

**DNA品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン**  
**— SSRを中心として —**

平成20年3月

独立行政法人 種苗管理センター

## 目次

	頁
はじめに	
第1章：妥当性確認の定義と適用範囲	2
1. 妥当性確認の定義	
2. 妥当性確認の適用範囲	
第2章：妥当性確認の手順と確認事項	4
1. 開発技術確認事項	
2. 試験室間共同試験	
第3章：DNA 分析手順を変更する際の妥当性確認	12
第4章：予備試験	13
1. 予備試験における確認事項	
第5章：注意事項	14
1. 作業エリア	
2. サンプルの磨砕	
3. DNA 濃度及び純度の確認	
4. PCR について	
5. コンタミネーション防止	
付属参考1 参考資料と考察	15
1. 妥当性確認のガイドライン作成の現状	
2. 法医学分野における妥当性確認のガイドラインの特徴	
3. 試験室間共同試験における試験室数について	
4. 分析結果の証拠能力について	
付属参考2 ガイドラインの適用例（おうとう）	18
1. 予備試験	
2. 開発技術確認事項	
3. 試験室間共同試験	
4. 各試験室から提出されたデータ及び報告	
付属参考3 資料等	27
1. 資料	
資料1 マーカーの独立性について	

資料 2 マーカー領域に Null 対立遺伝子がほぼ無いことの確認  
資料 3 フラグメントサイズの表示形式と誤差の範囲  
資料 4 - 1 資料 3 における表示形式の適用例  
資料 4 - 2 資料 3 の表示形式ではフラグメントサイズが正確に反映されない例  
資料 5 マーカー性能の再現性確認方法について  
資料 6 - 1 試験室及びマーカーごとのフラグメントサイズ  
資料 6 - 2 別の日に PCR・フラグメント解析をおこなったことによる誤差の例  
資料 6 - 3 シーケンサー、ポリマー及びキャピラリー別の誤差  
資料 6 - 4 フラグメント解析における機械的なエラーの例  
資料 7 SSR におけるフラグメントの分析方法  
資料 8 食品分野における定性分析法の妥当性確認に関するガイドライン  
資料 9 Developmental Validation の例

2. 用語

3. 参考文献

4. 調査検討委員

## はじめに

昭和 53 年の種苗法の制定により本格的な植物新品種保護制度が導入されて以降、新品種の出願・登録件数は着実に増加し、現在、年間の新品種の出願・登録件数は世界でもトップクラスになっている。その反面、これら新品種を無断で利用するいわゆる育成者権の侵害事件も増加しており、「農林水産省における知的財産戦略の対応方向」（平成 18 年 6 月、知的財産戦略本部）においても、育成者権侵害対策の強化策として DNA 品種識別技術の開発を促進し、対象品目数を増やすこと等が取り上げられている。また、食品の偽装表示なども社会問題化しており、品種の同一性の判定を迅速におこなうことが可能な DNA 品種識別技術の早期確立と幅広い活用が期待されている。

DNA 品種識別技術の開発は、これまで試験研究機関等において様々な植物について開発されてきており、今後も識別可能な植物・品種の拡大が見込まれている。他方、これらの開発された技術を実際の品種判定に利用する上で、重要となる技術の妥当性の検討については、平成 16 年から食品総合研究所の大坪らによるコメの RAPD-STS マーカーを用いた品種識別技術や野菜茶業研究所の國久・松元らによるイチゴの CAPS マーカーを用いた品種識別技術の妥当性確認試験がおこなわれている例があるものの、その他の技術については現在必ずしも十分な検討がなされていない状況にある。このため、「植物新品種の保護の強化及び活用の促進に関する検討報告会」（平成 18 年 12 月 19 日、農林水産省）では、DNA 品種識別技術に関する施策のあるべき方向として、個別に開発された DNA 品種識別技術の妥当性を検証し、共通ガイドラインとして確立を図るべきであるとしている。

DNA 分析に関するガイドラインについては、ヒトを対象とした法医学の分野においては複数のものが存在している。また食品関連分野では AOAC INTERNATIONAL(以下「AOAC」とする)等によって分析法の妥当性確認に関する国際的な基準が作成されているが、植物の DNA 品種識別技術に関する国際的な基準は無いのが現状である。

このため、平成 19 年度農林水産省の農業・食品産業競争力強化支援事業において、植物新品種の育成者権の適切な行使に向けた環境を整備するとともに、DNA 品種識別技術の利用促進が図られるよう、「DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン」の検討・取りまとめをおこなうこととし、DNA 品種識別技術の中でも最も代表的な SSR(Simple Sequence Repeat)法を中心としてガイドラインを作成することとした。

作成にあたっては、妥当性確認や DNA 品種識別技術の開発に係わる研究者等を委員とする「DNA 品種識別の妥当性の確認に関する調査検討委員会」（付属参考 3 の 4. 調査検討委員参照）を開催するとともに、法医学の分野での DNA 鑑定への取り組み（科学警察研究所等）も参考にして取りまとめをおこなった。



# 第1章：妥当性確認の定義と適用範囲

## 1. 妥当性確認の定義

妥当性確認について ISO/IEC 17025 では「分析法の妥当性確認とは、意図する特定の用途に対して個々の要求事項が満たされていることを調査によって確認し、客観的な証拠を用意することである」と定義されている。これを植物の DNA 品種識別技術に当てはめると、「意図する特定の用途」とは「植物の DNA 品種識別技術を育成者権侵害紛争等の解決に用いる」ことであり、「個々の要求事項」とは「DNA 品種識別技術を用いたときに、品種のアリル（遺伝子型）が正確に検出されるために必要な事項」である。また、FBI の DNA 分析方法に関する技術作業部会(SWGDAM : Scientific Working Group on DNA Analysis Methods) による妥当性確認のガイドラインでは、「DNA 分析手順の妥当性確認のために一般的に考慮されるべき事柄」の中で「妥当性確認とは科学界によって以下の必要な情報を得るプロセスである」と定義しており、その項目は次の通りである。

- (a)信頼できる結果を得るための手順の能力を評価する。
- (b)信頼できる結果を得ることができる状況を決定する。
- (c)手順の限界を定義する。

このように妥当性確認とは手順の中で不安定であるがために慎重に制御と監視がされなければならない側面を明らかにすることである。

妥当性確認の内容は「どのようなタイプの技術が妥当性確認されるか」次第であることから、本ガイドラインの作成に当たっては、同様の技術の妥当性確認をより参考にするべきであると考え、妥当性確認の手順及び試験項目などの詳細な基準については法医学分野のガイドラインを参考とし、既に実施されているコメやイチゴの妥当性確認試験のベースとされた AOAC のガイドラインについても参考とした。また、本ガイドラインの作成と並行して、山形県農業総合研究センターが開発したおうとうの品種識別技術（SSR）の妥当性確認試験を行い、その試験結果をガイドライン作成に反映させた。

## 2. 妥当性確認の適用範囲

SWGDAM のガイドラインでは、妥当性確認を Developmental Validation（DNA 分析法の開発時にいくつかの試験室でおこなう妥当性確認）と Internal Validation（開発した DNA 分析法を利用したい試験室に導入する際におこなう妥当性確認）とに分けているが、本ガイドラインにおける妥当性確認の適用範囲は、Developmental Validation に相当するものとした。Internal Validation については、本ガイドラインの予備試験にその要素が含まれるものの、本ガイドラインは品種識別技術の手順の妥当性確認を目的として作成したことから、これには含めないこととした。しかしながら、DNA 品種識別技術による分析サービスを提供する場合には Internal Validation に相当するものが必要であることから、試験室の認定や使用する機器・試薬の検証とともに別途ガイドラインを作成することが適当である。

また、本ガイドラインは SSR 法を中心として作成されているが、RAPD-STS 法、CAPS 法等を用いた DNA 品種識別技術に共通に適用される部分もあることから、SSR 法と共通する事項については項目名に「（共通）」と表記した。

### 参考：SSR 法とは

SSR はマイクロサテライト、STR(Short Tandem Repeat)とも呼ばれている。これらはゲノム上に存在する短いリピートユニットの反復配列の領域を指している。このリピートユニットの反復数に多様性があるので、ローカス(遺伝子座)に存在するアリル(対立遺伝子)の長さが異なると多型として検出できる。従って SSR の領域を PCR(Polymerase Chain Reaction)で増幅し、その長さを解析することで反復数の差を検出することができる。品種識別においては、品種の遺伝子型(アリルの組み合わせ)を示す SSR 領域を特異的に増幅するマーカーを用いることにより、それぞれの品種の遺伝子型を検出することができる。

SSR は真核生物のゲノム中に多く存在し、(複製時に反復数が読み間違えられる突然変異が起りやすいため)多型性が高い。加えて、SSR の多くはその長さが 100~200bp<sup>1)</sup>なので PCR の増幅に適しているという特徴がある。また、SSR 領域を増幅するプライマー(SSR マーカー)は保存領域に設定されるため SSR マーカーは信頼度が高く、共優性の遺伝形式を示すという特徴がある。

これらの特徴から、近年、様々な動植物において、親子鑑定や品種識別の手法として利用されている。

## 第2章：妥当性確認の手順と確認事項

妥当性確認を実行する手順としては、まず、技術の開発機関等が明らかにしておくべき事項の確認（開発技術確認）があり、次に、当該技術の再現性を異なる試験室間で確認するための試験室間共同試験の実施がある。

加えて、試験室間共同試験に参加する試験室のレベルの確保・確認等を目的として、試験室間共同試験を実施する前におこなう各試験室を対象とした予備試験がある。

DNA 品種識別技術の実際の工程は、①サンプルの採取、②サンプルからの DNA 抽出、③DNA 分析、④分析結果の品種別データとの照合という4つの工程を経て、品種の特定がおこなわれる。このうち、①及び④は再現性の確認を要するものではないことから、試験室間共同試験で再現性を確認する項目は②及び③となる。

妥当性確認（開発技術確認事項及び試験室間共同試験）の結果の確認や判定は妥当性確認を担当する機関がおこなうものとする。妥当性確認を担当する機関は妥当性確認の結果に基づいて、妥当性を確認した項目と確認していない項目を各技術の手順書等に明記させ、妥当性が確認された範囲を明確にする必要がある。

### 1. 開発技術確認事項

開発技術確認事項には以下のような項目があるが、全ての項目の実施が必須ではない。DNA 品種識別技術の種類等によって、必要ではない項目や確認をおこなわなくとも分析結果に影響のない項目は実施しなくてもよい。

反対に技術の種類や特性によっては、単独の試験室内では実用段階での分析結果の再現性や安定性が担保し得ないと考えられる項目がある場合は、開発技術確認事項ではなく、試験室間共同試験でおこなうべきである。

#### A. 分析する植物の情報

##### a. 品種内多型(共通)

品種内多型は、植物の繁殖様式(種子繁殖(自殖又は他殖)又は栄養繁殖)によって、存在する割合が大きく異なる。品種内で多型が高頻度に存在すると、DNA 品種識別技術では品種を識別することが難しい。一般に栄養繁殖性植物では品種内多型は少ないといわれているが、品種識別に利用する DNA 領域に品種内多型が存在する可能性が低いことを確認しておくべきである。

品種内多型は、育成されてからの時間の経過や異なる環境下での無意識の人為選抜によって発生する確率が高くなることから、品種内多型の存在を確認するためには、古くから広く流通している品種を用いて、時間的、地理的に離れた個体（元株と流通している株等）を収集し、DNA 品種識別で用いるマーカーにおいて、個体間で多型が検出されないことを確認することが必要である。

##### b. 分析する品種（植物）の由来(共通)

DNA 品種識別技術を用いて登録品種等のデータを整備する場合、供試する品種のサンプルはその品種を代表するもの（品種の真正サンプル）でなければならない。

このため、分析する品種の由来は、正確に把握することが必要である。

栄養繁殖性植物の場合、元株や原木からの、またはそれに近い株や木からサンプルを供試することが望ましい。そのようなサンプルが確保できない場合は、少なくとも別品種との取り違いやコンタミネーション等がないことを確認できるサンプルを用いるべきである。

種子繁殖性植物の場合は、品種登録の出願時に農林水産省種苗課に提出される出願品種の種子等であることが望ましい。

### **c. 基準品種の選定**

SSR 分析法では使用する試薬類や分析機器等の違いによって、検出されるフラグメントサイズに若干の差が出ることが知られている。このため試薬や分析機器はできるだけ統一することが望ましい。さらに分析データの一貫性を高めるため、あらかじめフラグメントサイズの基準となる品種を設定し、基準品種のフラグメントのピークからの距離を基に分析対象品種のフラグメントサイズを決定する方法が望ましい。このような方法でフラグメントサイズを決定する場合は、当該植物の DNA 品種識別をおこなう際に必ず基準品種を供試すべきである。

また RAPD-STC 法や CAPS 法においても、PCR 増幅や制限酵素処理が正常におこなわれたことを確認するため、供試されるマーカーごとに判定の基準となる品種を選定し、供試することが望ましい。

基準品種は、株や木（母株や原木）の由来が明確であり、品種の混同がないよう管理されていることが望ましい。また、分析にその DNA を利用することから、これらの株や木から DNA 抽出用のサンプルが提供できるものでなければならない。

SSR 分析法における基準品種の数は、使用する SSR マーカーによって検出されるアリの数やサイズの範囲を踏まえ、必要に応じて複数品種を設定する必要がある。アリの数が多い植物種やアリのサイズの範囲が広い植物種は、基準品種のフラグメントと分析する品種のフラグメントのピーク間の距離が長くなってしまい、フラグメント解析で検出されるフラグメントサイズの誤差が大きくなる可能性が高いことから、誤差が少なくなるように基準品種を追加することが望ましい。

## **B. SSR マーカーの情報**

### **a. マーカーの性能**

使用するマーカーは①増幅効率がよく、②品種間の多型性が高く、③識別しやすいマーカーであることが重要である。

SSR マーカーにおいては 2 塩基反復の SSR はスタッターバンドの影響で結果判定が難しくなることがある（資料 7 参照）ため、テイルド（PIG-tailing）を付加したマーカーを使用することも検討すべきである。

また、実用段階ではゲルでバンドパターンを判定する手法においても、マーカーの開発段階においてはシーケンサーによるフラグメント解析をおこない、識別に用いるバンドパターンとフラグメントが一致することを確認することが望ましい。

### **b. マーカーの独立性**

マーカーの独立性があらかじめ確認されていれば、「異なる品種が供試された全てのマーカーで同じ結果になる確率」を計算することができ<sup>2)</sup>、品種識別率（例えば同一品種である確率が 0.01%以下等）を算出することができる。マーカーの独立性は、他のマーカーと異なる連鎖群にあることが既知であるか、または同一連鎖群であれば十分に距離が離れているか等によって確認することができる（資料 1 参照）。

### **c. Null 対立遺伝子がほぼ無いことの確認**

使用するマーカーに Null 対立遺伝子がほぼ無いことがあらかじめ確認されていれば、フラグメント解析でのピーク（ゲルにおけるバンド）を確認することによって、プライマーが目的のローカスにアニーリングしていることがほぼ確実となる。このため、再現性の確認試験をアレルごとにおこなう必要がなく効率的である。

Null 対立遺伝子がほぼ無いことの確認は、母集団（100 品種程度又はそれ以上）におけるヘテロ接合度の予測値（Expected Heterozygosity : He）と観測値(Observed Heterozygosity : Ho)の関係から推定する方法等がある（資料 2 参照）。

## **C. DNA 抽出(共通)**

### **a. DNA 抽出法**

DNA を用いた品種識別をおこなうためには PCR によって十分に増幅する濃度及び純度の DNA がサンプルから抽出できる方法を確立しなければならない。

DNA 抽出法はできる限り市販のキットでおこなうことが望ましい。Buffer 等を自作した場合、作成者の技量、作成後からの経過期間、保存方法、作成に使用した試薬の質やマーカーの違い等によって結果に差が出る可能性があるため、自作した試薬で再現性よく DNA 抽出がおこなえる条件を確認する試験が新たに必要になる。

### **b. サンプル部位**

DNA 品種識別技術は植物体の一部しかなくても品種識別ができることが利点の一つである。この利点を生かすために、DNA 抽出が可能なサンプル部位には、一般に流通する収穫物または種苗から供試できる部位が含まれていることが望ましい。

また、サンプル部位の違いが、DNA の抽出効率や抽出法または品種識別の結果に影響を与える可能性があるため、安定した結果を得るための条件を確認する必要がある。特に、受精後に発生・肥大した組織では、分析する品種とは異なる(次代の)遺伝子型となる部分(種子やクリ等の果実部分)が存在するので、十分に確認すべきである。

### **c. サンプルの状態**

サンプル部位が果実等の場合、流通過程で日々老化・腐敗が進行している。DNA は生きた細胞内では安定的に存在するが、細胞が死ぬと分解が進むため、抽出効率が悪くなる。このため、DNA が抽出可能なサンプルの状態（限界）を把握しておくことが重要である。



#### **d. サンプルの保存**

サンプルの適切な保存は、試験の品質管理にとって重要である。

採取したサンプルは、他のサンプルと混同しないように袋等に入れ、記録をする必要がある。記録する事項は、サンプルの内容が分かるように名称、採取場所、採取日、採取者等である。また採取時のサンプルの状態がわかる写真を撮影してから保存することが望ましい。

保存は、サンプル部位や DNA 抽出までの時間により、適した方法を選択する。

冷凍保存する場合には、以下の点に注意しなければならない。

- ・サンプルを急速に冷凍すること。
- ・-30°C以下で保存すること。
- ・冷凍庫内にサンプルを詰め込みすぎないこと。
- ・サンプルの出し入れ時に保存サンプルを融解させないこと。
- ・液体窒素を利用する場合は、袋の破れ等によるコンタミネーションが起きないように注意すること。

また品種識別に供試したサンプルは、再試験等の可能性がある期間は保存しておくことが望ましい。なお、PCR 後の増幅産物の保存については、10 ページの「D. SSR マーカー性能の再現性確認」に記載した確認事項に注意する。

### **D. PCR 条件(共通)**

使用するマーカーに適した PCR 条件（PCR サイクル、供試する DNA 濃度及び試薬類の濃度等）を確認しなければならない。特に、手順書で指定する PCR 条件(特に DNA 濃度)の範囲においては十分な PCR 産物が得られることや非特異反応が無いことを確認する。

また、サンプル部位等が変わることによって、供試される DNA の濃度及び純度が変わる場合は、それに適した PCR 条件を確認する。

### **E. SSR 分析**

#### **a. PCR 産物の希釈倍率**

フラグメント解析に用いる PCR 産物の濃度は、判定結果に影響を与える恐れがある（資料 7 の図 10 及び 11 参照）ため、フラグメント解析に適した PCR 産物の希釈倍率を設定しておくことが望ましい。

