

「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要

1. 目的

H26 年度の品種保護に向けたDNA品種識別技術確立事業におけるDNA品種識別技術の妥当性の検証事業（以下「本事業」という。）は、ホクト株式会社きこ総合研究所が作成した「SSRマーカーによるブナシメジのDNA品種識別マニュアル」について、一部の品種に対するマーカーと識別手法の一部の妥当性の検証を行うことを目的とする。

2. 事業内容

1) DNA品種識別手法における妥当性確認方法等の決定

ブナシメジの品種識別マニュアルに記載されているマーカーと識別手法の一部につき、平成19年度農業・食品産業競争力強化支援事業により独立行政法人種苗管理センターが作成した「DNA品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン」(<http://www.ncss.go.jp/main/DNA/DNAguideline.pdf>、以下「妥当性ガイドライン」という。)に基づいて一部の品種について妥当性の検討を行い、マーカーと識別手法の妥当性を検証する。

2) 妥当性検証試験・試験結果のとりまとめおよび技術の妥当性の検証

ブナシメジの品種識別について、妥当性検証試験を実施してその結果のとりまとめを行い、技術の妥当性について検証する。

3. 報告書の内容

本事業の報告書においては、下記の3項目に分けて報告する。

- 1) 「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要
- 2) DNA分析によるブナシメジの品種識別手法の妥当性確認方法の決定
- 3) 「DNA分析によるブナシメジ品種の識別手法」の妥当性確認試験

DNA分析によるバナシメジの 品種識別手法の妥当性確認方法の決定

1. 妥当性確認方法の概要

妥当性確認事業は、DNA鑑定学会の認証規則に基づいて実施した。すなわち、各工程における主な問題点を洗い出し、是正の参考となるように配慮して実施した。

1) 委員会の設置

本学会員で委員会を構成し、妥当性確認試験結果の検討・確認を行った。

2) 認証規則

平成21年度に当学会で設定し、その後漸次改訂した、「DNA 鑑定提供までのジョブフローと規則」（添付資料1）を、認証のガイドラインとした。

3) 実施内容

- (1) バナシメジの DNA 品種識別手法における妥当性確認方法の決定
- (2) バナシメジの DNA 品種識別における識別マーカーの妥当性確認試験

2. 実施形態

1) 委員会の設置

妥当性確認事業を当学会の認証規則に従って推進するにあたり、下記「表1 妥当性検討委員会の委員」に記載した委員からなる妥当性検討委員会を設置して、報告書の評価を行った。

表1 妥当性検討委員会の委員

役職	氏名	所属
委員長	矢野 博	(独)農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業センター
	久原 哲	九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門
	辻本 敦美	日本ソフトウェアマネジメント株式会社
	萩原 久	日本電気株式会社 第二官公ソリューション事業部
	橋谷田 真樹	関西医科大学 医学部 法医学講座
	正岡 哲治	(独)水産総合研究センター 増養殖研究所

2) 妥当性確認試験の手順

妥当性確認試験は、品種識別マニュアルに記載されている内容について検査を行い、マーカーおよび識別手法の妥当性を検証するものである。検証は以下の手順で実施した。

(1) 品種識別マニュアルの受入れ

依頼元にマニュアルの提示を求め、内容について検討を行い、適宜修正を求めると共に、マニュアル完成時の自己検査をどの程度実施したかを確認し、これによりマニュアルの信頼度をチェックした。

(2) サンプル収集

依頼元より、一部の品種の品種識別検査および品種内多型検査を実施するために必要な量の、基準DNAサンプルおよび検査用サンプルの提供を受けた。

(3) 検証機関の選定と検査の実施

品種識別の検査を実施する機関を決定した。妥当性を考慮し、また、依頼元の課題提案書に従って、複数機関として3機関を選定した。依頼元より提供されたサンプルをこれらの機関に配布し、検証機関毎に妥当性確認のための検査を実施した。

(4) 実施報告書の作成

各検査機関で実施した検査結果を当学会で集計・解析し、報告書原案を作成した。

3. 実施内容

1) 妥当性確認試験の受入れ

妥当性確認試験を受け入れる際に、以下の条件を設けて受入を実施した。

(1) 品種識別手順のマニュアル化

ブナシメジの品種識別マニュアルを提出してもらい、標準操作マニュアル(Standard Operation Procedure)として、妥当性確認試験の受入を実施した。目次や記載内容は、当学会の「DNA鑑定サービスまでのジョブフローと規則」(添付資料1)の「品種識別マニュアルの書き方」に準じた変更を要請した。

(2) マーカー開発元の最終的な自己検証

自己検証は、品種識別試験についてはマニュアル掲載の30品種を8種のマーカーで3回反復試験を行った結果、基準品種識別率は100%とのことであった。また、品種内多型については、基準品種の30株を用いて8種のマーカーで3回反復試験を行った結果、一律は100%とのことであった。

(3) サンプル収集

品種識別検査を実用的なものとするため、基準株サンプル、生産者株サンプルおよび品種内多型調査用サンプルの三種類を収集した。基準株サンプルはマニュアル作成元がDNA抽出を行い、これを基準DNAとして生産者株サンプルについて識別検査を実施した。また、同じ基準DNAを用いて、同一品種内における多型頻度の調査を行った。

(4) 検証機関の選定

品種識別の検査を実施する機関を決定した。信頼性を考慮して3機関を選定した。

① 検証機関選定の手順

機関数：ホクト株式会社きのこ総合研究所が農林水産省に提出した課題提案書に従い、3機関とした。

選定条件：ISO9001 または ISO17025 を取得している機関。

- ② 選定した検証機関：機関名および各機関の取得認証は、下記「表2 検証機関の一覧」の通りである。

表2 検証機関の一覧

項番	機関名	ISO 認証項目
1	株式会社 LSI メディエンス	● 食品検査センター：ISO9001 ● 臨床検査：ISO15189, ISO14001, CAP (米国臨床病理医協会) ● ドーピング検査：ISO17025, WADA (世界アンチドーピング機構)
2	ビジョンバイオ株式会社	ISO17025
3	株式会社ファスマック	ISO9001

(5) 検査の実施

収集した生産者サンプルに、検証機関にとってはブラインド・テストとなるように、DNA 鑑定学会にて新たにサンプル番号を付与した。それらのサンプルを各検証機関に送付して、検証実験を行った。同時に、品種内多型調査用サンプルも、各検証機関に送付して、検証実験を行った。

