

「ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統及びラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統」に係る安全性確認

I はじめに

ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統及びラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼料名 : ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統
ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統
性質 : 除草剤グリホサート耐性
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : 米国モンサント社、Forage Genetics Incorporated 社

ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統(以下「J101 系統」という。)及びラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統(以下「J163 系統」という。)は、グリホサート(商品名:ラウンドアップ)存在下でも機能する改変 CP4 EPSPS たん白質を発現する遺伝子(改変 *cp4 epsps* 遺伝子)を導入したものであり、グリホサートの影響を受けずに生育できる性質を付与されている。

J101 系統及び J163 系統と既存のアルファルファとの相違は、J101 系統及び J163 系統が改変 CP4 EPSPS たん白質の発現によりグリホサートの影響を受けない点だけである。

一般に、アルファルファの茎葉が家畜等の飼料として広範に使用されている。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

1 遺伝的素材に関する事項

宿主として用いた植物はアルファルファ(*Medicago sativa* L)で、マメ科 *Medicago* 属に属する(参考文献①)。

導入に用いた改変 *cp4 epsps* 遺伝子は土壌微生物である *Agrobacterium* sp. CP4 株から同定・単離され、植物での発現を高めるためとベクター構築のため、遺伝子に改変が加えられている。

2 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

アルファルファの茎葉はたん白質、ビタミン及びカルシウムに富み、その収穫物は主に乳牛用の飼料として乾草、キューブ、ミール(乾草を粉砕したもの)、ペレットの形で利用されている(参考文献②)。

3 飼料の構成成分等に関する事項

J101 系統の茎葉の主要構成成分(乾物重%)は、たん白質 21.01%、総脂質 2.19%、ADF26.83%、NDF29.49%、灰分 13.48%、炭水化物 63.32%であり、J163 系統の茎葉の主要構成成分(乾物重%)は、たん白質 21.21%、総脂質 2.27%、ADF28.31%、NDF30.94%、

灰分 13.23%、炭水化物 63.29%であった。

4 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

J101 系統及び J163 系統と既存のアルファルファとの相違は、本組換えアルファルファが CP4 EPSPS たん白質の発現によりラウンドアップの影響を受けずに生育できる点のみである。この点を除くと J101 系統及び J163 系統は既存のアルファルファと同じであり、既存のアルファルファと比較して使用方法に変わりはない。

①収穫時期と貯蔵方法

一般栽培における刈取りは、寒冷地で1～2回、温暖地で5～6回以上可能であり、標準的な刈取り適期は「開花 10%時期」とされている。

②家畜等の摂取部位

茎葉を飼料として利用する。

③家畜等の摂取量

牛における1日飼料摂取量は体重の 3.0～4.0%で、うち 40～60%が粗飼料で占められる。産卵鶏における1日飼料摂取量は体重の 4.0～8.5%で、うちアルファルファ(ミール)の飼料配合率は 3%程度である。豚における1日飼料摂取量は体重の 3.4～7.3%であるが、アルファルファ(ミール)の使用量は特に決まっていない。

④調製及び加工方法

アルファルファはサイレージ若しくは乾草として加工される。さらに、乾草はミール、ペレット、キューブ状に加工されることが多い。

以上 1.1～1.4 により、J101 系統及び J163 系統の飼料としての安全性を評価するために、既存の飼料を比較対照として用いる方法が適用できると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

アルファルファは優れた飼料作物である一方、肥沃で雑草害の少ない土地でないと定着して草地化することが困難な作物である。アルファルファ草地におけるアルファルファと雑草との競合や、収穫物への雑草の混入による飼料の品質低下は、従来のアルファルファ栽培において重要な問題であった。

J101 系統及び J163 系統はグリホサートの存在下でも機能する改変 CP4 EPSPS たん白質を発現する改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入され、グリホサートの影響を受けずに生育することができる。結果として、除草効果に優れたグリホサートをアルファルファの栽培に利用できるようになり、雑草の発生に応じて従来よりも効果的・的確な除草が行えるようになるため、定着・草地化が容易となり、さらに従来よりも雑草の混入の少ない良質の収穫物を飼料として提供できるようになることが期待される。