ただし、PCR 産物の増幅効率はサーマルサイクラーの機種、ピペッティングの技術やピペットの精度、Taq polymerase の種類等により変わるため、示される希釈倍率は絶対的なものではなく、目安として扱う。

#### **b. 精度の確認**

SSR 分析において読みとられたフラグメントサイズは、サイズスタンダードのピーク間の距離を基に計算された数字であり、塩基数をカウントした数字ではないため、同じ品種でも若干の誤差が生じることがある。このため、同一品種のサンプル DNA を用いた複数のデータ（測定値）から、同じデータと見なせる範囲の決定基準を明ら

かにしなければならない。SSR 分析法では基準品種のフラグメントのピークからの距離(ピークのサイズの差。以下「距離」とする。)によるデータの表示形式を採用したり、同一のフラグメント(アليل)と判断される範囲の考え方について確認することが望ましい(資料3、資料4参照)。

#### **F. 加工品における確認事項(共通)**

DNA 品種識別技術を植物の加工品に適用する場合は、以下のことに留意しなければならない。

##### **a. 抽出される DNA の質と量**

加工品は加熱等の種々の加工工程により、DNA が断片化している可能性が高い。また、調味料や保存料等は DNA 抽出を阻害する要因になることもある。

このため、PCR の増幅産物のサイズが短いマーカーを選択することや、加工品に適した DNA 抽出法を検討することが重要である。

##### **b. 混合物**

加工品は分析対象となる植物以外のものや別品種が混合されていることもある。

このため混合されたサンプルから信頼できる結果を得るための条件を確認しなければならない。

#### **G. 査読のある論文誌への発表の必要性(共通)**

開発された DNA 品種識別技術は査読を経て論文発表されていることが重要である。これにより複数の専門家の中で、当該技術が受入れられたものとみなすことができる。さらに、技術を発表した論文が、複数引用されていることが望ましく、このことが裁判において DNA 品種識別技術による結果が証拠として採用されるための重要な要素になると考えられる。

## **2. 試験室間共同試験**

試験室間共同試験は主に各植物の DNA 品種識別技術の手順書に記載されている技術の試験室間における再現性を確認するためにおこなうものである。このため、仮に、試験において良好な結果が得られず手順書の修正等をおこなった場合は、修正内容に適した妥当性確認を再度おこなわなければならない。

#### **A 試験の設計(共通)**

##### **a 試験室数**

試験室間共同試験に参加する試験室数は、統計学的には 10 試験室以上であることが望ましいが、参加する試験室及び試験者の質(経験・実績)、使用するマーカーの専門分野における実績(複数の者による使用実績や査読のある文献等で同一植物への適用例がある等)のほか、試験にかかるコストや参加する試験室数の確保の可能性等も踏まえて、柔軟に設定(資料9における Developmental Validation の例では

試験室数は最小が3、最大が8である。) することが適当である。

#### **b 反復数**

反復数については DNA 品種識別技術の統計学的な信頼度を確認するため、必要な総サンプル数（試験室数×反復数）を満たすように設定することが望ましい。しかしながら、試験室数が少ない場合には、試験者の質や試験にかかるコスト及び労力を考慮し、過度の反復を同一試験室に課すことは必ずしも要求しない。総サンプル数が少ない場合、試験室間共同試験においてエラー(偽陽性、偽陰性等)が生じたときには、そのエラーの原因や対処法を究明する。原因が技術によると考えられる場合は、同規模あるいはそれ以上の規模で再試験をおこなうべきである。

#### **c. 基準品種**

基準品種のフラグメントは分析する品種のフラグメントを決定する基準となるため、全ての基準品種は試験室間共同試験に供試するべきである。

#### **d. その他**

試験室間共同試験に参加する試験室は、妥当性確認の対象となる DNA 品種識別技術が潜在的にもっている不安定な要素以外においては、結果を安定的に導き出すことができるレベル（技術的な経験・実績及び品質管理等）でなければならない。参加する試験室が ISO 17025 取得等の品質保証体制を構築している試験室でない場合や当該技術に対する経験や実績が十分でない場合、妥当性確認試験を担当する機関は予備試験（第4章）を実施することによって、参加試験室のレベルの確認・確保を図っておくべきである。

### **B. 再現性を確認する項目(共通)**

試験室間共同試験で再現性を確認する項目は「サンプルからの DNA 抽出」及び「DNA の増幅及びフラグメント解析」である。これらの項目は実際の分析においては一連の工程としておこなわれることから、1つの工程で再現性確認をおこなう方がよいが、結果が思わしくなかった場合には原因究明が難しくなることから、分割しておこなうことも可能である。

### **C. DNA 抽出法の再現性確認(共通)**

指定された DNA 抽出法によりサンプルから DNA 抽出を行い、アガロースゲルで電気泳動する等の方法で DNA の質と量が PCR に供試するのに十分であることを確認する。サンプル部位が変わることによって DNA 抽出方法が異なるかまたは修正が必要である場合は、サンプル部位ごとに再現性確認をおこなう。サンプルは原則として葉一枚、果実一個等のように、他品種等の混入の可能性がないサンプル単位でおこなう。

また、アガロースゲル等で十分な質と量の DNA が観察されても、PCR で増幅しない場合があることから、最終的な確認は PCR 増幅の結果を見て判断する。



#### D. SSR マーカー性能の再現性確認

SSR マーカーの性能の再現性の確認は、プライマーが特定のローカスに確実にアニーリングし、特定のフラグメントサイズが安定的に検出されることを確認するものである。

試験室内における反復ではフラグメントのピーク値を直接比較することができるが、試験室間で比較する場合は、分析機器や試薬等の違いによってピーク値の誤差が大きくなることがあることから、資料3及び4で示したような表示形式にして比較することが望ましい(資料6-1、6-3参照)。

再現性の確認方法としては、供試品種において各マーカーで検出される全てのフラグメントサイズについて、試験によって確認する方法(資料5の試験方法1)のほかに、Null 対立遺伝子(プライマー部分に変異がありアリルの増幅が得られない対立遺伝子)がほぼ無いことが確認されている場合には、マーカーごとに1つのフラグメントサイズを試験によって確認する方法(資料5の試験方法2)で足りうる。

また、フラグメント解析におけるデータの誤差を小さくするために、各試験室は4ページの「1. 開発技術確認事項」によって指定された条件・方法以外に以下のことに注意しなければならない。

- a. フラグメント解析はPCR増幅後、すぐにおこなうことが望ましい。  
(PCR増幅後、長期間保存したりすると非特異的なフラグメントが検出されることがあるため)
- b. マーカーの再現性確認で用いるサーマルサイクラーやシーケンサー等の機種、PCR増幅やフラグメント解析等での機器の設定及び試薬類は、供試する全ての品種とその反復において試験室ごとに同一条件でおこなうことが望ましい。
- c. 試薬類は機種や設定にあった適切なものを使用しなければならない。またサイズスタンダードは検出されるフラグメントサイズにあったものを可能な限り使用する。
- d. 比較する品種と基準品種は可能な限り同じ日、同じラン(作業単位)でおこなうことが望ましい(資料6-2参照)。
- e. フラグメント解析等においては機械的エラーがあることを想定して同じPCR産物を反復することが望ましい(資料6-4参照)。

#### E. 試験データの記録及び提出(共通)

試験室間共同試験の参加機関は以下の試験データについて記録を整理し、指定された期間内に試験の主体となる機関に提出しなければならない。

##### a. DNA抽出法の妥当性確認試験において

①DNAの濃度及び質が確認できる資料

例：アガロースゲルでの電気泳動写真

②抽出したDNAでPCR増幅が確認できる資料

例：SSR分析のフラグメント画像、増幅産物のゲル写真

**b. マーカーの妥当性確認試験において**

①マーカーが期待された性能を発揮しているか否かを確認できる資料  
SSR 法における例

- ・ SSR 分析のフラグメント画像（各マーカー、DNA サンプルごと）
- ・ フラグメント画像から分析者がピークと判断したピーク値

RAPD-STS 法、CAPS 法における例

①増幅産物等のバンド（パターン）が確認できるゲルの写真

**c. 共通事項**

①試験に使用した機器（機種名）及び試薬名（表 1）

②試験中に気付いた点

作業中の不具合やサンプル間の状態等の差、その他プロトコルを逸脱した可能性に関する情報

## 第3章：DNA 分析手順を変更する際の妥当性確認

妥当性が確認された技術の変法は、同一のまたは類似したサンプルを分析に供試し、オリジナルの手順と比べることによって性能が評価されなければならない。

再現性の確認においては変更点の種類とレベルに応じて、再度試験室間共同試験をおこなわなければならない。

### 1. 単一の試験室での再現性確認でよい変更点(共通)

- ① 使用する機器の機種変更
- ② DNA 抽出法における簡易な変更
- ③ DNA 抽出をおこなう植物や部位の変更（抽出法は変更しない）
- ④ 再現性確認済みのマーカーにおいて未確認のアリルが追加  
(Null 対立遺伝子がほぼないことが確認されたマーカーの場合のみ)
- ⑤ マーカーの簡易な変更（蛍光色素の変更等）

### 2. 追加的に複数の試験室で再現性確認することが望ましい変更点(共通)

- ① DNA 抽出法の簡易な変更に加えて抽出をおこなう植物や部位を変更する場合
- ② 特に信頼性が高いマーカー（査読のある文献等で同一植物への適用例がある等）を新規に追加・変更する場合

### 3. 新規に再現性を確認しなければならない変更点(共通)

- ① DNA 抽出法の大きな変更（キットの変更等抽出法の特徴を変更するもの）
- ② マーカーの追加・変更

## 第4章：予備試験

試験室間共同試験に参加する試験室は妥当性確認の対象となる技術が潜在的にもっている不安定な要素以外においては、結果を安定的に導き出すことができるレベル（技術的な経験・実績及び品質管理等）でなければならない。現段階では DNA 品種識別技術において（ISO 17025 取得等の）品質保証体制を構築している試験室は少なく、植物種ごとに確立されている DNA 品種識別技術の全てについて経験や実績がある試験室も少ないと考えられる。

このため当面は、妥当性確認においては共同試験を主導する機関等が中心となって、試験室間共同試験を実施する前に、十分な予備試験をおこなうことで、参加試験室及びそのスタッフの知識、経験の向上を図り、正しい結果を安定的に出せる体制を構築することが必要である。

将来的に各試験室のレベルが十分に担保できる客観的な指標が確立されれば、予備試験を必ずしも実施する必要はないと考えられる。

### 1. 予備試験における確認事項（共通）

予備試験は以下の事項について確認できる設計にすることが望ましい。

#### A. 試験室間共同試験の作業行程の確認

試験室間共同試験は原則として各植物における DNA 品種識別技術の手順書に沿っておこなう。予備試験ではその行程を確認することで、各試験室の技術的な改善事項や手順書の改善点（表現方法や機器等の違いによる修正点等）を見つけ出し、共同試験を円滑に進めるための条件を整備すべきである。

#### B. 反復分析

予備試験では結果の安定性を確認するために反復をとるべきである。

#### C. 結果判定能力の確認

SSR 分析においてはフラグメント解析で得られた画像と複数のピーク値から品種識別に用いるピーク値を判定できる能力を確認するべきである。そのため判定に経験や知識が要求されると考えられる事例については、予備試験に含めることが望ましい（資料7参照）。

RAPD-STs 法や CAPS 法においてはゲルで観察されたバンド（パターン）から正しい結果を判定できる能力を確認するべきである。特に非特異的な増幅や制限酵素で消化しきれなかったバンドの扱い等については、手順書に定められた判定方法を十分に理解していることを確認するべきである。

## 第5章：注意事項

妥当性確認試験をおこなう場合、または妥当性確認を経た DNA 品種識別技術を使用する場合は結果の安定性・再現性を高めるために以下の事項に注意しなければならない。

### 1. 作業エリア（共通）

コンタミネーション防止のため、DNA を抽出するエリア、PCR 反応液を調製するエリア、PCR 産物を扱うエリアは物理的に離れていることが望ましい。

### 2. サンプルの磨砕（共通）

サンプルの磨砕時は他の品種とのコンタミネーションに注意しなければならない。特に乳鉢を用いた磨砕においては周辺へのサンプル飛散を想定し、周辺に他のサンプルを置かないことや手袋等はサンプルごとに替えるべきである。

凍結サンプルは、破砕前の融解に注意しなければならない（融解により DNA の質と抽出効率が落ちるため）。

### 3. DNA 濃度及び純度の確認（共通）

抽出した DNA は PCR に供試する前に、濃度や純度（夾雑物の多少）を確認すべきである（DNA の濃度やタンパク質等の夾雑物が PCR 反応の結果に影響を与えないようにするため）。

確認方法は主体となる機関が特に指定しない限り、各試験室の判断で選んでよい。ただし、分光光度計は DNA だけでなく RNA も検出してしまうので、十分に RNA が処理されていないと見なされる。

### 4. PCR について（共通）

PCR 条件や試薬は試験の主体となる機関の指定したものでおこななければならない。

PCR 条件が同一であってもサーマルサイクラーの機種によって（異なる温度勾配等の条件のために）PCR の結果に差が出る可能性があることに注意しなければならない。

### 5. コンタミネーション防止（共通）

使用する器具は、滅菌済みの使い捨てプラスチック器具を用いることが望ましい。ガラス器具を用いる場合は、乾熱滅菌（180°C 2 時間）したものを使用すべきである。

DNA サンプル及び PCR 産物を扱う工程では手袋を着用することが望ましい。

試薬類は、別の実験で使ったものを使用してはならない。

## 付属参考 1 : 参考資料と考察

### 1. 妥当性確認のガイドライン作成の現状

妥当性確認は各分野においてガイドラインが作られており、AOAC の試験室間共同試験のガイドライン(2005)<sup>3)</sup>には Harmonized protocol 以外と明記した上で、定性分析法の試験室間共同試験についても実施上の最低条件が記載されている(資料 8 参照)。

またヒトの DNA 鑑定においても SWGDAM のガイドラインが作成されている。

さらに、DNA 分析を含む定性的な分析法について、IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry : 国際純正応用化学連合) が 2006 年から PCR 法による GMO 検知等の試験室間共同試験に関するドラフトの作成を開始したり<sup>4)</sup>、ANSI(American National Standards Institute : 米国規格協会)が ISO の TC34 (食品専門部会) 内に分子生物指標の検出技術に関わる新しい subcommittee 「biomarkers」 の設立を提案するといった動きが見られるほか、UPOV (植物新品種保護国際同盟) の技術作業部会において品種登録審査への分子技術の応用について検討がおこなわれているものの、現状では DNA 品種識別技術に関する国際的な妥当性確認のガイドラインは確立されていない。

### 2. 法医学分野における妥当性確認のガイドラインの特徴

日本においては、法医学分野の妥当性確認のガイドラインはまだ確立されていない。海外では SWGDAM のガイドラインと ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) のガイダンス<sup>5)</sup> 及び DAB Standard (DNA Advisory Board Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories : <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/dabqas.htm>) があり、特徴は次のとおりである。

SWGDAM のガイドラインでは、妥当性確認を DNA 分析法の開発時にいくつかの試験室でおこなうもの (Developmental Validation) と、開発した DNA 分析法を利用したい試験室に導入する際におこなう妥当性確認 (Internal Validation) とに分けて記載されている。

Developmental Validation はメーカーや公的研究機関等で手順の精確さと精度、試験室間の再現性を示す目的で、「マーカーの DNA 多型・染色体上の位置等の詳細」、「種特異性」、「感度」、「安定性」、「試験室間の再現性」、「母集団の DNA 多型」、「混合物での検出」、「精確さと精度」、及び「PCR の基本的な手順」について試験がおこなわれ、試験室間共同試験は「試験室間の再現性」に含まれる。試験室数についての明記はない。

Internal Validation は信頼性と適用限界を明らかにする目的で、「既知の試料を用いた試験」、「試験室間の再現性と精度の試験」、「分離される DNA サイズの確認試験」、「感度と確率的変動要因の試験」、「混合物での検知試験」、「コンタミネーション確認試験」、及び「DNA 分析技能認定試験」をおこない、これらの試験を通して少なくとも 50 試料は分析する。このうち DNA 分析技能認定試験は、内部試験 (例えば内部品質管理試料の利用)、外部試験 (技能試験) 又は共同試験でおこなう。

なお、AOAC のガイドライン等の食品分析における化学分析法の妥当性確認では、Internal Validation に相当する作業は検証 (method verification) といい、妥当性確認とは区別している。検証作業は、分析法を導入したい試験室が妥当性確認された性能の範囲内で



その分析法を利用可能か試験室ごとに確認するので、目的は類似している。

ENFSI のガイダンスでは妥当性確認の対象となる技術をその特徴によって「客観的な手法」と「主観的な手法」に分類している。「主観的な手法」とは分析結果が基準値と一致する、または一定の範囲内に含まれるかについて試験者の経験と専門知識が重要な決定要素になるものとされている。例として筆跡鑑定や顕微鏡での鑑定等があげられている。

SSR 分析の全てが「主観的な手法」であるわけではないが、フラグメント解析のデータから正しい結果を導き出すためには、データの正しい読み取り、分析する品種と比較する品種のデータの異同の判断及びデータが適切であるかの判断(サイズスタンダードの不具合の有無や PCR 産物の希釈倍率の適切性)が適切に行える経験と知識が必要である。

このことから SSR 分析にも試験者の経験と専門知識が結果に影響を与える行程があり、そのために SWGDAM のガイドラインでは Internal Validation が設定されているものと考えられる。

DAB Standard は DNA 鑑定を実行している法医学研究所が満たすべき、品種管理プログラムについて定めている。

### 3. 試験室間共同試験における試験室数について

SWGAM のガイドライン、ENFSI のガイダンス及び DAB Standards では、試験室間共同試験が必要であることについての記述はあるものの、試験室数についての記述はない。

DNA 鑑定キット (21-SNP multiplex と PowerPlex Y Validation) において実施された Developmental Validation の内容<sup>6) 7)</sup>を資料 9 に掲載した。これらのキットでは試験項目をいくつかに分けて妥当性確認をおこなうことでキット全体の妥当性確認をおこなっており、その試験項目のうち、試験室間の再現性を確認すべき項目については、複数の試験室で共同試験をおこなっている。共同試験に参加している試験室数は最少 3、最大 8 となっており、統一されていない。このことから、妥当性確認をおこなう技術 (キット) の内容に応じてサンプル数や共同試験室数を設計していると考えられる。

一方、AOAC のガイドライン及び ISO 16140 食品及び動物用飼料の微生物に関する代替法の妥当性確認では、定性分析法については、技術内容に関わらず統計的な側面から 10 試験室以上を要求している。

