

DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン(案)
－SSR について－

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：基礎的な理論および概念	2
1. 妥当性確認とは	
2. SSR 分析とは	
第2章：妥当性確認のガイドライン	3
1. 事前確認事項	
2. 試験室間共同試験	
3. 変更された技術の妥当性確認	
4. 試験データの提出	
第3章：予備試験	10
1. 予備試験における確認事項	
2. 技術を導入する試験室の確認事項	
第4章：注意事項	11
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. フラグメント解析について	
6. コンタミ防止	
第5章：ガイドライン（案）作成における参考資料と考察	12
1. 妥当性確認の基準作成の背景	
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. DNA 品種識別技術における結果の証拠能力	
第6章：ガイドライン（案）の適用例（オウトウ）	15
第7章：資料等	23
1. 資料1～8	
2. 所感	
3. 用語	
4. 参考文献	

はじめに

植物の新品種の育成には専門的な知識、技術、経験が欠かせないほか、長期にわたる労力と多額の資金やほ場等の設備を要するが、その反面、いったん新品種が世の中に出た場合、これを第三者が増殖することは極めて容易である。したがって、新品種の育成に投資した育成者に対し品種登録した種苗の利用に関する権利を独占させ、新品種の販売等を通じて資金を回収することを可能とし、次の新品種の開発への意欲を高める必要がある。これを担保する制度、すなわち植物品種保護制度は、農業生産の基礎を支える優良な品種の育成を支え、農業の振興をもたらすものといえる。

我が国においては、昭和 53 年の種苗法の制定により本格的な植物品種保護制度が導入された。制度発足後、新品種の出願・登録件数は着実に増加し、世界でもトップクラスになっている。

しかしその反面、平成 17 年度の社団法人農林水産先端技術産業振興センターによる「育成者権に関するアンケート調査報告書」によると「権利侵害を受けたことがある（その疑いのあるものを含む）」と回答した育成者は 33.6%にものぼっている。

育成者権の侵害に対して対抗措置を取ろうとする場合には育成者権者は侵害の事実を立証する必要がある。その立証をサポートするために独立行政法人種苗管理センターでは育成者権者の求めに応じて登録品種と侵害疑義品種がどの程度類似しているのかを判定する品種類似性試験を行っている。

品種類似性試験には、提出された植物体の特性を比較調査する「特性比較」、提出された種苗を同一条件下で栽培して特性を比較調査する「比較栽培」、提出された植物体又は一部組織から DNA を抽出し、DNA 品種識別技術を用いて比較する「DNA 分析」がある。

このうち、特性比較は調査を迅速におこなうことができるが、比較する植物体同士が異なる環境下で栽培されていることが多く、その影響から必ずしも期待した結果を得ることができないことがある。

また、比較栽培は比較する植物体同士が同一の栽培環境下で特性を調査することから、最も信頼性が高いが、調査が長期間に及ぶことと、提出された植物体から種苗の再生が困難な場合には実施できないという問題がある。

DNA 分析はこれらの問題を克服できる技術として早期開発・実用化に強い要請がある。「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）においては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、対象品目数を増加すること等が取り上げられている。

DNA 品種識別技術のもう一つの課題として、結果に対する品質保証の問題がある。試験研究機関等においては様々な種類の植物について DNA 品種識別技術が開発されつつあるが、実際の品種識別の判定に利用する上で、開発された技術の妥当性の検討や分析結果の品質保証等が課題になっている。AOAC INTERNATIONAL(以下「AOAC」とする)等では食品関連分野における分析法の妥当性確認に関する国際的な基準を作成しているが、植物の DNA 品種識別技術に関する国際的な基準となる妥当性の確認法は無いのが現状である。このため、開発された DNA 品種識別技術についてシステマティックに妥当性が確認される体制にはなっていない。

これについて「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。

そこで、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し、DNA 品種識別技術の利用促進に向けて、植物共通の妥当性確認のためのガイドラインを作成・提案することとした。

また、本ガイドラインでは様々な DNA 品種識別技術のうち、手法を SSR(Simple Sequence Repeat)に絞って作成をおこなう。その理由として、一つは SSR には品種を識別するマーカーとして優れた特徴がある（3. SSR 分析の概要・特徴参照）ことが挙げられる。もう一つは、本ガイドラインはその作成にあたって、「本ガイドラインを適用しようとする DNA 品種識別の妥当性確認の手順書を作成し、その結果をガイドラインに反映する」という行程で行おこなったことから、おうとうの DNA 品種識別技術として用いられている SSR に絞った形で作成することが適当であると考えられたためである。

第 1 章：基礎的な理論および概念

1. 妥当性確認とは

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 品種識別技術を規制に用いる」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、以下の項目が記載されている。

- (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。

2. SSR 分析とは

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型があるので、ローカスに存在するアリル（対立遺伝子）の長さに多型がみられることになる。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(アレルの組み合わせ)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こりやすいため)多型性が高い。加えて、SSR の多くはその長さが 100~200b¹⁾ 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。

※ 本ガイドライン(案)では塩基の単位を b(base)とした。これは、フラグメント解析に供試するサンプルが 1 本鎖であるからであり、基本的に bp(base pair)と同義である。

第 2 章：妥当性確認のガイドライン(案)

妥当性確認を実行する手順として、2 つの段階がある。一つは試験室間共同試験を実施する前に技術の開発機関等が明らかにしておくべき事項(事前確認事項)であり、もう一つは技術の再現性等を確認するための試験室間共同試験である。

1. 事前確認事項

事前確認事項には下記の項目があるが、全ての項目の実施が必須ではない。技術の種類によっては必要のない項目や不明であっても支障のない項目は実施しなくてもよい。

確認した項目の詳細と確認していない項目は各技術の実施マニュアル等に明記する必要がある。

また、技術の種類によって事前確認事項ではなく、試験室間共同試験で確認した方がよいと判断される項目は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

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ことが必要である。

品種内多型は時間の経過や異なる環境下で発生する確率が高くなることから、サンプルとして古くから広く流通している品種において、時間的(元株と流通している株等)、地理的に離れたサンプルを収集し、DNA 品種識別で用いるマーカーにおいて、多型が検出されないことを確認する等の方法が考えられる。

b. 品種の由来

DNA 品種識別技術を用いて登録品種等のデータを確定する場合や権利侵害を疑われるサンプルとデータを比較する等の場合、供試するサンプルは、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、サンプルとして供試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、元株や原木由来のサンプル、またはそれに近い株や木からのサンプルであることが望ましい。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コンタミネーション等がないことが担保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 分析では使用する試薬類や機器類の違いによって、検出されるアリのサイズに若干の差が出ることが知られている。これを補正するためにアリのサイズの基準となる品種を設定し、その基準品種のアリからの距離を元に分析する品種のアリのサイズを決定する方法が望ましい。基準品種は当該植物の DNA 品種識別を行う場合には必ず供試されるべき品種である。