(6) 実施報告書

各機関で実施した検査結果のデータを DNA 鑑定学会に送付してもらい、それらを集計・解析して、報告書を作成した。

「DNA 分析によるブナシメジ品種の識別手法」の妥当性確認試験

1. 妥当性確認試験の受入れ

1) 検証依頼を受けた品種識別手順のマニュアル (添付資料2)

題名 : S S R マーカーによるブナシメジのDNA品種識別マニュアル

作成元 : ホクト株式会社きのこ総合研究所

2) サンプル収集

下記「表3 サンプル一覧表」記載の提供元より、ブナシメジの基準株サンプル 1 品種の DNA および生産者株サンプル 12 品種各 5 株、および品種内多型調査用サンプル 1 品種 30 株の凍結菌糸の分与を受けた。基準株サンプルの DNA は、ホクト株式会社きのこ総合研究所より、(500+2000)ng 毎に 3 分されて DNA 鑑定学会に送付された。この DNA を基準マーカーDNA として、生産者株サンプル 12 品種の品種識別マーカーの検証、および、基準株 1 品種の品種内多型調査を行った。生産者株サンプルおよび品種内多型調査用サンプルは、いずれもホクト株式会社きのこ総合研究所より、チューブ入りの菌糸を冷凍した状態で、DNA 鑑定学会に送付された。

表3 サンプル一覧表

植物種類	種類別	品種名	試料形態	量	入手先
ブナシメジ	基準株	ホクト白1号菌	DNA	2,500ng×3検証機関	ホクト株式会社 きのこ総合研究所
	生産者株サンプル (品種識別用)	ホクト白1号菌	凍結菌糸	各5株×3検証機関	
		MH025066			
		MH025012			
		MH025064			
		MH025286			
		MH025288			
		MH025362			
		MH025369			
		MH025397			
		MH025462			
		MH025463			
		MH025528			
	基準株サンプル (多型調査用)	ホクト白1号菌	凍結菌糸	30株×3検証機関	

2. 検証の形態

検証は、下記の物品を検証機関へ配布して実施した。

1) サンプル

(1) 配布内容

3 機関各々に、下記のサンプルを配布した。

- ① ブナシメジの基準株 DNA 溶液 1 種
(基準マーカーDNA 各 2 チューブ
 $5\text{ng}/\mu\text{L} \times 100\mu\text{L}$ / チューブ、 $20\text{ng}/\mu\text{L} \times 100\mu\text{L}$ / チューブ)
- ② 品種識別用のブナシメジの冷凍菌糸 60 株
(生産者株サンプル 12 品種の冷凍菌糸 各 5 株)
- ③ 品種内多型調査用のブナシメジの冷凍菌糸 30 株
(基準株のホクト白 1 号の冷凍菌糸)

(2) 配布方法

① 基準マーカーDNA

ホクト株式会社きこの総合研究所から DNA 鑑定学会に送付された 1 品種(ホクト白 1 号)の DNA 水溶液を、3 箇所の検証機関の全てに、各 2 チューブ ($5\text{ng}/\mu\text{L} \times 100\mu\text{L}$ / チューブ 1 本、 $20\text{ng}/\mu\text{L} \times 100\mu\text{L}$ / チューブ 1 本) ずつ送付した。

② 品種識別用の生産者株のサンプル

ホクト株式会社きこの総合研究所から、12 品種の生産者株の菌糸サンプルが 5 株ずつ計 60 株、冷凍で DNA 鑑定学会に送付された。サンプルは株ごとに三分されて 3 本のエッペンドルフチューブに入れられており、この結果、60 株 $\times$ 3 組 = 180 本のエッペンドルフチューブ入り菌糸サンプルが、冷凍された状態で DNA 鑑定学会に届けられた。

品種識別検査をブラインドで行うため、DNA 鑑定学会において、これらの冷凍菌糸の株ごとにランダムにサンプル番号をふり直した。学会で新たに付与したサンプル番号は下記の「表 4 品種識別用サンプル番号対応表」の通りである。この結果、ホクト株式会社きこの総合研究所から送付された品種検査用サンプル三組は、DNA 鑑定学会への到着時点とは異なるサンプル番号を持つこととなった。これら三組の各々を、3 箇所の検証機関へ冷凍で送付した。

多型調査用の株のサンプルについては、ホクト株式会社きこの総合研究所から 1 品種(ホクト白 1 号菌)の多型調査用株のサンプルが、株ごとに菌糸をエッペンドルフチューブに入れた状態で、3 組、冷凍で DNA 鑑定学会に送付された。DNA 鑑定学会において、各組の冷凍菌糸に 1~30 の番号をふり、同一構成の検査用サンプル 3 組を作成して、各組を 3 箇所の検証機関へ冷凍で送付した。

表 4 品種識別用サンプル番号対応表

品種	サンプル数	サンプル番号	品種	サンプル数	サンプル番号
ホクト白1号菌	5	52	MH025362	5	28
		35			56
		12			5
		15			13
		22			51
MH025066	5	17	MH025369	5	21
		8			1
		55			49
		23			43
		27			4
MH025012	5	47	MH025397	5	60
		19			37
		39			33
		29			7
		20			30
MH025064	5	31	MH025462	5	59
		34			46
		25			2
		11			18
		58			10
MH025286	5	45	MH025463	5	48
		42			32
		9			14
		50			44
		16			53
MH025288	5	3	MH025528	5	6
		54			57
		41			26
		38			36
		24			40

2) 「SSR マーカーによる冷凍ブナシメジの DNA 品種識別マニュアル」 (添付資料2)

提供元 : ホクト株式会社きのこ総合研究所

作成機関 : ホクト株式会社きのこ総合研究所

メール添付にて各検証機関に送付した。

3) ブナシメジの検査項目

各検証機関に配布した検査項目表を改変して表 5 に示した。

表 5 検査項目（1 検証機関当り）

種類別	品種名	形態	量	実験	実験数
				繰り返し数	
基準品種	ホクト白1号菌	DNA	2,500ng	依頼元が提供	
マーカーの塩基配列	マーカー数:8種	配列情報	配列情報		
生産者株	12品種	凍結菌糸	5株／品種	2回	120
品種内多型調査株	ホクト白1号菌	凍結菌糸	30株	1回	30