AOAC のガイドラインが要求している 10 試験室以上の試験室数は、感度(陽性試料の正解率)または特異性(陰性試料の正解率)の真値が 80%と仮定したときに、その $\pm 10\%$ の範囲内 (72~88%) に、正規分布近似を用いて計算した比率 (正解率) の 90%信頼区間が入るのに必要な試験室数  $L$  と併行測定回数  $m$  の条件を与える式、 $362 \leq Lm^2$  をほぼ満たすように決められている (資料 8 参照)。

植物における DNA 品種識別技術は、DNA 抽出、PCR、シーケンサー等個々の作業・機器がキット化、自動化されている部分が多いこと等の分析技術的な側面に加えて、対象となる植物種が様々であること、それぞれの技術に対して精通した試験室が多くはないこと等共同試験の実施面をも考慮して、共同試験に参加する試験室数については統計学的に信頼性が高まる 10 試験室以上が望ましいとしつつも、諸条件を勘案し、柔軟に設定できることとした。

また、サンプル数や共同試験参加試験室数を増加させて、妥当性確認試験に要求される

水準以上の試験をおこなうことは、労力、コストが増加するばかりで効率的ではない。したがって、あらかじめ妥当性確認試験の予備的な試験結果等で試験室内や試験室間での分析値が安定していることが確認されている場合には、反復数や試験室数を減ずる等効率的な試験設計に努めるべきである。

#### 4. 分析結果の証拠能力について

植物の DNA 品種識別技術は育成者権の侵害に対するの対抗措置等として使用されることから、試験の結果が裁判で受け入れられる条件を整えておくことが望ましい。

米国では科学的な証拠が裁判で受け入れられるための基準として Daubert Standard<sup>8)</sup>があり、多くの州で採用されている。Daubert Standard は裁判において受け入れられる科学的な証拠について判断を下した 1993 年の判例である。それは以下の 4 つの項目からなっている ([http://books.nap.edu/openbook.php?record\\_id=11696&page=4](http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=11696&page=4) より引用)。

1. whether or not it could be tested and falsified  
(その手法は検証したり、偽りを立証したりできるかどうか)
2. whether it had been subject to peer review and publication  
(その手法は論文誌に査読されて発表されているか)
3. whether there existed known or potential rate of error and standards controlling the technique's operation  
(誤判定をする確率が既知または潜在的に存在するか(0に近い)、そして分析手法を管理する基準(手順書等)が存在するか。)
4. whether or not it was generally accepted within the scientific community  
(その手法は科学界のなかで一般的に受け入れられているか)  
(調査検討委員会仮訳)

これらの項目を満たした技術による科学的な証拠は、試験室の品質保証の問題を別にすれば、裁判において証拠能力を否定されることはないとされている。日本の法医学界では Daubert Standard をそのまま受け入れているわけではないが、これに沿って科学的な証拠の確立をおこなっていることから、植物の DNA 品種識別技術においても妥当性確認をおこなう技術は Daubert Standard を満たしていることが望ましい。

日本において 4 項目のうち特に重要視されているのは②と④とのことであり、査読を受け論文として公表されていることにより専門家の間で受け入れられた技術とみなされている。さらに、いくつかの論文で引用されていれば、その技術は(専門家間で)一般的に受け入れられたと見なされる。このため、DNA 品種識別に使用する技術は査読を受け、論文発表されていることが重要である。



## 付属参考2：ガイドラインの適用例（おうとう）

本ガイドラインを適用する形で「おうとう」のDNA品種識別の妥当性確認をおこなった結果は次のとおりである。

### 1. 予備試験

#### A. 予備試験における確認事項

##### a. 試験室間共同試験の作業行程の確認

山形県農業総合研究センターが作成した「おうとうのDNA品種識別の手順書（品種登録ホームページ（<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>）における「DNA品種識別技術について」の参考資料9）」に従い、葉、果梗、果皮を材料としたDNA抽出法とマーカー性能について、試験室間共同試験で再現性を確認するための前段階として予備試験をおこなった。DNA抽出法の予備試験においては葉で「大将錦」、果梗及び果皮で「佐藤錦」をサンプルとして供試した。マーカー性能の予備試験では「佐藤錦」及び「紅秀峰」をサンプルとして供試し、3マーカーを用いて試験をおこなった。

##### b. 反復分析

DNA抽出法及びマーカー性能において、それぞれ2反復ずつおこなった。

##### c. 結果判定能力の確認

フラグメント解析で得られた画像や複数のピーク値から品種識別に用いるピーク値を判定できる能力を確認するために、マーカー性能の予備試験には供試品種においてSSRの典型的な波形を示し、かつ供試品種でホモ型とヘテロ型を検出する3マーカーを供試した。

上記のような試験設計で予備試験をおこなったことによって、手順書の文章の改善・追加事項や試験の詳細についての確認に関する意見・提案が参加試験室から寄せられ、本試験における注意点として修正するとともに、フラグメント解析における結果判定の注意点について、いくつかの試験室に再確認をおこなった。

これにより、参加試験室がSSR分析及びおうとうのDNA品種識別技術について一定の経験を積むことができたとともに、誤解のない手順書にするための修正をおこなうことができた。

### 2. 開発技術確認事項

#### A. 分析する植物の情報

##### a. 品種内多型

品種内多型を調査する品種として、古くから広く流通している品種である「佐藤錦」を供試した。山形県農業総合研究センター農業生産技術試験場内で保存栽培している「佐藤錦」と東京大田市場及び国内産地にて購入した北海道産、福島県産、

山梨県産、長野県産及びタスマニア産の「佐藤錦」の果梗または果皮から抽出した DNA を 12 の SSR マーカーを用いてフラグメント解析をおこなった。その結果供試したサンプルから得られたデータ間に差が見られなかったことから、品種内多型の頻度が低いことが示唆された<sup>9)</sup>。

#### **b. 品種の由来**

供試したサンプル（葉、果梗、果皮）は全て山形県農業総合研究センター内で保存している品種（木）から採取した。

#### **c. 基準品種の選定**

基準品種の数は山形県農業総合研究センターの試験データより 1 マーカー当たりのアليل数がそれほど多くないこと、アليلのサイズの範囲も広くないことが示され、2 品種程度が適当であると考えられた。

そこで山形県農業総合研究センターの育成品種でありかつ原木も管理されている「紅秀峰」と、原木はないものの、山形県農業総合研究センター内で管理されている木があり、品種内多型が少ないことが推察でき、多くの品種の育種素材にもなっている「佐藤錦」を基準品種に選定した。

### **B. SSR マーカーの情報**

#### **a. マーカーの性能**

Prunus 統合連鎖地図等に記載されている SSR マーカーのうち増幅効率が良く、品種間の多型性が高く、かつ識別しやすいマーカーを 10 マーカー選んだ。

#### **b. マーカーの独立性**

マーカーの独立性を確保するために、Prunus 統合連鎖地図等で染色体上の位置が明らかになっているマーカーを選んだ。おうとうの 8 本の染色体上から 1 マーカーずつと G1 及び G4(G1、G4 は連鎖群番号を示す)からはマーカー間が 40~50cM 程度になることを確認した上でさらに 1 マーカーずつ追加した。合わせて 10 マーカーを妥当性確認試験に供試した。

#### **c. Null 対立遺伝子がほぼ無いことの確認**

妥当性確認試験に供試した 10 マーカーのうち、8 マーカーについては He と Ho の値が文献により示されており<sup>10) 11)</sup>、Null 対立遺伝子がほぼないことが推定された。また、残りの 2 マーカーについても山形県農業総合研究センターが上記と同様の確認をおこなったところ、Null 対立遺伝子がほぼないことが推定された。

### **C. DNA 抽出**

#### **a. DNA 抽出法**

QIAGEN 社の DNeasy Plant Mini Kit の手順書に概ね従った。手順書の変更点は以下の通りである。

- ① Buffer AP1 400ul にメルカプトエタノール 8ul と不溶性ポリビニルピロリドン 4mg を加える。
- ② Buffer AE を添加・遠心後、マイクロチューブ内に溶出した液を再度 DNeasy Mini スピンカラムに移し、遠心する。

#### b. サンプル部位

サンプル部位には、市場に流通している部位から果梗と果皮を供試した。また果実が流通していない時期に分析がおこなわれる場合があることを想定して葉についても供試した。

#### c. サンプルの状態

購入した果実を常温と冷蔵（4℃）で1～6週間保存した後、果梗と果皮から DNA を抽出し、1 マーカーでフラグメント解析をおこなった。その結果、冷蔵保存した果実の果梗と果皮からは保存後6週目でも DNA 抽出が可能であった。常温保存の果実においても保存後5週目でも DNA 抽出は可能であったが、早いものでは保存後2週目から、5週目ではほとんどのサンプルにカビが発生したため、サンプルとして、適当ではなかった。しかし、PCR 増幅及びフラグメント解析への影響はなかった。

#### d. サンプルの保存

山形県農業総合研究センターで採取したサンプルはラベリング後、-30℃で冷凍保存した。

### D. PCR 条件

PCR 反応液については以下の通りに調製した。また、PCR サイクルについては10 マーカー中9 マーカーでは①のサイクルで、マーカー「6-1」のみ②のサイクルでおこなった。

#### a. PCR 反応液

10×buffer	2.0 μl
dNTP	2.0 μl
H <sub>2</sub> O	13.9 μl
Taq polymerase	0.1 μl
marker	1.0 μl
DNA	1.0 μl
計	20.0 μl

## b. PCR サイクル

①	②
94℃ 3min	94℃ 3min
94℃ 30sec } 35cycles	94℃ 30sec } 35cycles
55℃ 30sec }	51℃ 30sec }
72℃ 1min }	72℃ 1min }
72℃ 5min	72℃ 5min
4℃ ∞	4℃ ∞

## E. SSR 分析

### a. PCR 産物の希釈倍率

表 1 : 試験室間共同試験に供試したマーカーごとの PCR 産物の希釈倍率 (参考)

マーカー名	1-1	1-2	2-1	3-1	4-1	4-2	5-1	6-1	7-1	8-1
希釈倍率(倍)	10	20	10	60	30	80	20	40	20	20

### b. 精度の確認

単一の試験室内ではデータ値を直接比較し、原則として 1b 未満の差であれば同じサイズのフラグメントと判断した。また、試験室間のデータ値の比較では資料 3 のデータの表示形式に変換して比較をおこなった。

## F. 加工品における確認事項

今回の妥当性確認では加工品を想定していないため、確認はおこなわなかった。

## G. peer review と論文発表

おうとうの DNA 品種識別技術に関して peer review を経て、以下の論文を発表した。  
高品善, 石黒亮, 西村幸一, 山本俊哉 : SSR マーカーによる輸入おうとうおよび国内市販品の品種識別, DNA 多型, 15, 101-104(2007).

## 3. 試験室間共同試験

試験室間共同試験は以下の 11 機関の試験室が参加しておこなわれた。

- ・独立行政法人種苗管理センター DNA 品種識別チーム(メインラボ)
- ・独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構  
果樹研究所 果樹ゲノム研究チーム
- ・独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構  
食品総合研究所 食品素材科学研究領域 穀類利用ユニット
- ・独立行政法人農林水産消費安全技術センター 表示監視部 技術研究課
- ・山形県農業総合研究センター 農業生産技術試験場 バイオ育種科
- ・福島県農業総合センター 果樹研究所 栽培グループ
- ・茨城県農業総合センター 生物工学研究所 果樹・花き育種研究室
- ・千葉県農業総合研究センター 生物工学部 植物工学研究室

- ・和歌山県農林水産総合技術センター 果樹試験場 うめ研究所
- ・福岡県農業総合試験場 バイオテクノロジー部
- ・宮崎県総合農業試験場 生物工学部

## A. 再現性を確認する項目

DNA 抽出法及びマーカーの性能

## B. DNA 抽出法の再現性確認

基準品種とする「佐藤錦」「紅秀峰」の葉、果梗、果皮から3反復ずつ、合計18サンプルのDNA抽出を各試験室でおこなった。抽出したDNAはアガロースゲルで電気泳動し、濃度及び不純物の確認をおこなった。その後SSRマーカーを用いてPCRをおこない、正しいPCR産物が得られることを確認した。

その結果、果梗から得られたDNAは、アガロースゲル及びPCR産物における確認で全ての試験室において遺伝子型の判定が可能であった(図1)。

葉からのDNA抽出は、サンプル葉が成葉に近いものであったことから、抽出効率が果梗に比べて若干劣る試験室があったものの、抽出されたDNAはアガロースゲル及びPCR産物における確認で全ての試験室において遺伝子型の判定が可能であった。

果皮からのDNA抽出では、果実が凍結サンプルであったことから、果皮を剥離する工程がやや難しかったことと、果皮に果肉が多くついていると、多糖類等の不純物が多くなることから、抽出効率が落ちる試験室が多かった。このため、アガロースゲルによる視覚的確認が難しいケースがいくつかあったが、PCR増幅は10試験室において良好な結果が得られた。1試験室においては指定したプロトコルではPCR産物が確認できなかった。このため、PCR反応液に供試するDNA量を1/10に、PCRサイクル数を35回から40回に、PCR産物の希釈倍率を20倍から10倍にする等の変更を加えた結果、PCR産物が確認できた。このことから、抽出されたDNAに多糖類等の不純物が多く混じていたことが、指定したプロトコルでうまくいかなかった原因であると考えられた。

以上のことから、葉及び果梗のDNA抽出法については再現性が確認された。果皮についても1試験室で指定したプロトコルでは良好な結果が得られなかったが、PCRに供試するDNA量を1/10にし、PCRサイクル数そしてPCR産物の希釈倍率を変更して解析可能となったことから、果実から果皮を採取する課程において果肉が多く付着していたことによって多糖類等の夾雑物が抽出効率を低下させていたものと考えられる。おうとうのDNA品種識別技術の手順書には「なるべく果肉を取らないように」という記述があるため、①原因がDNA抽出法の問題ではないと考えられること、②他の10試験室で良好な結果が得られていることから、再現性があると判断された。

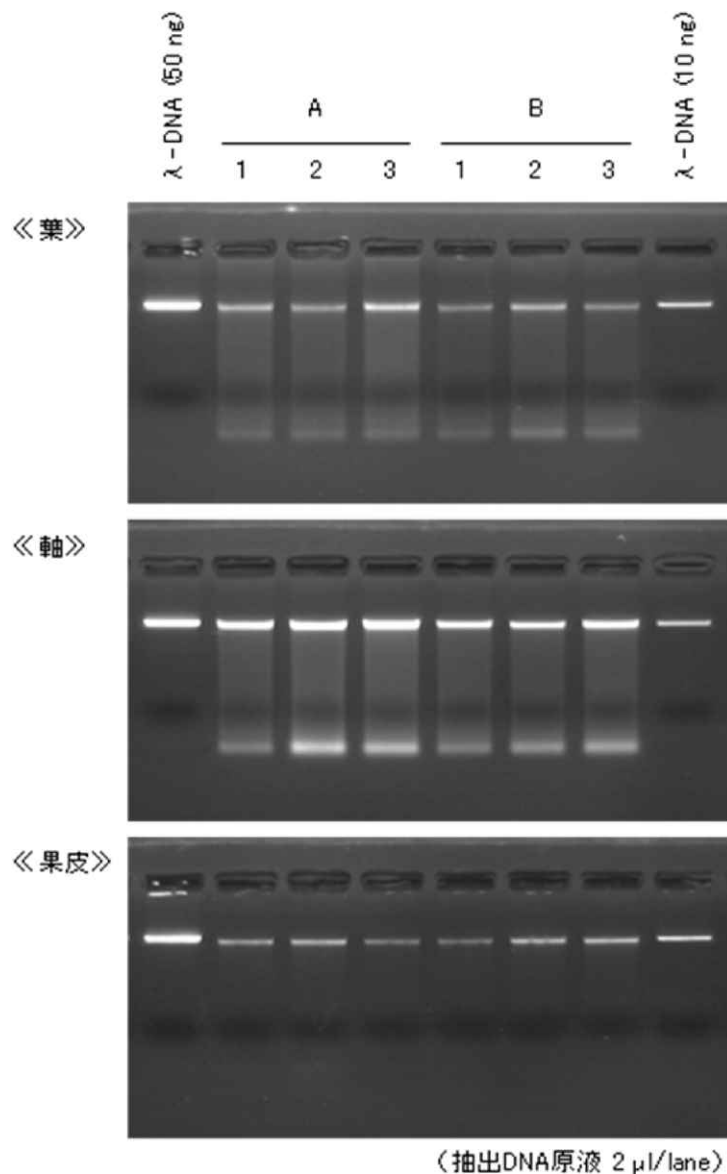


図.1 DNA抽出法の再現性確認の結果(食品総合研究所の例)

### C. マーカー性能の再現性確認

マーカーの独立性及びNull対立遺伝子頻度が確認されていることから、試験方法2(資料5参照)で再現性の確認をおこなった。

サンプルDNAは基準品種となる「佐藤錦」と「紅秀峰」を供試した。各試験室はサンプルDNAと10のSSRマーカーのそれぞれの組み合わせを6反復、合計120サンプルの分析をおこなった。

その結果、全体的には試験室内の反復においては再現性が高いデータ値が得られた。個別のマーカーとしては8マーカーでは全試験室で全てのサンプルDNAから一定のデータの範囲と解釈できる(各試験室内における誤差が1bp未満の)結果が得られた(資料6-1、図2参照)。

残りの2マーカーにおいては10試験室で再現性の高いデータが得られたものの、1

試験室において一定のデータの範囲と解釈することがやや難しい（各試験室内における誤差が1.06bpと1.14bpの）結果が得られた。その原因としては、①2つのマーカータとも「佐藤錦」と「紅秀峰」間のデータにやや差がみられたこと、②それぞれの品種の反復内では再現性の高いデータが得られたこと、③その2つのマーカータでは「佐藤錦」と「紅秀峰」のサンプルDNAを別々の日にPCRとフラグメント解析を実施した(試験担当者に確認)こと、④再現性の高い結果を出した10試験室においても、「佐藤錦」と「紅秀峰」を別々の日に実施したマーカータにおいては同様の傾向が見られたことから、上述の2マーカータにおけるデータの特徴は、サンプルDNAを別の日に（または別のランで）おこなったことによる機械的な誤差である可能性が考えられた。確認のために当該試験室で2品種を同一日にPCRとフラグメント解析を実施した結果、再現性の高いデータが得られた。

以上のことから、8マーカータについては11試験室で全てのサンプルDNAから再現性の高い結果が得られたため、再現性が確認された。

残りの2マーカータについても、一定のデータの範囲と解釈することがやや難しい結果が得られたものの、①10試験室で再現性の高い結果が得られたこと、②誤差の原因がマーカータの性能によるものではないと考えられることから、再現性があると判断された。

