

体種そのものか、その形質を持つGE動物)が同定され、NADAに申請する個体種のその目的(使用用途)も同定することになる。CVMとしては、製品の同定はNADAの申請での内容・構成によってとても重要なものと考えており、GE動物の開発の早い段階でCVMに相談してくれることを望む。例えば、INADの開始プロセスの段階など。

製品定義とは、GE動物の性質を指す。よって、IV.B.1で示したように、製品同定に関して必要になる情報とは次のようなものがある：

- GE動物の倍数性
- GE動物の接合子体
- 動物の説明(例：通常名/血統/系統；生物分類と種)
- rDNA構成体のコピー数
- 構成体の名前
- 挿入場所の性質
- GE動物の系統、つまり
- GE動物が持つ意図された用途、主張

Step 2: 構成体の分子の性質

このステップでは、個体種の要素と構成について説明をする(21 CFR 514.1(b)(4))。まずは、商用化が予定されるGE動物の祖先に導入されるrDNA構成体の同定と性質の分析をすることを勧める。このステップと次のステップは、NADAの安全性レビューを行う上での危険要素の洗い出し作業の一部となる。良くある形として、次の情報などを含めるべきである。(これのみに留まるべきではないが)

- 構成体構成物質のような機能のもとになるソースの説明
- rDNA構成体の配列
- 組み換えを行う目的
- rDNAがいかに集積したのかの説明
- 導入したDNAの意図した機能
- 対象動物や細胞への導入前のrDNAの純粋性

製品への危険性が存在するリスクを計るために、rDNA構成体が潜在的に可動するDNA配列をもつのか、病原体、毒素(アレルギーを含む)、意図しない細胞・皮膚・臓器への異常調節を生むかどうかを評価できるとCVMは期待している。

Step 3: GE動物系統の分子レベルでの性質

このステップでは引き続き、市場に出荷が予定される組換えGE動物のrDNA構成体とその生成物の分析と、この動物を生産していくことで起こる潜在的な危険の分析をする。この分析を通じて、NADA申請における同定やGMP(医薬品製造管理基準)の問題に対処することになる。21 CFR 514.1(b)(1)と(b)(5)、rDNAを最初のGE動物に導入した時の方法の説明とそのデータを、その動物がキメラでなかったことも含めて、報告することを勧める。さらに、この動物の始祖を作り出した際の繁殖戦略を説明することを勧める。このGE動物は最初の形質転換イ

ベントでの最終的な安定版を含み、この形質を持つ動物が市場に出される。このGE動物の最終的なrDNA構成体の安定版の性質を完全に説明しなければならない。

Step 4: GE動物の表現型の性質

前の二つのステップでのプロセスは、rDNAとGE動物になる変化の確立と性質についてのものであった。ここからのステップでは、GE動物が引き起こす人間へのリスク、GE動物の健康リスク、環境へのリスクを説明をする。GE動物の健全性に関しては、21 CFR 514.1(b)(8)の対象動物安全規定を含め、rDNA構成体もしくはその発現物質が、直接・非直接的に毒性を持つかどうかのデータを提出するように勧める。一般的には、GE動物の健全性についての情報やデータを編集・提出することを勧める。これには、獣医診断や治療履歴、成長率、生殖機能、行動の様子などが含まれる。加えて、GE動物の生理学的なデータの提出も勧める。臨床でのキメラ、血液・組織の状態、検死の結果など。商業化で想定される世代にできるだけ近い形で、世代にわたるGE動物のデータを集めることを勧める。

Step 5: 遺伝子型と表現型の永続性評価

Step3と同様に、Step5では、21 CFR 514.1(b)(5)で条文化されたGMPが求めるものへの追加的な対処を記述する。ある組み換えイベントの結果が想定したrDNA構成体であり、そのGM動物がそのGM動物と同定されたという情報を提出することが、永続性を示すことになる。これは、rDNA構成体が安定的に遺伝している事と、表現型が安定していて予期可能なことが期待しても良いという前提があるからである。この評価方法は、サンプリング計画の開発にも使われるかもしれない。

遺伝子型の永続性に関して、遺伝した構成体は安定的ということを立てた調査結果を使うことを勧める。表現型の永続性に関しては、意図して発現させた形質が複数世代にわたって安定したデータを提出することを勧める。可能であれば、少なくとも2世代にわたるデータを集めるべきである。できれば、連続しない世代でのサンプリング(例:F2とF4)をすることを勧める。

以下のことが十分に弁別ができるような方法をとるべきである(1):対象の動物に意図した構成体が含まれているのかどうか。(2):構成体が、安全で効果的であると評価された状態から大きく変化したかどうか。それは、rDNA構成体が最終的に落ち着く遺伝子上の場所を検査するといった検査方法を使うということである。こういった検査方法の策定にあたっては、CVMに連絡をすることを勧める。

Step 6: 食料・飼料の安全性と環境の安全性のアセスメント

食料・試料の安全性

ステップ6のこの部分では、食料・飼料の安全性について、21 CFR 514.1(b)(8)で定められた要件について記す。GM動物由来の食料・飼料を、人間と動物が食用として場合の安全性がこの要件を決める。

食料・飼料の安全性リスクの問題は、大きく二つのカテゴリに分けられる。最初のカテゴリは、その個体種で発現した性質が食料・飼料になったときに、そのものが毒性(アレルギーも

含め)を持つかどうかという問題である。二番目のカテゴリとしては、個体種とその発現物質の二つについて、潜在的な毒性の有無があるのかという問題である。(例として、個体種における発現物質とその発現場所が、生理学的な影響をその動物に与え、その食品・飼料を摂取することでなんらかの危険性を生じる、または摂取におけるリスクを増大させる場合)食料・飼料の経路による潜在的な危険性は、生物学的な変化が以下の二つの点であるのかどうかで決定される。(1)その動物が持つ生理学的な面(ステップ3で記したGE動物の表現型の性質)(2)GE動物由来の可食組織で組成されたものが、非GE動物由来のものに比べて、毒性を示唆するかどうか。

つまり、発現させた形質が安全で、対象GE動物由来の可食組織で作った製品が比較対象となる製品と同様に安全であるならば、CVMとしては、このGE動物由来の食品・飼料は安全だと考える。このタイプの食料・飼料の摂取から来る安全性はコントロールされているとなる。

GE動物由来の食品について、他の食品と同じ表示に関する義務である。動物由来の食品全般に関しては、FDAで、魚と海産物、牛乳と他の乳製品、卵殻内のすべての卵の要素についての表示を義務づけている。FSISでは、ほとんどのタイプの肉、鶏肉、卵製品の監督をしている。

GE動物由来の食品と同タイプの非GE動物由来の食品に違いが見られる場合は(例:栄養成分に違いがある場合)、一般的には、成分に違いがありうるという表示を記載することになる。

FDAは、Codex(国際食品規格委員会)のバイオテクノロジーによる食品の臨時政府間タスクフォースおよびそのワーキンググループに参加して、rDNA由来食品の安全性アセスメントのガイドライン発効に関与した。(Codex 栄養委員会:rDNA動物由来の食品の安全性アセスメントのためのガイドライン:in ALINORM 08/31/34, Appendix II; (ftp://ftp.fao.org/codex/Alinorm08/al31_34e.pdf) NADAにおけるGE動物由来の食品安全性を確保するために必要な情報は、このCodexのガイドラインで説明されているものと整合している。

環境への安全性

ここからは、NADAの申請における環境面の要件についてである。21 CFR 514.1(b)(14)で記されている。少なくとも私達が経験を積むまでは、ほとんどのGE動物の申請においては、環境への影響が個別、累積的問わず、評価することを義務づけられるだろう(異常な環境影響が存在しないかどうか)(21 CFR 25.21)。EA手続きにおいて、GE動物は人間の環境に重大な影響を及ぼすことはないことを証明されることは、重大な問題がない(FONSI)ということになる。

GE動物の開発初期段階においてCVMに連絡を取ることで、CVMはEA手続きを、環境問題およびGE動物とその生成物の使用と処分に関する潜在的な影響問題に絞ることができる。EA手続きに盛り込む適切な内容とその範囲はさまざまであり、GE動物製品、その効用、使用条件(例:水中動物なのか陸上動物なのか)によって変化する。よって、EA手続きの準備に入るまえに、CVMに連絡を取ることを勧める。

Step 7: 効果・効用の検証

これまでのステップでの検討は、主に同一性と安全性の問題を扱っていた。この市場出荷前の最終ステップは、有効性の問題を扱う。言い換えれば、GE動物が意図した性質通りかどうか