このため基準品種は、由来が明確な株や木（母株や原木）がきちんと（責任を持って）管理されている品種であることが望ましい。少なくとも、その品種を代表する株や木から DNA サンプルが供試できる品種でなければならない。そのうえで、手に入りやすい品種であることが望ましい。

また、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アリのサイズの範囲」等によって変動する。アリの数が多い場合やアリのサイズの範囲が広い場合は基準品種のアリと分析する品種のアリ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アリのサイズの誤差が大きくなってしまう可能性が高い。このような場合は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。また、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。

b. マーカーの独立性

マーカーの独立性が確認されていることによって、「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、品種識別率（同一品種である確率が 0% 等）を出すことができる。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、等によって一定の担保をすることができる（資料1参照）。

c. Null 対立遺伝子がほぼ無いことの確認

Null 対立遺伝子がほぼ無いことが確認されることによって、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がほぼ確実となる。このため、再現性の確認をアリルごとにする必要がないことになる。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

a. DNA 抽出法

PCRによって十分に増幅するレベルの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行うことが望ましい。

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メーカーの違い等によって手順通りに試験を行っても結果に差が出る可能性があることに留意しなければならない。また、信頼できる結果が得られる条件を確認しておくべきである。

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 抽出に供試する部位は、収穫物または種苗として一般に流通する部位等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する場合、安定した結果を得るための条件を確立する必要がある。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)があるので、十分に確認する必要がある。

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は重要である。

d. サンプルの保存

SSR 分析における基準品種等は実際の分析に供試するサンプルをあらかじめ保管しておくことができる。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。記録する事項としては、サンプルの内容が分かる名称、採取場所、採取日、採取者等を記録することとする。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。

保存方法はサンプル部位や DNA 抽出までの時間によって、適した方法を選択することとする。ただし冷凍保存する場合は、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。
- ・冷凍庫は-30℃以下に設定すること。
- ・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の融解に気をつけること。

また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にも気をつける必要がある。

D. PCR 条件

使用するマーカーに適した反応コンディション（PCR サイクル、供試する DNA 量及び試薬類の濃度等）を確認しなければならない。特に SSR 分析における基準品種において、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しなければならない。

サンプル部位等が変わることによって、供試される DNA の質や量が変わる場合は、それに適した反応コンディションを確認しなければならない。

E. SSR 分析

a. PCR 産物の希釈倍率

フラグメント解析に不適な PCR 産物の濃度は、判定結果に影響を与えるため、フラグメント解析に適した PCR 産物の希釈倍率を確認することが望ましい。

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いことに留意しなければならない。

b. 精度の確認

同一サンプルの複数のデータ（測定値）から、平均と適合する範囲を確認し、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。

そのために基準品種のアリルからの距離によるデータの表示形式を採用したり、アリルの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

植物の加工品に DNA 品種識別技術を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

加工品は調理等の行程で細胞破壊や熱処理がされることにより、DNA が断片化す

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 で増幅される産物のサイズが小さ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は重要である。

b. 混合物

加工品は分析対象となる植物・品種以外のもの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. 査読と論文発表の必要性

妥当性確認をおこなう DNA 品種識別技術は査読を経て論文発表されていることや技術を発表した論文が複数引用されていることが重要である。それによって専門家から技術的な信頼性が高いことを認められていることになる。このことは裁判において 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技術の再現性を確認するためにおこなう。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、参加する試験室数の確保の可能性や試験にかかるコスト等を考慮し、参加する試験室及び試験者の質（経験・実績）を踏まえて、柔軟に設定できるものとする。

また、全ての基準品種は試験室間共同試験に必ず供試しなければならない。

A. 再現性を確認する項目

DNA 品種識別技術はその行程として、①サンプルの採取、②サンプルからの DNA 抽出、③DNA 分析（SSR 分析）、④分析結果の照合という 4 つの工程を経て、品種の特定をおこなう。このうち、試験室間共同試験で再現性を確認する項目は②及び③である。②と③は 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の原因究明が難しくなることがあることから、分割しておこなってもよいこととする。

B. DNA 抽出法の再現性確認

指定された DNA 抽出法によってサンプルから 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かを確認する。サンプル部位が変わることによって DNA 抽出方法が変わる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。

C. マーカー性能の再現性確認

SSR マーカーの性能の再現性を確認する方法としては 2 つの方法が考えられる（資料 5 参照）。一つは特定の品種に対して特定のフラグメントサイズを安定的に返してくること（試験方法 1）であり、もう一つはプライマーが特定のローカスに確実にアニーリングすること（試験方法 2）である。これらの性能が試験室間共同試験に参加した試験室において、再現性よく発揮されることを確認することを目的としておこなう。

どちらの試験方法を選択するかは、使用する SSR マーカーの Null 対立遺伝子（プライマー部分に変異があり、アリルが得られない対立遺伝子）頻度が確認されているかによる。

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「1. 事前確認事項」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。

- ① フラグメント解析は PCR 後、すぐにおこなうことが望ましい。
（PCR 後、長期間保存したり、凍結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）
- ② マーカーの再現性確認で用いる機種、設定、試薬類は 1 マーカーについておこなう全ての品種およびその反復は同一のでおこなうことはもちろん、可能な限り同じ日、同じランでおこなうことが望ましい（資料 6 参照）。
- ③ 基準品種のアリルは分析する品種のアリルを決定する基準となるため、試験室間共同試験に供試し、アリルのサイズ等を確認するべきである。

3. 変更された技術の妥当性確認

一度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用いて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。

A. 単一の試験室での再現性確認でよい変更点

- 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 再現性が確認されているマーカーのアリルの追加
- ⑤ マーカーの簡易な変更（蛍光色素の変更等）

B. 複数の試験室で再現性確認することが望ましい変更点

- ① DNA 抽出をおこなう植物や部位の変更（抽出法に簡易な変更あり）

- ②マーカーの追加・変更（査読のある文献等で同一植物への適用例がある等特に信頼性が高いマーカー）

C. 新規に再現性を確認しなければならない変更点

- 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

4. 試験データの提出

妥当性確認試験の協力機関は設定された期間内に作成した下記の試験データを試験の主体となる機関に提出する。

A. DNA 抽出法の妥当性試験において

- 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 分析の波形図）

B. マーカーの妥当性試験において

- ①SSR 分析の波形図（各マーカー、サンプルごと）
- ②波形図から分析者がピークと判断したデータ値

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）
（試験に参加した機関間で統一されていないものについて報告する。）
- ③ 験中に気付いた点
不具合やサンプル間の差、その他プロトコルを逸脱した可能性に関する情報