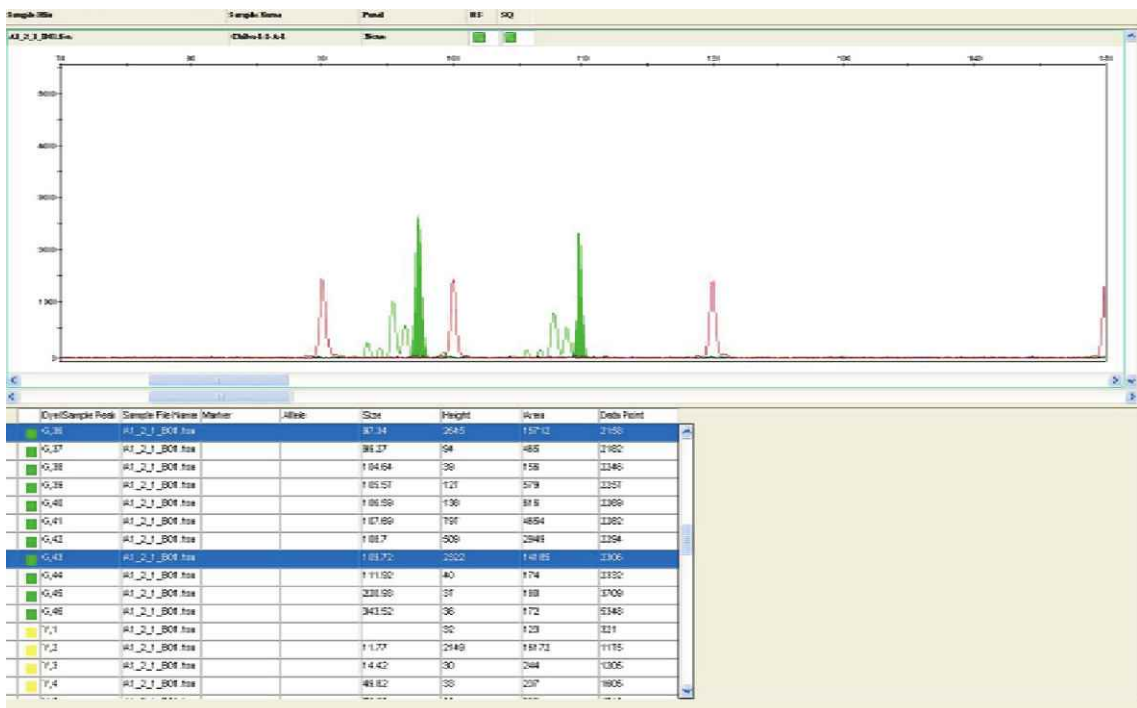


図.2 マーカータ性能の再現性確認の結果（千葉県農業総合研究センターの例）



## 4. 各試験室から提出されたデータ及び報告

### A. DNA 抽出法の妥当性確認試験において

DNA の濃度及び質が確認できる資料として、11 試験室からアガロースゲルによる電気泳動写真の提出を受けた。

抽出した DNA で PCR 増幅が確認できる資料として、11 試験室からフラグメント解析による波形図の提出を受けた。

### B. マーカーの妥当性確認試験において

11 試験室から各マーカー、サンプル DNA ごとのフラグメント解析による波形図の提出を受けた。提出に当たり、画面の幅を 80b で統一すること、波形のピークの先端が見えるようにすること、どの波形をデータとして採用したか分かるようにすること等を申し合わせた。

波形図から分析者がピークと判断したデータ値を一覧表にしたものの提出を受けた。

### C. 共通事項

①試験に使用した機器（機種名）及び試薬名

表 2 参照。

②試験中に気付いた点

・果皮の DNA 抽出において、手順書通りにおこなったところ、アガロースゲル及び PCR において、DNA が確認できなかった。このため、供試した果皮の量を 1/2 にし、PCR 反応組成と PCR サイクル数そして PCR 産物の希釈倍率を変更して解析可能となった。

・GeneMapper において、SQ(Sizing Quality)が常に赤(Low Quality)となる（primer peak が検出・認識され、サイズの標識がずれる）ため、全て手動で設定した。



表2：各試験室の使用機器一覧

	サーマルサイクラー	シーケンサー	キャピラリー数	キャピラリー	ポリマー	サイズスタンダード
種苗管理センター	PE Applied Biosystems 9700	ABI 310	1本	310 Capillaries 47 cm×50um	POP-4	400HD ROX
果樹研究所	PE Applied Biosystems 9700	ABI 3100xl	16本	3100/3130xl 36cm Capillary Array	POP-4	400HD ROX
食品総合研究所	BIO-RAD iCycler	ABI 310	1本	310 Capillaries 47 cm×50um	POP-4	400HD ROX
消費安全技術センター	PE Applied Biosystems 9700	ABI 3130xl	16本	3100/3130xl 50cm Capillary Array	POP-7	400HD ROX
山形県農業総合研究センター	PE Applied Biosystems 9700	ABI 310	1本	310 Capillaries 47 cm×50um	POP-4	400HD ROX
福島県農業総合センター	PE Applied Biosystems 9700	ABI 3130	4本	3100-Avant/3130 36cm Capillary Array	POP-7	400HD ROX
茨城県農業総合センター	PE Applied Biosystems 9700	ABI 3130xl	16本	3100/3130xl 36cm Capillary Array	POP-4	400HD ROX
千葉県農業総合研究センター	PE Applied Biosystems 9700	ABI 3130xl	16本	3100/3130xl 50cm Capillary Array	POP-7	400HD ROX
和歌山県農林水産総合技術センター	Gene Amp PCR System 2700	ABI 310	1本	310 Capillaries 47 cm×50um	POP-4	400HD ROX
福岡県農業総合試験場	アステック PC-808-02	ABI 310	1本	310 Capillaries 47 cm×50um	POP-4	400HD ROX
宮崎県総合農業試験場	PE Applied Biosystems 9700	ABI 3100	4本	3100-Avant/3130 36cm Capillary Array	POP-4	400HD ROX

## 付属参考3：資料等

### 1. 資料

#### 資料1 マーカーの独立性について

数多くの品種を識別するためや品種識別の精度を確保するために、2個以上のDNAマーカーを用いる場合がある。この場合は用いるマーカーが遺伝的に独立に分離することをまず確かめる必要がある。この場合における独立とは、複数の遺伝子座のそれぞれの対立遺伝子の組合せが、ランダムに起こり、確率の法則に従うことである。逆に、マーカーが連鎖している(独立していない)場合は特定の組合せの頻度が有意に高くなる。連鎖しているマーカーでは、2つのマーカー間の距離が近いためにマーカー間での組換えが、他の染色体に座乗するマーカーに比較して、まれにしか起こらない。従って対立遺伝子の組合せがランダムに起きずに、特定の対立遺伝子どうしの組合せの割合に高低が生じる。もし用いるマーカーが連鎖していると、複数のマーカーの分析結果から得られるマーカー遺伝子型に違いがなく、品種識別の精度の向上にはつながらない。

独立なマーカーセットを簡単に得るには、染色体数に収束した連鎖地図上の連鎖群から一つずつのマーカーを選ぶことである。しかしながら、染色体数に収束した連鎖地図が存在しない場合、使用するマーカーの連鎖地図上の位置が特定されていない場合、さらには、染色体数よりも多い数のマーカーセットを用いる必要がある場合には、使用するマーカー間の独立性を自身で検定する必要がある。使用するマーカーセットについて解析可能な分離集団がある場合には、各マーカー遺伝子型を分離個体の観察値と期待値とを算出し、カイ2乗検定により観察値と期待値の間に有意な差がないことを確かめる。例えば、AとBの2つの遺伝子座にそれぞれの対立遺伝子を $a_1$ 、 $a_2$ 、 $b_1$ 、 $b_2$ とし、 $a_1$ と、 $b_1$ の遺伝子頻度を $p$ 、 $q$ とすると、 $a_2$ と、 $b_2$ はそれぞれ $1-p$ 、 $1-q$ となる。したがって $(a_1b_1)$ 、 $(a_1b_2)$ 、 $(a_2b_1)$ 、 $(a_2b_2)$ 各ハプロタイプの頻度は $pq$ :  $p(1-q)$ :  $(1-p)q$ :  $(1-p)(1-q)$ となるが、観察値がこの頻度比べて大きくなれば認められれば、連鎖している可能性が示唆され、その使用を避けるべきである。また分離集団が得られない場合には、当該作物における品種群のマーカー遺伝子型を決め、このデータを基に個々のマーカーの出現頻度を算出し、分離集団のときと同様にマーカー間の観察値と期待値とを比較する。いずれの場合でも、有意水準は一般的に用いられている5%水準で良いと考えられる。

#### マーカーの独立性が確認されていない場合

独立性が確認されていないマーカーを使用したDNA品種識別では、2つのサンプルの分析結果に差があれば、それぞれのサンプルは異なる品種であるということが(それぞれの品種に使用したマーカーにおいて品種内多型がなければ)可能であるが、分析結果に差がなかった場合、「異なる品種が供試された全てのマーカーで同じ結果になる確率」を計算することができないため、品種識別率(同一品種である確率が0.01%等)を算出することができない。

このようなマーカーを用いて、分析結果から品種を特定するためには、①サンプル

ルがいくつかの候補（の品種）に絞られていること、②その候補の全てがそのマーカーで作成されたデータベースに載っていること、③そのデータベース上で少なくとも候補となる品種は他の全ての品種と識別できること、の条件を満たしている必要がある。

表3：マーカーの独立性の確認の有無と品種同定

	マーカーの独立性	
	確認済み	未確認
サンプル間で分析結果が違う場合	異なる品種であるといえる。 (※)	異なる品種であるといえる。 (※)
サンプル間で分析結果が同じ場合	品種識別率から同一品種である確率を算出することができる。	分析結果が既知の品種のみが分析品種の候補であり、その品種群に分析結果が同じ品種がない場合、同一品種であるといえる。

※品種内多型等の問題がない場合。

## 資料2 マーカー領域に Null 対立遺伝子がほぼ無いことの確認

遺伝子型を基に行う法医鑑定において、検査を行って同一性や血縁関係を否定できればそれで十分であるが、否定できない場合（同一であるとき）には確率計算が必要になる。この場合、検査対象となる遺伝子座について、その集団が Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) にあることが前提となる。また効率的な個人識別を行うためには、検査する遺伝子座の適切な選択が不可欠である。一般的に多型に富み、遺伝子頻度のばらつきがよい遺伝子座が望ましい。しかし、あまりに高多型であると判定の困難さを招き、データベースの信頼性においても問題が生ずるため、実際には 8~10 前後のアリルを有するマイクロサテライト (SSR) が個人識別に用いられている。

代表的な多型性の指標にヘテロ接合度 (Heterozygosity) と多型情報含有値 (Polymorphic Information Contents : PIC) がある。ヘテロ接合度は、「集団においてヘテロ接合体を有する者の割合」であり、「集団から任意の 2 つのアリルを取り出した場合、その 2 つが異なる確率」である。以下の式 (1) で計算できる。多型情報含有値は、ある遺伝子座において子の 2 つのアリルがそれぞれどちらの親に由来するかを結論できる確率であり、以下の式 (2) で計算できる。

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \quad (1)$$

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum \sum 2(p_i p_j)^2 \quad (2)$$

PIC が高いことは、家系調査による疾患関連遺伝子の解析において有利となる。また法医学領域において PIC は、特に当該遺伝子座の血縁鑑定に対する有用性の指標として理解されている。

Null 対立遺伝子は、ある遺伝子座において検出できない対立遺伝子をいう。Null 対立遺伝子は、SSR 遺伝子座において、一部の遺伝子座だけが Hardy-Weinberg 平衡から逸脱している場合などの原因の 1 つである。SSR 遺伝子座では、Null 対立遺伝子が片方もしくは両方のプライマーのアニーリングサイトの変異が原因でしばしば発生し、SSR 対立遺伝子の増幅を妨げる。特にある 1 つの種よりクローニングされた SSR のプライマーを用いて、異なる種や属をタイピングしようとするときにこの問題はおきることが多い。個体 (品種) 識別を行う場合、Null 対立遺伝子の存在は遺伝子型から判別がつかないため、Null 対立遺伝子を含まない遺伝子座を DNA マーカーとして選択することが望ましい。ある集団における Null 対立遺伝子頻度 (Null Allele Frequency) は、Null 対立遺伝子が存在するとヘテロ接合度の予測値 (Expected Heterozygosity :  $H_e$ ) より観測値 (Observed Heterozygosity :  $H_o$ ) が減少する関係から推定する。通常は、集団の遺伝子型データから解析ソフト (Genepop や CERVUS など) を用いて求める。

### 資料3 フラグメントサイズの表示形式と誤差の範囲

#### 1. フラグメントサイズの表示形式

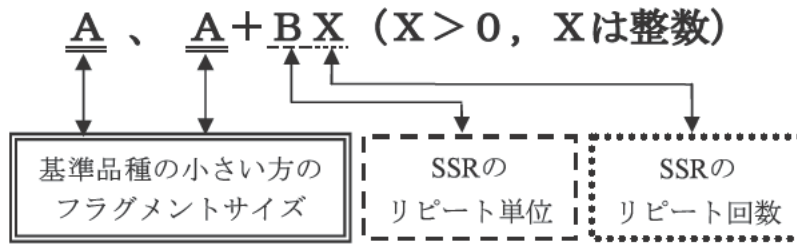
SSR 分析において読み取られたフラグメントサイズは、サイズスタンダードのピーク間の距離を基に計算された数字であり、塩基数をカウントした数字ではない。このため、シーケンサーの機種、サイズスタンダード等の種類、キャピラリーの種類、ポリマーの種類やプライマーに付加する蛍光色素等の違いによって若干の誤差が生じることから、同じ品種でも異なるフラグメントサイズを検出することがある。

このため、データベースを作成する場合や他の機関のデータと比較する場合においてはフラグメント解析で得られたフラグメントサイズをそのまま品種のデータとすることは難しいと考えられる。この誤差を解消し、これらのデータを共通に扱えるようにするために、フラグメントサイズの基準となる品種（基準品種）を設定し、分析する品種のフラグメントサイズは基準品種のフラグメントのピークからの距離で表すことを基本とした表示形式を以下に提案する。

具体的には基準品種において、SSR マーカーを用いて検出されたフラグメントのうち、最もサイズの小さいフラグメントをその SSR マーカーのフラグメントサイズの基準とする。そして、基準品種の他のフラグメント（基準品種に複数のピークがある場合）はそのフラグメントのピークからの距離で表示する。次に、分析する品種の（複数の）フラグメントのうち基準品種の（複数の）フラグメントと最も近いフラグメント（これを分析フラグメント①とする）を選び、その2つのフラグメントのピーク間の距離を計算する。分析する品種のその他のフラグメントは分析フラグメント①からの距離で表示する。これは、フラグメントサイズの誤差が、フラグメントのピーク間の距離では小さいことを利用したものである。

SSR マーカーによるフラグメントサイズは通常 SSR における塩基のリピート単位ごとに増減する（2 塩基リピートの SSR なら 2 塩基単位、3 塩基リピートの SSR なら 3 塩基単位で増減する）ことから、フラグメントサイズも塩基のリピート単位で増減する表示形式とした。

以下に例として、基準品種のフラグメントサイズの表示形式を示した。対立遺伝子がヘテロの場合、2 種類の増幅産物が検出されるが、サイズの小さい方を「A」、大きい方を「A」に「SSR のリピート単位（2 塩基リピートなら 2）」と「SSR のリピート回数（ $X > 0$ 、 $X$  は整数）」の積を加えた数値で表す。フラグメント解析ではフラグメントサイズは小数点第 2 位まで表示されるが、実際の塩基数は整数であるため、四捨五入して「X」を整数値にする。



A + B Xの値は、実際のフラグメント解析で得られたデータとは（小数点第2位まで表示されるため）、完全には一致しないことが多い。一致しない場合はデータ値とA + B Xの値が最も近くなる「X（整数）」を選ぶ。

### 基準品種のフラグメントサイズの表示方法（例）

\* SSRは2塩基リピート。  
 \* フラグメントサイズは「100.2bp」と「110.4bp」。  
 上記の条件より  
 「A = 100.2」となり、  
 「A + B X」は「100.2 + 2 × X」となる。  
 よって「100.2 + 2 × X = 110.4」より「X = 5.1」となる。  
 Xは整数なので5.1を四捨五入して5とする。  
 よって、100.2bpと110.4bpはA、A + 10と表示される。

### 基準品種のフラグメントサイズを基にした分析品種の表示方法（例）

\* SSRは2塩基リピート。  
 \* 基準品種のフラグメントサイズは「100.2bp」と「110.4bp」であり、A、A + 10と表示。  
 \* 分析品種のフラグメントサイズは「106.4bp」と「112.6bp」  
 上記の条件より  
 基準品種と分析品種のフラグメントサイズで最も近いのは基準品種の「110.4bp」と分析品種の「112.6bp」であることから  
 $112.6 - 110.4 = 2.2$   
 よって112.6は「A + 10 + 2.2」となり「A + 12.2」となる。  
 B Xは整数であることから四捨五入して、「A + 12」となる。  
 「112.6bp」が「A + 12」と表示されることから  
 $112.6 - 106.4 = 6.2$ となり、  
 「106.4bp」は「A + 12 - 6.2」となり、「A + 5.8」となる。  
 B Xは整数であることから四捨五入して、「A + 6」となる。  
 よって、基準品種のフラグメントサイズを基にした分析品種の表示形式は「A + 6」、「A + 12」となる。



## 2. 上記の表示形式ではフラグメントサイズが正確に反映されない例

上記のフラグメントサイズの表示形式を適用した例を資料4-1に示した。資料4-1では、全てのデータが本来のフラグメントサイズを反映した表示形式にすることができた。ほとんどのデータは上記の表示形式で本来のフラグメントサイズを反映できるものと考えられるが、そうでないものもある。その例を資料4-2に示した。ここでは試験室Yと試験室Iのデータはフラグメントのピーク間の距離を見る限り安定した結果であるが、ピーク間の距離の平均が12.51bpであるため、わずかな誤差によって四捨五入をした最終的な表示に差が生じている。

データが塩基数の単位にならないのは、フラグメント解析は塩基数をカウントするのではなく、サイズスタンダードのピーク間の距離からフラグメントサイズを算出しているためである。このような算出方法であるため、①(塩基は種類によってサイズが異なるため)塩基配列に偏りがある場合や②フラグメントのピーク間やフラグメントとサイズスタンダードのピーク間の距離が長い場合は誤差が大きくなりやすいと考えられる。

## 3. 許容される誤差の範囲

資料4-2で示したように、最終的な表示データは異なるものの、反復したデータ間の誤差が小さい場合、誤差が一定の範囲内であれば試験者の判断によって同一のフラグメントサイズとすることができるかについて検討した。