かを検証する。これは 21 CFR 514.1(b)(8) で規定されている。例えば、病気への耐性強化を意図した G E 動物の場合、この動物が実際にその病気に対して抵抗力があるということを実証する必要がある。非食用目的の製品を作る目的の G E 動物の場合、その動物が実際に意図した製品を作り出しているかを実証しなければならない。例えば、その製品が葉であったり葉の成分になる場合、その葉の安全性と有効性をそれぞれ CDER(医薬品評価研究センター)で評価する必要がある。CVM は CVM と協調することによって、性質とデータがこの要件を満たすように勧める。

V. 認証後における責任

G E 動物が認証された後、申請者は継続的な責任を持つ。登録、薬品リストへの登録、記録保持、補完する情報の提出、定期的な報告などについてである。(21 USC 360, 21 USC 356a, 21 CFR 514.80, 21 CFR 514.8) これらの責任を果たすためには、次に示す一般的なアプローチを使うことを勧めるが、提出する固有のデータや情報については、CVM と緊密に連絡を取りあうことを勧める。

A. 法的な登録と薬品登録の要件

21 USC 360 で定められた登録要件の一部として、申請者の名前、事業活動をしている場所、G E 動物を実験・生産場所をする設備を登録する。これは 21 CFR Part 207. に記載されている。登録における実施責任の一部として、すべての規制を受ける個体種を登録する必要がある。これは、21 CFR 207.22(a)(1)に従う。作成したすべての G E 動物のリストになるはずである。

B. 記録保持

G E 動物に関する安全性と有効性に関するすべての情報を含む記録を索引化し欠損のない状態で、ファイルを作成・保持する必要がある。このファイルには、一般的には、重篤な有害事象報告(Adverse Event Reports)や、国内・海外からの情報から成る。文字情報として公表されているものなどがある。

C. 年次報告書、補完的文書、その他、承認を受けた申請者へ求められるもの

一年に一回、販売許可の下りた G E 動物の一群から遺伝子型と表現型の永続性が保たれているかの情報を収集することを勧める。この集められた情報については、ケースバイケースであるが、CVM に相談をするべきである。すべての使用されている試験方法について、現在の業務処理手続標準(SOPs)を維持するように勧める。また、他の農場での G E 動物(生物学的な汚染を引き起こす)でも SOPs を維持することを勧める。

G E 動物に対して行われた変更については、そのすべての変更を提出しなければならない。また、変更の計画についても提出が必要である。変更によって引き起こされるリスクいかによって、報告書の内容や提出時期は変わる。どのような変更が行われたか、どのような報告書が必要かは、21 CFR 514.8 を記載されている。G E 動物の認証後に行う報告書の問題については、別途、ガイダンスを出す予定である。行われた変更がどの項目に該当するのかについての質問があれば、CVM に連絡を取ることを勧める。

D. 認証された製品にまつわる記録と報告について

認証されたGE動物にまつわるデータ、調査、その他の情報についての報告書を提出する必要がある。これは、21 CFR 514.80(a)(2)に定められている。この経過報告は、認証後2年間は半年ごとに、その後は一年ごとに、CVMの調査部に提出する(21CFR 514.80(a)(4))。

GE動物関連製品の表示は、処方、推薦、示唆に限定されることに留意すべきである。これは、21 USC 360b(a)(1)で規定された、表示に関する認証の条件に基づく表示となる。この表示には、認証時と同じ文言と強調点が使われる。危険性と安全上の注意に関する説明もこの表示方法になる。

VI. Import Tolerances

FFDCのセクション512(a)(6)は、輸入されたが使用が承認をされていない動物由来の食用部分(食品)中の新規動物医薬品と医薬品残留物の安全性について、FDAに判断を与えてる(Import Tolerance)。申請者が、GE動物に関しNADAの承認を求めるとしても、またそれら動物由来食品のImport Toleranceを求めるとしても、食品の安全を評価する基準は基本的に同一である(注記4)。外国からのGE動物由来食品の輸入を可能にするImport Toleranceを設定するために必要な情報は、このガイダンスの食品安全性に関連する部分に記載されており、Codexのガイダンス(Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Animals)とも整合的になるはずである。Import Toleranceの設定に関しては、CVMに相談することを勧める。

注記4 Import toleranceを確立するために、FDAはNADAの許可を得るに使われると同様の食品の安全性基準に基づいた安全性が担保されていることを評価しなければいけない。

医薬品及び環境浄化目的の遺伝子組換え植物の調査研究

研究分担者 吉松嘉代 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部

研究要旨 医薬品目的の遺伝子組換え植物（薬用 GM 植物）の範囲を、GM 植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物及び牛、豚、鶏等の家畜の健康に影響を与える植物と定め、薬用 GM 植物及び環境浄化目的の GM 植物（環境浄化用 GM 植物）に関する情報を収集した。用途・使用目的別に分類するカテゴリーとして、機能的食品・嗜好品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化の 8 種類を設定し、それぞれの一覧表を作成した。2006-2009 年 1 月末に公表・出版された論文等 179 件をそれぞれのカテゴリー別に集計した結果、機能的食品・嗜好品：44 件、経口ワクチン：35 件、食用医薬：9 件、ワクチン抗原：20 件、抗体医薬：23 件、治療薬：22 件、診断薬・試薬：5 件、環境浄化：21 件であり、また、また、国別の件数では、米国：51 件、日本：45 件に次ぎ、中国：21 件であった。さらに作物別に集計した結果、タバコ 60 件についてイネ 18 件、トマト 12 件であった。調査の結果、食用作物の中で最も薬用 GM 植物としての使用頻度が高いイネについて、自家プロモーター発現系 GM 植物検知法を検討した。モデル植物として自家プロモーター制御下でマーカー遺伝子である β -glucuronidase (GUS) を発現する DSH1::GUS イネのゲノム DNA を材料に、制限酵素処理、自己閉環ゲノム DNA ライブラリーの作成、プロモーター領域から周辺配列方向へ PCR を行うインバース PCR (IPCR) を行い GM 植物の検知を試みた結果、本法が自家プロモーター発現系 GM 植物検知法として有用であることを実証した。また、GUS 遺伝子を有する非食用 GM 植物の検知法として、組織化学的染色法が簡便な検知法として実用可能であることを示した。さらに、GM 植物において多用される「組換えマーカー」遺伝子の検知に、PCR 法が有用であることを示した。

協力研究者

河野徳昭 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部

A. 研究目的

最近活発に研究開発が進んでいる高栄養、高機能または医薬品類を生産する遺伝子組換え植物（薬用 GM 植物）や環境浄化を目的とする遺伝子組換え植物（環境浄化用 GM 植物）は、外見上は通常の作物と変わらないため見分けがつかず、外国では一般圃場栽培も行われている。このような作物の開発状況及び実態を調査し、把握しておくことは、食品の安全性確保の見地から非常に重要である。そこで本研究においては、薬用 GM 植物及び環境浄化用 GM 植物の開発状況・生産実態に関する情報を収集して整理し、食品の安全性評価基準作成の一助とする。

また、今後、増加すると想定される未承認の遺伝子組換え作物には、従来の害虫抵抗性 GM 作物や、

除草剤耐性 GM 作物に加え、直接国民の健康へ影響を及ぼすと思われる薬用 GM 植物や環境浄化用 GM 植物が混入することが危惧され、これらの未承認 GM 植物検知のための配列未知の導入遺伝子配列の取得・解析法の開発が急務となっている。一般に、新規機能性を付与するために GM 植物に導入された機能性遺伝子は、[プロモーター、機能性遺伝子（生合成酵素、抗生物質耐性、マーカー遺伝子等）、ターミネーター] から成るカセット構造をとっている。そこで、薬用 GM 植物及び環境浄化用 GM 植物について得られた情報のうち、特に汎用プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子等の配列情報を収集・整理し、これらの部分配列をもとに、挿入遺伝子未知の未承認 GM 植物から導入された外来遺伝子を検出するための手法の開発を行う。

さらに、近年とくに穀類を中心として利用が拡大しているホスト植物の自家プロモーターによる目的物質発現システムの検知法の開発を行う。

B. 研究方法

1) 薬用及び環境浄化用 GM 植物の調査

遺伝子組換え植物のうち、人あるいは牛、豚、鶏等の家畜の健康に影響を与える成分を生産する植物を薬用 GM 植物の範囲と位置づけ、薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報を文献データベース (Entrez PubMed, Chemical Abstracts)、インターネット検索 (Google)、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリ別に整理し、それぞれの一覧表を作成した¹⁻¹⁷⁸⁾。また、得られた情報を国別及び作物別に集計した。