表1: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	PE Applied Biosystems 9700	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	PE Applied Biosystems 9700	ABI 310	1 本	310 Capillaries 47 cm×50um	POP-4	400HD ROX
福島	PE Applied Biosystems 9700	ABI 3130	4 本	3100-Avant/3130 36cm Capillary Array	POP-7	400HD ROX
茨城	PE Applied Biosystems 9700	ABI 3130xl	16 本	3100/3130xl 36cm Capillary Array	POP-4	400HD ROX
千葉	PE Applied Biosystems 9700	ABI 3130xl	16 本	3100/3130xl 50cm Capillary Array	POP-7	400HD ROX
和歌山	Gene Amp PCR System 2700	ABI 310	1 本	310 Capillaries 47 cm×50um	POP-4	400HD ROX
福岡	アステック PC-808-02	ABI 310	1 本	310 Capillaries 47 cm×50um	POP-4	400HD ROX
宮崎	PE Applied Biosystems 9700	ABI 3100	4 本	3100-Avant/3130 36cm Capillary Array	POP-4	400HD ROX

第3章：予備試験

試験室(試験室間共同試験に参加する試験室や妥当性確認された技術を使用する試験室)は妥当性確認をおこなう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、結果を安定的に出すことができるレベル(技術的な経験・実績および品質管理等)でなければならない。

しかしながら、現段階では DNA 品種識別技術において（ISO 取得等の）品質保証体制を構築している試験室が少ないため、当面、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、十分な予備試験を行うことで、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と考えられる。

本章はガイドラインの本論ではないが、妥当性確認の結果に大きく影響する要素を持っていることから章の1つとして扱った。

1. 予備試験における確認事項

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 品種識別技術のマニュアルに沿っておこなう。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マニュアルの改善点（表現方法や機器等の違いによる修正点等）を見つけ出し、共同試験をスムーズに進めるための下地を作るべきである。

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

フラグメント解析における波形データから正しいピークを判定できる能力を確認するべきである。そのため典型的な波形データのうち、判定に経験や知識が要求されると考えられるものについては、予備試験に含めることが望ましい（資料7参照）。

2. 技術を導入する試験室の確認事項

「1.」で挙げた項目以外に技術を導入する試験室は以下の事項を実施していることが望ましい。

A. 基準品種と不明の品種を用いた再現性と精度の試験

B. 内部、外部または共同で実施される技術の検定試験

第4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

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

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代えることを実行するべきである。

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）。

磨砕方法は主体となる機関から特に指定がない限り、サンプル部位、サンプル数、試験室の設備等から最適な方法を選択できる。

3. DNA 濃度及び純度の確認

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）を確認するべきである（DNA の濃淡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 RNA と DNA を同じ波長で検出することに注意しなければならない。

4. PCR について

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行われなければならない。

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. フラグメント解析について

試験室内ではシーケンサーの機種および使用する試薬類は統一しなければならない。

サンプルごとに反復をとるべきである。

PCR 後はすぐにフラグメント解析をすることが望ましい。

分析対象の品種、比較する品種、基準品種、およびそれらの反復は同一のランの中で分析しなければならない。

6. コンタミネーション防止

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℃ 2 時間）するべきである。

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。

第5章：ガイドライン（案）作成における参考資料と考察

1. 妥当性確認の基準作成の背景

妥当性確認は各分野において基準が作られており、DNA 分析を含む定性的な分析法につ

いても 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²⁾、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」の設立を提案したりという動きが見られるが、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基準は確立されていない。

そのため、本ガイドライン (案) を作成するにあたり、稲やイチゴの妥当性確認において使用された AOAC の試験室間共同試験のガイドライン(2005)³⁾ と識別技術として SSR (植物以外での名称は STR(Short Tandem Repeat))を使用する法医学分野のガイドラインを参考にした。

両ガイドラインとも妥当性確認の考え方は同じであるものの、第 1 章の 1 で記載したように技術の妥当性確認は「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、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いう結論に達したことから、妥当性確認の項目など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することとした。

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ため、SWGDM のガイドラインと ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) のガイドダンス⁴⁾ および DAB Standard (DNA Advisory Board Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories)⁵⁾ を参考にした。

SWGDM 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行う妥当性確認 (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これに含まれる。試験室数についての明記はないが、SWGDM 共同試験の一環として行っている。

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、検定試験を少なくとも 50 試料で分析する。このうち検定試験は、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) 又は共同試験で行う。

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毎に確認するので、複数の試験室で実施する Internal Validation とは異なるが、目的は類似している。これは、DNA 鑑定の技術は Developmental Validation を経たものであっても、実施する試験室や試験者がその技術に対する経験や専門知識が十分で

なければ正しい結果が得られない可能性が他の技術に比べて高いことを示唆していると考えられる。

ENFSI のガイド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」とはサンプルが基準値と一致する、または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およ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。

3. 試験室間共同試験における試験室数について

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 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)

一方、SWGDAM のガイドライン、ENFSI のガイドンスおよび DAB Standards においても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。

資料 9 に 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⁷⁾を掲載した。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いる。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行っている。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。これは法医学における試験室間共同試験は画一的なものではなく、妥当性確認をおこなう技術(キットの内容等)により柔軟に設計しているからであると考えられる。

植物における DNA 品種識別技術は①対象となる植物種が多いこと、②主産地に地域的な偏りがあることなどから共同試験に参加する試験室数を一定の数にすることは妥当性確認を経る DNA 品種識別技術の数を抑制する可能性があると考えられる。また、試験室数を一定にすることで経験や実績が十分でない試験室や試験者が参加する可能性が高まり、妥当性確認の結果に影響を与える危険性も考えられる。

これらのことから、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。

4. DNA 品種識別技術における結果の証拠能力

植物の DNA 品種識別技術は育成者権の侵害に対しての対抗措置等として使用することを目的としていることから、試験の結果は裁判における証拠としての能力を満たしていることが望ましい。

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 Standard⁸⁾ 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。

- ①その証拠が基づいた手法は試験できる仮説を中心としているか？
- ②その手法と関連する既知又は潜在的な誤差率。
- ③その手法が査読を受けているか？
- ④その手法は関連する科学界で一般的に受け入れられているか？

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 6 項目のうち特に重要視されているのは③と④ということであった。査読を受け、論文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であることとなる。いくつかの論文で掲載されていれば、その技術は（専門家間で）一般的に受け入れられたと見なすことができ、ひいてはその技術を使用することが標準的であるということができる。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。

第 6 章：ガイドライン（案）の適用例（おうとう）

本ガイドライン(案)はその作成にあたって、ガイドライン（案）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。

1. 事前確認事項

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（以下山形県農試）内で保存している「佐藤錦」と東京大田市場および国内産地にて購入した北海道産、福島県産、山梨県産、長野県産およびタスマニア産の「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⁹⁾。

b. 品種の由来

供試したサンプルは全て山形県農試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試の試験データから 1 マーカー当たりのアليل数がそれほど多くないこととアليلのサイズの範囲も広くないことから 2 品種程度が適当であると考えられた。