フラグメントサイズは、通常のSSRにおいては反復配列のリポート単位ごとに増減するため、リポート単位を同一のフラグメントサイズと見なせる範囲とする(2塩基リポートなら $\pm 1\text{bp}$ )ことも考えられたが、塩基のInsertion、Deletion等により、リポート単位によらないフラグメントサイズの増減(この場合 $A+BX+\alpha$ と表示)もあるため、許容される誤差の範囲は1bp( $\pm 0.5\text{bp}$ )が適切であると考えられた。

### データの誤差の許容範囲

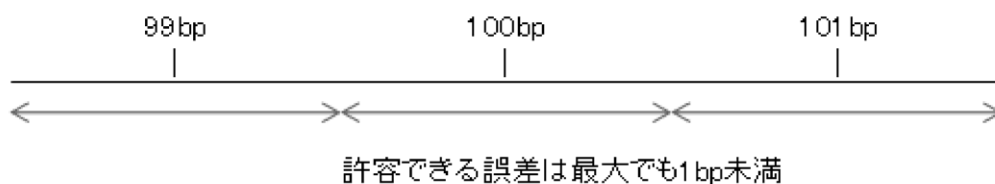


図3：データの誤差の許容範囲のイメージ

次におうとうの試験室間共同試験のデータから各試験室内でのフラグメントサイズの誤差(最大値と最小値の差)を比較した結果を表4に示した。

表4：試験室内のアリルの誤差

試験室名	NC	NI	FN	FA	YA	FS	I	CH	WA	FO	MI	ALL
誤差平均	0.21	0.27	0.24	0.17	0.20	0.33	0.17	0.16	0.29	0.29	0.31	1.78

注1：10プライマーにおける18のフラグメントサイズの誤差の平均。単位はbp。

表 4 より、各試験室の誤差の平均は 1bp を大きく下回っており、同一のフラグメントサイズと見なすための許容される誤差は 1bp ( $\pm 0.5\text{bp}$ ) とすることが適当であると考えられる。

また、全試験室間のデータの誤差の平均は 1.78bp であることから、異なる試験室でおこなったフラグメントサイズを直接比較することは、許容される誤差を超えることから、すべきではないと考えられる。

#### 4. 試験者による判定

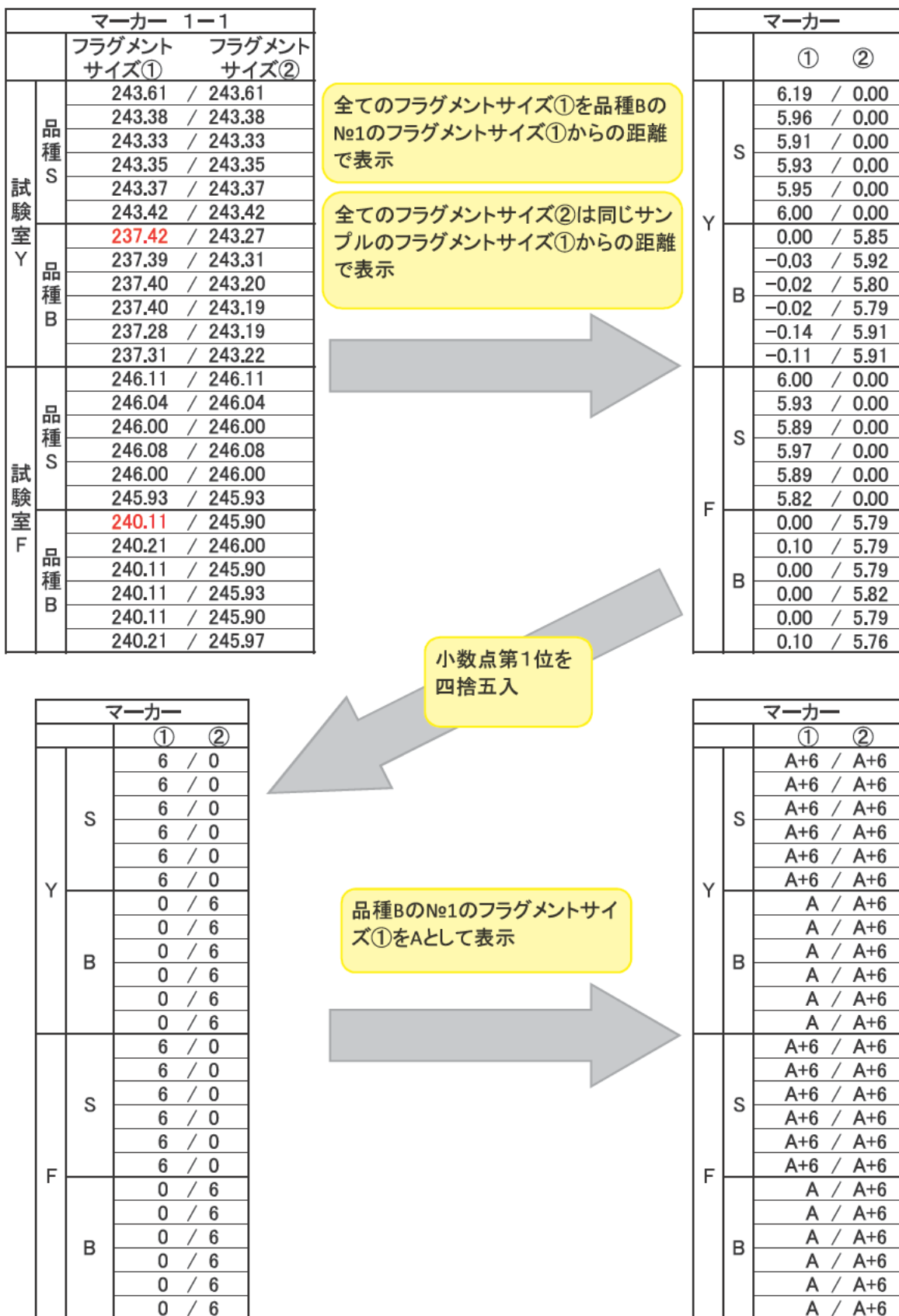
以上のことから、資料 4-2 で示したように、前述の表示形式が単純には当てはまらない場合は、以下の条件を満たしていることを確認してから、試験者が同一のフラグメントサイズであるか否かを判断することになる。

- ・試験室内で同一日に反復したフラグメントのピーク間の差が小さい(1bp 未満)こと。

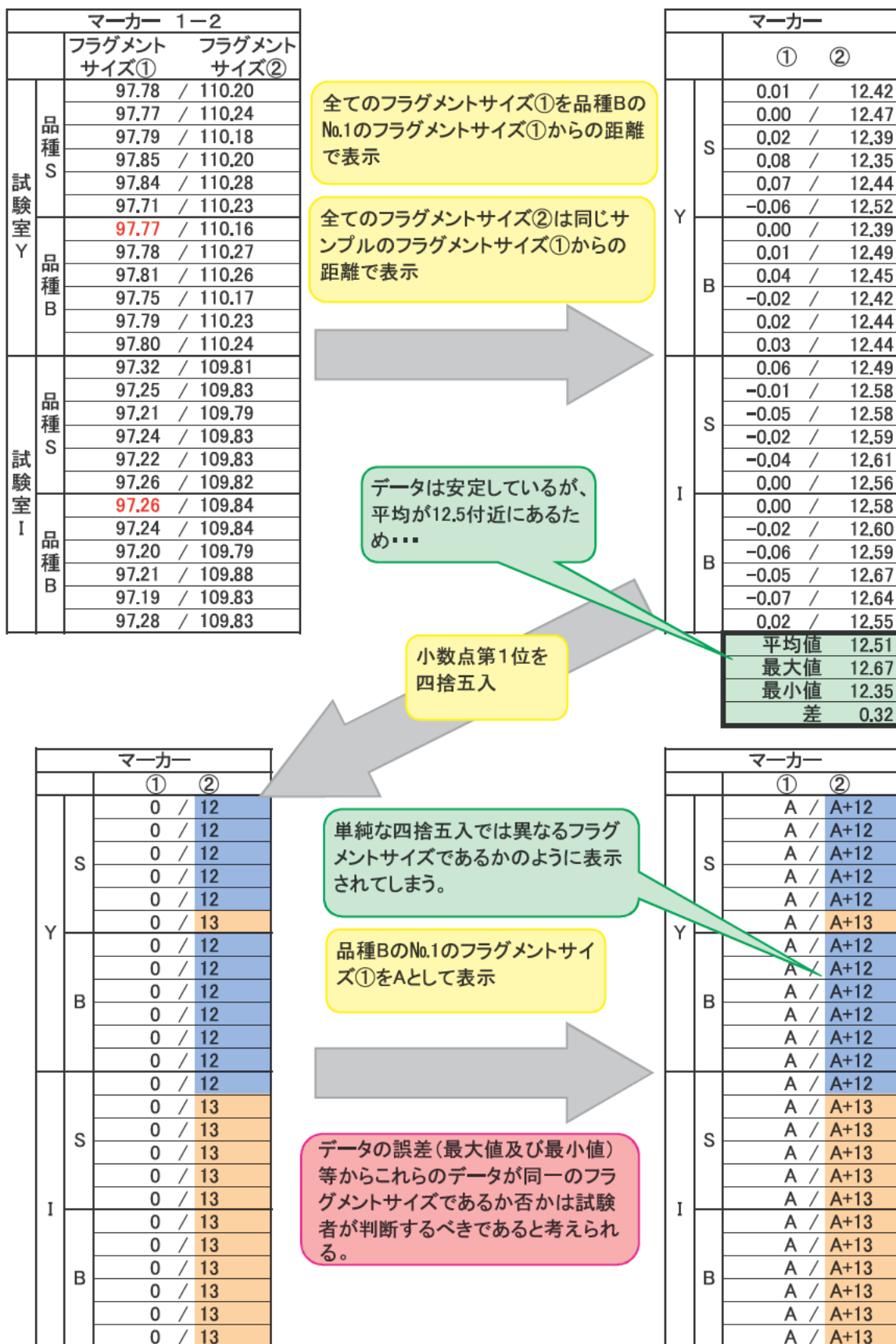
なお、試験者による判定をおこなう前に誤差を最小限にするための注意事項を確認すべきである (10 ページの「D. SSR マーカー性能の再現性確認」参照)。



資料4-1 資料3における表示形式の適用例



資料4-2 資料3の表示形式ではフラグメントサイズが正確に反映されない例



## 資料5 マーカー性能の再現性確認方法について

### 1. 試験方法1

この方法は SSR 分析によって検出されるフラグメントサイズ(アリル)の再現性を確認する方法であり、これにより SSR マーカーの妥当性確認をおこなう。あるマーカーA を用いてある品種 c と d の DNA を PCR すると、品種 c では 138bp と 150bp の、品種 d では 150bp と 173bp のフラグメントサイズが検出される場合、他機関においてもその結果が再現できるか(厳密にはフラグメントサイズの再現性ではなく、フラグメントのピーク間の距離の再現性である)を確認するやり方である。

試験方法1は各品種のフラグメントサイズ(アリル)を再現性確認の対象としていることから、アリル数(フラグメントサイズの種類数)が多くなると試験規模が大きくなる。また再現性が確認されたフラグメントサイズ(アリル)以外は妥当性確認がされていないことになる。ただし、試験方法1では Null 対立遺伝子がある SSR マーカーであっても、妥当性確認をおこなうことができる。

フラグメントサイズの再現性確認には2つの方法が考えられる。1つ目は、マーカーAを用いて150bpと173bpのフラグメントサイズが得られるのは品種d、品種e・・・、というフラグメントサイズの組み合わせで確認する方法である。2つ目はマーカーAを用いて138bpのフラグメントサイズが得られるのは品種a、品種b・・・、150bpが得られるのは品種b、品種c、・・・、のように個々のフラグメントサイズに分けておこなうやり方がある。SSR マーカー当たりのアリル数が多い場合は、後者が適していると考えられる。

マーカーの独立性が確認されていなくても、試験方法1をおこなうことは可能であるが、品種識別率を出すことができないことに留意しなければならない。(資料1)

表5：試験方法1の例

マーカーAで5種類、マーカーBで3種類のアリルの再現性を確認する。

品種名	マーカーA	マーカーB
品種a	138 / 173	216 / 224
品種b	138 / 138	216 / 224
品種c	138 / 150	216 / 224
品種d	150 / 173	218 / 224
品種e	150 / 173	224 / 224
品種f	140 / 152	216 / 218

### 2. 試験方法2

試験方法2は「プライマーが目的のローカスに確実にアニーリングすること」が再現性を確認すべき SSR マーカーの性能であるという考え方である。SSR マーカーが目的のローカスにアニーリングしさえすれば(PCR条件等が適正であれば)、結果的に目的のアリルを増幅することができるため、検出されるフラグメントサイズはその品種のアリル(遺伝子型)をほぼ正確に表しているといえる。そのため、アリルごとの再現性を確認する必要

はないと考えられる。

異なる品種を用いても、プライマーが目的のローカスにアニーリングすることを証明するためには、そのローカスに Null 対立遺伝子がほぼ無いことが確認されていることが必要である（資料2参照）。

試験方法2は基準品種等（1品種でもよい）を供試して、想定されたフラグメントサイズが検出されるかで再現性を確認する。他のアレルについては確認する必要がないので、試験規模が小さくてすむ。

この方法のもう一つのメリットは、一度試験室間共同試験で妥当性が確認された SSR マーカーは、新品種等において未知のアレルが検出された場合でもアレルごとの再現性確認を必要としないことである。

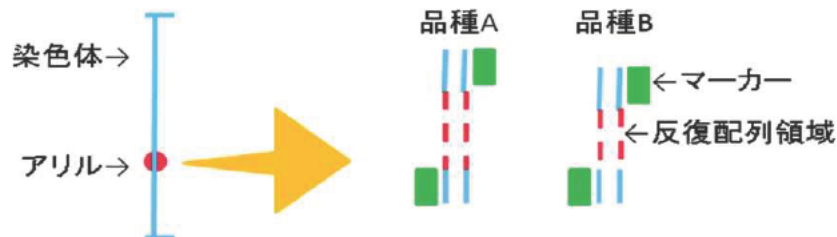


図4：試験方法2のイメージ図

プライマーが目的のローカスに確実にアニーリングすることを確認できれば品種Aと品種Bのアレルの違いはマーカーの性能に影響しない。

表6：試験方法1と2の比較

	試験方法1	試験方法2
再現性確認の対象	各マーカーの全アレル (対立遺伝子)	各マーカーが対応するローカス (遺伝子座)
試験の規模	マーカー数×識別品種のアレル数×反復数×機関数。 (試験規模大)	マーカー数×1～数品種×反復数×機関数。(試験規模小)
新マーカーを加えたとき	新マーカー×識別品種のアレル数×反復数×機関数で再度妥当性確認。	新マーカー×1～数品種×反復数×機関数で再度妥当性確認。
既存のマーカーのアレルが追加される時	追加されたアレル数×追加された品種数×反復数×機関数で再度妥当性確認。	追加の妥当性確認なし。
アレルの再現性確認	供試品種の全アレルを試験室間共同試験で直接確認する。	供試品種の特定のアレルを試験室間共同試験で直接確認する。



資料6-1: 試験室及びマーカーごとのフラグメントサイズ(おとうの試験室間共同試験における)