2) 自家プロモーター発現系 GMO 及び主要組換えマーカーの検知法開発

自家プロモーター発現系 GMO モデル植物 DSH1::GUS イネ

遺伝子導入宿主植物の自家プロモーターによりマーカー遺伝子を発現するイネのモデル植物として、イネのスフィンゴ脂質合成の鍵酵素である dihydrosphingosine C4 Hydroxylase 1 のプロモーター制御下でマーカー遺伝子である β -glucuronidase (GUS) を発現する DSH1::GUS イネ¹⁷⁹⁾ を使用した。

DSH1::GUS イネの栽培

DSH1::GUS イネ (GUS 系) 及び共に譲渡を受けた非組換えイネ (日本晴、WT 系) の栽培は薬用植物資源研究センター 筑波研究部 薬用植物資源研究棟内グロースチャンパーにおいて行った。播種後約一ヶ月の実生苗を径 15 cm x 深さ 12.5 cm の下記の培養土を入れたポリポットに移植し、ばんじゅう A (内寸 38 x 64 x 14.5cm) 1 つあたりに 7-8 鉢を入れ、ポット全体が浸るまで灌水した。

培養土は、JA 粒状くみあい合成培土 3 号 (サンアグロ全農) (N 0.4 g, P 0.8 g, K 0.6 g /kg) にくみあいゼオライト入粒状培土鹿沼 A 号 (鹿沼産業株式会社) (N 0.6 g, P 1.5 g, K 0.6 g /kg) を補充したものを使用した。短日条件に変更した播種 61 日後に、くみあい尿素入り窒素加里化成 2 号 NK2(16-0-16) を鉢ごとに 3 g 追肥を行った。

グロースチャンパー内の相対湿度は全期間を通じ 60% とし、照明・温度条件は、播種後 60 日目までは、

14 時間明 (温度 28°C) / 10 時間暗 (温度 23°C)、61 日目から 10 時間明 (温度 28°C) / 14 時間暗 (温度 23°C) の短日条件に変更した。

イネゲノム DNA の調製

イネからのゲノム DNA の調製は、新鮮葉からは DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)、また、コメからの調製には GM Quicker 2 (Nippon Gene) を用いた。新鮮葉は切片調製後、2 ml 容のスクリーキャップチューブに入れ、ステンレスボール (4.8 mm 径) 2 個と共に、キット添付の Buffer AP1 500 μ l と共に破砕機 MS-100 (TOMY) で 60 秒間 x 2 回 (4,500 rpm) 破砕したのち、キットのプロトコルに従いゲノム DNA を調製した。コメ (玄米または精米済み) の場合は乳鉢乳棒を用い粉砕したのち、遺伝子組換え米 (LLRICE601) の検知法¹⁸⁰⁾ (GM Quicker 2 を用いたゲノム DNA 抽出法の変法) に従い調製した。

インバース PCR (IPCR) 用ゲノムライブラリーの調製

DSH1::GUS イネの文献¹⁷⁹⁾ 記載の情報をもとに DSH1 プロモーターの 5' 領域および 3' 領域それぞれの近傍領域について、電気泳動レベルでの判別に適した増幅産物が得られる制限酵素サイトを検索し、その結果、5' 領域については、*EcoRV* と *DraI* (いずれも平滑末端) の二重消化、また 3' 領域については *MspI* が適当なサイズの増幅産物を与える自己閉環ゲノム DNA ライブラリーが作製できるものと考えられた。そこで、それぞれの制限酵素でゲノム DNA を完全消化したのち、self-ligation により環状ゲノム DNA ライブラリーを作製した。

IPCR 法による自家プロモーター系 GMO 検知法の検証

DSH1 プロモーターの 5' 領域および 3' 領域それぞれに特異的な「外向き」プライマーを各 2 セット設計し、IPCR に用いた。PCR 機器は Perkin Elmer 社 GeneAmp 2400 を使用した。反応系の組成および PCR 条件は下記である。

ddH₂O 77 μ l, ExTaq buffer (10 x) 10 μ l, dNTP 8 μ l, primer sense & antisense (100 μ M) 1 μ l each, genome DNA library 2.5 μ l, ExTaq (Takara Bio) 0.5 μ l (reaction volume: 100 μ l)

94°C 5 min. - (94°C 30 sec. - 58°C 30 sec. - 72°C 1 min.) x 30 - 72°C 10 min. - 4°C infinite

蛍光法による GUS 米の検知法の検討

非組換え体は WT2, WT14 株を, DSH1::GUS イネは GUS1, GUS13 株を使用した。新鮮葉約 100 mg をメスで細かく裁断し、2 ml 容のスクリーキャップ付きチューブに入れ、破碎バッファーを [新鮮重量(mg) × 4/3] μ l 加えた。これに 4.8 mm 径ステンレスボール 2 個を入れ、MS-100(TOMY)で 2,000 rpm 60 秒破碎した。いったん氷上で 1 分静置したのちふたたび MS-100 で 2,000 rpm 30 秒破碎した。これに 20 μ l の基質溶液と 130 μ l の破碎バッファーを加え 37°C で 1 時間ゆっくりと回転攪拌したのち、5,000 rpm で 5 分遠心分離し、上清 50 μ l を新しい 0.5 ml エッペンドルフチューブに移した。これに 150 μ l の反応停止バッファーを加え UV 305 nm 下蛍光を観察した。

破碎バッファー: 50 mM SPB (pH 7.0), 0.1% Triton X-100, 10 mM β -ME, 1 mM EDTA

4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide (4MUG) 基質溶液: 10 mM 4MUG (破碎バッファーに溶解)

反応停止バッファー: 0.2 M Na_2CO_3

組織化学的染色法による GUS 米の検知法の検討

GUS 遺伝子を有する未承認遺伝子組換えバパイヤ (55-1) の GUS 試験法^{181, 182)}に従った 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) を基質とする組織化学的染色法を検討した。非組換え体は WT2 株を, DSH1::GUS イネは GUS1 株を使用した。コメ(脱穀前) 12 粒をメスで殻を剥き、玄米と籾殻に分離した。新鮮葉は先端の 1 cm 程度を 5 切片に切断した。これらの試料を 15 ml コニカルチューブ入れ、X-Gluc 基質溶液を加えた(玄米 500 μ l, 籾殻 1 ml)。減圧チャンバー内で 15 分間減圧処理したのち、37 °C インキュベーターで約 14 時間保温した。その後、実体顕微鏡下青色色素の有無を観察した。

X-Gluc 基質溶液: 1 mM X-Gluc in 0.2 M SPB (pH 7.0)

PCR 法による遺伝子組換えマーカの検知

前述の DSH1::GUS イネをモデル GM 植物に設定し、組換えマーカ遺伝子のうち、CaMV35S プロモーター、GUS 遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子

(hptII)、NOS ターミネーターのそれぞれについて特異的なプライマーを用い、モデル GM 試料より調製したゲノム DNA を鋳型に、各遺伝子の PCR 法による組換え体の検知を試みた。また、モニタリング例としてアリゾナ州ツーソンのスーパーマーケットで購入した米国市場流通米 4 種(試料コード A、B、C、D)を被試験試料とした。試料 D のみがカリフォルニア州のメーカーの製品で、他の 3 種はテキサス州のメーカーの製品であった。なお、PCR 反応の陽性対照としては内在性の SPS 遺伝子を使用した。

C. 研究結果

1. 2005-2008 年の米国における薬用 GM 植物野外圃場栽培申請・認可及び作付け状況¹⁾

U. S. Department of Agriculture (USDA) Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) の情報公開サイト「Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Proteins for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS」で、2005 年から 2008 年までの米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物野外圃場作付け申請・認可状況を調べた(図 1、2009 年 1 月 16 日現在)。

2006 年は認可面積 589.00 エーカーに対し、181.64 エーカーに作付けが行われ、2007 年は認可面積 811.08 エーカーに対し、176.08 エーカーに作付けが行われた。2008 年の認可面積は 2650.50 エーカーと、2007 年の約 3.3 倍であるが、作付けが行われた面積は未だ公開されていない。

2006 年から 2009 年までの薬用及び環境浄化用 GM 植物米国野外圃場作付け申請・認可状況を表 1-4 に示した。2009 年は既に 6 社から 10 件の申請が行われ、作物は、トウモロコシ、イネ、ベニバナ、オオムギ、ポプラである(表 1)。2008 年は、8 社から 13 件の栽培が申請され、そのうち 5 件が作付けされ、作物はイネ、ベニバナ、トウモロコシ、ポプラである。ベントリア社のラクtofフェリン生産イネ、リゾチーム生産イネ及びヒト血清アルブミン生産イネは、ノースカロライナ州及びカンザス州で栽培され、ノースカロライナ州では 100 エーカー以上、カンザス州では 3200 エーカーまでの栽培が計画され作付けされた(表 2)。なお、ベントリア社は HP で、ラクtofフェリンの増産を公表している(2008 年 10 月 1