品種は山形県農試の育成品種で原木も管理されている「紅秀峰」と原木はないものの、山形県農試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分か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 および G4 からはマーカー間が 40~50cM 程度の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 マーカーの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 H_e と H_o の値が示されており^{10) 11)}、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 のプロトコルに概ね従った。プロトコル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 スピニングカラムに移し、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週目のサンプルからでもDNAが抽出できた。常温保存の果実においても保存後5週目のサンプルからでもDNAは抽出できたが、早いものでは保存後2週目で、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。PCR増幅およ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

山形県農試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	2,0ul
dNTP	2,0ul
H ₂ O	13.9ul
Taq polymerase	0,1ul
marker	1,0ul
DNA	1,0ul
計	20.0ul

b. PCR サイクル

①

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

②

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

E. SSR 分析

a. PCR 産物の希釈倍率

表2：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アリルと判断した。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。

「SSR マーカーによる輸入オウトウおよび国内市販品の品種識別」高品善、遠藤玲子、藤井浩、山本俊哉 DNA 多型 Vol.15(2007)101-104

2. 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 抽出法およびマーカーの性能

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をして濃度およ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 はアガロースゲルおよび PCR 産物における確認で全ての試験室において良好な結果が得られた(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 はアガロースゲルおよ

び PCR 産物における確認で全ての試験室において良好な結果が得られた。

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。アガロースゲルでの確認が難しいものがいくつかあったが、PCR 産物での確認では 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 40 回に、PCR 産物の希釈倍率を 1/2 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っていたことが、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、葉および果梗の 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、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ため、AOAC のガイドラインに照らしても妥当性確認の基準を満たしていることから、再現性が確認された。

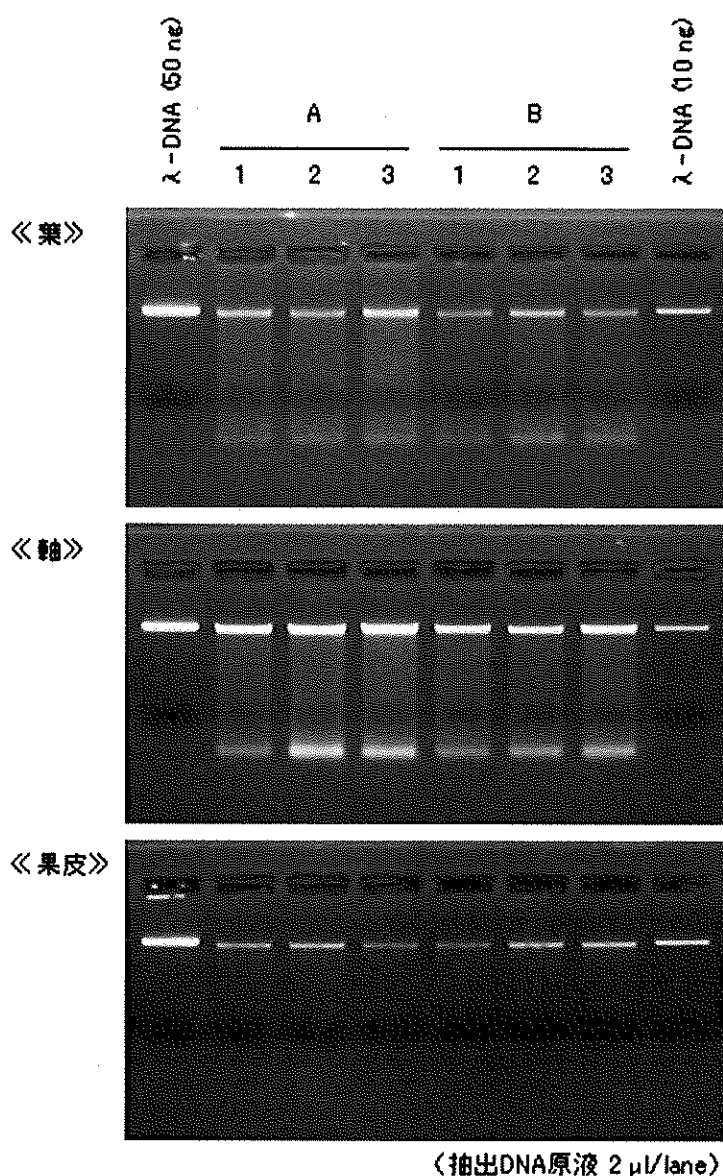


図.1 DNA 抽出法の再現性確認の結果(食品総合研究所)

C. マーカー性能の再現性確認

マーカーの独立性および Null 対立遺伝子頻度が確認されていることから、試験方法 1 で再現性の確認をおこなった。

サンプルは基準品種となる「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。

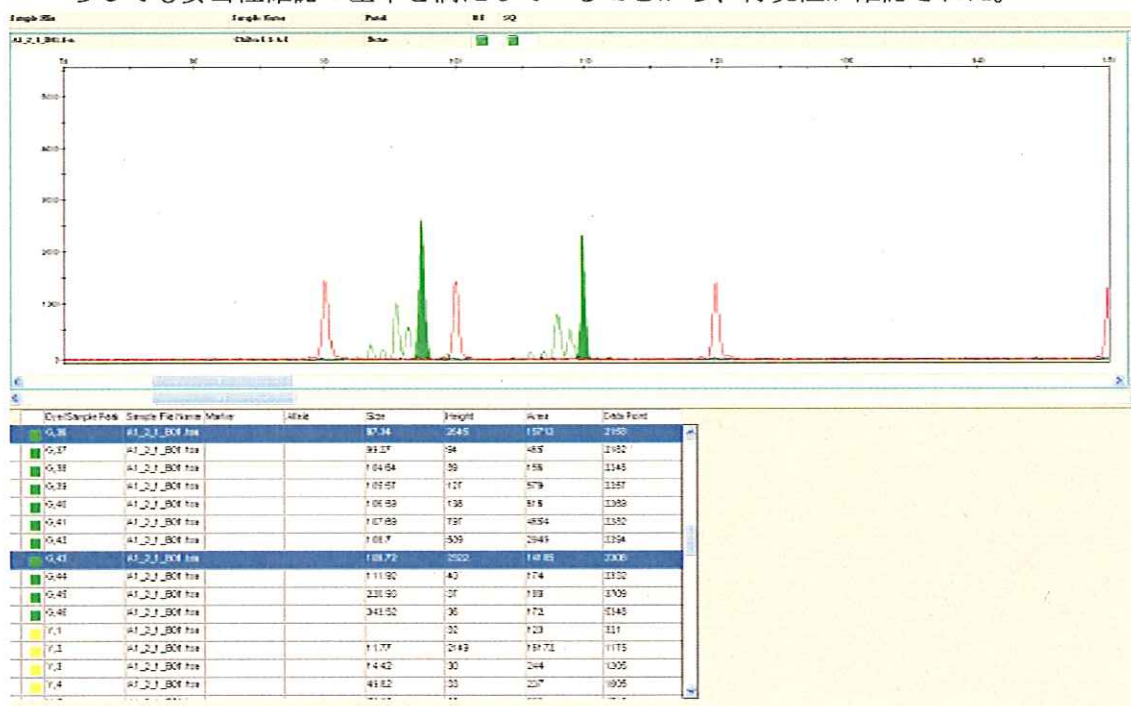
その結果、10 試験室では全てのサンプルから再現性の高い(一定のデータの範囲と解釈できる)結果が得られた (図 2)。