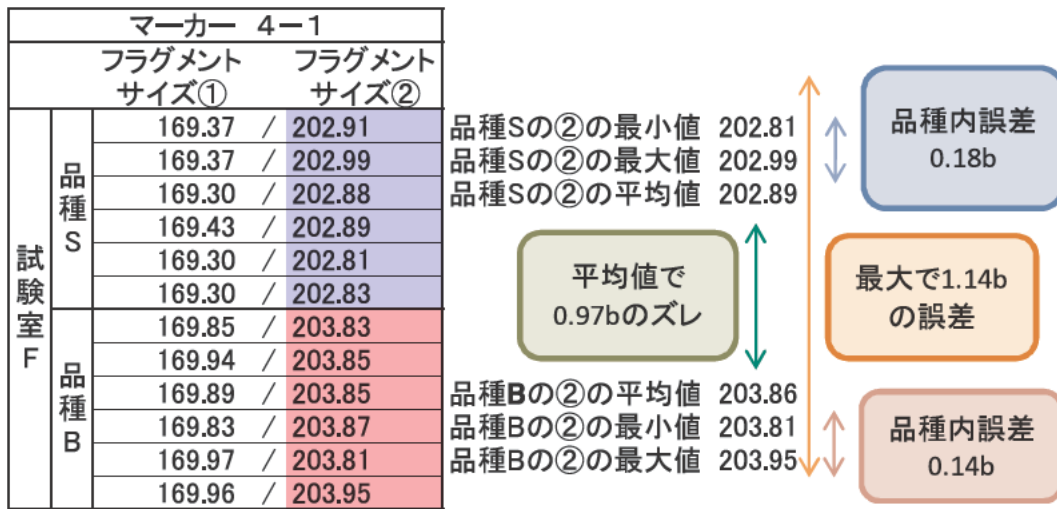
フラグメントサイズ	マーカー名																							
	1-1		1-2		2-1		3-1		4-1		4-2		5-1		6-1		7-1		8-1					
	①	②	①	②	①	②	①	②	①	②	①	②	①	②	①	②	①	②	①	②				
試験室A	238.17	244.25	97.21	109.89	118.63	142.97	138.11	168.94	203.34	165.81	147.11	151.00	115.99	122.24	160.22	164.35	155.72	157.75						
最大値	238.05	244.00	97.07	109.71	118.30	142.84	137.97	168.57	203.00	165.53	146.71	150.79	115.79	122.12	160.11	164.17	155.62	157.62						
最小値	0.12	0.25	0.14	0.18	0.33	0.13	0.14	0.37	0.34	0.28	0.40	0.21	0.20	0.12	0.11	0.18	0.10	0.13						
差	237.64	243.57	97.18	109.79	117.96	142.28	137.89	168.61	203.06	165.69	147.16	151.18	115.70	122.25	160.25	164.24	155.43	157.50						
試験室B	237.20	243.31	97.09	109.65	117.86	142.19	137.42	168.41	202.84	165.56	146.99	151.07	115.58	121.64	159.92	164.02	154.92	156.87						
最大値	0.44	0.26	0.09	0.14	0.10	0.09	0.47	0.20	0.22	0.13	0.17	0.11	0.12	0.61	0.33	0.22	0.51	0.63						
最小値	238.32	244.19	97.37	109.93	118.46	142.97	137.90	168.70	202.93	165.90	147.31	151.37	116.01	122.36	160.47	164.60	156.07	158.15						
差	238.12	244.02	97.08	109.69	118.23	142.69	137.64	168.38	202.69	165.65	146.98	151.14	115.99	122.22	160.23	164.23	155.84	157.89						
差	0.20	0.17	0.29	0.24	0.23	0.28	0.26	0.32	0.24	0.25	0.33	0.23	0.02	0.14	0.24	0.37	0.23	0.26						
試験室D	239.76	245.47	97.54	109.89	119.64	144.37	138.56	169.36	203.07	166.82	147.93	152.02	116.32	122.77	161.51	165.48	157.36	159.43						
最大値	239.52	245.29	97.37	109.75	119.46	144.28	138.47	169.24	202.96	166.65	147.82	151.89	116.24	122.40	161.34	165.28	157.08	159.17						
最小値	0.24	0.18	0.17	0.14	0.18	0.09	0.09	0.12	0.11	0.17	0.11	0.13	0.08	0.37	0.17	0.20	0.28	0.26						
差	237.42	243.61	97.85	110.28	118.32	142.82	138.10	168.57	202.31	165.94	147.38	151.47	116.22	122.36	160.54	164.54	156.51	158.58						
試験室E	237.28	243.19	97.71	110.16	118.20	142.71	137.85	168.42	202.15	165.79	147.24	151.38	115.99	122.03	160.43	164.39	156.10	158.13						
最大値	0.14	0.42	0.14	0.12	0.12	0.11	0.25	0.15	0.16	0.15	0.14	0.09	0.23	0.33	0.11	0.15	0.41	0.45						
最小値	240.21	246.11	97.03	109.48	119.45	144.54	138.71	169.97	203.95	167.20	147.61	151.70	116.20	122.78	161.86	166.09	157.39	159.46						
差	240.11	245.90	96.89	109.35	119.22	144.38	138.52	169.30	202.81	166.93	147.48	151.62	116.10	121.72	161.59	165.50	157.21	159.26						
差	0.10	0.21	0.14	0.13	0.23	0.16	0.19	0.67	1.14	0.27	0.13	0.08	0.10	1.06	0.27	0.59	0.18	0.20						
試験室G	238.17	244.11	97.32	109.88	118.27	142.65	137.98	168.87	203.20	165.95	147.23	151.29	116.17	122.41	160.52	164.63	155.97	158.02						
最大値	238.04	243.92	97.19	109.79	118.03	142.51	137.73	168.70	203.08	165.71	147.11	151.24	116.08	122.30	160.32	164.36	155.73	157.79						
最小値	0.13	0.19	0.13	0.09	0.24	0.14	0.25	0.17	0.12	0.24	0.12	0.05	0.09	0.11	0.20	0.27	0.24	0.23						
差	239.54	245.36	97.40	109.81	119.50	144.22	138.55	169.27	203.07	166.65	147.88	151.92	116.22	122.66	161.36	165.41	157.14	159.13						
試験室H	239.46	245.24	97.32	109.70	119.23	144.11	138.36	169.11	202.91	166.41	147.78	151.82	116.12	122.36	161.27	165.18	156.83	159.04						
最大値	0.08	0.12	0.08	0.11	0.27	0.11	0.19	0.16	0.16	0.24	0.10	0.10	0.10	0.33	0.09	0.23	0.31	0.09						
最小値	237.90	244.24	97.39	109.86	118.41	142.76	137.90	168.65	202.85	165.95	147.34	151.24	116.10	122.36	160.36	164.53	155.93	158.01						
差	237.71	243.68	97.17	109.62	118.03	142.61	137.32	168.37	202.67	165.37	146.91	151.15	116.01	122.12	160.12	164.12	155.76	157.81						
差	0.19	0.56	0.22	0.24	0.38	0.15	0.58	0.28	0.18	0.58	0.43	0.09	0.09	0.24	0.24	0.41	0.17	0.20						
試験室J	238.67	245.19	97.50	110.04	119.13	143.80	138.31	168.88	203.08	166.56	147.27	151.27	116.07	122.39	160.35	164.38	156.75	158.74						
最大値	238.34	244.29	97.37	109.92	118.52	143.50	138.09	168.50	202.93	166.09	147.01	151.27	115.97	122.25	160.12	164.16	156.43	158.48						
最小値	0.33	0.90	0.13	0.12	0.61	0.30	0.22	0.38	0.15	0.47	0.26	0.00	0.10	0.14	0.23	0.22	0.32	0.26						
差	238.12	244.02	97.21	109.79	118.32	142.66	137.86	168.76	203.11	165.84	147.13	151.20	115.99	122.26	160.47	164.56	155.90	157.95						
試験室K	237.71	243.65	97.06	109.69	117.80	142.50	137.48	168.36	202.90	165.46	146.77	151.13	115.83	122.01	160.17	164.23	155.40	157.42						
最大値	0.41	0.37	0.15	0.10	0.52	0.16	0.38	0.40	0.21	0.38	0.36	0.07	0.16	0.25	0.30	0.33	0.50	0.53						
最小値	240.21	246.11	97.85	110.28	119.64	144.54	138.71	169.97	203.95	167.20	147.93	152.02	116.32	122.78	161.86	166.09	157.39	159.46						
差	237.20	243.19	96.89	109.35	117.80	142.19	137.32	168.36	202.15	165.37	146.71	150.79	115.58	121.64	159.92	164.02	154.92	156.87						
差	3.01	2.92	0.96	0.93	1.84	2.35	1.39	1.61	1.80	1.83	1.22	1.23	0.74	1.14	1.94	2.07	2.47	2.59						

上表はアウトウの2品種(佐藤錦と紅秀峰)を10マーカーを用いて11試験室がそれぞれ6反復ずつフラグメント解析をおこなった結果である。最大値、及び最小値は各試験室のフラグメント解析で検出された同一のアリルからのフラグメントサイズの最大値、及び最小値を示す。①、②はそれぞれそのマーカーで検出されたアリルの種類を示す。マーカー3-1、4-2については供試した2品種では遺伝子型がホモであったため、フラグメントサイズが1種類となっている。

上表から各試験室内でのフラグメントサイズの誤差は試験室Fのマーカー4-1の②と6-1の②以外は全て1bp以下(平均0.24bp)であり、安定した結果であった。また、試験室間では誤差が1bpを超えるものが多いことから、フラグメントサイズのデータ値を直接比較することは困難であると考えられた。このため、試験室間でフラグメントサイズを比較する場合は、資料3及び4で示したようにフラグメントサイズの基準となる品種(基準品種)を用いて、フラグメントサイズ間の距離でデータを表す形式にすることが必要であると考えられる。

また、試験室Fのマーカー4-1の②と6-1の②は供試した2品種をそれぞれ別の日にPCR・フラグメント解析をおこなったことによる誤差の拡大であることが確認された。

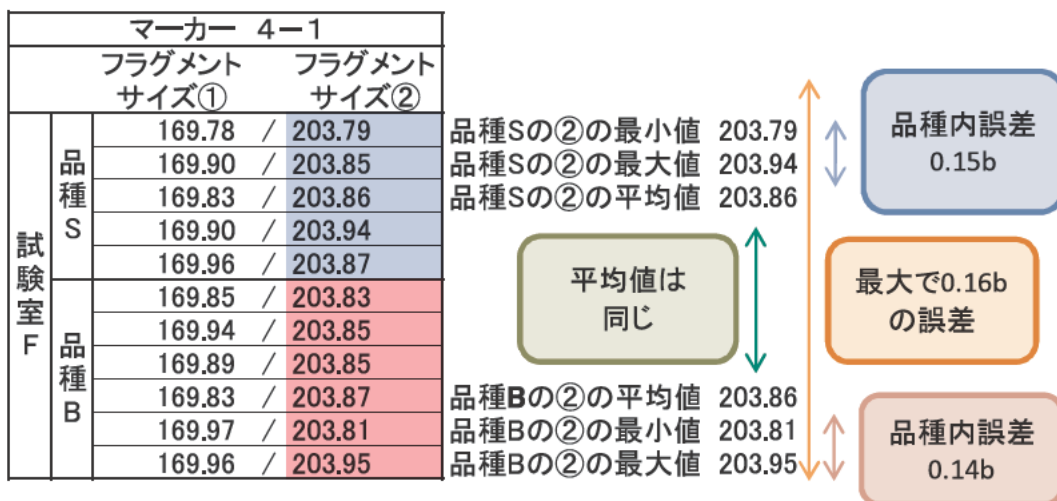
資料6-2 別の日にPCR・フラグメント解析をおこなったことによる誤差の例



※品種Sと品種Bは別の日にPCRとフラグメント解析をおこなった。  
 品種Sと品種Bではフラグメントサイズ②において、平均値で0.97b、最大で1.14bの差がみられた。  
 しかし、同一日におこなったそれぞれの品種の反復ではデータは安定していた。  
 これ以外にも同様の事例があったため、品種Sと品種Bのデータの差が大きくなったのは、  
 異なる日にPCRとフラグメント解析をおこなったことによる機械的な誤差であると考えられる。



同一日にPCR・フラグメント解析をおこなった結果



**資料6-3 シーケンサー、ポリマー及びキャピラリー類の誤差**

おとうの試験室間共同試験に参加した試験室で使用されたシーケンサー、ポリマー及びキャピラリーの種類別に検出されたデータを比較した。その結果、これらの機器・試薬類が同じであっても試験室が異なるとフラグメントサイズのデータを直接比較することは難しいことが示された。

このためフラグメントサイズのデータを直接比較する場合は、同一の試験室内でPCRフラグメント解析をおこなった結果を用いなければならない。

試験室間でデータを比較する場合は、資料3及び4で示したようにフラグメントサイズの基準となる品種(基準品種)を用いて、フラグメントサイズのピーク間の距離でデータを表示する形式にすることが必要であると考えられる。

また、キャピラリーが3100/3130x1 50cm Capillary Arrayの場合ではデータが比較的安定しているが、これを使用した試験室のみであったことを考慮すると、この結果をもって、3100/3130x1 50cm Capillary Arrayを使用して検出されたデータが試験室間でも直接比較できるということにはならないと考える。

シーケンサー機種	試験室数	フラグメントサイズ	マーカー名																
			1-1	1-2	2-1	3-1	4-1	4-2	5-1	6-1	7-1	8-1							
ABI 310	最大値	238.67	245.19	97.85	110.28	119.13	143.80	138.31	168.94	203.34	166.56	147.38	151.47	116.22	122.39	160.54	164.60	156.75	158.74
	最小値	237.28	243.19	97.07	109.62	118.03	142.61	137.32	168.37	202.15	165.37	146.71	150.79	115.79	122.03	160.11	164.12	155.62	157.62
	差	1.39	2.00	0.78	1.10	1.19	0.99	1.19	0.57	0.57	1.19	0.67	0.68	0.43	0.36	0.43	0.48	1.13	1.12
ABI 3100	最大値	238.12	244.02	97.21	109.79	118.32	142.66	137.89	168.76	203.11	165.84	147.16	151.20	115.99	122.26	160.47	164.56	155.90	157.95
	最小値	237.20	243.31	97.06	109.65	117.80	142.19	137.42	168.36	202.84	165.46	146.77	151.07	115.58	121.64	159.92	164.02	154.92	156.87
	差	0.92	0.71	0.15	0.14	0.52	0.47	0.47	0.40	0.27	0.38	0.39	0.13	0.41	0.62	0.55	0.54	0.98	1.08
ABI 3130	最大値	240.21	246.11	97.54	109.89	119.64	144.54	138.71	169.97	203.95	167.20	147.93	152.02	116.32	122.78	161.86	166.09	157.39	159.46
	最小値	238.04	243.92	96.89	109.35	118.03	142.51	137.73	168.70	202.81	165.71	147.11	151.24	116.08	121.72	160.32	164.36	155.73	157.79
	差	2.17	2.19	0.65	0.54	1.61	2.03	0.98	1.27	1.14	1.49	0.82	0.78	0.24	1.06	1.54	1.73	1.66	1.67

ポリマー	試験室数	フラグメントサイズ	マーカー名																
			1-1	1-2	2-1	3-1	4-1	4-2	5-1	6-1	7-1	8-1							
POP-4	最大値	239.54	245.36	97.85	110.28	119.50	144.22	138.55	169.27	203.34	166.65	147.88	151.92	116.22	122.89	161.36	165.41	157.14	159.13
	最小値	237.20	243.19	97.06	109.62	117.80	142.19	137.32	168.36	202.15	165.37	146.71	150.79	115.58	121.64	159.92	164.02	154.92	156.87
	差	2.34	2.17	0.79	1.10	1.70	2.03	1.23	0.91	0.91	1.19	1.17	1.13	0.64	1.05	1.44	1.39	2.22	2.26
POP-7	最大値	240.21	246.11	97.54	109.89	119.64	144.54	138.71	169.97	203.95	167.20	147.93	152.02	116.32	122.78	161.86	166.09	157.39	159.46
	最小値	239.52	245.29	96.89	109.35	119.22	144.28	138.47	169.24	202.81	166.65	147.48	151.62	116.10	121.72	161.34	165.28	157.08	159.17
	差	0.69	0.82	0.65	0.54	0.42	0.26	0.24	0.73	1.14	0.55	0.45	0.40	0.22	1.06	0.52	0.81	0.31	0.29

キャピラリー	試験室数	フラグメントサイズ	マーカー名																
			1-1	1-2	2-1	3-1	4-1	4-2	5-1	6-1	7-1	8-1							
310 Capillary	最大値	238.67	245.19	97.85	110.28	119.13	143.80	138.31	168.94	203.34	166.56	147.38	151.47	116.22	122.39	160.54	164.60	156.75	158.74
	最小値	237.28	243.19	97.07	109.62	118.03	142.61	137.32	168.37	202.15	165.37	146.71	150.79	115.79	122.03	160.11	164.12	155.62	157.62
	差	1.39	2.00	0.78	1.10	1.19	0.99	1.19	0.57	0.57	1.19	0.67	0.68	0.43	0.36	0.43	0.48	1.13	1.12
3100-36cm	最大値	240.21	246.11	97.21	109.79	118.32	142.66	137.89	168.76	203.11	165.84	147.16	151.20	115.99	122.26	160.47	164.56	155.90	157.95
	最小値	237.71	243.65	96.89	109.35	117.80	142.50	137.48	168.36	202.81	165.46	146.77	151.13	115.83	121.72	160.17	164.23	155.40	157.42
	差	2.50	2.46	0.32	0.44	1.65	2.04	1.23	1.61	1.14	1.74	0.84	0.57	0.37	1.06	1.69	1.86	1.99	2.04
3100/3130x1	最大値	238.17	244.11	97.32	109.88	118.27	142.65	137.98	168.87	203.20	165.95	147.23	151.29	116.17	122.41	160.52	164.63	155.97	158.02
	最小値	237.20	243.31	97.09	109.65	117.86	142.19	137.42	168.41	202.84	165.56	146.99	151.07	115.58	121.64	159.92	164.02	154.92	156.87
	差	0.97	0.80	0.23	0.23	0.41	0.46	0.56	0.46	0.36	0.39	0.24	0.22	0.59	0.77	0.60	0.61	1.05	1.15
3100/3130x1 50cm	最大値	239.76	245.47	97.54	109.89	119.64	144.37	138.56	169.36	203.07	166.82	147.93	152.02	116.32	122.77	161.51	165.48	157.36	159.43
	最小値	239.46	245.24	97.32	109.70	119.23	144.11	138.36	169.11	202.91	166.41	147.78	151.82	116.12	122.36	161.27	165.18	156.83	159.04
	差	0.30	0.23	0.22	0.19	0.41	0.26	0.20	0.25	0.16	0.41	0.15	0.20	0.20	0.41	0.24	0.30	0.53	0.39

※①、②はアリの種類を示す。



### 資料6-4 フラグメント解析における機械的なエラーの例

試験室Fにおいて、マーカー1-1を用いて品種SとBのフラグメント解析をおこなったところ、左表のような結果となった。

フラグメントサイズ②において、最初に解析した品種Sの1番目が少し大きな値を示している。

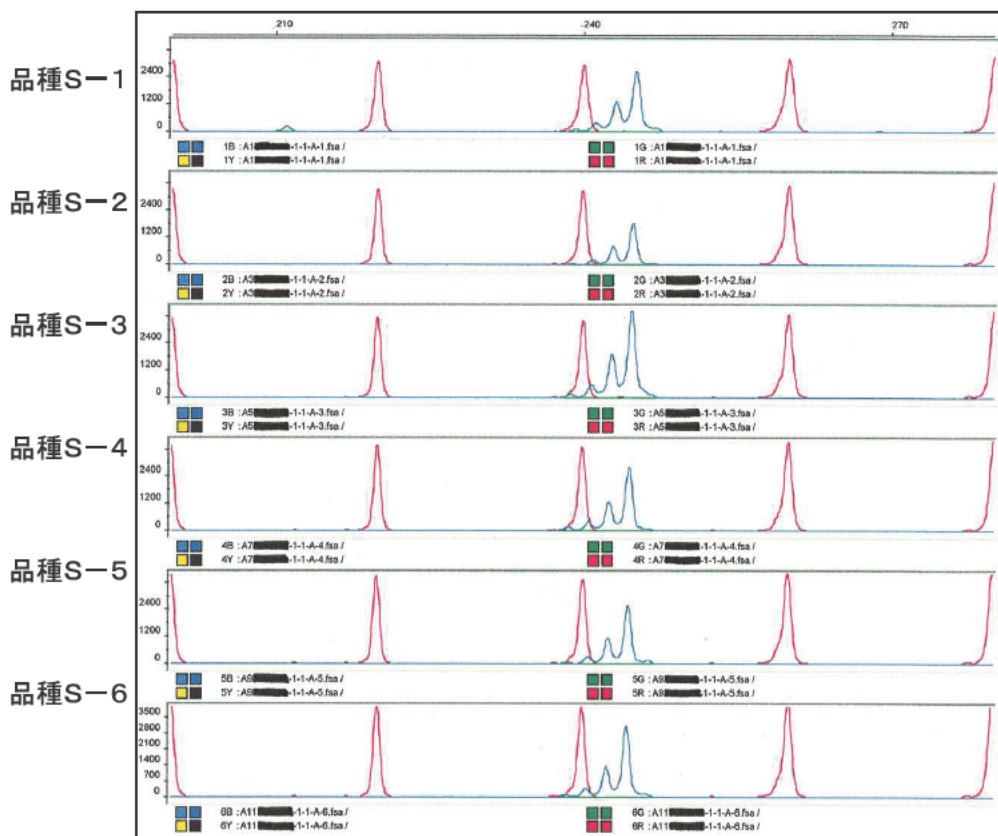
フラグメント画面を見る限り、フラグメント解析に問題はなかったものと考えられた。

この原因は以下の示す事例から、フラグメント解析をおこなうサンプルセットの中でキャピラリーが最初に解析するサンプルはデータ値が振れることがあるものと考えられた。

・この試験室では1本キャピラリーのシーケンサーを使用していたこと。

・4本キャピラリーを使用していた試験室では最初に解析した4つのデータがそれ以降に解析したデータよりも小さい値を示した例があったこと。

マーカー 1-1			
	フラグメント解析の順番	フラグメントサイズ① (品種Bのみ)	フラグメントサイズ②
試験室 F	品種 S	1	245.19 / 245.19
		2	244.87 / 244.87
		3	244.71 / 244.71
		4	244.53 / 244.53
		5	244.50 / 244.50
		6	244.37 / 244.37
試験室 F	品種 B	7	238.67 / 244.63
		8	238.38 / 244.29
		9	238.53 / 244.51
		10	238.66 / 244.55
		11	238.34 / 244.30
		12	238.67 / 244.63