日付け)。

ベントリア社の GM イネは 2006 年以降 100 エーカー以上の栽培の申請が行われるようになっており、2007 年からは 3000 エーカー以上の申請と栽培申請面積が急速に拡大している (表 1-4)。

2. 2006-2009 年 1 月に公表・出版された薬用 GM 植物に関する論文等 2-

文献情報 (SciFinder) で「transgenic plant」をキーワードに抽出された 2006-2009 年 1 月の情報

(2009 年 1 月末現在)、World Congress on In Vitro Biology, Tucson, Jun. 14-18, 2008 Abstract、2006-2008 年に国内で開催された日本植物細胞分子生物学会講演要旨集、日本農芸化学会及び第 26 回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集 (主催: バイオテクノロジー開発技術研究組合) から、薬用 GM 植物に関する情報を収集した結果を表 5-14 に示した。収集した情報 179 件をそれぞれのカテゴリ別に集計した結果、機能的食品・嗜好品: 44 件、経口ワクチン: 35 件、食用医薬: 9 件、ワクチン抗原: 20 件、抗体医薬: 23 件、治療薬: 22 件、診断薬・試薬: 5 件、環境浄化: 21 件であり、薬用及び環境浄化用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能的食品・嗜好品および経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。

また、国別の件数を集計した結果、米国: 51 件、日本: 45 件に次ぎ、中国: 21 件、ドイツ: 9 件、韓国: 7 件であった。米国、日本及び中国は、幅広いカテゴリでの開発研究が進んでおり、ドイツは機能的食品・嗜好品と抗体医薬、韓国は経口ワクチン、治療薬と機能的食品・嗜好品の開発研究が行われていた。

さらに作物別に集計した結果、タバコ 60 件に次いでイネ 18 件、トマト 12 件が多かった。

3. 自家プロモーター発現系 GMO の検知法開発

前記の文献調査により、穀類、特にイネを中心とした利用の拡大が明らかになった。組換えイネは、繁用プロモーターだけでなく、特にイネ種子 (米) の利用を目的とする場合、自家プロモーターによる標的遺伝子の発現系が用いられる場合が多い。そこで、自家プロモーター制御下の標的遺伝子を有する GM 植物の検知法として、塩基配列既知領域の周辺未

知領域の遺伝子情報解析に用いられるインバース PCR (IPCR) 法の適用の可否について、自家プロモーター発現系のモデル GM 植物を設定し、検知技術の開発及び検証を行った。

3-1. IPCR 法による自家プロモーター発現系 GMO 検知法のストラテジー

イネにおけるグルテリンプロモーターやアクチンプロモーターのような自家プロモーター発現系の GMO は、ホストと同じプロモーターで発現を行うため、在来又は繁用のプロモーターに対する PCR によるスクリーニング法では、同じサイズの増幅産物を与えるため、判別が不可能であった。しかし GMO と非 GMO では、プロモーターは同じでも、その周辺配列は異なるため、試料のゲノム DNA を制限酵素消化したのち自己閉環ライブラリーを作成し、プロモーター領域から周辺配列方向へ PCR を行うインバース PCR (IPCR) 法により、GMO 特異的な増幅産物が得られる。この原理を利用したのが、IPCR 法による自家プロモーター発現系 GMO の検知法である。

具体的には、解析対象植物から抽出したゲノム DNA を適当な制限酵素で消化し、self-ligation により自己閉環ゲノム DNA ライブラリーとする。これを鋳型として、プロモーター等の「組換えマーカー」領域に特異的なプライマーで「外向き」に PCR を行い、既知配列の周辺部の配列情報を取得するもので、非組換え体と組換え体の PCR 増幅産物を電気泳動で解析した場合、理論的には組換え体の方が非組換え体と比較して、1 本以上多くのバンドが観察される (図 2)。

3-2. モデル GM イネ植物

モデル GM イネは DSH1 遺伝子の機能解析の過程で、発現部位解析のため東京理科大学基礎工学部生物工学科 島田浩章研究室において作製されたものであり、DSH1 プロモーター制御下で GUS を発現する植物である。形質転換用ベクター pCMBIA1301 をバックボーンとするコンストラクト (図 3) がイネ日本晴にアグロバクテリウム法により導入されている。組換えイネは同研究室より実生苗として譲渡を受けた。なお、DSH1 遺伝子の発現部位は stigma (柱頭)、vascular bundle (維管束)、apical meristem (茎頂分裂組織) と報告されている¹⁷⁹⁾。

DSH1::GUS イネの栽培

短日条件変更後 12 日後に出穂、開花が認められ、播種後 102 日目に株ごとに根元から約 10 cm で刈り取り、穂を自然乾燥した後、種籾として収穫した。栽培の様子を図 4 に示す。DSH1::GUS イネおよび非組換え体は、グロースチャンパーにおいて良好に稔実し、コメが収穫された。なお、両者の間で顕著な形態の差異は認められなかった (図 4)。

3-3. PCR 法による自家プロモーター発現系 GMO 検知法の検証

DSH1::GUS イネは文献¹⁷⁹⁾記載の情報から図 3 に示すような遺伝子構造を有すると推定されたので、これをもとに DSH1 プロモーターの 5' 領域および 3' 領域それぞれの近傍領域について、電気泳動レベルでの判別に適した増幅産物が得られる制限酵素サイトを検索し、その結果、5' 領域については、*EcoRV* と *DraI* (いずれも平滑末端) の二重消化、また 3' 領域については *MspI* が適当なサイズの増幅産物を与える自己閉環ゲノム DNA ライブラリーが作製できるものと考えられた。そこで、それぞれの制限酵素でゲノム DNA を完全消化したのち、self-ligation により環状ゲノム DNA ライブラリーを作製した。

DSH1 プロモーターの 5' 領域および 3' 領域それぞれに特異的な「外向き」プライマーを各 2 セット設計し、IPCR を実施した (図 5)。その結果、両領域において非組換え体と組換え体に共通な増幅産物のバンドに加え、DSH1::GUS イネに特異的な増幅産物のバンドが検出された (図 6、7)。これは IPCR 法が自家プロモーター発現系 GM 植物の検知に有効であることを示すものである。

ところで、DSH1::GUS イネにおいては、IPCR の増幅産物は文献記載のコンストラクトの情報から想定していたものとは異なる増幅産物のサイズを与えた。この理由を解明するため、増幅産物を T-vector にクローニングし、塩基配列を解析したところ、自己閉環ライブラリー調製時の self-ligation の際に他の制限酵素消化断片とのランダムな ligation が起きていることが判明した。これは、IPCR 法による組換え体検出時のノイズ (余分な増幅産物) となるもので、今後、非特異的な他の消化断片とのライゲーションを低減させる反応

条件の検討等が必要である。

3-4. GUS 米の検知法の検討

GM 植物作出の際に高頻度で使用されていることが調査研究により明らかになった主要な組換え体選抜マーカーのうち、 β -glucuronidase (GUS) について、酵素活性を検知指標とした蛍光法及び組織化学的染色法の組換え体検知への適用の可否を、DSH1::GUS イネを材料に検討した。

GUS 米検知法 (蛍光法)

4MUG を基質とした蛍光法では、新鮮葉より調製した粗酵素液を用いたアッセイで、DSH1::GUS イネにおいて非組換え体には見られない強い蛍光が観察された (図 8)。しかしながら、玄米またはその籾殻を用いた非破壊的なアッセイでは、蛍光強度の差は認められなかった。

GUS 米検知法 (組織化学的染色法)

X-Gluc を基質とした組織化学的染色法では、DSH1::GUS イネの玄米の胚芽部に 12 粒中 11 粒において青色呈色が認められた (図 9)。一方、DSH1::GUS イネの籾殻や、非組換え体の玄米、籾殻においては青色を呈した部位は認められなかった。葉の切片については、DSH1::GUS イネにおいて葉の切断面からわずかに青色色素の浸潤が認められた。

3-5. PCR 法による遺伝子組換えマーカーの検知の試み

本研究の調査結果から、GM 植物で使用される頻度が高い遺伝子は「組換えマーカー」として、それらを標的とした PCR 法による組換え体のスクリーニングに使用できる可能性が示された。そこで、前述の DSH1::GUS イネをモデル GM 植物に設定し、組換えマーカー遺伝子のうち、CaMV35S プロモーター、GUS 遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (hptII)、NOS ターミネーターのそれぞれについて特異的なプライマーを用い、モデル GM 試料より調製したゲノム DNA を鋳型に、各遺伝子の PCR 法による組換え体の検知が可能か検討した。また、モニタリング例として、アリゾナ州ツーソンのスーパーマーケットで購入した米国市場流通米 4 種 (試料コード A、B、C、D) を被試験試料とした。試料 D のみがカリフォルニア州