残りの 1 試験室では 2 つのマーカー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結果が得られた。そのデータの特徴として、2 つのマーカーともに「佐藤錦」と「紅秀峰」間のデータにやや差がみられ、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。担当者によるとその2つのマーカーについては、「佐藤錦」と「紅秀峰」のPCRとフラグメント解析を別々の日に実施したとのことであった。また、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においては同様の傾向が見られた。このため、上述の2マーカーにおけるデータの特徴はサンプルを別の日に（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。

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

残りの2マーカーについても、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、①原因がマーカーの性能によるものではないと考えられること、②10試験室で再現性の高い結果が得られていることから、AOACのガイドラインに照らしても妥当性確認の基準を満たしていることから、再現性が確認された。



3. 変更された技術の妥当性確認

本妥当性確認において、試験室間共同試験で確認すべき技術の変更点はないことから、実施しなかった。

4. 試験データの提出

A. DNA抽出法の妥当性試験において

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. マーカーの妥当性試験において

11 試験室から各マーカー、サンプル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

（試験に参加した機関間で統一されていないものについて報告する。）

②試験中に気付いた点

不具合やサンプル間の差、その他プロトコルを逸脱した可能性に関する情報

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

山形農試のおうとうの DNA 品種識別マニュアルに従い、葉、果梗、果皮における DNA 抽出とマーカー性能の再現性確認の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、果梗およ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およ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 抽出および PCR・フラグメント解析において、それぞれ 2 反復ずつおこなった。

c. 結果判定能力の確認

フラグメント解析における波形データから正しいピーク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、マニュアルの文章の改善・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するように要請をおこなった。

これにより、参加試験室が SSR 分析およびおうとうの 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、誤解のないマニュアルにするための修正をおこなうことができた。

A. 技術を導入する試験室の確認事項

a. 基準品種と不明の品種を用いた再現性と精度の試験

予備試験は、品種名を伏せておこなったことから(ブラインド試験)、簡易ではあるが、参加試験室における再現性と精度を確認できたと考えられる。

b. 内部、外部または共同で実施される技術の検定試験

予備試験も本試験と同様に、サンプル等は種苗管理センターから送付し、結果についても同センターに報告させたことから、外部による技術の検定試験を実施したと見なすことができると考えられる。

第7章：資料等

1. 資料

次ページから資料1～9を掲載した。

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、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、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、 χ^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、観察値がこの頻度と比べて大きなずれが認められれば、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% で良いと考えられる。マーカーの独立性に関する詳細は、鵜飼保雄著「ゲノムレベルの遺伝解析 MAP と QTL」(東京大学出版会) 一第 4 章連鎖検定一を参照する。

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 SSR マーカーを使用した DNA 品種識別では、2 つのサンプルの結果に差があれば、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 SSR マーカーにおいて品種内多型がなければ)可能であるが、2 つのサンプルの SSR 分析の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% 等)を出すことができない。

このような SSR マーカーを用いて、SSR 分析の結果から品種を特定するためには、①サンプ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 SSR 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SSR分析の結果が違う場合	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SSR分析の結果が同じ場合	品種識別率から同一品種である確率を出すことができる。	SSR分析の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SSR分析の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 Null 対立遺伝子がほぼ無いことの確認

遺伝子型をもと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。

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

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 : He）より観測値（Observed Heterozygosity : Ho）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 フラグメント解析によるデータの表示形式と誤差の範囲

1. データの表示形式

SSR 分析において読み取られた PCR 産物のサイズは、サイズスタンダード間の距離を元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、シークエンサーの機種、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データ値をもつことになる。

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データ値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サイズ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、データの誤差がフラグメントサイズを示すデータ値では比較的大きいが、フラグメント間の距離では比較的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、基準品種のデータ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）」の積を加えた値を足した数字で表す。フラグメント解析で得られる数字は小数点第 2 位まで表示されるが、実際の塩基数は整数であるため、通常は四捨五入して「X」を整数値にする。

$$\underline{A}、\underline{A+B}\underline{X} \text{ (} X > 0, X \text{は整数)}$$

基準品種の小さい方の フラグメントサイズ	SSRの リピート単位	SSRの リピート回数
-------------------------	----------------	----------------

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。

基準品種のデータの表示方法（例）

* SSRは2塩基リピート。

* 増幅産物のピーク値は「100.2b」と「110.4b」。

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、100.2bと110.4bはA、A + 10と表示される。

基準品種のデータを元にした分析品種のデータ表示（例）

* SSRは2塩基リピート。

* 基準品種のピーク値は「100.2b」と「110.4b」であり、A、A + 10と表示。

* 分析品種のピーク値は「106.4b」と「112.6b」

上記の条件より

基準品種と分析品種のピーク値で最も近いのは

基準品種の「110.4b」と分析品種の「112.6b」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。

「112.6b」が「A + 12」と表示されることから

$$112.6 - 106.4 = 6.2 \text{ となり、}$$

「106.4b」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、基準品種のデータを元にした分析品種のデータ表示は

「A + 6」、「A + 12」となる。

このデータの表示形式を適用した例を別紙1に示した。別紙1におけるデータでは、最終的に全てのデータが本来のデータの範囲を反映した表示形式にすることができた。実際にはほとんどのデータは上記の表示形式で本来のデータ範囲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。別紙2には上記の表示形式が単純には当てはまらない例を示した。ここでは試験室Yと試験室Iのデータはアリル間の距離を見る限り安定した結果であるが、アリル間の距離の平均が12.51bであるため、わずかなズレによって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との距離からデータを算出しているからである。このため、①塩基は種類によってサイズが異なることから、塩基配列に偏りがあると誤差が大きくなること、②アリル間やアリルとサイズスタンダードの距離が長くなると誤差が大きくなりやすいこと等からこのような誤差が生じると考えられる。

2. 誤差の範囲

最終的な表示データは異なるものの、別紙2の例では反復したデータ間の誤差は小さいため、誤差が一定の範囲内であれば試験者の判断によってアリルの範囲とすることができるとについて検討した。