## 資料7 SSRにおけるフラグメントの分析方法

SSR マーカーによって増幅されるアリルはフラグメント(波形)として検出される。このフラグメントにはいくつかの特徴がある。この特徴を把握しておくことで、検出されるフラグメントを正しく解析することができる。

### 1. 独特の形状

SSR マーカーを用いた PCR 産物をフラグメント解析すると、目的のフラグメントの前後にそれよりも小さいフラグメントが階段状に検出される。これらのフラグメントは通常、SSR の塩基リピートを単位として、目的のフラグメントの前 (より小さい bp) に 3~4 つ、後 (より大きい bp) に 1~2 つ検出され、図 5 の様な独特の形状となる。

また、それらのフラグメントから 1 塩基ずれた位置にスタッターバンドというフラグメントが検出されることもある (図 6)。スタッターバンドがあるとフラグメントの分析が難しくなる。特に、複数の品種が混在している可能性があるサンプル DNA や倍数性の高い品種では正確な判断ができなくなる可能性がある。3 塩基以上のリピートの SSR を用いればスタッターバンドが分析に与える影響は小さくなるが、3 塩基以上のリピートの SSR は 2 塩基リピートの SSR に比べて多型の頻度が小さい傾向があるため、品種識別に有効なマーカーを作成することが難しい。なお、3 塩基以上のリピートの SSR は 2008 年まで特許があることを留意しなければならない。

スタッターバンドはテイルドと呼ばれる 7 塩基の配列 (GTTTCTT) をリバースプライマーに付加することでその影響を小さくすることができる。このため、2 塩基リピートの SSR を用いる場合にはリバースプライマーにテイルドを付加することが望ましい。

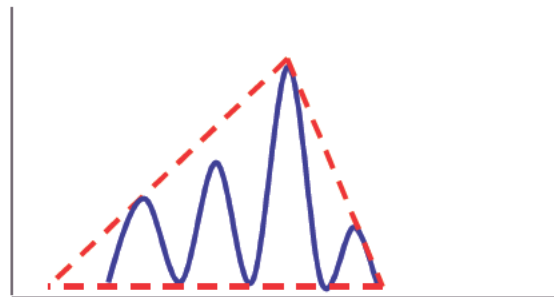


図 5 : SSR マーカーによるフラグメントの形状

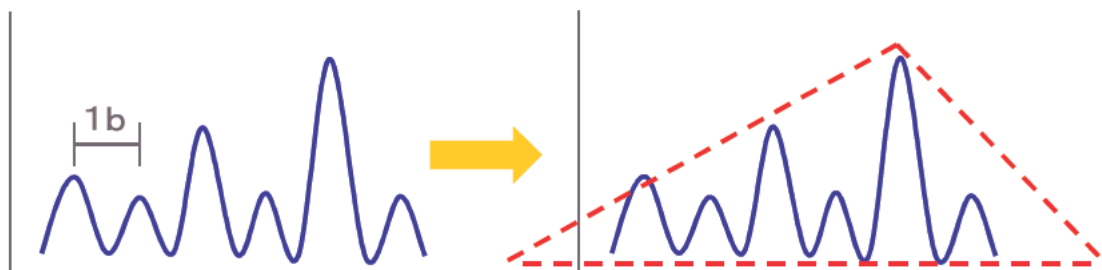


図 6 : 2 塩基リピートの SSR においてスタッターバンドが出たフラグメントの形状

## 2. フラグメントの長さが短いほど増幅効率がよい

SSR マーカーにおけるフラグメントは長さが短いほど増幅効率がよい傾向がある。例えば、100bp と 120bp のフラグメントが増幅される場合、100bp の方が 120bp のフラグメントよりもピークが高くなる。この差は2つのフラグメントの長さの差が大きいほど大きくなる(図7)。

このため、PCR 産物を滅菌水等で希釈したものや増幅が十分でない PCR 産物をフラグメント解析に供試する場合は注意が必要である。このような PCR 産物を用いた場合、検出されたフラグメントのピークがサイズスタンダードのピークの半分以下だった時に、(SSR 独特のフラグメントの形状を示さなかったり、フラグメントのピークがノイズと同程度の高さになってしまうと)本来あるはずの別のフラグメントを見逃してしまう可能性がある。そのため、検出されるフラグメントのうち最も高いピークがサイズスタンダードのピークより高いことが望ましい。フラグメントのピークが低い場合は、PCR 産物の希釈倍率を変更し、再度フラグメント解析を行うべきである。

また、同じマーカーを用いても分析品種のアリルがホモであるかヘテロであるかによってフラグメントのピークの高さが異なることにも注意しなければならない(図8、図9)。

図5～9を理解することで、一見しただけでは解析しにくいフラグメントも正しく解析することができる。

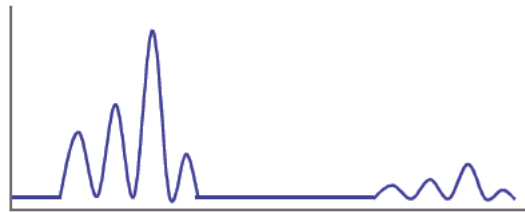


図7：アリの距離が離れている場合のフラグメントのピークの関係（イメージ）

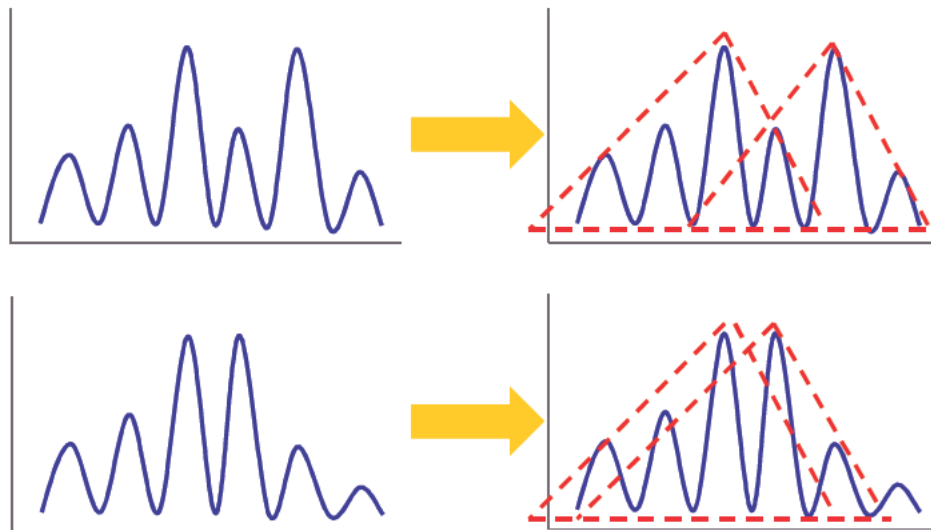


図8：2つのピークがあると判断されるフラグメントの例

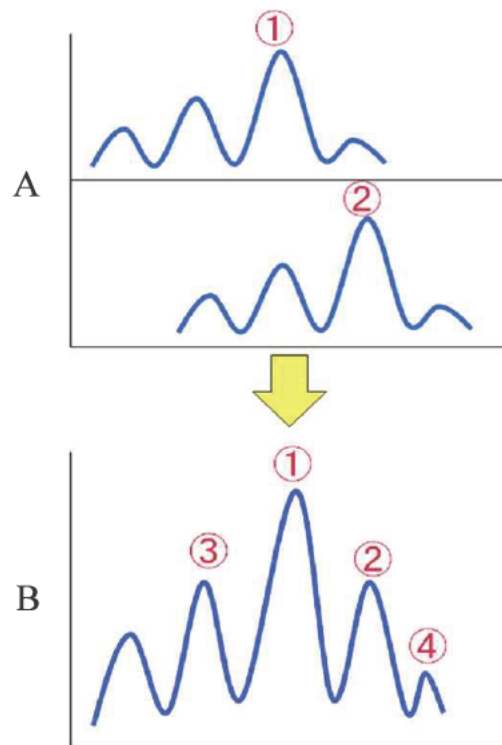


図9：波形の分析例

図9のBのようなフラグメントが検出された場合、以下の2つの条件が満たされていれば、Aのような2種類のフラグメントが重なっていると考えられるので、①と②の2つのピークがあると判断する。

- ・②のピークが③のピークと同程度。
- ・②のピークが①のピークよりも小さい。

これに加えて④に小さいピークがあることも補足的な判断基準となる。

### 3. その他の注意事項

フラグメント解析に供試する PCR 産物の濃度が薄いとフラグメントのピークが低くなるが、濃すぎるとフラグメントのピークが解析できる上限を超えたり、正しいサイズが表示されなかったりする(図10)。PCR 産物の濃度が濃すぎないことを把握するためには、フラグメント解析を行う際にマーカーに付加した蛍光色素とサイズスタンダードの蛍光色素以外の蛍光色素についても、同時に解析することが重要である。PCR 産物の濃度が濃すぎると、図11のように本来フラグメントが検出されるはずのない蛍光色素でもフラグメントが検出される。これは、PCR 産物の蛍光色素の強度が強すぎて、比較的色彩の近い蛍光色素が影響を受けるためにおこる。このような場合は、PCR 産物を希釈し直して、再度解析する必要がある。

サイズスタンダードのフラグメントが正しく表示されていることを確認することも重要である。フラグメントサイズはサイズスタンダードのピーク間の距離から計算されるので、サイズスタンダードのピークに歪みがあると、フラグメントサイズが正しい値を示さない。サイズスタンダードのピークに歪みが見られた場合は再度解析する必要がある。

また、図5で示した SSR 独特のフラグメントの形状を示していないフラグメント（フラグメントの前後に低いフラグメントがないものやフラグメントの幅が 1bp を超えるもの）は SSR マーカーによって増幅されたアリル由来のフラグメントではないので、SSR のフラグメントと判断しない(図1 2)。

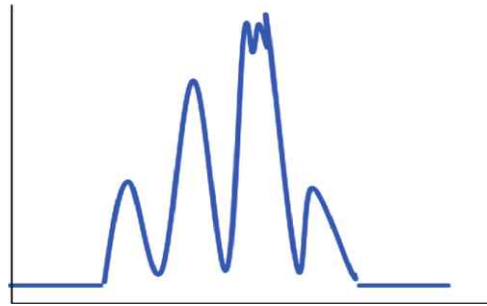


図1 0 : PCR 産物の濃度が濃いために起こるフラグメントの乱れ1  
ピークの頂点がつぶれている場合は PCR 産物の濃度が濃すぎる。

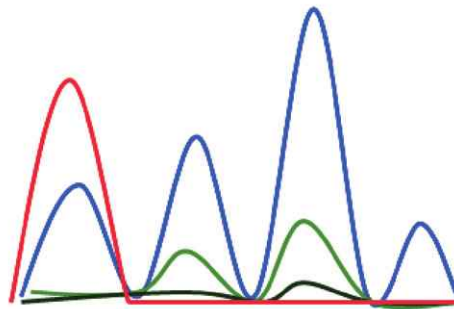


図1 1 : PCR 産物の濃度が濃いために起こるフラグメントの乱れ2  
青：目的のフラグメント 赤：サイズスタンダード 緑・黄：ノイズ  
上図では青の蛍光色素でピークがあるが、PCR 産物の濃度が濃いために他の蛍光色素が影響を受けてる。

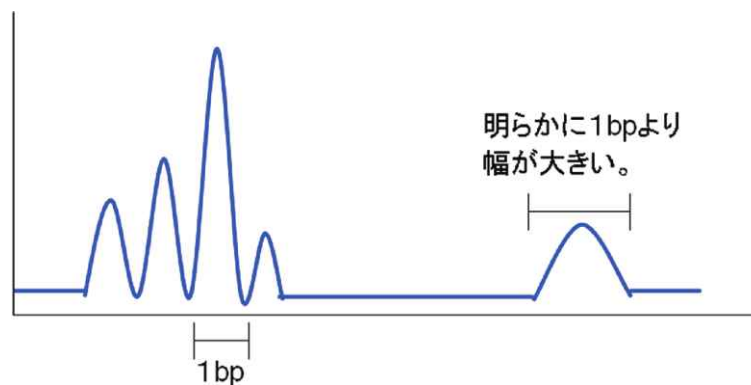


図1 2 : SSR マーカーによる増幅産物ではないフラグメントの例  
上図の右側のピークはピークの前後に SSR 独特の小さな波形がない。  
また、幅が 1bp より大きいものは、DNA 以外の波形であると考えられる。



## 資料 8 食品分野における定性分析法の妥当性確認に関するガイドライン

定性分析法の室間共同試験について、化学分析の定量法に関する IUPAC/ISO/AOAC International の Harmonized protocol、または医薬品の分析法に関する ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) の Harmonized protocol のような国際的ガイドラインは ISO 16140 以外は 2008 年 3 月現在制定されていない。

IUPAC では、2006 年 2 月から定性的な分析法及びスクリーニング法 (例えば、ELISA 法によるアレルギー物質の検知、PCR 法による GMO 検知、Lateral flow デバイスによる迅速検査) の室間共同試験に関するドラフトの作成を開始している<sup>4)</sup>。

AOAC INTERNATIONAL (以下 AOAC) の室間共同試験のガイドライン(2005)<sup>3)</sup>は定量分析法についてのガイドラインであるが、定性分析法の室間共同試験についても Harmonized protocol 以外と明記した上で、実施上の最低条件が記載されている。

### AOAC の定性分析法の室間共同試験実施上の最低条件

10 試験室が、陽性試料については 1 マトリック当たり 2 濃度、各濃度で 6 試料の結果を報告し、陰性試料については、マトリック当たり 6 試料の結果を報告する。

また、AOAC には、食品微生物の定量及び定性の公式分析法の妥当性確認に関するメソッドコミッティのガイドライン<sup>1 2)</sup>がある。これには、食品微生物の定性分析法について、単一試験室でおこなうメソッド比較試験 (代替メソッドとリファレンスメソッドの性能比較) 及び室間共同試験の設計ガイドラインが含まれている。試験室間共同試験の試験室数、反復数の条件は、上記の最低条件と同じである。

上記の最低条件が決められた統計学的背景の詳細は後述するが、感度(陽性試料の正解率)または特異性(陰性試料の正解率)の真値が 80%と仮定したときに、その±10%の範囲内 (72~88%) に、正解率の推定値の 90%信頼区間が入るのに必要な試験室数  $L$  と反復数  $m$  の条件を与える(5)式をほぼ満たすように、試験室数 10 と反復数 6 を決めている。

ISO 16140 : 2003 食品及び動物用飼料の微生物に関する代替法の妥当性確認プロトコル<sup>1 3)</sup>では、以下の定性分析法の室間共同試験プロトコルを定めている。

### ISO 16140:2003 の定性分析法の室間共同試験実施上の最低条件

- ・外れ値のない最低 10 試験室の結果を報告する。
- ・陰性試料、代替法の検出限界よりも少し高い濃度の試料、及び検出限界の約 10 倍の濃度の試料の最低 3 濃度の試料を用いる。
- ・各試験室は、代替法及び対照法を用いて、各濃度の非明示試料 (blind samples) を最低 8 回併行測定する。
- ・以上より、1 試料について最低 480 個 (2 メソッド×10 試験室×3 濃度×8 回併行) の測定結果を報告する。
- ・代替法については、微生物毎に試験が必要な試料タイプがまとめられている Annex B のリストから選択した各食品カテゴリーについて、少なくとも 1 種類の製品を用いて試験する。

定性分析法の共同試験に必要な試験室数と試料数の統計学的背景

McClure(1990)<sup>1,4)</sup>の検討結果が、AOAC の定性分析法の室間共同試験実施上の最低条件に反映されているので、その検討内容を紹介する。

- 1) 分析結果(標本データ)から求めた感度  $p_+$  (小文字の  $p$ ) が、母集団の感度 (真の感度  $P_+$  (大文字の  $P$ ) の一定範囲内 (許容可能な範囲内)  $P_+ \pm d$  に入るように試験室及び試料数を決めるのが基本的な考え方である。
- 2) 標本データから求めた感度には推定誤差が伴うため信頼区間(母集団の感度の値が存在すると推定される範囲)を計算し、この信頼区間が許容可能な範囲内に入るようにする。
- 3) 試験室数を  $L$ 、試料数を  $m$  とし、母集団の感度は正規分布に従うと仮定すると、標本データから求めた感度の信頼区間は

$$p_+ - \frac{z_{1-\alpha} S_a}{L^{1/2} m} \leq P_+ \leq p_+ + \frac{z_{1-\alpha} S_a}{L^{1/2} m} \quad (1)$$

になる。ここで、 $z_{1-\alpha}$  は標準正規分布の上側確率  $\alpha$  のときの  $z$  スコア、 $S_a$  は各試験室から得られた正解数  $a_i (i=1, \dots, L)$  の標準偏差で

$$S_a = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^L (a_i - \bar{a})^2}{L-1}} \quad (2)$$

