

仮 訳

動物のクローニング： リスク評価

獣医学センター
米国食品医薬品局
保健社会福祉省
7500 Standish Place Rockville, MD 20855

2008 年 1 月 8 日

第1章：

エグゼクティブサマリー（概要）

第1章：エグゼクティブサマリー（概要）

クローニングは、畜産業で現在利用されている一連の生殖補助技術（assisted reproductive technology：ART）に関わる体細胞核移植（somatic cell nuclear transfer：SCNT）のプロセスを指して使われる俗称である。本リスク評価文書には、米国食品医薬品局（Food and Drug Administration：FDA）の獣医学センター（Center for Veterinary Medicine、略してCVM、または単にセンターと呼ぶ）が従来食物として使用してきた種（すなわちウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ）でのクローニングに関する有用な情報を、科学的見地に基づいてレビューした結果を記載する。

A. 概要

本リスク評価文書は、SCNT 技術をはじめ、そのプロセスに伴う動物の健康への影響と、通常飼育動物による畜産業で ART が利用されていることを背景に、クローン動物とその子孫¹によって生じ得る摂食の有害性について述べたものである。第 II 章では、食用動物の育種で現在利用されている ART の概要をまとめ、また SCNT について詳しく説明する。第 III 章では、リスク評価の手法と動物クローニングへの適用について、またクローニングの結果生じるおそれのある有害性の本質について詳述する。後成的リプログラミングに伴うプロセスや、SCNT やほかの ART に由来する動物で顕著にみられる有害な転帰との関連性の要綱は、第 IV 章に記載した。第 V 章は、潜在的健康リスクを代理母のほか、クローンとその子孫など、クローニングの手法に伴う動物に健康上のリスクを与える可能性について述べる。第 VI 章は、クローン動物またはその子孫に由来する食料品を使用した結果生じるおそれのある摂食量のリスクについて触れる。各章で主題に関する結論が述べられているが、リスク評価は第 VII 章にまとめ、我々の全体的な結論もそこに記載した。また、リスク評価の手法をできる限り透明化するため、方法論はすべてリスク評価の本文中に記す。CVM が評価した情報とデータは、一般公開されており、ピアレビューを受けた刊行物か本文書の付録のいずれかで入手できる。CVM が結論を得るに至った手法については、バイアスが存在する可能性や不確実性に関する明確な記述とともに、本リスク評価文書内に示した。本文書は、データと基礎的な情報を含めた著書目録、用語集、および付録の一式がそろって完成版とする。

¹ 今回の分析の目的に合わせ、クローンは体細胞核移植によって無性生殖で単一の動物から作られた動物と定義されている。クローンは、このようにその核ドナー動物と遺伝的に同一である。クローンの子孫は、少なくとも1頭のクローン動物の親がおり（ただし、2頭のクローン動物が交配した結果として生まれることもある）、有性生殖によって生まれる。クローンのクローンは、クローンとみなされる（すなわち、SCNT プロセスに直接起因する）。

本リスク評価文書は、クローニングの結果として動物に導入される可能性のある有害性の本質を識別して特徴付けるとともに、米国で現在実施されているほかの ART を背景にそれらを置き換えて定性分析を行った結果をまとめたものである。転帰は既知の比較対象動物と比較して検討されるため、このタイプのリスク評価で前向きな転帰に関して引き出せる最も有力な結論とは、「別の新たなリスクはない」ということである。「別の新たなリスクはない」との所見がクローン動物の健康に適用されるとすれば、このクローニング法は、ほかの ART よりも大きなリスクを当該の動物の健康に対して何らもたらさないことを意味することになる。この所見をクローン由来の食料品の安全性に当てはめると、クローン動物やその子孫由来の食品について「別の新たなリスクはない」とする所見が意味するところは、通常飼育動物由来の相当製品でみられないような新たなリスクは一切ない、あるいはその安全性は我々が毎日口にしている食料と同程度である、ということになる。すべてのリスク評価で言えることだが、ある程度の不確実性は、我々が採用したアプローチか、データ自体のいずれかに本来備わっている性質による。不確実性が存在するところでは、CVM は不確実の度合いとその存在理由を明らかにするよう努めた。