のメーカーの製品で、他の3種はテキサス州のメーカーの製品であった。なお、PCR 反応の陽性対照としては内在性のSPS 遺伝子を使用した。

CaMV35S プロモーター、GUS 遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、NOS ターミネーター (図10) のそれぞれについて米国市場流通米より調製したゲノム DNA を鋳型に各遺伝子の検知を試みた。その結果、陰性対照 (非 GM) の日本晴、陽性対照の DSH1::GUS イネは良い対照となることが確認されたが、モデル試料として使用した米国市場流通米4種からはいずれの遺伝子も検出されなかった (図11)。

D. 考察

2006年から2009年1月末までの薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報を収集し、カテゴリ別に整理し分類した。野外圃場栽培状況については、インターネット上で情報が公開されている米国について調査した。

米国における薬用 GM 植物野外圃場栽培の経年の認可面積の増減は、2005年から2006年は1.75倍の増加、2006年から2007年は1.02倍の増加で、作付け面積の増減は、2005年から2006年は2.2倍の増加、2006年から2007年は0.97倍の減少である。昨年までは増加の一途を辿っていた野外圃場栽培申請・作付け面積が、2006-2007年ではほとんど変化がない。しかし、2007年から2008年の認可面積の変化は3.27倍の増加で2006年から2007年の1.02倍に比べて増加が著しい。2008年の作付け面積は未だ公表されていないが、この認可面積の増加が、作付け面積の増加に反映されているかどうかは、引き続き注視する必要があると思われる。

2006-2009年1月末に収集した情報179件をそれぞれのカテゴリ別に集計した結果、機能性食品・嗜好品:44件、経口ワクチン:35件、食用医薬:9件、ワクチン抗原:20件、抗体医薬:23件、治療薬:22件、診断薬・試薬:5件、環境浄化:21件であり、薬用及び環境浄化用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品・嗜好品および経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。また、国別の件数を集計した結果、米国:51件、日本:45件に次ぎ、中国:21件、ドイツ:9件、韓国:7件であった。米国、日本及び中国は、幅

広いカテゴリでの開発研究が進んでおり、ドイツは機能性食品・嗜好品と抗体医薬、韓国は経口ワクチン、治療薬と機能性食品・嗜好品の開発研究が行われていた。

国内学会は学会講演要旨等の情報が得られやすく、2008年は米国学会での調査も行ったため、日本、米国に関しては比較的多数の情報が収集できた。しかしながら、その他の外国の情報は、インターネット及びSciFinderによる文献検索に限られてしまうため、最新情報を得るのは困難である。それにも関わらず、中国及び韓国の件数が多かったことは、実際にはそれらの国でより多くの研究が活発に行われていることを示唆している。

さらに作物別に集計した結果、タバコ60件に次いでイネ18件、トマト12件が多かった。イネ及びトマトは国内での栽培も盛んであるが、国外から輸入もされている。中国及び韓国は日本と距離が近く、日本の農産物の主な輸入元である。今後、未承認の薬用及び環境浄化用 GM 植物が誤って食品として輸入されないように、さらに情報を収集する必要があると思われる。

調査の結果、実験植物で繁用されるタバコについて、イネが薬用 GM 植物ホストとしての利用頻度が高く、自家プロモーター発現系での挿入遺伝導入も行われていることが明らかになったため、DSH1::GUS イネをモデル植物として、IPCR法が自家プロモーター発現系 GMO の検知に適用可能であるか否かを検討し、有用であることを実証した。しかしながら、IPCRの増幅産物は予想した数よりも多く出現した。これらの予期しない増幅産物は、ゲノム DNA の自己閉環ライブラリー作成時に複数の制限酵素消化断片が非特異的にライゲーションするために生成することが判明したので、より高精度の検知のためには、自己閉環ライブラリー作成時のライゲーション条件等の検討が必要と考えられる。

レポーター遺伝子の GUS 遺伝子は、他の植物同様、組換えイネの作出に繁用されている。そこで、未承認パバイヤ検知法を応用した組織化学的染色法を DSH1::GUS イネに適用した。その結果、胚芽における GUS 活性の検知に成功し、本法が GUS 遺伝子を持つ遺伝子組換え米の検出法として有用であることを示した。本法は、実際には GUS 遺

伝子の発現部位のターゲット化により組換え体ごとに GUS による青色呈色部位が異なると予想されるが、胚芽もしくは胚乳において GUS を発現する組換えイネならば簡便な検知法として実用可能と考えられる。

さらに、DSH1::GUS イネを陽性対照、米国市場流通米をモニタリング被検試料として「組換えマーカー」遺伝子の PCR 法による検知を試みた。今回入手した米国市場流通米からはいずれの遺伝子も検知されなかったが、非食用 GM 植物においてはマーカー遺伝子の残留の可能性が高いと危惧されるため、本法の開発は意義のあるものと考えられる。

E. 結論

薬用遺伝子組換え (GM) 植物の範囲を、GM 植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物及び牛、豚、鶏等の家畜の健康に影響を与える植物と定め、薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報を、文献データベース (Entrez PubMed、Chemical Abstracts)、インターネット検索 (Google)、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し分類した。米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物の野外圃場栽培の認可面積は、2006 年 589.00 エーカー、2007 年 811.08 エーカー、2008 年 2650.5 エーカーと最近急速に拡大している。2006-2009 年 1 月末に公表・出版された論文等 179 件をそれぞれのカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品：44 件、経口ワクチン：35 件、食用医薬：9 件、ワクチン抗原：20 件、抗体医薬：23 件、治療薬：22 件、診断薬・試薬：5 件、環境浄化：21 件であり、薬用及び環境浄化用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品・嗜好品および経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。また、国別の件数では、米国：51 件、日本：45 件に次ぎ、中国：21 件であった。さらに作物別に集計した結果、タバコ 60 件についてイネ 18 件、トマト 12 件であった。

上記の調査研究結果に基づき、検知対象 GMO として設定した医薬品及び環境浄化目的の遺伝子組換え植物を主とする非食用 GMO、とくに、自家プロモーター発現系 GM 植物については、その検

知法として IPCR 法が有用であることを実証した。また、GUS 遺伝子を有する非食用 GM 植物の検知法として、組織化学的染色法が簡便な検知法として実用可能であることを示した。さらに、GM 植物において多用される「組換えマーカー」遺伝子の検知に、PCR 法が有用であることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 参考文献・インターネットホームページ

1. Release Permits for Pharmaceuticals, Industrials, Value Added Protein for Human Consumption, or for Phytoremediation Granted or Pending by APHIS as of Jan. 16, 2009, http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html
2. 江面浩、溝口剛、福田直也、棚瀬京子、平井正良、加藤一機、You-Wang Kim、矢野めぐむ、田村創、福川剛、古川奈緒子、角田英男、池上雄二、「組換えトマトを利用したミラクリン製造の基盤技術開発 (その 1) 組換えトマトでのミラクリン生産をさらに改良・高度化するための基盤技術」、第 26 回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産/糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索/AD 総合診断体系実用化、平成 20 年 11 月 6 日、東京、p97-98.
3. 黒田浩文、市川尚斉、西崎修代、菊崎綾子、高根健一、Narendra Duhita、棚瀬京子、吉田滋樹、江面浩、「組換えトマトを利用したミラクリン製造の基盤技術開発 (その 2) 組換えトマトを利用したミラクリン製造の実用化を目指す研究開発」、同、p. 99-100.
4. 佐竹炎、森本綱世、金賢仲、小埜栄一郎、岡澤敦司、畑直樹、小林昭雄、「組換えレンギョウ等による高機能性成分生産及び閉鎖系での栽培シス