になる。 $\bar{a}$  は  $a_i$  の平均値 ( $\bar{a} = \sum_{i=1}^L a_i / L$ ) である。

(1)式の  $S_a / (L^{1/2} m)$  は標本データから求めた感度  $p_+$  の標準誤差である (付録 1 の A4 式参照)。

- 4) (1)式の信頼区間が  $P_+ \pm d$  の許容可能な範囲内に入る条件は

$$\frac{z_{1-\alpha} S_a}{L^{1/2} m} \leq d \quad (3)$$

になる。(3)式の両辺を 2 乗して  $Lm^2$  について解くと

$$\left( \frac{z_{1-\alpha} S_a}{d} \right)^2 \leq Lm^2 \quad (4)$$

が得られる。(4)式が試験室数と試料数を決めるための条件式である。

- 5) McClure(1990)では、定性分析法の許容可能な最低条件を、陽性及び陰性を 80%以上正しく判定でき(感度及び特異性が 80%以上)、両側危険率 10%(片側の  $\alpha=0.05$ )の元でこの判定率を 80%の $\pm 10\%$ の $\pm 0.08$  ( $d=0.08$ ) で推定可能なことと設定し、この場合に必要な試験室数と試料数を検討した。
- 6) (4)式中の  $S_a^2$  が決まれば左辺の値は求まり、 $Lm^2$  が満たすべき条件は決まる。McClure(1990)は、 $S_a^2$  をコンピュータシミュレーション (付録 1 参照) で擬似データを発生させて検討した結果、 $S_a^2=0.8558$  の推定値を得ている。
- 7) (4)式に  $z_{0.95}=1.645$ 、 $d=0.08$ 、 $S_a^2=0.8558$  を代入すると

$$362 \leq Lm^2 \quad (5)$$



になる。

- 8) (5)式を満たす  $L$  と  $m$  として、試験室数  $L=15$ 、試料数  $m=5$  (陽性であると既知の試料数  $n_1=m=5$ 、陰性であると既知の試料数  $n_2=m=5$ ) を McClure(1990)では推奨した。

$$362 \leq 15 \times 5^2 = 375 \quad (6)$$

- 9) 試験室数  $L$  を減らす場合、最低 10 試験室以上とし、試料数  $Ln_1 = Ln_2 \approx 75$  になるように  $n_1$ 、 $n_2$  を決めるべきと McClure(1990)は述べている。この条件は、感度のバイアスが「1/試験室数」に比例するため 10%を超えないこと、及び外れ値検定 (Cochran の Q 検定) の検定統計量の分布がカイ二乗分布で近似できることを保証すると McClure は説明している。しかし、10 試験室以上なら感度のバイアスが 10%を超えない根拠として引用した Cochran の説明<sup>15)</sup>は、補助変数を用いた比推定 (ratio estimate) のバイアスに関するものであり、定性分析法の正解率は当てはまらない。また、Tate and Brown<sup>16)</sup>によると、全てが陽性または陰性でない分析用試料 (test sample) が少なくとも 4 試料あり、かつ外れ値の試験室を除去後少なくとも 6 試験室残っていれば Cochran の Q 検定におけるカイ二乗分布の近似はよい。よって、試験室数と反復数を(5)式で決める理由は、正解率 80%を危険率 10%の下で±10%以内の精度で推定するためである。

- 10) AOAC の室間共同試験のガイドラインの 1995 年版<sup>17)</sup>、2000 年版<sup>18)</sup>は  $L=15$ 、 $m=5$  を採用しているが、2002 年版<sup>19)</sup>では  $L=10$ 、 $m=6$  に変更している。

$$362 \approx 10 \times 6^2 = 360 \quad (7)$$

#### 付録1 McClure(1990)のシミュレーション方法

SAS の uniform プロシージャを用いて 0~1 の一様乱数を発生させ、uniform プロシージャの出力>0.2 なら 1 (陽性)、それ以外なら 0 (陰性) として (検出率 80%に相当)、 $L=10$  試験室、 $m=5$  反復試験/試験室のデータセットを生成して乱塊法の 2 元分散分析モデル

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \pi_j + \varepsilon_{ij} \quad (A1)$$

で解析している。ここで、 $X_{ij}$  は 0 または 1 の反応値、 $m$  は感度の真値、 $\alpha_i$  は試験室  $i$  による反応値の変動、 $\pi_j$  は分析用試料  $j$  による反応値の変動、 $\varepsilon_{ij}$  は偶然誤差である。具体的には SAS の Varcomp プロシージャ (分散分析の中の枝分かれ実験という解析) で上記データセットを(A1)式を用いて解析し、 $\alpha_i$ 、 $\pi_j$ 、 $\varepsilon_{ij}$  の分散の大きさを計算している。この解析を 500 回繰り返した結果、 $\pi_j$  の分散は 500 回とも偶然誤差と有意でなかったため ( $p=0.25$ )、(A1)式は一元分散分析モデル

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad (A2)$$

に簡略化した。(A2)式が成り立つことより感度の不偏分散は

$$\sum_{i=1}^L (a_i/m - \bar{a}/m)^2 / (L-1) = \frac{1}{m^2} \sum_{i=1}^L (a_i - \bar{a})^2 / (L-1) = \frac{S_a^2}{m^2} \quad (A3)$$

になり、感度の標準誤差は(A3)式の不偏分散を  $L$  で割った平方根

$$\frac{S_a}{L^{1/2}m} \tag{A4}$$

になる。

各データセットについて  $S_a^2$  を計算し、500 データセットの  $S_a^2$  の平均値が 0.8558 である。

## 資料9 Developmental Validation の例

### PowerPlex Y Validation

Reference: Krenke *et al.* (2005) *Forensic Sci. Int.* 148(1):1-14

<u>Study Completed</u>	<u>Description of Samples Tested</u> <u>(performed in 7 labs and Promega)</u>	<u># Run</u>
Single Source (Concordance)	5 samples x 8 labs	40
Mixture Ratio (male:female)	6 labs x 2 M/F mixture series x 11 ratios (1:0,1:1,1:10,1:100,1:300,1:1000,0.5:300, 0.25:300,0.125:300, 0.0625:300, 0.03:300 ng M:F)	132
Mixture Ratio (male:male)	6 labs x 2 M/M mixtures series x 11 ratios (1:0,19:1,9:1,5:1,2:1,1:1,1:2,1:5,1:9,1:19,0:1)	132
Sensitivity	7 labs x 2 series x 6 amounts (1/0.5/0.25/0.125/0.06/0.03)	84
Non-Human	24 animals	24
NIST SRM	6 components of SRM 2395	6
Precision (ABI 3100 and ABI 377)	10 ladder replicates + 10 sample replicated + [8 ladders + 8 samples for 377]	36
Non-Probative Cases	65 cases with 102 samples	102
Stutter	412 males used	412
Peak Height Ratio	N/A (except for DYS385 but no studies were noted)	
Cycling Parameters	5 cycles (28/27/26/25/24) x 8 punch sizes x 2 samples	80
Annealing Temperature	5 labs x 5 temperatures (54/58/60/62/64) x 1 sample	25
Reaction volume	5 volumes (50/25/15/12.5/6.25) x [5 amounts + 5 concentrations]	50
Thermal cycler test	4 models (480/2400/9600/9700) x 1 sample + [3 models x 3 sets x 12 samples]	76
Male-specificity	2 females x 1 titration series (0-500 ng female DNA) x 5 amounts	10
TaqGold polymerase titration	5 amounts (1.38/2.06/2.75/3.44/4.13 U) x 4 quantities (1/0.5/0.25/0.13 ng DNA)	20
Primer pair titration	5 amounts (0.5x/0.75x/1x/1.5x/2x) x 4 quantities (1/0.5/0.25/0.13 ng DNA)	20
Magnesium titration	5 amounts (1/1.25/1.5/1.75/2 mM Mg) x 4 quantities (1/0.5/0.25/0.13 ng DNA)	20
	TOTAL SAMPLES EXAMINED	<b>1269</b>

## Validation of 21-SNP multiplex

<u>Study Conducted</u>	<u>Description of Samples Tested</u>	<u># Run</u>	If redone now
Single Source (Concordance)	32 samples for 3 individuals	96	24
Mixture Samples	not performed		10
Mixture Ratio (male:female)	not performed		
Mixture Ratio (male:male)	not performed		
Sensitivity	1ng, 500pg, 250pg, 125pg, 63pg, 31pg, 16pg, 0pg x 12 dilution series	96	16
Sensitivity	Artificially degraded samples	18	16
Non-Human	dog, cat, guinea pig, ferret, horse, chicken, wolf, toad, rat, bull, cow, deer, badger, pigeon, spider monkey, otter, gorilla, chimpanzee and orang-utan, <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Escherichia coli</i> and <i>Clostridium perfringens</i>	22	8
Precision (ABI 3100 and ABI 377)	used samples from single source and dilution series		
Non-Probative Cases	6 cases, various crime scene samples plus reference buccals	18	18
Stutter	n/a		
Peak Height Ratio	used samples from single source and dilution series		
Cycling Parameters	not part of validation, part of previous work		
Annealing Temperature	not part of validation, part of previous work		
Reaction volume	not part of validation, part of previous work		
Thermal cycler test	not part of validation, part of previous work		
Male-specificity	n/a		
Other: Population database samples	201 White Caucasian samples, 71 Indian Sub-continent and 86 Afro-Caribbean	358	300
Other: Reproducibility	Different sample types - blood, hair, semen, saliva, trace swabs	96	32
Other: CE injection parameters	Dilution series	8	8
TOTAL SAMPLES EXAMINED		712	432

## 2. 用語

### ローカス(遺伝子座)

ゲノム DNA の特定の領域をローカスと呼ぶ。多型が見いだされるローカスは遺伝子又はその一部であることもあるし、遺伝子以外の領域であることもある。

### アリル(対立遺伝子)

一つのローカスで多型を示す個々の塩基配列をアリルと呼ぶ。アリルはある DNA 領域の塩基配列の一部が置換、挿入、欠失したもの、縦列反復配列における反復単位の数(反復数)の違いによるもの等がある。

### プライマー

テンプレート(鋳型)DNA に相補的な配列を持ち、DNA 合成酵素(DNA ポリメラーゼ)により 2 本鎖 DNA を合成するのに使われる短い 1 本鎖 DNA をプライマーと呼ぶ。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に必要である。

### マーカー

多型分析に用いたプライマー、プローブ、制限酵素等を用いて、特定の DNA 領域の特定の多型を表す記号をマーカーと呼ぶ。

### フラグメント解析

ゲノムを鋳型として蛍光色素等で標識したプライマーを用いて PCR 増幅を行い、キャピラリー電気泳動することによって PCR 産物の断片長を解析することをフラグメント解析と呼ぶ。

### シーケンサー

DNA 上に記録された塩基配列の自動読み取り装置。DNA シーケンサーという場合もある。DNA の塩基配列決定技術は、遺伝子の構造機能研究はもとより、進化系統に関する研究や個体識別鑑定をはじめ、さまざまな目的に応用されている。

### RAPD

Random Amplified Polymorphic DNA の略。ゲノム DNA をテンプレート(鋳型)にして、ランダムプライマーの存在下で PCR によって増幅した時、ゲノム DNA の塩基配列に差異があると、プライマーの結合に差異が生じランダムプライマーで PCR 増幅される DNA 断片のサイズや数が異なることがある。その差異をアガロースやポリアクリルアミドのゲルによる電気泳動で検出するのが RAPD 法である。RAPD マーカーは一般に優性マーカーである。

STS 化プライマーの場合は、各品種共通の不要バンドが消失し、識別バンドのみが出現するので、RAPD 法の問題とされていた再現性、識別誤認の問題が解決される。

### CAPS

Cleaved Amplified Polymorphic Sequence の略。CAPS 法は PCR-RFLP 法とも呼ばれる。PCR 増幅産物を特定の制限酵素で切断して RFLP を見いだす手法である。CAPS 法は増幅産物の塩基配列が判っていない場合でも利用することができるが、増幅産物の塩基配列情報があると使いやすい。特定領域の DNA 断片の塩基配列を比較して制限酵素認識部位での塩基配列の差異があればその制限酵素を用いる。適当な制限酵素認識部位での差異がない場合はプライマーを工夫して PCR 増幅産物に制限酵素認識部位を導入する dCAPS (derived CAPS) 法が使われることが多い。

CAPS マーカーあるいは dCAPS マーカーは共優性マーカーで、1 塩基の多型を検出することもできる

#### **SWGDM**

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods の略。前身の TWGDAM (Technical Working Group on DNA Analysis Methods) は法医学の品質保証への関心の高まりに応じて FBI(連邦捜査局)が招集した Working Group である。TWGDAM は 1989、1991、1995 年に TWGDAM Guideline を発行・改訂し、その後、科学的な Working Group や FBI の科学的 Working Group を主導する部分である SWGDAM となった。

#### **AOAC International**

1884 年に米国に設立された Association of Official Agricultural Chemists が始まりであり、途中で Association of Official Analytical Chemists に名称変更され、1992 年に AOAC International に正式名が変更された。妥当性確認された分析法の開発、利用、ハーモナイゼーション及び試験室の品質保証を国際的に提供、促進することを目的に活動している団体である。

#### **IUPAC**

国際化学・応用化学連合 (International Union of Pure and Applied Chemistry) は化学分野の国際振興を目的に 1919 年に設立された化学者の団体で、化学命名法、用語、分析法などの標準化を行っている。

#### **ISO**

国際標準化機構 (International Organization for Standardization) の略称で、1947 年に設立された国際的な標準規格作成を目的に活動している民間の非政府組織である。1 国 1 メンバーで構成され、メンバーは各国の標準規格作成団体である。

#### **Harmonized protocol**

複数の標準規格作成団体が合意したプロトコルを示す。化学分析の定量法の試験室間共同試験プロトコルは IUPAC/ISO/AOAC International が主催したワークショップに参加した各国の標準規格作成団体が合意したものである。標準化された分析法の採用及びその性能特性の提示のための Harmonized protocol は IUPAC 主催のワークショップに参加した各国の標準規格作成団体が合意したものである。技能試験、内部品質管理、単一試験室による妥当性確認、回収率に関する各 Harmonized protocol は IUPAC/ISO/AOAC International の 3 者が協力して作成したものである。ICH ガイドラインもハーモナイズドプロトコルである。

#### **ICH**

医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) の略称で、日米欧の医薬品監督官庁及び製薬業界の専門家が医薬品の申請に関する技術などの国際標準化を推進している団体である。ICH ガイドラインの一つとして分析法の妥当性確認のガイドラインを公表している。

#### **ENFSI**

European Network of Forensic Science Institutes の略。ヨーロッパにおける法科学分野の専門家グループ。法医学分野での知識と経験の共有を目的として 1995 年設立された。31 カ国の 53 研究所(2005 年現在)がメンバーとなっている。常任委員会として Expert Working

Group Committee (EWGC)、the Quality & Competence Committee (QCC)と the European Academy of Forensic Science (EAFS)をもつ。

#### DAB Standards

DNA Advisory Board Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories の略。DNA 鑑定を実行している法医学研究所の品質保証基準である。DNA Advisory Board(DNA 諮問委員会)は 1994 年に制定された米国 DNA 鑑定法に基づき、FBI(連邦捜査局)長官によって、品質保証の基準の作成、改正、勧告を目的として設立された。

#### ハプロタイプ

haploid genotype" (半数体の遺伝子型) の略で、生物がもっている単一の染色体上の遺伝的な構成 (具体的には DNA 配列) のことである。二倍体生物の場合、ハプロタイプは各遺伝子座位にある対立遺伝子のいずれか一方の組合せをいう。またゲノム全体に対して(複数の染色体にまたがって) ということもあるが、この場合には特にいずれかの片親に由来する遺伝子の組合せを指す。さらに現在は限定的な意味として、同一染色体上で統計学的に見て関連のある、つまり遺伝的に連鎖している多型 (一塩基多型[SNP]など) の組合せをいうことが多い。

### 3. 参考文献

- 1) 真木寿治 : PCR Tips, 95 (秀潤社, 1997)
- 2) DNA 品種識別技術検討会 (2003) : 植物品種識別における品種同定理論, 植物の DNA 品種識別についての基本的な留意事項
- 3) AOAC Int. (2005) . Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 18 ed., Gaithersburg, MD,USA. : [http://eoma.aoac.org/app\\_d.pdf](http://eoma.aoac.org/app_d.pdf)
- 4) IUPAC (2006) . Establishment of guidelines for the validation of qualitative and semi-quantitative (screening) methods by collaborative trial: a harmonized protocol. <http://www.iupac.org/projects/2005/2005-024-2-600.html>
- 5) ENFSI (2006) . STANDING COMMITTEE FOR QUALITY AND COMPETENCE (QCC): VALIDATION AND IMPLEMENTATION OF (NEW) METHODS.
- 6) L.A. Dixon, C.M. Murray, E.J. Archer, A.E. Dobbins, P. Koumi, P. Gill (2005) Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes. *Forensic Sci Int.* 154: 62-77 : <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/validation.htm>
- 7) Krenke *et al.* (2005) *Forensic Sci. Int.* 148(1):1-14 <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/validation.htm>
- 8) The National Academies Press (2006) :Discussions of the Committee on Daubert Standards: Summary of Meetings. [http://books.nap.edu/catalog.php?record\\_id=11696#toc](http://books.nap.edu/catalog.php?record_id=11696#toc)
- 9) 高品善, 石黒亮, 西村幸一 : SSR マーカーによる輸入オウトウおよび国内市販品種の品種識別, DNA 多型, 15, 101-104 (2007) .
- 10) 高品善, 松田成美, 山本俊哉, 林建樹, 木村鉄也, 西村幸一 : SSR マーカーによるオウトウの品種識別・親子判定, 平成 15 年度 東北農業研究成果情報 [http://www.affrc.go.jp/ja/research/seika/data\\_tohoku/h15/seibutu/h15seibutu006](http://www.affrc.go.jp/ja/research/seika/data_tohoku/h15/seibutu/h15seibutu006)
- 11) 高品善, 松田成美, 木村鉄也, 山本俊哉, 西村幸一 : オウトウ品種判別における SSR マーカーの利用, 育種学研究, 第 6 巻別冊 1 号, 181 (2004) .
- 12) FELDSINE, P, ABEYTA, C. and ANDREWS, W.H. (2002). AOAC INTERNATIONAL



Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J. AOAC Int., **85**(5), 1187–1200. <http://www.aoac.org/vmeth/MICGUIDE.pdf>

- 1 3) ISO 16140 (2003) . Microbiology of food and animal feeding stuffs —Protocol for the validation of alternative methods.
- 1 4) McClure, F.D. (1990). Design and analysis of qualitative collaborative studies: minimum collaborative program. J. AOAC, **73**, 953-960.
- 1 5) Cochran, W.G. (1977) . Sampling Techniques 3rd Ed. John Wiley & sons, New York, pp.160.
- 1 6) Tate, M.W. and Brown, S.M. (1970) . J. Am. Statist. Assoc., **65**, 155-160.
- 1 7) AOAC Int. (1995) . AOAC INTERNATIONAL Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis. J. AOAC Int., **78**(5), 143A–160A.
- 1 8) AOAC Int. (2000) . Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 17 ed., Gaithersburg, MD,USA.
- 1 9) AOAC Int. (2002) . Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 17 ed. rev.1, Gaithersburg, MD,USA. [http://www.aoac.org/vmeth/Manual\\_Part\\_6.pdf](http://www.aoac.org/vmeth/Manual_Part_6.pdf)

#### 4. 調査検討委員

委員長	安井 明美	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品分析研究領域長
委員	内藤 成弘	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品分析研究領域 品質情報解析ユニット 主任研究員
委員	松元 哲	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 野菜ゲノム研究チーム 上席研究員
委員	山本 俊哉	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所 果樹ゲノム研究チーム長
委員	高品 善	山形県農業総合研究センター 農業生産技術試験場 バイオ育種科 専門研究員