アリルの範囲は、通常SSRは反復配列のリピート単位ごとに増減するため、リピート単位をアリルの範囲とする(2塩基リピートなら $\pm 1b$)ことも考えられたが、塩基のInsertion、Deletion等により、リピート単位によらないアリルの増減(この場合 $A+BX+\alpha$ と表示)もあるため、 $1b$ ($\pm 0.5b$) が適切であると考えられた。

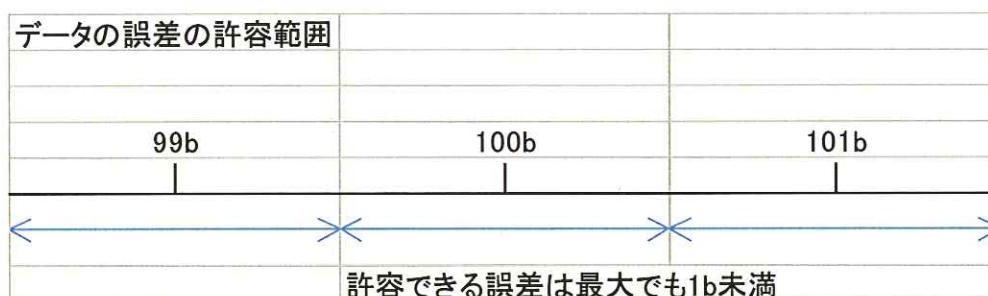


図3：データの誤差の許容範囲のイメージ

次にアウトウの試験室間共同試験のデータから各試験室内でのアリルの誤差を比較した結果を下表に示した。

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のアリルの誤差の平均。単位はb。

上表より、各試験室の誤差の平均は1bを大きく下回っている。このことからデータの誤差は $1b$ ($\pm 0.5b$) とすることが適正であると考えられる。

ただし、誤差を最小限にするためには試験室、機種、試薬類が全て統一することが望ましい。これは上表より全試験室間のデータの誤差は1.78bであることから、異なる試験室でおこなったデータを直接比較することはできないからである。その他の注意事項はガイ

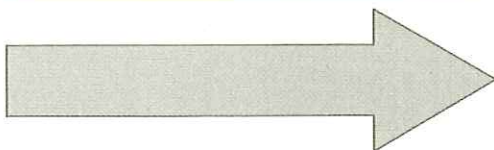
ドライン（案）本文の A.事前協議事項－C. マーカー性能の再現性確認－c. 注意事項を参照すること。

資料4-1 資料3におけるデータの表示形式の適用例(おうとうの試験室間共同試験)

マーカー 1-1		
		アリル① アリル②
試験室 Y	品種 S	243.61 / 243.61
		243.38 / 243.38
		243.33 / 243.33
		243.35 / 243.35
		243.37 / 243.37
		243.42 / 243.42
		237.42 / 243.27
試験室 Y	品種 B	237.39 / 243.31
		237.40 / 243.20
		237.40 / 243.19
		237.28 / 243.19
		237.31 / 243.22
試験室 F	品種 S	246.11 / 246.11
		246.04 / 246.04
		246.00 / 246.00
		246.08 / 246.08
		246.00 / 246.00
		245.93 / 245.93
		240.11 / 245.90
試験室 F	品種 B	240.21 / 246.00
		240.11 / 245.90
		240.11 / 245.93
		240.11 / 245.90
		240.21 / 245.97

全てのアリル①を品種BのNo.1のアリル①からの距離で表示

全てのアリル②は同じサンプルのアリル①からの距離で表示



マーカー		
		① ②
Y	S	6.19 / 0.00
		5.96 / 0.00
		5.91 / 0.00
		5.93 / 0.00
		5.95 / 0.00
		6.00 / 0.00
		0.00 / 5.85
Y	B	-0.03 / 5.92
		-0.02 / 5.80
		-0.02 / 5.79
		-0.14 / 5.91
		-0.11 / 5.91
F	S	6.00 / 0.00
		5.93 / 0.00
		5.89 / 0.00
		5.97 / 0.00
		5.89 / 0.00
		5.82 / 0.00
		0.00 / 5.79
F	B	0.10 / 5.79
		0.00 / 5.79
		0.00 / 5.82
		0.00 / 5.79
		0.10 / 5.76

小数点第1位を四捨五入



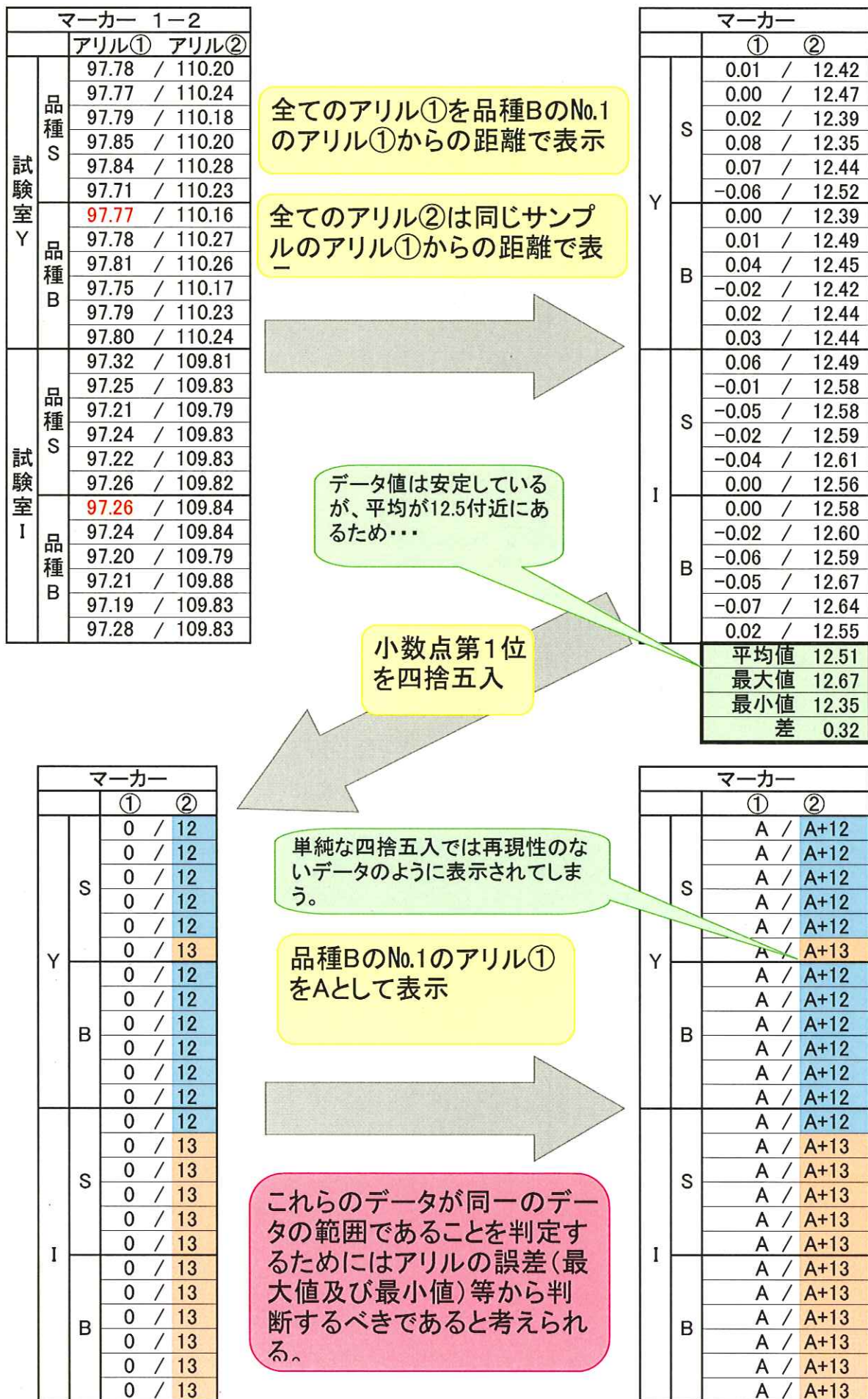
マーカー		
		① ②
Y	S	6 / 0
		6 / 0
		6 / 0
		6 / 0
		6 / 0
		6 / 0
		0 / 6
Y	B	0 / 6
		0 / 6
		0 / 6
		0 / 6
		0 / 6
		0 / 6
		0 / 6
F	S	6 / 0
		6 / 0
		6 / 0
		6 / 0
		6 / 0
		6 / 0
		0 / 6
F	B	0 / 6
		0 / 6
		0 / 6
		0 / 6
		0 / 6