B. 技術の概要（第 II 章）

生殖補助技術（ART）は 1 世紀以上もの間、畜産業では広く採用されており、少なくともその技術のうち 1 種類（人工授精）は数百年間にわたり実施されている。これらの技術により、最新の SCNT の開発技術を通し、きわめて最小限度の生殖補助がなされる動物から自然交配の動物まで、一つの生物群集を成している。ART は、望ましい表現型の選択と伝播により国内の家畜種の遺伝的改良に役立つとともに、理想的な表現型の特徴が全国の群に組み込まれるスピードを上げるうえで一役買っている。たとえば人工授精の場合、物理的に存在する種雄を使用せずに有益なゲノムを伝播できるようになり、それによって遺伝的に優れた点を地理学上比較的小規模な地域枠を越えて伝播させることが可能になった。

一般的に用いられる ART の多くは、第一段階として受精に依存している。このような卵子と精子の結合は、種雄と種雌からの遺伝物質の組み換えを伴い、しばしば「遺伝子のトランプのシャッフル」と呼ばれている。育種家の見解によると、有性生殖から生じる表現型は予測不可能である、つまり交配から子の特性が推定できることもあるが、確実な予測はできない。こうした技術が最も進んだ形の核移植は受精を必要とせず、遺伝子の再シャッフルのリスクを伴わずに予め判明している遺伝子型と表現型を伝播できる。したがって、畜産業に直ちに最も大きく現れる SCNT の影響とは、表現型が判明したゲノムを伝播できる点となる。また、生殖機能が損なわれているおそれのある動物や、非常に有益ながら死亡した動物での繁殖も可能となる。ART のほかの新しい形式（たとえば体外受精、胚分裂など）といえる SCNT は、すでにある程度明らかになっている有害な転帰を動物や妊娠の

可能性のある種雌に与える。

C. リスク評価の方法論（第 III 章）

リスク評価は、定義済みの曝露シナリオに入れられる有害性を確認する際に、また曝露の発生という転帰が一度でも生じる見込みと重度を推定する際に用いる科学的見地に立った手法を取っている。リスク評価を構成するそれぞれのステップは、すべてではないにしても、多くは不確実性の度合いがさまざまであるため、リスク評価の担当者は、不確実性が何に端を発しているか、また何らかのリスクの判定を下す場合にはその不確実性によって生じるとされる影響について、明確に記載する必要がある。リスク評価は、リスクマネージャーが扱う範囲内の非常に幅広い背景事情への理解と責任に基づき、種々のオプションを選ぶ選択肢の科学的な基盤としての機能を果たすものである。

質的な面から言えば、リスクとは、考えられる転帰への曝露を結びつけると、検討中の物質やプロセスの内因的な性質が曝露と組み合わせることによる何らかの作用として考えられる。リスク分析を行う場合、「有害性」と、曝露の結果として生じる可能性のある潜在的「リスク」とを区別することがきわめて重要となる。「有害性」は、有害な転帰、損傷、またはある種の損失もしくは不利益を生む可能性のある行為や現象と定義できる。これらは時に損害と呼ばれ、有害転帰を検知する機会を最大限に増やせるよう設定した研究室の条件下でしばしば確認される。よって、このような観察に基づく概要は、しばしば「有害性確認」や「有害性の特徴付け」と呼ばれる。次に「リスク」とは、曝露が生じた場合に危害が生じる確率を推定する条件つき確率である。しかしながら、このような質的な評価においては、リスクは質的な背景の範囲内でのみ検討できるものであるが、定量的解釈はすべきではない。

クローニングに関係のある動物とそうした動物由来の食品に対する有害性とリスクを検討するには、有害性とリスクの識別、既存のデータでリスクの問題を取り上げる程度の決定、残存している不確実性の特徴付け、およびリスク評価に最も適切なリスク定義の採択の 4 点を扱う必要がある。

有害転帰と関連性をもつ原因が遺伝子組換えの結果によるのか、クローニングであるのかを判定することは不可能なため、本リスク評価文書では、絶対的に「クローンのみ」によって生じた有害性やリスクを識別する際には、遺伝子組換えクローンを明確に除外する。また、今回のリスク評価では、少なくともクローン動物とその子孫ならびにそれらに由来する食品は、通常飼育動物とこれに由来する食品と同一の法規の規制対象となるものと考えられている。