仕様書は DNA 鑑定学会で作成し、メール添付にて各検証機関に送付した。

4) ブナシメジ検査結果票

検証機関が検査結果を記入する表として、DNA 鑑定学会で作成し、メール添付にて各検証機関に送付した。

2. 検査と結果

1) 検査内容

品種識別マニュアル中の表 2 に記載されている確マーカーのターゲットサイズと同マニュアルの付属文書 2. に記載されている各マーカーのフラグメント長をもとに、DNA 鑑定学会で数値でのサイズ表を作成し直した（表 6 品種識別マーカー）。これをもとに、「表 5 検査項目（1 検証機関当り）」に従って検査を実施した。この検査手法は、キャピラリーシーケンサーを用いる電気泳動において、基準品種のマーカー DNA 断片とサンプルの DNA 断片を比較し、サイズの異同を判断してマーカータイプを決定し、それらと品種毎のマーカータイプの比較を行って品種を識別するものである。

表6 品種識別マーカー

品種名	マーカー							
	msHm-1	msHm-2	msHm-3	msHm-4	msHm-5	msHm-6	msHm-7	msHm-8
ホクト白1号菌	133	67/79	145	155	269	130	132	243
MH025014	133	67/87	139/145	161	290	134	92	220
MH025016	115/133	67	127/139	149	281	130	132	220
MH025019	133	67/79	127/145	149	284	138	92/132	220
MH025022	133	67	127/139	161	284	130/138	92/132	220
MH025066	115/133	67/79	139	155	269/284	130/134	92	243
MH025081	133	67/79	127	149	284	130	92/132	220
MH025146	133	67	145	149	269/284	134	132	207
MH025217	115/133	67/79	145	155	269/284	130	132	243
MH025374	115/133	67/79	145	155	269	130	72	243
MH025038	121	67	119/137	161	278/293	134	87	220
MH025045	115	67/71	133/145	155/161	293	130	97	215
MH025046	115/127	59/71	139	149	281	134	92	220/243
MH025054	127	71	127	155	278	126	92	220
MH025070	127/145	71	139	143	278	130	92	207
MH025092	115	67/75	145	149/161	284	134/138	87	220
MH025097	115	67	127/139	161	265/269	134/148	77	209
MH025121	115/127	63	127	167	265/284	130	72	223
MH025160	115/127	63/75	127	167	281	122	84	291
MH025339	115/121	67/71	133	173	284	126/134	92	220
MH025012	115/133	67/79	139	155	269/284	130/134	92	243
MH025064	115/121	67	127/139	155	265/269	134	72	207
MH025286	133	67/79	127/139	155	269/293	130/134	72	243
MH025288	121/133	67	127	149	265/284	142	92	220
MH025362	115/121	67/79	139	161	269	134	72	247
MH025369	115/121	67/71	139	161	269/281	134	72	217/247
MH025397	115	63/79	145	149	269/284	130	72/132	243
MH025462	121	67/71	127/139	161	269	130/134	72	217
MH025463	121	71/79	139	155	269/293	134	72	247
MH025528	133	67/79	139	155	269/284	130/134	92	243

3) ブナシメジの検査結果

検証機関によるブナシメジの検査結果を DNA 鑑定学会が回収し、サンプルのブラインド化情報と突き合わせて、正答率を求めた。

(1) 品種識別結果

詳細なデータは、添付資料3「ブナシメジの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種識別検査）」参照のこと。

① ホクト白1号菌の識別

検査依頼を受けたマニュアルは、ホクト白1号菌とそれ以外の品種を識別することを目的としている。そこでまずこの目的に沿った各検証機関の品種名の

回答状況を、下記の表 7 に示した。

表 7 品種名回答の分類（ホクト白一号菌か否かの識別）

		回答数			
		B社	F社	L社	全体
回答数	正答数	120	120	120	360
	誤答数	0	0	0	0
	未答数	0	0	0	0
	合計	120	120	120	360
正解率		100%	100%	100%	100%

各検証機関とも、回答率、正答率ともに 100%であった。この結果、提供されたマニュアルに従って検査を行うことにより、今回提供された 12 品種については、ホクト白 1 号菌かそうでないかを正しく識別することができていた。

② 12 品種間相互の識別

提供されたマニュアルの付属文書 2. 「8 種類の SSR マーカーによる 30 種類のフラグメント長」によれば、今回提供された 12 品種のうち MH025066 と MH025012 は、8 種類のマーカーすべてのフラグメントの数とサイズが完全に同一である。このため、今回のサンプルとしては、ホクトきのこ研究所からは、これら 2 品種はそれぞれの品種名で提供されたが、マニュアルに従った検査では、両者は区別が不可能である。そこで、これら 2 種のサンプル計 10 検体については、MH025066 と MH025012 の両者の同時回答を正解とし、検査全数に対する正答率を品種ごとに集計した結果を、下記の表 8 に示した。

表 8 品種別の品種名正解状況

品種	検査数			回答数		未答数	全体	回答率		未答率	全体
	機関毎検体数	機関毎検査回数	全体検査数	正答数	誤答数			正答率	誤答率		
ホクト白1号菌	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025066 MH025012	10	2	20	20	0	0	20	100%	0%	0%	100%
MH025064	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025286	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025288	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025362	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025369	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025397	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025462	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025463	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
MH025528	5	2	10	10	0	0	10	100%	0%	0%	100%
全体	60	各2	120	120	0	0	120	100%	0%	0%	100%

検証機関から返送された品種識別結果を見ると、該当するサンプルの品種としては、MH025066 と MH025012 が併記されていたため、これを正解とした。

これらを含めた品種名の回答は、すべての検証機関において、60 サンプルのすべての品種が正解であった。（詳細なデータは、添付資料4「品種判定結果一覧」参照のこと。

上記の結果より、提供されたマニュアルは、ホクト白 1 号菌を含む 11 種類の品種（ただしうち 1 種類は 2 品種に当て嵌まる）を、すべて相互に識別することができるといえる。

続いて、マーカー毎の集計を行った。今回検証したマニュアルでは 8 種類の品種識別マーカーを用いており、各マーカーはそれぞれ、2 本または 1 本のフラグメントとそのサイズを識別基準としている。したがって、マーカー毎に、フラグメント本数の正誤およびサイズの正誤の両方について判定が必要である。