品種BのNo.1のアリル①をAとして表示



マーカー		
		① ②
Y	S	A+6 / A+6
		A+6 / A+6
		A+6 / A+6
		A+6 / A+6
		A+6 / A+6
		A+6 / A+6
		A+6 / A+6
Y	B	A / A+6
		A / A+6
		A / A+6
		A / A+6
		A / A+6
		A / A+6
		A / A+6
F	S	A+6 / A+6
		A+6 / A+6
		A+6 / A+6
		A+6 / A+6
		A+6 / A+6
		A+6 / A+6
		A+6 / A+6
F	B	A / A+6
		A / A+6
		A / A+6
		A / A+6
		A / A+6

資料4-2 同一のデータと見なすために人的判断が必要となる例(おうとうの試験室間共同試験)



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

これは SSR 分析によって検出されるアリルの再現性を確認することで、SSR マーカーの妥当性確認を行う方法である。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 138b と 150b の、品種 d では 150b と 173b のアリルが検出される場合、他の機関において試験を実施した場合にその結果が再現できるか（後述するがアリルのサイズの再現性ではなく、アリル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、アリル数が多くなると試験規模が大きくなる。

また、厳密には再現性が確認された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、品種識別に使用することができる。

アリルの妥当性確認の方法には2つの方法が考えられる。1つ目は、マーカーA を用いて 150b と 173b のアリル得られるのは品種 d、品種 e・・・、というアリル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 138b のアリルが得られるのは品種 a、品種 b・・・、150b が得られるのは品種 b、品種 c、・・・、のように個々のアリルの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

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、その PCR 産物は品種の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、アレルごとの再現性確認を必要としないため、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その妥当性に影響がないことである。

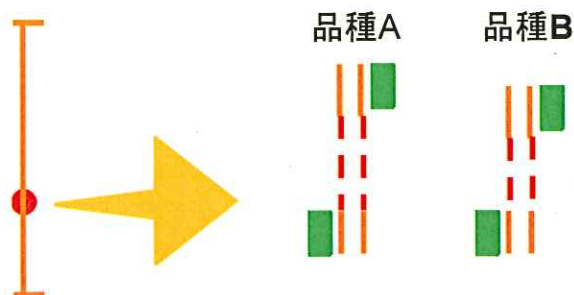


図4：試験方法2のイメージ図

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	各品種のアレル（対立遺伝子型）	ローカス（対立遺伝子）
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とき	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 異なる日にPCR・フラグメント解析をおこなったことによる誤差の例

マーカー 4-1		アリル①		アリル②	
試験室 F	品種 S	169.37	/	202.91	
		169.37	/	202.99	
		169.30	/	202.88	
		169.43	/	202.89	
		169.30	/	202.81	
		169.30	/	202.83	
	品種 B	169.85	/	203.83	
		169.94	/	203.85	
		169.89	/	203.85	
		169.83	/	203.87	
		169.97	/	203.81	
		169.96	/	203.95	

アリル②の最小値 202.81
アリル②の最大値 202.99
アリル②の平均値 202.89

品種内誤差 0.18b

平均値で 0.97bのズレ

アリル②の平均値 203.86
アリル②の最小値 203.81
アリル②の最大値 203.95

最大で 1.14bの誤差

品種内誤差 0.14b

※品種Sと品種Bは異なる日にPCRとフラグメント解析をおこなった。

品種Sと品種Bではアリル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値は安定していた。

これ以外にも同様の事例があったため、品種Sと品種Bのデータ値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。

資料7 フラグメント解析における SSR 波形の分析方法

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、目的のアリルのフラグメントの前後にそれよりも小さい波形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、目的の波形の前（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、それらの波形から 1 塩基ずれた位置にスタッターバンドという波形が検出されることもある（図 6）。2 塩基リピートの SSR の場合、スタッターバンドがあると波形分析がしづらくなる。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ことと 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。

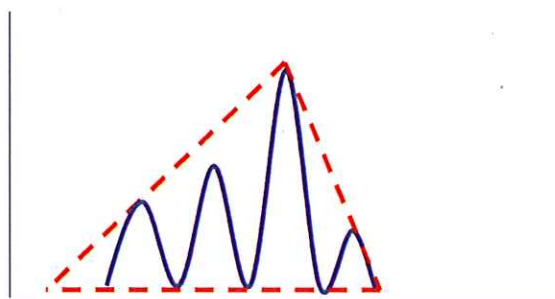


図 5：SSR マーカーによるフラグメントの形状

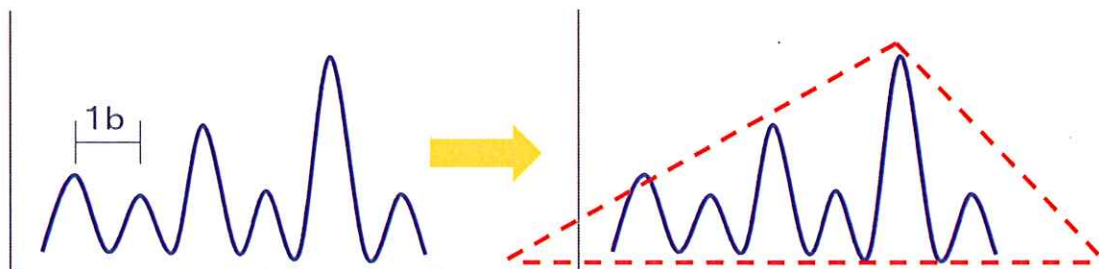


図 6：2 塩基リピートの SSR においてスタッターバンドが出たフラグメントの形状

2. アリルの長さが短いほど増幅効率がよい

SSR マーカーによるフラグメントはアリルの長さが短いほど増幅効率がよい傾向がある。例えば、100b と 120b のアリルが増幅される場合、100b のアリルの方が 120b のアリルよりもフラグメントのピークが高くなる。この差は二つのアリル（フラグメント）の距離が離れるほど大きくなる（図 7）。