3 宿主に関する事項

1 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

アルファルファ(*Medicago sativa* L)は、マメ科 *Medicago* 属に属する多年生植物である(参考

文献②)。J101 及び J163 系統の作成にあたっては、アルファルファ品種の育種母本群である R2336 系統が用いられた。

2 遺伝的先祖に関する事項

多年生植物であるアルファルファの属する *Medicago* 属は 60 種以上の種からなり、現在商業栽培が行われているアルファルファには *Medicago sativa* L. subsp. *Sativa*(紫花アルファルファ)、*M. sativa* L. subsp. *falcate* L.(黄花アルファルファ)の2つの亜種とこれらの交雑種が存在している。栽培種の多くは *Medicago sativa* L. subsp. *sativa* に属する。

3 有害生理活性物質の生産に関する事項

アルファルファは、リグニン、サポニン、L-カナバニンといった有害物質を産生することが報告されている。

(1)リグニン

アルファルファの飼料としての品質を低下させる抗栄養素としてリグニンがある(参考文献③)。リグニンはセルロースと共に植物の木質部を形成するものであり、植物の生育が進むにつれてその含量が多くなる。リグニンの科学的構造は不明な点が多いが、約 14%~21%のメキシル基を含み、アルカリに対しては不安定であって、塩酸と硫酸に対しては安定である。リグニンは動物によりほとんど消化されないため、リグニンの多い飼料は栄養価が劣る(参考文献②)。アルファルファ商業品種のリグニン含量は、乾草中に 4.5~7.6%程度含まれている(参考文献④)。

(2)サポニン

サポニンは植物界に広く分布する異なる構造や機能を有するトリテルペノイドグルコシドの混合体であり、アルファルファに含まれるサポニンを化学的構造により分類すると、ソヤサポニン、メディカジェニック酸グリコシド、ザーニック酸グリコシド、ヒドラジングリコシドに分類される。

サポニンは溶血性を有するが、経口では胃腸管からほとんど吸収されず血管に入ることはないため、ほ乳類に対する経口毒性は一般的に低いとされている。

(3)L-カナバニン

L-カナバニンは植物界に存在する天然アミノ酸で種子及びスプラウトの乾物重の約 1.5%含まれている。アルギニンの構造類似体として作用し、アルギニンに関する拮抗阻害剤として作用したり、アルギニンが阻害する酵素活性をアルギニンと同様に阻害し、微生物・植物の生育を阻害する。

4 寄生性及び定着性に関する事項

アルファルファは種子植物であり、それを食する家畜等に寄生または定着することはない。

5 ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

アルファルファにはウイルス病等の病害が発生するが、これらの病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。

6 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

アルファルファは刈取りや地上部枯死後に残存する株冠(Crown)に生じる新たな分茎(Shoot)

を用いて人為的な栄養増殖が可能であるが、一般栽培や自然条件下で分茎から新たに株が増殖することはない(参考文献⑤)。また、アルファルファの株冠は-20℃以下の温度でも生存できるので越冬可能である(参考文献⑥)。一方、成熟種子にはしばしば水分吸収を防ぐ不浸透性の種皮が形成され、その場合は土壌中で長期間生存可能となる(参考文献⑦)。

尚、アルファルファは肥沃で雑草害の少ない土地でないと多年生植物としての永続性を発揮することができず、雑草との競合に弱いために(参考文献⑤)、自然条件下での繁殖能力は極めて弱いと考えられる。

7 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

アルファルファは種子繁殖する多年生植物であり、また、自家不和合性の強い他殖性植物でもあり、主にハナバチ、ハキリバチやミツバチ等を花粉媒介昆虫として虫媒受粉によって種子形成される(参考文献①, ⑥, ⑧, ⑨)。開花始めは 5~6 月で虫媒によって他花受精を行う(参考文献⑩)。植物体は刈取りや地上部枯死後に株冠(Crown)が生じて越冬し、その翌年に株冠から新たな分茎(Shoot)が再生する。

8 飼料に利用された歴史に関する事項

アルファルファは紀元前 1400~1200 年のトルコの遺跡で家畜の飼料として利用されていたことが発見されている。わが国へは明治 7 年(1874)にアメリカから北海道に導入されたのが始まりで、普及したのは戦後(1945~)のことである(参考文献⑤)。

9 飼料の安全な利用に関する事項

アルファルファは飼料として安全に利用されている。

10 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

越冬後に株冠から再生される植物体は茎葉処理型除草剤やマメ科植物に感受性の広葉用除草剤の散布、あるいは耕起により容易に不活化される。尚、アルファルファは肥沃で雑草害の少ない土地でないと多年生植物としての永続性を発揮することができず、雑草との競合に弱い(参考文献⑤)。