まず、総検査数を下記の表 9 で算出したところ、検証機関毎に 1,920 回ずつの判断が必要であった。

表 9 機関毎のマーカーフラグメントの総検査数

検査機関	マーカー数	マーカー毎 検査フラグメント数	検体数	検体毎 検査回数	総検査数
B社	8	2	60	2	1920
F社	8	2	60	2	1920
L社	8	2	60	2	1920
全体	24	6	180	6	5760

これらの数にもとづき、各サンプルについて、マーカーのうちどれだけが正解品種のマーカーと、フラグメント数、サイズともに一致したかを、正解品種毎に集計した。これに際して、上述した 8 種類のマーカーが全て同一である MH025066 と MH025012 については、サンプル提供元のホクトきのこ研究所からはそれぞれ別の品種としてサンプルが提供されているため、これら 2 種類を分けて集計した。また、フラグメントサイズは機器ごとのばらつき等により多少の誤差が生じることを鑑み、サイズを±1 以内、±2 以内、±3 以内と許容範囲を拡げて正解とし、別々に集計を行った。この結果を示したのが、下記の「表 10 許容範囲別の品種毎のマーカー一致率」である。

表 1 O 品種毎のマーカ一致率

A. 許容範囲± 1

正解品種名	最大 フラグメント数	フラグメント一致数					フラグメント一致率				
		B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均	B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均
ホクト白1号菌	16	12	13.8	7.9	11.2	11.2	75.0%	86.3%	49.4%	70.2%	70.2%
MH025066	16	11	11	7.1	9.7	9.7	68.8%	68.8%	44.4%	60.6%	60.6%
MH025012	16	11	12.8	7	10.3	10.3	68.8%	80.0%	43.8%	64.2%	64.2%
MH025064	16	10	12	7.3	9.8	9.8	62.5%	75.0%	45.6%	61.0%	61.0%
MH025286	16	12	13.6	7.8	11.1	11.1	75.0%	85.0%	48.8%	69.6%	69.6%
MH025288	16	11	10.8	8.9	10.2	10.2	68.8%	67.5%	55.6%	64.0%	64.0%
MH025362	16	10	13	8.3	10.4	10.4	62.5%	81.3%	51.9%	65.2%	65.2%
MH025369	16	10.3	12.1	7.4	9.9	9.9	64.4%	75.6%	46.3%	62.1%	62.1%
MH025397	16	11	12.5	8.2	10.6	10.6	68.8%	78.1%	51.3%	66.0%	66.0%
MH025462	16	9	13	6.5	9.5	9.5	56.3%	81.3%	40.6%	59.4%	59.4%
MH025463	16	11	13.2	9.4	11.2	11.2	68.8%	82.5%	58.8%	70.0%	70.0%
MH025528	16	10.8	14.5	7.8	11.0	11.0	67.5%	90.6%	48.8%	69.0%	69.0%
平均	16	10.8	12.7	7.8	10.4	10.4	67.2%	79.3%	48.8%	65.1%	65.1%

B. 許容範囲± 2

正解品種名	最大 フラグメント数	フラグメント一致数					フラグメント一致率				
		B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均	B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均
ホクト白1号菌	16	12.0	13.8	13.0	12.9	12.9	75.0%	86.3%	81.3%	80.8%	80.8%
MH025066	16	12.0	12.5	14.1	12.9	12.9	75.0%	78.1%	88.1%	80.4%	80.4%
MH025012	16	12.0	14.4	14.2	13.5	13.5	75.0%	90.0%	88.8%	84.6%	84.6%
MH025064	16	12.0	13.7	14.7	13.5	13.5	75.0%	85.6%	91.9%	84.2%	84.2%
MH025286	16	12.0	14.6	14.9	13.8	13.8	75.0%	91.3%	93.1%	86.5%	86.5%
MH025288	16	12.0	11.8	12.9	12.2	12.2	75.0%	73.8%	80.6%	76.5%	76.5%
MH025362	16	12.0	14.7	14.0	13.6	13.6	75.0%	91.9%	87.5%	84.8%	84.8%
MH025369	16	12.4	14.0	13.4	13.3	13.3	77.5%	87.5%	83.8%	82.9%	82.9%
MH025397	16	12.0	14.2	12.6	12.9	12.9	75.0%	88.8%	78.8%	80.8%	80.8%
MH025462	16	10.0	14.0	12.5	12.2	12.2	62.5%	87.5%	78.1%	76.0%	76.0%
MH025463	16	12.0	14.2	14.5	13.6	13.6	75.0%	88.8%	90.6%	84.8%	84.8%
MH025528	16	10.8	15.3	14.5	13.5	13.5	67.5%	95.6%	90.6%	84.6%	84.6%
平均	16	11.8	13.9	13.8	13.2	13.2	73.5%	87.1%	86.1%	82.2%	82.2%

C. 許容範囲± 3

正解品種名	最大 フラグメント数	フラグメント一致数					フラグメント一致率				
		B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均	B社	F社	L社	検査毎 平均	サンプル毎 平均
ホクト白1号菌	16	12.0	13.8	14.0	13.3	13.3	75.0%	86.3%	87.5%	82.9%	82.9%
MH025066	16	12.0	13.0	15.0	13.3	13.3	75.0%	81.3%	93.8%	83.3%	83.3%
MH025012	16	12.0	14.5	15.0	13.8	13.8	75.0%	90.6%	93.8%	86.5%	86.5%
MH025064	16	12.0	13.7	15.0	13.6	13.6	75.0%	85.6%	93.8%	84.8%	84.8%
MH025286	16	12.0	15.3	15.0	14.1	14.1	75.0%	95.6%	93.8%	88.1%	88.1%
MH025288	16	12.0	12.1	14.9	13.0	13.0	75.0%	75.6%	93.1%	81.3%	81.3%
MH025362	16	12.0	14.7	15.0	13.9	13.9	75.0%	91.9%	93.8%	86.9%	86.9%
MH025369	16	12.4	14.3	15.0	13.9	13.9	77.5%	89.4%	93.8%	86.9%	86.9%
MH025397	16	12.0	14.2	13.9	13.4	13.4	75.0%	88.8%	86.9%	83.5%	83.5%
MH025462	16	10.0	14.0	13.0	12.3	12.3	62.5%	87.5%	81.3%	77.1%	77.1%
MH025463	16	12.0	14.2	15.0	13.7	13.7	75.0%	88.8%	93.8%	85.8%	85.8%
MH025528	16	10.8	15.3	15.0	13.7	13.7	67.5%	95.6%	93.8%	85.6%	85.6%
平均	16	11.8	14.1	14.7	13.5	13.5	73.5%	88.1%	91.6%	84.4%	84.4%