このため、PCR 産物を滅菌水等で希釈したものをサンプルとする場合や、PCR による増幅が十分でないサンプルを扱う場合は注意が必要である。このようなサンプルを用いたときに、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場合、（SSR 独特のフラグメントの形状を示していなかったり、フラグメント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。これを避けるため、アリル由来のフラグメントのうち最もピークが高いものはサイズスタンダード程度の高さがあることが望ましい。フラグメントのピークが低い場合は、PCR 産物の希釈倍率の変更し、再度フラグメント解析を行うことを検討した方がよい。

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）。

上記の A と B 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。

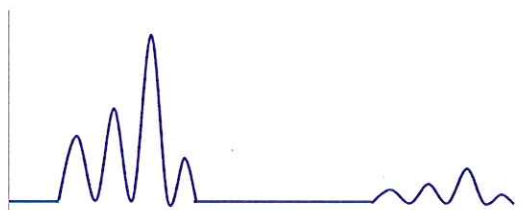


図 7：アリルの距離が離れている場合のフラグメントのピークの関係（イメージ）

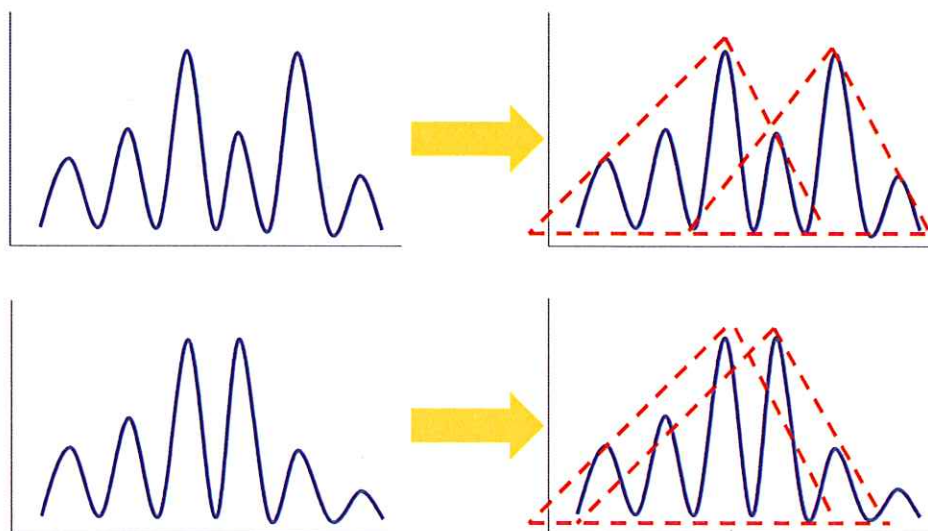


図 8：2つのピークがあると判断されるフラグメントの例

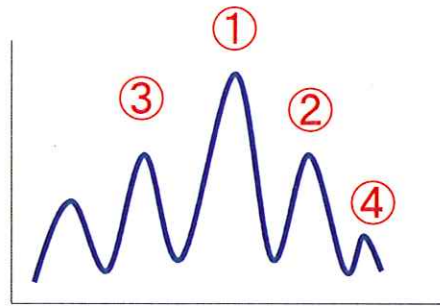


図 9：波形の分析例

図 9 において、②のピークが③のピークより同程度もしくは少し低い場合、②のピークが①のピークよりも小さいことおよび④に小さいピークがあるかを判断基準とする。 ありと判断できる場合は①と②の 2 つのピークがあると判断する。

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上記のように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、比較的色彩調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。

また、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。PCR 産物からのフラグメントの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、フラグメントの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。

SSR 独特のフラグメントを示していないピークは SSR のフラグメントとして認識しないこと。ピーク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 1b を超えるものは SSR マーカーによって増幅されたアレル由来のフラグメントではないので、SSR のフラグメントとしてみないこと。

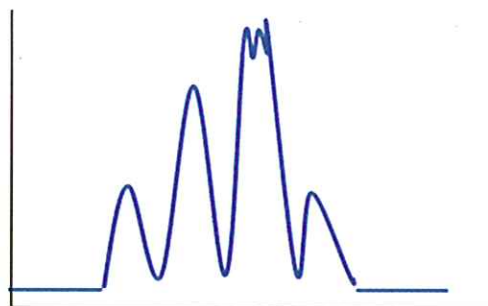


図 1 0 : サンプル濃度が濃いために起こるフラグメントの乱れ 1
ピークの頂点がつぶれている場合はサンプル濃度が濃すぎる。

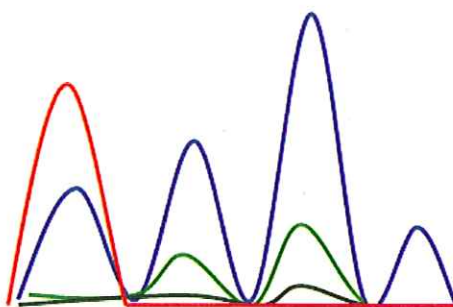


図 1 1 : サンプル濃度が濃いために起こるフラグメントの乱れ 2
青：目的のフラグメント 赤：サイズスタンダード 緑・黄：ノイズ
上図では青の蛍光色素でピークがあるが、サンプル濃度が濃いために他の蛍光色素が影響を受けてる。

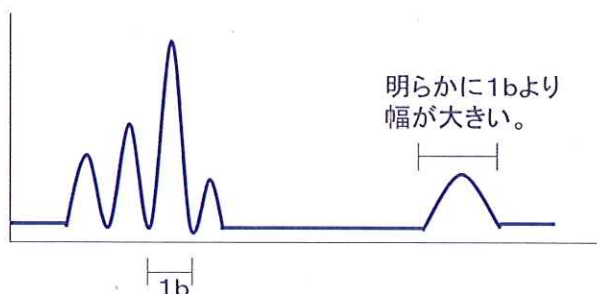


図 1 2 : SSR マーカーによる増幅産物ではないフラグメントの例
上図の右側のピークはピークの前後に SSR 独特の小さな波形がない。また、幅が 1b より大きいものは、DNA 以外の波形であると考えられる。