11 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

アルファルファの近縁種である他の *Medicago* 属種において有害生理活性物質の産生は報告されていない。

4 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

J101 系統及び J163 系統の作出には、プラスミド・ベクター PV-MSHT4 を用いた。このプラスミド・ベクターの作成にあたっては pBR322 由来の 2 種類のベクターを用いた。

2 性質に関する事項

プラスミド・ベクター PV-MSHT4 の全長は 9,023bp である。このプラスミド・ベクターに存在する

全ての遺伝子は、その由来・機能が明らかになっており、既知の有害塩基配列を含まない。

3 薬剤耐性に関する事項

プラスミド・ベクターPV-MSHT4 はスペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aad* 遺伝子を持つ。*aad* 遺伝子は T-DNA 領域外に存在しており、J101 系統及び J163 系統中に導入されなかったことがサザンブロット分析によって確認されている。

4 伝達性に関する事項

プラスミド・ベクターPV-MSHT4 は、伝達性に関与する DNA 配列を持たない。

5 宿主依存性に関する事項

プラスミド・ベクターPV-MSHT4 は、自立増殖可能な宿主が *E. coli* 及び *Agrobacterium tumefaciens* といった細菌に限られている。

6 発現ベクターの作成方法に関する事項

プラスミド・ベクターPV-MSHT4 の作成にあたっては、pBR322 由来の 2 種類のベクターを用いた。[CTP2]-[改変 *cp4 epsps*]-[E9 3']-[LB]-[*ori*-V]-[ROP]-[*ori*-322]-[*aad*]-[RB]-[FMV プロモーター]の順で各構成要素が連結されたベクターと[P-eFMV]-[HSP70-Leader]-[*cryIIA*]-[NOS'3]-[*nptII*]-[p-CAMV35S]-[LB]-[*ori*-V]-[ROP]-[*aad*]-[RB]の順で各構成要素が連結されたベクターを制限酵素処理して必要部分を切り取り、各断片を純化した後に連結してプラスミド・ベクターPV-MSHT4 を作出した。

7 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクターPV-MSHT4 の T-DNA 領域をアルファルファの茎葉細胞の染色体上に導入した。

5 挿入遺伝子に関する事項

1 供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株より単離され、植物での発現を高めるため、アミノ酸配列を変えないように塩基配列に改変が加えられている。*Agrobacterium* sp. は、土壌中に存在する微生物の一つである。

(2) 安全性に関する事項

改変 CP4 EPSPS たん白質は植物や微生物が有する芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つである。EPSPS たん白質の酵素機能は既知のものであり、これまでに家畜は植物や微生物から様々な EPSPS たん白質を摂取してきている。

2 遺伝子の挿入方法に関する事項

4.6 及び 4.7 参照。

3 構造に関する事項

プロモーターには *Figwort mosaic virus*(ゴマノハグサモザイクウイルス)由来の重複エンハンサー-35S プロモーターである P-eFMV を用いた。ターミネーターにはエンドウの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3'非翻訳領域を用いた。プラスミド・ベクターPV-MSHT4 に含まれる全ての遺伝子はその特性が明らかとなっており、既知の有害な配列を含んでいない。

4 性質に関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、グリホサート存在下でも酵素活性を示す EPSPS(5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素)たん白質を発現する。EPSPS たん白質は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つで、その基質はホスホエノールピルビン酸とシキミ酸-3-リン酸であり、その機能は既知のものである。J101 系統中に存在する挿入遺伝子の分子量は 3.62kb、J163 系統中に存在する挿入遺伝子の分子量は 3.63kb である。

5 純度に関する事項

挿入遺伝子はプラスミド・ベクターにクローニングされたものであり純化されている。

6 安定性に関する事項

J101 系統及び J163 系統の各後代について、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果、挿入遺伝子の安定性が確認された。また、ウェスタンブロット分析によっても供試した全ての世代において、CP4 EPSPS たん白質の分子量と一致するバンドが検出され、発現たん白質の安定性が確認された。

7 コピー数に関する事項

サザンブロット分析の結果から、J101 系統及び J163 系統の挿入遺伝子はアルファルファゲノムの1箇所に1コピー存在することが示された。

8 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

CP4 EPSPS たん白質の計 9 つの収穫草試料の茎葉における発現量は、J101 系統において 2001 年は平均 276µg/g 新鮮重(範囲:220~340µg/g 新鮮重)及び 2002 年は平均 238µg/g 新鮮重(範囲:160~340µg/g 新鮮重)、J163 系統において 2001 年は平均 317µg/g 新鮮重(範囲:270~380µg/g 新鮮重)及び 2002 年は平均 223µg/g 新鮮重(範囲:140~340µg/g 新鮮重)であった。