有害性とリスクの原因：外来遺伝子が SCNT によって誕生した動物に導入されることはなかったため、生じ得る有害性の可能性に関し土台となる仮説では、クローン動物に認められる異常は、ドナー細胞核の不完全または不適切なプログラミングが原因とされる。これらの異常は肉眼的な場合（解剖学的異常、大きさや成長速度の差、受胎能、罹患率、死亡率の低下など）があり、本質的には潜行性の高い異常となる場合もある。潜行性の有害性が存在すると考えられる場合、クローンが非顕性の生理的変化を伴わずに明らかに正常な外観と機能を備えて発現することが年 1 回ある。ここでいう変化には、変更を臨床化学上、血液学不完全または不適切なプログラミングが、または設定した生理的変化のポイント（ホルモン値の変化など）の変化も含まれる²。摂食リスクについては、不完全または不適切なプログラミングの結果として生じるおそれのある、関連ある潜行性の有害性には、食物の栄養学的な内容に影響を及ぼすカギとなるタンパク質の発現上の変化も含まれる。同様の有害性は、ほかの ART や自然交配を経て生まれる動物で生じる。今回のリスク評価の目的は、比較対象動物では特にみられない独特の何らかの有害性が生じるか否か、または、ほかの ART または自然交配を経て生まれたウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギでは確認されていないかどうかを判定することにある。

クローニングに関連する動物の健康と摂食リスクについて述べるため、今回 2 つの補完的なアプローチを採用した。まず、クローン動物の健康に関する情報については、Critical Biological Systems Approach (CBSA) と呼ばれる CVM が開発したアプローチの枠組みの中で評価された。摂食リスクには、「組成分析」と呼ばれる第 2 のアプローチと併せて CBSA を適用した。CBSA と組成分析を駆使して入手できたデータをすべてレビューしたうえで、次に証拠の重みという手法を用いて、クローニングに関連のある動物におけるリスクとクローン動物によって生産された食物を摂取したヒトにおけるリスクに関する結論を引き出した。

CBSA：このアプローチでは、クローン動物のライフサイクルを機能面から発達上の 5 つのノード（節目）に分ける。発達ノード 1 には、SCNT に関係する技術的ステップの中でも初期（細胞融合）が該当するほか、胎児の発達期間全体にも及ぶ。発達ノード 2 には、種雌の分娩誘導、出産、重要な出生後数日間などの周産期が含まれる。第 3 の発達ノードとなる「若年期の発達と機能」は、出生から思春期の出現までの急速に成長する時期を網羅する。「生殖期の発達と機能」ノード（発達ノード 4）には、クローンの生殖寿命全体を通しての思春期と生殖期の機能が該当する。「思春期後の成熟期」ノード（発達ノード 5）は、性的に成熟している、または成熟したクローンの非生殖的機能（成長、体重増加、疾患の罹患頻度、加齢、また可能であれば寿命など）で構成されている。

² このような潜行性の有害性は、標準的な食品の安全性評価に典型的に含まれるものではない。

CBSA を用いて入手データを評価する方法は、リスク評価（すなわち動物の健康または摂食リスク）の各構成要素の本質的な部分から作り上げられた。たとえば、動物の健康の有害転帰の確認には、クローン動物と妊娠中の代理母を対象とした。人工授精（artificial insemination : AI）、体外受精（in vitro fertilization : IVF）、割球の核移植（blastomere nuclear transfer : BNT）などのほかの ART との比較で重点が置かれたのは、クローンの発育と正常に発達する可能性であった。動物の健康に関する今回の評価では、肉眼的変化から生化学的変化（遺伝子発現上の変化、酵素活性の差異など）に至るまで、クローン動物の福祉に影響を及ぼす可能性のある広範囲にわたる有害性について検討した。摂食リスクについては、肉眼的に異常のみられるクローン動物をこの分析から除外し、SCNT プロセスの結果として生じる可能性のある独特の潜行性の有害性を同定することに重点を置いた。このアプローチの理論は第 IV 章に記載されており、これらの潜行性の有害性の源として後成的リプログラミングの役割を負う分子レベルでの証拠を示す。有害性は潜行性であるという仮説から、有害転帰の場合（およびこのように摂食リスクが潜在する場合は）可能な限り高感度の画面にするため、個々の動物や動物ごとの個々の分析物までも含め、データセットは極力解像度が高いもので評価した。このリスク評価において、動物の健康を評価する際に用いる解像度が最も詳細なレベルに入るのは、個々の動物の生理学的測定値と生化学的測定値であった。技術が成熟するにつれ、ゲノミクス、プロテオミクス、およびそれらを統合した代謝測定値などの分子レベルの技術は、上記のような測定を支援するものとなる（NAS 2004）。