全体を平均してのフラグメントサイズ一致率は、許容正解の許容範囲を± 1にとると 65.1%、± 2にとると 82.2%、± 3にとると 84.4%となり、品種毎・検証機関毎にばらつきが見られた。

品種毎のフラグメントサイズ一致率は、正解の許容範囲正解の許容範囲を± 1にとると 59.4～70.2%、± 2にとると 76.0～84.8%、± 3にとると 77.1～86.9%であった。

また、検証機関毎のフラグメントサイズ一致率は、正解の許容範囲を± 1にとると 48.8～79.3%、正解の許容範囲を± 2にとると 73.5～87.1%、正解の許容範囲を± 3にとると 73.5～91.6%であった。

全体結果の一覧は添付資料 5「品種毎のマーカー一致率の詳細」を参照のこと。

当然のことながら、正解の許容範囲を狭く設定するほどフラグメントサイズの一致率は低くなり、50%を割る値もみられたが、許容範囲を広げると、70%代半ば以上の一致率が認められた。この数値は特に高い値ではなく、より精度の高い結果を得られるようなマーカーとマニュアルの改良が望まれる。しかし、品種名による識別結果が全機関全問正解であったことと考えあわせると、今回検証に用いた 11 種類 12 品種の識別には問題なく使用できるマーカーと考えられる。

また、これらの表から、品種毎に正解の許容範囲の変化に伴うマーカー一致率の

変化をグラフにしてみると、下記の図1のようになり、全体として、正解の許容範囲を拡げるとマーカー一致率が高くなる傾向が見られた。

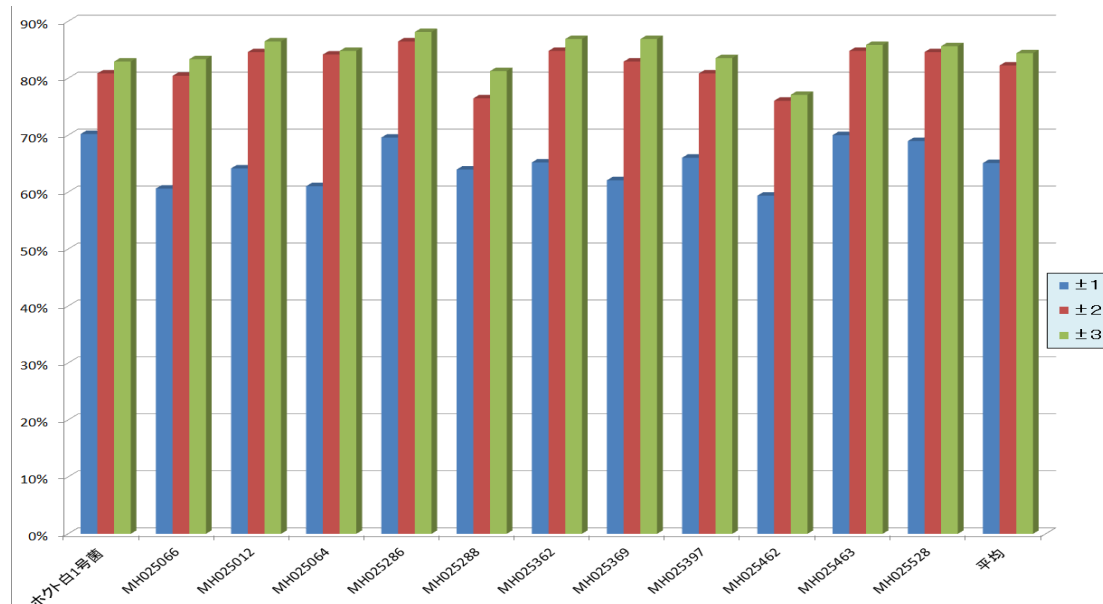
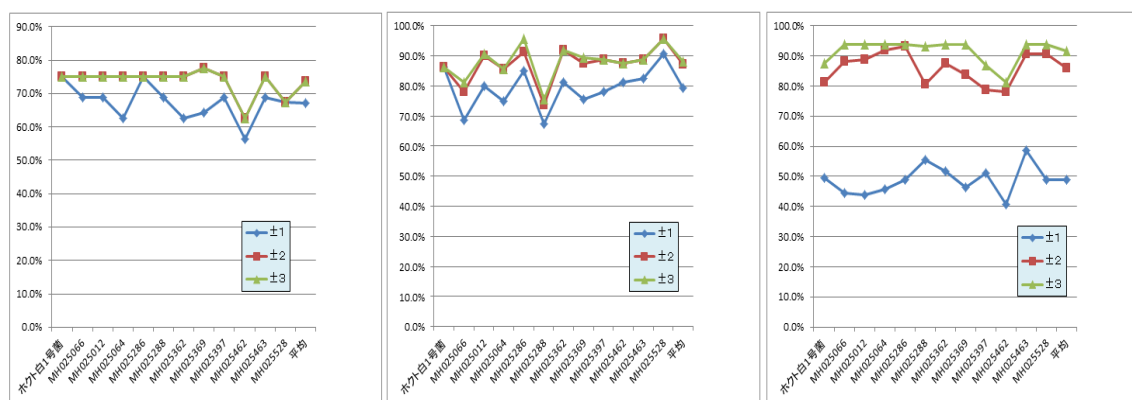


図1 正解の許容範囲と品種毎のマーカー一致率

さらに、検証機関毎に正解の許容範囲の相違に伴うマーカー一致率の相違をグラフにしてみると、下記の図2のようになり、全体として、正解の許容範囲を拡げるとマーカー一致率が高くなる傾向が見られた。

また、品種によってフラグメントサイズの一致率に違いが見られたが、検証機関毎に一致率の低い品種は異なり、一定の傾向は見られなかった。



B 社

F 社

L 社

図2 検証機関毎の正解の許容範囲とマーカー一致率の関係次に、各サンプルのマーカーフラグメントのうちどれだけが正解品種のマーカータイプと一致したかを

一致数と一致率で算出し、フラグメント毎に集計したのが、下記の表 1 1 である。また、提供されたマニュアルでは、各マーカーは 2 本または 1 本のため、それらをマーカー毎に合わせて、マーカーとしてのフラグメントの一致状況を集計したのが続く表 1 2 である。