- テム構築」第26回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産/糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索/AD総合診断体系実用化、平成20年11月6日、東京、p79-80.
5. Shou, Huixia; Wu, Ping; Zheng, Luqing; Zheng, Ye; Cheng, Longjun; Lei, Xingen; Bei, Xiaoshu. Transgenic crops expressing nicotianamine synthase gene NAS1 with seed rich in iron/zinc and nicotinamide. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2008), 17pp. CODEN: CNXXEV CN 101200714 A 20080618 Patent written in Chinese. Application: CN 1007-1561 20071009. Priority: . CAN 149:120606 AN 2008:744088
 6. Jung, Rudolf. Grain quality through altered expression of seed proteins, sorghum lysine-ketoglutarate reductase (LKR) and delta-kafirin2, and sugarcane delta-prolamin2. U.S. Pat. Appl. Publ. (2008), 33pp., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 546,627. CODEN: USXXCO US 2008134361 A1 20080605 Patent written in English. Application: US 2007-782965 20070725. Priority: US 2005-728784 20051020; US 2006-546627 20061012. CAN 149:28195 AN 2008:675098
 7. Froberg, Claus; Van Lipzig, Rosalinde. Engineering of truncated alternan sucrose from *Leuconostoc mesenteroides*, and use for alternan production. PCT Int. Appl. (2008), 79pp. CODEN: PIXXD2 WO 2008098975 A1 20080821 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, NO, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2008-EP51760 20080213. Priority: EP 2007-90022 20070214; US 2007-901532 20070215. CAN 149:283712 AN 2008:1006256
 8. Lisko K. A., Harris R. S., Vactayo J. and LORENCE A. Engineering Ascorbate for Enhanced Growth, Nutritional Content, and Stress Tolerance in Crops. In Vitro Cellular & Developmental Biology 44, Issue Abstract, Spring 2008, S28.
 9. Morris J, Hawthorne KM, Hotze T, Abrams SA, Hirschi KD. Nutritional impact of elevated calcium transport activity in carrots. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 5;105(5):1431-1435.
 10. Damude, Howard Glenn; Kinney, Anthony J. Production of arachidonic acid in oilseed plants expressing recombinant fatty acid desaturase and/or elongase for food, feed and pharmaceutical uses. U.S. Pat. Appl. Publ. (2008), 71pp. CODEN: USXXCO US 2008194685 A1 20080814 Patent written in English. Application: US 2008-29557 20080212. Priority: US 2007-889373 20070212. CAN 149:221853 AN 2008:974917
 11. Ananga A., Dodo H., and Konan K. Elimination of the Three Major Allergens in Transgenic Peanut (*Arachis hypogaea* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology 44, Issue Abstract, Spring 2008, S36-37.
 12. Park S. H., Elless M. P., Park J., Lim W., and Hirschi K. D. Genetic Manipulation for Enhancing Calcium Uptake in Lettuce. In Vitro Cellular & Developmental Biology 44, Issue Abstract, Spring 2008, S54-55.
 13. Dewey, Ralph E.; Bowen, Steven W.; Siminszky, Balazs; Gavilano, Lily. Alteration of tobacco alkaloid content through modification of specific cytochrome p450 genes. U.S. Pat. Appl. Publ. (2008), 72pp., Cont.-in-part of Appl. No. PCT/US2000/005665. CODEN: USXXCO US 2008202541 A1 20080828 Patent written in English. Application: US

- 2006-580765 20061013. Priority: WO
2005-US5665 20050223. CAN 149:303245 AN
2008:1039648
14. 菅谷俊之、Hyeon-Jin S、江面浩. ミラクリン遺伝子を導入した組換えイチョゴの作製、第24回日本植物細胞分子生物学会つくば大会・シンポジウム講演要旨集 (2006.7)、p.74
15. 本山貴康、奥本裕、谷坂隆俊、高岩文雄、内海成. イネ種子におけるダイズβ-conglycininα'およびβサブユニットの共発現とその効果、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集(2006.3)、p189.
16. 門脇光一. コエンザイムQ10強化米の開発、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集(2006.3)、p.シ50.
17. 松田史生、Dubouzet J、宮川亘、若狭暁. OASA1D:TDC3形質転換イネの代謝変動解析、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集(2006.3)、p188.
18. Wakasa K, Hasegawa H, Nemoto H, Matsuda F, Miyazawa H, Tozawa Y, Morino K, Komatsu A, Yamada T, Terakawa T, Miyagawa H. High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. *J Exp Bot.* 57(12): 3069-3078 (2006).
19. 桑野美緒、高岩文雄、吉田薫. 18kDaオレオシンプロモーターによるフィチン酸合成抑制種子系統の作出. 第25回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム講演要旨集(2007.8) p.182.
20. Shimada, Hiroaki. Production of transgenic rice with mutated floury-2 gene for lowered allergen and the use of the floury-2 gene and its product as the markers for identifying the low allergen rice strains. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2007), 21pp. CODEN: JKXXAF JP 2007202427 A 20070816 Patent written in Japanese. Application: JP 2006-22248 20060131. Priority: . CAN 147:270197 AN 2007:903092
21. Cirpus, Petra; Bauer, Joerg; Qiu, Xiao; Wu, Guohai; Chen, Bifang; Truksa, Martin. Transgenic plants expressing fatty acid desaturase genes for use in the manufacture of polyunsaturated fatty acids. *Ger. Offen.* (2007), 46pp. CODEN: GWXXBX DE 102006008030 A1 20070823 Patent written in German. Application: DE 2006-102006008030 20060221. Priority: . CAN 147:254098 AN 2007:940862
22. Das B, Goswami L, Ray S, Ghosh S, Bhattacharyya S, Das S, Majumder AL. Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica juncea* with a cyanobacterial (*Synechocystis* PCC6803) delta-6 desaturase gene leads to production of gamma-linolenic acid. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86: 216-231 (2006).
23. Regina A, Bird A, Topping D, Bowden S, Freeman J, Barsby T, Kosar-Hashemi B, Li Z, Rahman S, Morell M. High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *PNAS* 103(10): 3546-3551 (2006).
24. Frohberg, Claus; Essigmann, Bernd. Transgenic plants which overexpress glutamine:fructose 6-phosphate amidotransferase for increased glucosaminoglycan prodn. *PCT Int. Appl.* (2007), 84pp. CODEN: PIXXD2 WO 2007039317 A2 20070412 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2006-EP9776 20061005. Priority: EP 2005-90279 20051005; US

- 2005-725388 20051011; EP 2006-90177
20060922. CAN 146:376113 AN 2007:409406
25. Bi, Rui-ming; Gao, Feng. Analysis of protein and agronomic trait of transgenic sweetpotato with 10kD zein gene. *Shengwu Jishu* (2007), 17(3), 33-36.
26. Birch, Robert George; Wu, Luguang. Isomaltulose synthase sequences from *Erwinia rhapontici* and *Pantoea dispersa*, and uses in isomaltulose production, preferably by transgenic plants. U.S. (2007), 86pp., Cont.-in-part of Appl. No. PCT/AU01/01084. CODEN: USXXAM US 7250282 B2 20070731 Patent written in English. Application: US 2003-374726 20030227. Priority: WO 2001-AU1084 20010829. CAN 147:206547 AN 2007:835483
27. Morris WL, Ducreux LJ, Fraser PD, Millam S, Taylor MA. Engineering ketocarotenoid biosynthesis in potato tubers. *Metab Eng.* 8(3): 253-263 (2006).
28. Yun, Song Joong; Park, Myoung Ryoul; Park, Moon Hee; Lee, Hyo Jeong. Method for preparing transgenic plant capable of producing higher level of total tocopherol through increase of contents of all tocopherol homologues, and transgenic plant. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* (2007), No pp. given.
29. Cirpus, Petra; Bauer, Joerg; Qiu, Xiao; Wu, Guohai; Datla, Nagamani; Truksa, Martin. Manufacture of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid with transgenic plants expressing foreign fatty acid desaturase and elongase genes. *PCT Int. Appl.* (2007), 77pp. CODEN: PIXXD2 WO 2007017419 A2 20070215 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2006-EP9775 20061005. Priority: EP 2005-90277 20051005; US 2005-725530 20051011; EP 2006-90053 20060407. CAN 146:416319 AN 2007:410886
30. Frohberg, Claus; Essigmann, Bernd. Improved hyaluronan production using transgenic plants. *PCT Int. Appl.* (2007), 105pp. CODEN: PIXXD2 WO 2007039316 A1 20070412 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2006-EP9775 20061005. Priority: EP 2005-90277 20051005; US 2005-725530 20051011; EP 2006-90053 20060407. CAN 146:416319 AN 2007:410886
31. Yu CK, Lam CN, Springob K, Schmidt J, Chu IK, Lo C. Constitutive accumulation of cis-piceid in transgenic Arabidopsis overexpressing a sorghum stilbene synthase gene. *Plant Cell Physiol.* 2006 Jul;47(7):1017-1021.
32. 高梨功次郎、松田史生、石本政男、若狭暁、宮川亘。トリプトファン高生産形質転換ダイズの代謝プロファイリング、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集(2006.3)、p181.
33. Tavva, Venkata S.; Kim, Yul-Ho; Kagan, Isabelle A.; Dinkins, Randy D.; Kim, Kyung-Hwan; Collins, Glenn B. Increased α