9 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

J101 系統及び J163 系統の作出に用いたプラスミド・ベクターPV-MSHT4 にはプラスミド・ベクターの構築・選抜及び増殖に必要な選抜マーカー遺伝子としてスペクチノマイシン/ストレプトマイシン耐性を付与する *aad* 遺伝子を有しているが、*aad* 遺伝子はベクターの T-DNA 領域外に

ある。サザンブロット分析及び PCR 分析による導入遺伝子の解析において、J101 系統及び J163 系統中に *aad* 遺伝子は導入されていないことが確認された。

10 外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項
サザンブロット分析及び PCR 分析の結果、J101 系統及び J163 系統中には改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含むプラスミド PV-MSHT4 の T-DNA 領域のみが 1 コピー含まれており、その他の遺伝子断片は導入されていないことが確認された。このことから、J101 系統及び J163 系統中には CP4 EPSPS たん白質を発現するオープンリーディングフレームのみが含まれており、目的以外のたん白質を発現するオープンリーディングフレームは含まれていないと考えられた。

6 組換え体に関する事項

1 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

J101 系統及び J163 系統と既存のアルファルファとの違いは、J101 系統及び J163 系統が改変 CP4 EPSPS たん白質の発現によりグリホサートの影響を受けない点である。

2 遺伝子産物の毒性に関する事項

GenBank/EMBL 及び SwissProt からなる毒素データベース(TOXIN 5)中に「毒素」として登録されている既知毒素と改変 CP4 EPSPS たん白質との比較を行った。その結果、改変 CP4 EPSPS たん白質と既知毒素との間に相同性は認められなかった。

また、改変 CP4 EPSPS たん白質を用いてマウスの急性強制経口投与試験を行った結果、改変 CP4 EPSPS たん白質の最大投与量 572 mg/kg でもマウスに有害な影響は認められなかった。

米国の圃場試験で収穫されたラウンドアップ・レディー・アルファルファの茎葉における CP4 EPSPS たん白質の最大発現量は 390µg/g 新鮮重であり、仮に飼料として用いられるアルファルファに本たん白質がすべて残っており、収穫時の茎葉の水分含量を 80%、乾燥後の水分含量を 15%として換算すると、CP4 EPSPS たん白質の乾物中の最大値は 2,080µg/g 乾物重となる。上記の CP4 EPSPS たん白質の投与量は、家畜の体重 1kg に対して1日当たり約 28%(0.28kg)(体重 670kg の乳牛で約 188kg)のアルファルファを与えることに相当する。泌乳牛が1日に摂取できる乾物摂取量は体重の 3~4%であり、牛における1日飼料摂取量は体重の 3.0~4.0%、産卵鶏における1日飼料摂取量は体重の約 4.0~8.5%、豚における1日飼料摂取量は体重の 3.4~7.3%とされており、全ての飼料をアルファルファ乾草で賄ったとしても体重の 28%のアルファルファを給餌することは不可能である。

3 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

(1)人工胃液に対する感受性

改変 CP4 EPSPS たん白質の免疫反応性は、試験開始後 15 秒以内で検出限界以下に消失した。

(2)人工腸液に対する感受性

改変 CP4 EPSPS たん白質の免疫反応性は、10 分後に大半が消失し、100 分後に検出限界以下に消失した。

(3)加熱処理に対する感受性

約 100℃で 38 分間の加熱条件により改変 CP4 EPSPS たん白質の免疫反応性及び酵素活性が 99%以上失われることが ELISA 分析等により確認された。

4 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

EPSPS たん白質はホスホエノールピルビン酸(PEP)及びシキミ酸-3-リン酸(S3P)に反応する。PEP と S3P 以外に EPSPS たん白質と反応することが知られているのは S3P 類似体であるシキミ酸のみである。EPSPS たん白質とシキミ酸の反応性は、EPSPS たん白質と S3P の反応性のおよそ 200 万分の 1 であることから、シキミ酸が植物体内で EPSPS たん白質と反応することはないと考察された。