表 1 1 マーカーフラグメント毎の一致状況

A. フラグメント一致数

許容範囲	検査 フラグメント数	機関	マーカー															
			msHm-1		msHm-2		msHm-3		msHm-4		msHm-5		msHm-6		msHm-7		msHm-8	
±1	120	B社	14	44	60	60	60	60	60	54	60	60	54	60	6	50	56	60
		F社	28	35	59	51	56	52	53	48	56	47	54	41	5	44	45	55
		L社	0	26	7	10	16	46	0	54	3	56	0	32	59	50	38	60
		全体	14.0	35.0	42.0	40.3	44.0	52.7	37.7	52.0	39.7	54.3	36.0	44.3	23.3	48.0	46.3	58.3
±2		B社	60	60	60	60	60	60	60	54	60	60	54	60	60	50	56	60
		F社	58	35	59	51	56	52	53	48	56	47	54	41	46	44	45	55
		L社	37	54	60	60	41	57	0	54	60	60	49	60	60	50	56	60
		全体	51.7	49.7	59.7	57.0	52.3	56.3	37.7	52.0	58.7	55.7	52.3	53.7	55.3	48.0	52.3	58.3
±3		B社	60	60	60	60	60	60	60	54	60	60	54	60	60	50	56	60
		F社	58	35	59	51	56	52	53	48	56	51	54	45	46	44	49	55
		L社	60	60	60	60	56	60	7	54	60	60	53	60	60	50	56	60
		全体	59.3	51.7	59.7	57.0	57.3	57.3	40.0	52.0	58.7	57.0	53.7	55.0	55.3	48.0	53.7	58.3

B. フラグメント一致率

許容範囲	検査 フラグメント数	機関	マーカー															
			msHm-1		msHm-2		msHm-3		msHm-4		msHm-5		msHm-6		msHm-7		msHm-8	
±1	120	B社	11.7%	36.7%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	5.0%	41.7%	46.7%	50.0%
		F社	23.3%	29.2%	49.2%	42.5%	46.7%	43.3%	44.2%	40.0%	46.7%	39.2%	45.0%	34.2%	4.2%	36.7%	37.5%	45.8%
		L社	0.0%	21.7%	5.8%	8.3%	13.3%	38.3%	0.0%	45.0%	2.5%	46.7%	0.0%	26.7%	49.2%	41.7%	31.7%	50.0%
		全体	11.7%	29.2%	35.0%	33.6%	36.7%	43.9%	31.4%	43.3%	33.1%	45.3%	30.0%	36.9%	19.4%	40.0%	38.6%	48.6%
±2		B社	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	50.0%	41.7%	46.7%	50.0%
		F社	48.3%	29.2%	49.2%	42.5%	46.7%	43.3%	44.2%	40.0%	46.7%	39.2%	45.0%	34.2%	38.3%	36.7%	37.5%	45.8%
		L社	30.8%	45.0%	50.0%	50.0%	34.2%	47.5%	0.0%	45.0%	50.0%	50.0%	40.8%	50.0%	50.0%	41.7%	46.7%	50.0%
		全体	43.1%	41.4%	49.7%	47.5%	43.6%	46.9%	31.4%	43.3%	48.9%	46.4%	43.6%	44.7%	46.1%	40.0%	43.6%	48.6%
±3		B社	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	50.0%	45.0%	50.0%	50.0%	41.7%	46.7%	50.0%
		F社	48.3%	29.2%	49.2%	42.5%	46.7%	43.3%	44.2%	40.0%	46.7%	42.5%	45.0%	37.5%	38.3%	36.7%	40.8%	45.8%
		L社	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	46.7%	50.0%	5.8%	45.0%	50.0%	50.0%	44.2%	50.0%	50.0%	41.7%	46.7%	50.0%
		全体	49.4%	43.1%	49.7%	47.5%	47.8%	47.8%	33.3%	43.3%	48.9%	47.5%	44.7%	45.8%	46.1%	40.0%	44.7%	48.6%

表 1 2 マーカー毎の一致状況

A. マーカー一致数

許容範囲	検査 フラグメント数	機関	マーカー								
			msHm-1	msHm-2	msHm-3	msHm-4	msHm-5	msHm-6	msHm-7	msHm-8	平均
±1	120	B社	58	120	120	114	120	114	56	116	102.3
		F社	63	110	108	101	103	95	49	100	91.1
		L社	26	17	62	54	59	32	109	98	57.1
		全体	49.0	82.3	96.7	89.7	94.0	80.3	71.3	104.7	83.5
±2		B社	120	120	120	114	120	114	110	116	116.8
		F社	93	110	108	101	103	95	90	100	100.0
		L社	91	120	98	54	120	109	110	116	102.3
		全体	101.3	116.7	108.7	89.7	114.3	106.0	103.3	110.7	106.3
±3		B社	120	120	120	114	120	114	110	116	116.8
		F社	93	110	108	101	107	99	90	104	101.5
		L社	120	120	116	61	120	113	110	116	109.5
		全体	111.0	116.7	114.7	92.0	115.7	108.7	103.3	112.0	109.3

B. マーカー一致率

許容範囲	検査 フラグメント数	機関	マーカー								
			msHm-1	msHm-2	msHm-3	msHm-4	msHm-5	msHm-6	msHm-7	msHm-8	平均
±1	120	B社	24%	50%	50%	48%	50%	48%	23%	48%	42.6%
		F社	26%	46%	45%	42%	43%	40%	20%	42%	38.0%
		L社	11%	7%	26%	23%	25%	13%	45%	41%	23.8%
		全体	20.4%	34.3%	40.3%	37.4%	39.2%	33.5%	29.7%	43.6%	34.8%
±2		B社	50%	50%	50%	48%	50%	48%	46%	48%	48.6%
		F社	39%	46%	45%	42%	43%	40%	38%	42%	41.7%
		L社	38%	50%	41%	23%	50%	45%	46%	48%	42.6%
		全体	42.2%	48.6%	45.3%	37.4%	47.6%	44.2%	43.1%	46.1%	44.3%
±3		B社	50%	50%	50%	48%	50%	48%	46%	48%	48.6%
		F社	39%	46%	45%	42%	45%	41%	38%	43%	42.3%
		L社	50%	50%	48%	25%	50%	47%	46%	48%	45.6%
		全体	46.3%	48.6%	47.8%	38.3%	48.2%	45.3%	43.1%	46.7%	45.5%