- tocopherol content in soybean seed overexpressing the *Perilla frutescens* γ -tocopherol methyltransferase gene. *Plant Cell Reports* (2007), 26(1), 61-70.
34. 小原一郎、小門善正、山本浩文、佐藤文彦、矢崎一史。酵母 COQ2 遺伝子を用いた高等植物コエンザイム Q の代謝工学、日本農芸化学会 2006 年度大会講演要旨集 (2006.3)、p. シ 49.
35. Tian L, Dixon RA. Engineering isoflavone metabolism with an artificial bifunctional enzyme. *Planta*. 2006 Aug;224(3):496-507.
36. Liu, Rongrong; Hu, Yuanlei; Li, Jialin; Lin, Zhongping. Production of soybean isoflavone genistein in non-legume plants via genetically modified secondary metabolism pathway. *Metabolic Engineering* (2007), 9(1), 1-7.
37. Xie DY, Sharma SB, Wright E, Wang ZY, Dixon RA. Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expressions of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor. *Plant J* 45(6): 895-907 (2006).
38. 谷口美香、武石愛佳、永田裕加里、井上栄一、玉掛秀人、安西弘行。ヤーコンおよびキクイモ 1-SST 遺伝子を導入した植物におけるフラクトオリゴ糖生産、日本農芸化学会 2006 年度大会講演要旨集 (2006.3)、p190.
39. Huang S, Frizzi A, Florida CA, Kruger DE, Luethy MH. High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD alpha-zeins. *Plant Mol Biol*. 61(3): 525-535 (2006).
40. Wang, Pi-wu; Gao, Wei; Guan, Shu-yan; Qu, Jing; Zhang, Jun; Yao, Dan; Ma, Jian. Analysis on variation of amylose content in maize transgenic plants of antisense gene of starch branching enzyme (sbe2b). *Jilin Nongye Daxue Xuebao* (2008), 30(4), 415-418, 426.
41. van der Rest B, Danoun S, Boudet AM, Rochange SF. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. *J Exp Bot*. 57(6): 1399-1411 (2006).
42. Kisaka, Hiroaki; Kida, Takao; Miwa, Tetsuya. Transgenic tomato plants that overexpress a gene for NADH-dependent glutamate dehydrogenase (legdhl). *Breeding Science* (2007), 57(2), 101-106.
43. Husken A, Baumert A, Milkowski C, Becker HC, Strack D, Mollers C. Resveratrol glucoside (Piceid) synthesis in seeds of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.) *Theor Appl Genet*. 111(8): 1553-1562 (2005).
44. 三沢典彦、藤澤雅樹、原田尚志、瀧田英司、櫻井望、鈴木秀幸、柴田大輔、大山莞爾。「カロテノイド生産制御の開発：遺伝子組換えナタネ種子による有用カロテノイド生産」、第 26 回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産／糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索／AD 総合診断体系実用化、平成 20 年 11 月 6 日、東京、p64-66.
45. Graham, Ian A.; Larson, Tony; Napier, Johnathan A. Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates. *Current Opinion in Biotechnology* (2007), 18(2), 142-147.
46. Ruhmann S, Treutter D, Fritsche S, Briviba K, Szankowski I. Piceid (resveratrol glucoside) synthesis in stilbene synthase transgenic apple fruit. *J Agric Food Chem*. 54(13): 4633-4640 (2006).
47. 島田照久、笠原さおり、杉田耕一、南藤和也、和才昌史、新屋智崇、高岩文雄、「イネ種子での医療用タンパク質の生産技術開発 (その 2) 閉鎖型植物工場用組換えイネ作成技術の開発」、第 26 回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産／糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索／AD 総合診断体系実用化、平成 20 年 11 月 6 日、東京、p75-76.
48. 黒河志保、高橋裕子、目島未央、石川いずみ、中西潮、幸義一、徳原大介、野地智法、片岡伸浩、清野宏、「イネ種子での医療用タンパク質の生産技術開発 (その 3) 組換えイネを用いる米型経口ワクチンの研究開発」、同上、p77-78.
49. Lee RW, Cornelisse M, Ziauddin A, Slack PJ, Hodgins DC, Strommer JN, Shewen PE, Lo RY.

- Expression of a modified Mannheimia haemolytica GS60 outer membrane lipoprotein in transgenic alfalfa for the development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis. *J Biotechnol.* 2008 Jun 1;135(2):224-231.
50. Hwang, Cheol Ho. Development of transgenic plant for manufacturing oral vaccine against diarrhea caused by pig enterotoxigenic Escherichia coli. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* (2008), 13pp. CODEN: KRXXA7 KR 2008036162 A 20080425 Patent written in Korean. Application: KR 2006-102624 20061022. Priority: . CAN 149:207908 AN 2008:594791
51. Matoba N., Kajiura H., Cherni I., Doran J. D., Bomsel M., Fujiyama K., and Mor T. S. In Planta Expression and Molecular Characterization of the Candidate HIV-1 Mucosal Vaccine CTB-MPR649-684. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 44, Issue Abstract, Spring 2008, S35.
52. Wang K. Controlled Field Release of Pharmaceutical Corn in Iowa: Lessons and Strategies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 44, Issue Abstract, Spring 2008, S25.
53. Topal E., Alvarez M. L., and Mason H. S. Plant-derived Intimin Vaccine to Prevent Colonization of Enterohemorrhagic Escherichia coli. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 44, Issue Abstract, Spring 2008, S36.
54. Chowdhury K. and Kantor M. Transformation of Tomato with Antimalarial Genes with an Aim to Produce Edible Vaccines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 44, Issue Abstract, Spring 2008, S35.
55. Liu, Junhong; Li, Fengmei; Shi, Yanjing; Zhang, Yuanyuan; Su, Zhongliang; Li, Junfeng; Lu, Hui. Hepatitis C virus vaccine from edible transgenic plant expressing composite epitope gene. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* (2007), 14pp. CODEN: CNXXEV CN 101070544 A 20071114 Patent written in Chinese. Application: CN 1007-8041 20060508. Priority: . CAN 148:25143 AN 2007:1300931
56. 澤田和敏, 松井健史, 川本恵子, 牧野壮一, 加藤 晃, 吉田和哉. 植物におけるブタ浮腫病ワクチンタンパク質高生産技術の開発、第26回日本植物細胞分子生物学会大阪大会・シンポジウム (2008.9.1-2) 講演要旨集 p169.
57. Huang LK, Liao SC, Chang CC, Liu HJ. Expression of avian reovirus sigmaC protein in transgenic plants. *J Virol Methods.* 2006 Jun;134(1-2):217-222.
58. Yang ZQ, Liu QQ, Pan ZM, Yu HX, Jiao XA. Expression of the fusion glycoprotein of newcasstle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine.* 2007 Jan 8;25(4):591-598
59. 松村健. 遺伝子組換え植物による物質生産技術開発、日本農芸化学会 2006 年度大会講演要旨集 (2006.3)、シ 97.
60. Li JT, Fei L, Mou ZR, Wei J, Tang Y, He HY, Wang L, Wu YZ. Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology.* 2006 Dec 5-20;356(1-2):171-178.
61. 三好幸宏、諏佐健太郎、姫野尚美、五反田亨、伊藤亮、「組換えジャガイモを利用した家畜用経口ワクチン素材の開発」、第26回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産/糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索/AD総合診断体系実用化、平成20年11月6日、東京、p36-39.
62. Liang W, Huang Y, Yang X, Zhou Z, Pan A, Qian B, Huang C, Chen J, Zhang D. Oral immunization of mice with plant-derived fimbrial adhesin FaeG induces systemic and mucosal K88ad enterotoxigenic Escherichia coli-specific immune responses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Apr;46(3):393-399.
63. Daniell, Henry. Transgenic plant expressing Entamoeba histolytica LecA protein as mammalian edible vaccine for amebiasis. *PCT*