5 宿主との差異に関する事項

J101 系統及び J163 系統と、対照の非組換えアルファルファ中の構成成分を比較するために、茎葉について、主要構成成分(灰分、炭水化物、水分、たん白、脂肪分)、アミノ酸組成、酸性デタージェント繊維(ADF)、中性デタージェント繊維(NDF)、無機物(カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム、亜鉛)、リグニン等の分析を行った。分析の結果、J101 系統及び J163 系統と非組換えアルファルファの間に生物学的に意味のある差は認められなかった。

6 外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国で行われた J101 系統及び J163 系統のは場試験において、生存・増殖能力に関し非組換えアルファルファと差異は認められなかった。

7 生存及び増殖能力の制限に関する事項

米国で行われた J101 系統及び J163 系統のは場試験において、生存・増殖能力に関し非組換えアルファルファと差異は認められなかったことから、制限要因についても同等であると考察された。

8 不活化法に関する事項

物理的防除(耕耘)や化学的防除(感受性を示す除草剤の散布)など、アルファルファを枯死させる従来の方法によって J101 系統及び J163 系統は不活化される。

9 外国における認可等に関する事項

米国食品医薬品局(FDA)には、2003 年 12 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行い、2004 年 12 月に認可された。米国農務省(USDA)には、2004 年4月に無規制栽培(商業栽培)のための申請を行った。

カナダ厚生省(Health Canada)及びカナダ食品検査局(CFIA)には、2003 年 12 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行った。

10 作出、育種及び栽培方法に関する事項

J101 系統及び J163 系統と既存のアルファルファとの栽培方法の相違は、J101 系統及び J163 系統において生育期の雑草防除にラウンドアップが使用できる点である。その他の点では

同じである。

11 種子の製法及び管理方法に関する事項

J101 系統及び J163 系統の種子の製法及び管理方法は従来のアルファルファと同様である。

7 2から6までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項

- 1 単回投与の毒性に関する試験
- 2 反復投与の毒性に関する試験(短期)
- 3 反復投与の毒性に関する試験(長期)
- 4 世代繁殖に関する試験
- 5 催腫瘍性に関する試験
- 6 変異原性に関する試験
- 7 催奇形性に関する試験
- 8 対象家畜等を用いた飼養試験
- 9 その他必要な試験

IV 審議結果

ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統及びラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断された。

V 参考文献

- ① Lesins, K.A. and I. Lesins. 1979. Genus *Medicago* (Leguminosae): A Taxogenetic Study. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- ② 新編・飼料ハンドブック、亀岡暄一編、社団法人 日本科学飼料協会、1998.
- ③ Howarth, R.E. 1988. Antiquality factors and non-nutritive chemical components. pp.494-510. .In A.A. Hanson, D.K. Barnes and R.R. Hill, Jr. (ed.) Alfalfa and alfalfa improvement. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin.
- ④ Julier, B., C. Huyghe and C. Ecalé. 2000. Within- and among-cultivar genetic variation in alfalfa: Forage quality, morphology, and yield. *Crop Sci* 40: 365-369.
- ⑤ 鈴木信治. 1992. マメ科牧草 アルファルファ(ルーサン)ーその品種・栽培・利用ー. 雪印種苗, 北海道.
- ⑥ McKenzie, J.S., Paquin, R., Duke, S.H. 1988. Cold and heat tolerance. pp 259-302. *In* Alfalfa and Alfalfa Improvement. Hanson, A.A., Barnes, D.K., Hill, R.R. (ed.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc, 677 S. Segoe Road, Madison, WI 53711, USA.
- ⑦ Bass, L.N., Gunn, C.R., Hesterman, O.B., Roos, E.E. 1988. Seed physiology, seedling performance, and seed sprouting. p. 961-983. *In* Alfalfa and Alfalfa Improvement. Hanson, A.A., Barnes, D.K., Hill, R.R. (ed.). American Society of Agronomy, Inc., 677 S. Segoe Road, Madison, WI 53711, USA.

- ⑧ Quiros, C.F. and Bauchan, G.R. 1988. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. pp93-124. In Alfalfa and Alfalfa Improvement. Hanson, A.A., Barnes, D.K., Hill, R.R. (ed.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc, 677 S. Segoe Road, Madison, WI 53711, USA.
- ⑨ Teuber, L.R. and M.A. Brick. 1988. Morphology and anatomy. pp125-162. In A.A. Hanson, D.K. Barnes and R.R. Hill, Jr. (ed.) Alfalfa and alfalfa improvement. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- ⑩ 第二次増訂改版 農学大事典、野口弥吉監修、養賢堂、1987.