全体としてのマーカー一致率は、正解の許容範囲を±1にとると 34.8%、±2に

とると 42.6%、± 3にとると 45.5%であり、高いとは言えない。マーカー毎の一致率は、正解の許容範囲を± 1にとると 20.4~43.6%、± 2にとると 37.4~48.6%、± 3にとると 38.3~48.6%となり、マーカー毎にばらついた。なお、正解の許容範囲を± 3まで広げても、一致率が 100%となるマーカーは、どこの検証機関でも見られず、中には一致率が最高で 40%に満たないマーカーもあった。検査の再現性に疑問が生じる危険性を避けるためには、マーカーやマニュアルに改良の余地があると考えられる。

個々のマーカーの一致率が高くないにもかかわらず、品種識別の成績が良かったのは、今回検証に用いた品種のマーカーサイズやパターンが相互に大きく異なり、多少のサイズの逸脱があっても全体のパターンとして精度よく品種を判定できるシステムになっているように思われる。

三検証機関のデータを比較すると、検証機関毎にマーカー一致率が大きく異なり、その原因はマーカーパターンを正確に検出・識別する能力や、マーカーの一致率が低くても、全体の傾向などから品種を判定する経験値の違いによるものと同時に、提供されたマニュアルに記載されているマーカーのタイプやサイズの正確さにも問題があると思われる。

例えば、基準品種としているホクト白 1 号菌の msHm-7 のマーカーは、提供されたマニュアルによればフラグメントは 1 本となっている。しかし、検査結果を見ると、3 か所の検証機関すべてにおいて、70 ベース程の鎖長付近にもう一本のフラグメントが検出されている。このように、フラグメントサイズの多少の誤差よりも検査結果の精度に及ぼす影響が大きいと思われる、フラグメント数が異なるという現象が見られることは、提供されたマニュアルからは、検査結果に大きな影響を与える可能性のある要素が排除されていないことを示すため、十分な検討・改良が必要と思われる。

(2) 品種内多型調査の結果

品種内多型調査のための検査は、ホクト白 1 号菌 1 品種のみにつき、30 株を用いて行った。ホクト株式会社きのこ総合研究所から、1.5ml のエッペンドルフチューブに入れた冷凍のホクト白 1 号菌が、DNA 鑑定学会宛てに配送された。1 番から 30 番までの番号が記載されたチューブが番号毎に 3 本ずつ用意されていた。これらを 1 番から 30 番までの続き番号のチューブを各 1 本ずつ含む 30 本単位のグループ 3 組に分け、それぞれのグループを、3 箇所の検証機関に配布し、検査を行った。

詳細なデータは、「添付資料 6 ブナシメジの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種内多型調査）」参照のこと。

正解の許容範囲別に、各検証機関の検査結果のフラグメントの一致数と一致率のまとめを下記の表 1 3 に示した。

表 1 3 ホクト白 1 号菌の品種内多型検査のマーカーフラグメント一致状況

許容範囲	合計 フラグメント 数	一致フラグメント数				一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
±1	16	15.0	15.0	7.3	12.4	93.8%	93.5%	45.8%	77.7%
±2	16	15.0	15.0	12.8	14.3	93.8%	93.5%	80.0%	89.1%
±3	16	15.0	15.0	14.0	14.7	93.8%	93.8%	87.5%	91.7%

全体として、マーカー一致率は正解の許容範囲として±1をとると 77.1%、±2をとると 89.1%、±3をとると 91.7%と、許容範囲を拡げるに従ってかなり高い値となった。検証機関毎に結果を見ると、大多数のサンプルでマーカーフラグメントの一致数および一致率が同じ数値になっていることから、これらの 30 組のサンプル集団の中で多型が見られているとは考えにくいと思われる。

サンプル毎のマーカーフラグメントの一致数および一致率の詳細なデータは、「添付資料 7 許容範囲毎の品種内多型検査結果」参照のこと。

次に、マーカーフラグメント毎、およびマーカー毎の一致率を図 3 に示した。これを見ると、フラグメントサイズの違いの許容範囲を±3まで拡げれば、ほとんどのフラグメントが基準品種のサイズと一致することがわかる。しかし、前項で記述した msHm-7 のマーカーについては、全ての検証機関ですべてのサンプルに 2 本のフラグメントが検出されているため、マニュアルでは検出されないと記述されている右側のフラグメントの一致率がゼロになっている。そしてこの結果、マーカー単位