- Int. Appl. (2007), 32pp. CODEN: PIXXD2 WO 2007053182 A2 20070510 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2006-US21020 20060530. Priority: US 2005-685733 20050527. CAN 146:507527 AN 2007:510468
64. Gil, Felix; Reytor, Edel; Perez-Filgueira, Daniel Mariano; Escribano, Jose M. Multimerization of peptide antigens for production of stable immunogens in transgenic plants. *Journal of Biotechnology* (2007), 128(3), 512-518.
65. Lee KY, Kim DH, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Yoo HS, Arntzen CJ, Yang MS, Jang YS. Induction of protective immune responses against the challenge of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the oral administration of transgenic tobacco plant expressing ApxIIA toxin from the bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Dec;48(3):381-389.
66. Zhang H, Zhang X, Liu M, Zhang J, Li Y, Zheng CC. Expression and characterization of *Helicobacter pylori* heat-shock protein A (HspA) protein in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Biotechnol Appl Biochem.* 2006 Jan;43(Pt 1):33-38.
67. Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD. A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 2;103(18):7082-7087.
68. Sala, Monica; Greco, Raffaella; Michel, Marie; Guetard, Denise; Wain-Hobson, Simon; Sala, Francesco. Virus-like particles containing HBsAg fused to recombinant epitopes, particularly of HIV-1, their production, and bivalent vaccine uses. *PCT Int. Appl.* (2008), 144pp. CODEN: PIXXD2 WO 2008035210 A2 20080327 Designated States W: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ. Designated States RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LU, MC, MT, NL, PT, SE, TR, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, ML, MR, NE, SN, TD, TG. Patent written in English. Application: WO 2007-IB3308 20070816. Priority: US 2006-837909 20060816. CAN 148:424897 AN 2008:381425
69. Li HY, Ramalingam S, Chye ML. Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006 Sep;231(8):1346-1352.
70. Karaman S, Cunnick J, Wang K. Analysis of immune response in young and aged mice vaccinated with corn-derived antigen against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Mol Biotechnol.* 2006 Jan;32(1):31-42.
71. Guerrero-Andrade O, Loza-Rubio E, Olivera-Flores T, Fehervari-Bone T, Gomez-Lim MA (2006) Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res.* 15(4): 455-463.
72. Chen HF, Chang MH, Chiang BL, Jeng ST. Institute of Plant Biology and Department of Life Science, National Taiwan University,

- Taipei, Taiwan, ROC. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VPI protein from enterovirus 71. *Vaccine*. 2006 Apr 5;24(15):2944-51.
73. Alvarez ML, Pinyerd HL, Crisantes JD, Rigano MM, Pinkhasov J, Walmsley AM, Mason HS, Cardineau GA. Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine*. 2006 Mar 24;24(14):2477-90.
74. Saldana S, Esquivel Guadarrama F, Olivera Flores Tde J, Arias N, Lopez S, Arias C, Ruiz-Medrano R, Mason H, Mor T, Richter L, Arntzen CJ, Gomez Lim MA. Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. *Viral Immunol*. 2006 Spring;19(1):42-53.
75. Shchelkunov SN, Salyaev RK, Pozdnyakov SG, Rekoslavskaya NI, Nesterov AE, Ryzhova TS, Sumtsova VM, Pakova NV, Mishutina UO, Kopytina TV, Hammond RW. Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses. *Biotechnol Lett*. 2006 Jul;28(13):959-967.
76. Lou, Xiao-Ming; Yao, Quan-Hong; Zhang, Zhen; Peng, Ri-He; Xiong, Ai-Sheng; Wang, Hua-Kun. Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants. *Clinical and Vaccine Immunology* (2007), 14(4), 464-469.
77. Kim, Young-Sook; Kim, Mi-Young; Kim, Tae-Geum; Yang, Moon-Sik. Expression and Assembly of Cholera Toxin B Subunit (CTB) in Transgenic Carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular Biotechnology* (2009), 41(1), 8-14.
78. Zhang, Zhan-lu; Tang, Yi-xiong; Xue, Wen-tong; Liu, Jian-li; Liang, Zhe; Lu, Yun-ming; Wu, Yan-min. Study on expression of avian influenza virus hemagglutinin gene in *Lotus corniculatus*. *Zhongguo Nongye Kexue* (Beijing, China) (2008), 41(1), 303-307.
79. Webster DE, Smith SD, Pickering RJ, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh SL. Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine*. 2006 Apr 24;24(17):3538-3544.
80. Kim TG, Kim MY, Kim BG, Kang TJ, Kim YS, Jang YS, Arntzen CJ, Yang MS. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Protein Expr Purif*. 2007 Jan;51(1):22-27.
81. 澤田和敏. 組換えレタスを用いたブタ浮腫病ワクチン成分生産、第25回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム講演要旨集(2007.8) p.31.
82. 安野理恵. 遺伝子組換え植物工場の開発、第25回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム講演要旨集(2007.8) p.32.
83. 青木隆、加賀谷羽衣子、田林紀子、古田和義、Marcelo Silva Andrade、宮代裕子、油井晶子、半澤卓、松村健、安野理恵、杉本千尋、谷口孝喜、「遺伝子組換えによる機能性イチゴの作出」、第26回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産／糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索／AD総合診断体系実用化、平成20年11月6日、東京、p32-35.
84. 保田浩、林祐二、城森孝仁、高岩文雄. イネ胚乳中での外来遺伝子産物の局在と蓄積量について、第24回日本植物細胞分子生物学会つくば大会・シンポジウム講演要旨集(2006.7)、p.66.
85. 高岩文雄、高木英典、楊麗群、広瀬咲子、斉藤三郎、杉田耕一、笠原さおり、海老沼宏安. スギ花粉症緩和米の開発状況、日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集(2006.7)、p.シ98.
86. 高岩文雄. 生理活性ペプチドを利用した健康機能性米の開発、第25回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム講演要旨集(2007.8) p.47.
87. Liu, Dehu. Breeding of transgenic plants capable of expressing lumbricin and its

- products used in preparing medicines and health food with thrombolytic activity. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2007), 34pp. CODEN: CNXXEV CN 1940066 A 20070404 Patent written in Chinese. Application: CN 1010-5584 20050929. Priority: . CAN 146:448262 AN 2007:385747
88. 横田明徳、重岡成、淀井敦司、蘆田弘樹、田茂井政宏、福田弘和、加藤徹、茨木裕、牛山敬一、Lim Soon、稲井康二、渡辺理江、「医・農・工融合によるヒトチオレドキシシンⅠ産生レタスの生産技術の開発」、第26回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産／糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索／AD総合診断体系実用化、平成20年11月6日、東京、p101-102.
89. 堀田貢、一町田紀子、後藤一法、石原岳明、田村咲子、上田一郎、増田税、中原健二、杉本千尋、梶野喜一、中村一郎、松村健、福澤徳穂、松尾幸毅、安野理恵、「ウイルスベクターを用いた高効率発現システムの開発」、第26回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、植物利用物質生産／糖鎖機能活用技術開発、疾患制御遺伝子探索／AD総合診断体系実用化、平成20年11月6日、東京、p79-80.
90. Mehra A. and Brad M. J. Production of Cervical Cancer-related HPV 16E7 as a Pharmaceutical Protein in Rice Seeds. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 44, Issue Abstract, Spring 2008, S35-36.
91. Shah N., Matoba N., Chang H., Hu J., and Mor T. S. Plague Antigen Fusions with gp41 Membrane Proximal Region as HIV Vaccine Candidate. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 44, Issue Abstract, Spring 2008, S72-73.
92. 姫島正樹. ダウ・アグロサイエンスのバイオテクノロジー：植物生産ワクチン、第25回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム講演要旨集 (2007.8) p.183.
93. Medicago's Pandemic Flu Vaccine Provides 100% Protection in Mice at Low Doses, Quebec City, Quebec, January 22, 2008, <http://www2.medicago.com/upload/MDG%20letha1%20study%20release%20FINAL%20EN.pdf>
94. Mishra S, Yadav DK, Tuli R. Ubiquitin fusion enhances cholera toxin B subunit expression in transgenic plants and the plant-expressed protein binds GM1 receptors more efficiently. *Biotechnol.* 2006 Dec 15;127(1):95-108 (2006).
95. Cheng, Chang; Chen, Zhen; Zhu, Cheng. Construction of plant expression vectors with fusion gene of *Helicobacter pylori* cagA, ureB and ctb and its genetic transformation in tobacco. *Weishengwu Xuebao* (2007), 47(1), 29-33. Publisher: Kexue Chubanshe CODEN: KRXXA7 KR 2007002763 A 20070105 Patent written in Korean. Application: KR 2005-58427 20050630. Priority: . CAN 147:293327 AN 2007:754137
96. Maclean, J.; Koekemoer, M.; Olivier, A. J.; Stewart, D.; Hitzeroth, I. I.; Rademacher, T.; Fischer, R.; Williamson, A.-L.; Rybicki, E. P. Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *Journal of General Virology* (2007), 88(5), 1460-1469.
97. Phoolcharoen W., Uppalapati C., Arntzen C. J., Chen Q., and Mason H. S. Transient Expression of Ebola Recombinant Immune Complex in *Nicotiana benthamiana*. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 44, Issue Abstract, Spring 2008, S61.
98. Huang, Zhong; LePore, Kate; Elkin, Galina; Thanavala, Yasmin; Mason, Hugh S. High-yield rapid production of hepatitis B surface antigen in plant leaf by a viral expression system. *Plant Biotechnology Journal* (2008), 6(2), 202-209.
99. Cherni I., Vassall A., Matoba N., and Mor. T. S. MPR649-684-Hep B Core Antigen Fusion Forms Viruslike Particles in Plants and is Immunogenic in Mice. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 44, Issue Abstract, Spring 2008, S57.