で見た一致率も、msHm-7 では 50%程度に留まっている。

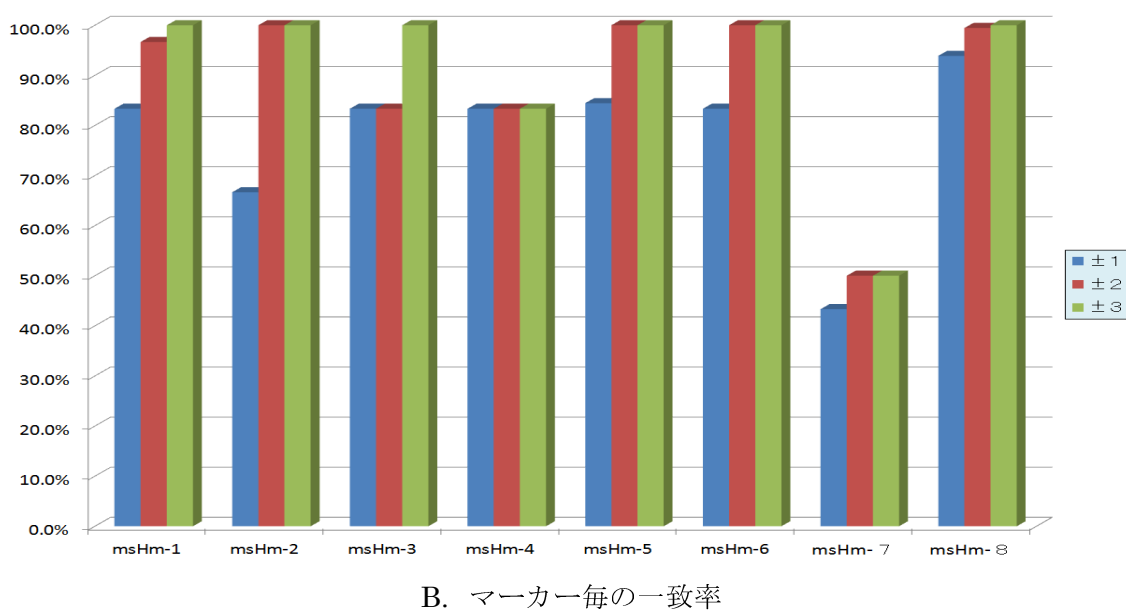
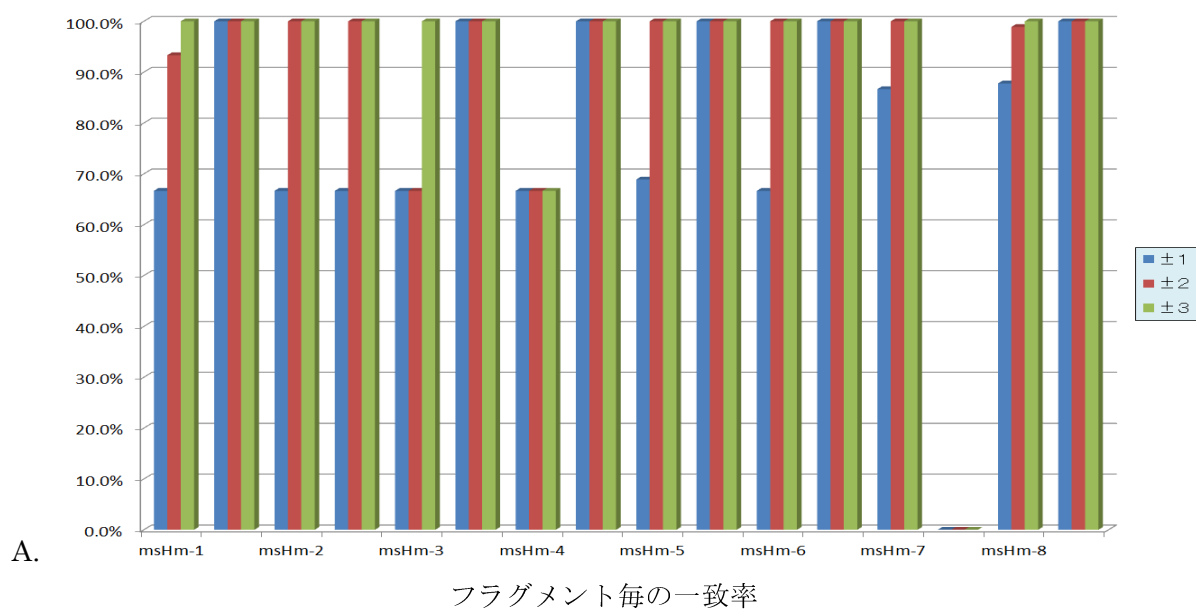


図3 品種内多型調査におけるフラグメント毎の一致率

これらの結果から、今回提供されたブナシメジの品種識別マーカーは、今回の基準品種であるホクト白1号菌の品種内多型の検出に用いるには不十分なものであると考えられ、検討・改良が必要と思われる。

4. 「SSR マーカーによる冷凍ブナシメジの DNA 品種識別マニュアル」評価

上記の結果により、「SSR マーカーによるブナシメジの DNA 品種識別マニュアル」の評価は、下記の以下の表 1 4 の通りである。

表 1 4 「SSR マーカーによるブナシメジの DNA 品種識別マニュアル」の評価

マニュアル	提供されたマニュアルによる品種名の認証率は、ホクト白 1 号菌、MH025066/MH025012、MH025064、MH025286、MH025288、MH025362、MH025369、MH025397、MH025462、MH025463、MH025528 の 11 種類 12 品種の品種識別においては、すべての検証機関において 100%であった。 したがって、提供されたマニュアルは、ホクト白 1 号菌とそれ以外の 10 種類 11 品種の識別、および、ホクト白 1 号菌を含む 11 種類 12 品種の相互間での識別を、高い信頼性を持って行えるマニュアルであると言える。 しかしながら、三検証機関のデータを比較すると、検証機関毎にマーカー一致率が大きく異なっており、その一つの原因は、マーカーパターンを正確に検出・識別する能力や、マーカーの一致率が低くても、全体の傾向などから品種を判定する経験値の違いによるものと思われる。このため、初めての実験者でも高いマーカー一致率が得られ、その結果として精度の高い安定的な品種識別を行えるよう、更なるマニュアルの改良を検討することが望ましい。
マーカー	提示されたマーカー毎の認証率は、全体に 50%以下の低い数値であった。一方で、品種毎にみたマーカーの認証率は、おおよそ 60～85%程度の間でばらついた。こちらは低い数値とは言えない。このことから、今回検証に用いた品種間のマーカーサイズのパターンは相互に大きく異なり、パターン全体から品種識別をしやすいシステムになっていると考えられる。 マーカーの正確なサイズは、使用する機器や実験技術者個人の力量によっても変わる可能性があるため、本システムのように、厳密なマーカーサイズ測定結果でなくとも誤りなく品種識別ができるシステムは、判定の精度を高く保つ良い方法と思われる。 しかし、マーカーサイズの一致率が高くないことは、特に未経験者がマニュアルに従って得た実験結果のフラグメントサイズのセットから正解品種を導き出す際には、誤った判定の原因になりうるため、マーカーとして用いるフラグメントのサイズについては、十分な再検討を要すると考えられる。 例えば、基準品種としているホクト白 1 号菌の msHm-7 のマーカーは、提供されたマニュアルによればフラグメントは 1 本となっている。しかし、検査結果を見ると、3 か所の検証機関すべてにおいて、70 ベース程の鎖長

	付近にもう一本のフラグメントが検出されている。このように、フラグメントサイズの多少の誤差よりも検査結果の精度に及ぼす影響が大きいと思われる、フラグメント数が異なるという現象が見られることは、提供されたマニュアルからは、検査結果に大きな影響を与える可能性のある要素が排除されていないことを示すため、十分な検討・改良が必要と思われる。
妥当性 総合評価	今回の検証に用いた 12 品種のブナシメジの品種識別を行った場合の認証率は 100% で、品種識別結果は精度が高い。 マーカーは、マニュアルと全検証機関との検査結果が異なるものも含まれており、慎重な再検討が必要である。

以上