組成分析：クローン動物から生産した食物を摂取した場合のリスクに関し結論に達することを目的に、動物の健康に関する所見（CBSA から得られたもの）を組成分析アプローチの結果と共に検討した。潜行性の有害性が存在する可能性を見出すために、リスク評価のこの部分で検討するデータには、ビタミンおよびミネラルの詳細な分析、脂肪酸のプロファイル、クローンから生産した食肉や乳のタンパク質の特徴付けのほかに、肉眼的に認められる組成の測定値（カーカスの組成、脂肪とタンパク質の割合など）を対象として含めた。クローンから生産した食物の成分は、比較対象動物から生産した食物の組成と比較し、また食肉と乳について公表されている参照範囲とも比較した。これらの比較は、クローンからの食肉や乳が通常飼育動物からの食肉や乳と著しく異なるか否かを判定するベースを形成するものとなり、食物摂取によるリスクに関する全体的な結論に影響を与えた。

証拠の重み：証拠の重みの評価は、単一の研究や、そのほか研究のサブセットにも依存していない。代わりに、リスク評価の経過で集められた全情報について、専門家の判断に基づいている。これにより、評価されるエンドポイントの矛盾点と、評価の何らかの特定の面に関する情報量には変動性がある。第 IV、V、VI 章には、有害性確認と有害性の特徴付

け、およびその後に行うリスク評価と関連するとみられる研究の詳しい説明を記した。確認された有害転帰ごとに、その転帰によるクローニングの因果関係の経験による証拠は、ほかの起因物質やプロセスとの関連があったことを示す経験的な証拠と比較した。

D. クローンとその子孫の後成的リプログラミングの影響（第IV章）

後成学とは、発現と細胞増殖の期間中に生じる遺伝子発現の可能性における安定的な変化の研究として定義されている。有性生殖では、二倍体ゲノムは、2つの一倍体ゲノムが融合することによって新たに作られる。その後そのゲノムは機能を備えた有機体の中で発現するが、これは「プログラム」によって制御されている。遺伝子発現の後成的制御にはいくつか例があるが、中でもDNAメチル化が最も特徴付けられる可能性がある。

哺乳類の胚はその発育過程で主として2回、主要な後成的リプログラミングを経る。そしてその2回ともがクローニングに重大な影響をもつ。これらのうち1回は受精直後に起こるもので、移植前のリプログラミングと呼ばれている。もう1回は、配偶子形成（最終的に精子と卵子になる細胞の発現）の期間中に起こる。移植前のリプログラミングは、受精後と、核移植の場合は除核卵母細胞によるドナー核の融合後に起こることから、これはクローニング法により最も早く影響を受けており、欠陥のあるクローンの発現に最も直接的に関与している可能性がある。配偶子形成のリプログラミングは、これによりクローンの有性生殖に使用される配偶子が発生するため、クローンで顕著にみられる異常に関与している可能性もあるが、子孫に対してはより広範囲にわたる影響をもっている可能性がある。

SCNTによるクローンの産生の効率（すなわち、移植される胚の数と比較した、生存している子が誕生する数）は非常に低い。このように効率が低い理由は、不適切な後成的リプログラミングと関連している可能性がある。クローニングの際は、ドナー核が受精由来の接合体であるかのように、何とか胚発育を誘導するようドナー核を促す必要がある。これは多くの回で成功していない。異常な後成的リプログラミングは、生体外培養の重要な構成要素とともに、クローン胚と胎児のゲノム全体と個々の遺伝子レベルと、ARTを用いて生まれた動物の同様の発育段階で認められている。IVFの低い成功率とSCNTのさらに低い成功率で示されるとおり、これらの多くは致死性である。最終的に正常で健常と思われるクローンに至る成功例が少ない中、SCNT由来の胚でのリプログラミングは、受精由来の胚でのリプログラミングと同程度の成功率であるとみられる。生存し明らかに健常なクローンは、受精由来の動物に比べ、後成的なレベルの差異をある程度示すことがあるものの、これらの差異が健康な状態や正常に成長し発育する能力に対して有害な影響をもつとは思われない。

獣医学センターでは、クローンが摂食リスクを有することになる場合、それらのリスクが生じ得る唯一のメカニズムは、ほかの ART で認められる場合と同様に、不適切な後成的リプログラミングから来ていると考えている。異常な制御を受けている遺伝子は自然に存在し動物のゲノムを構成する「正常な」遺伝子であり、ほかの供給源から組換え DNA の技術を経て導入された遺伝子ではない（すなわち、クローンは遺伝子組換え動物もしくは遺伝子改変動物ではない）点に注目することが重要である。

有性生殖によるクローン動物の子孫では、不適切な後成的リプログラミングがほかの ART または自然繁殖で認められる以上のレベルで予測されることはない。それらのクローンの親とは異なり、クローンの子孫は雌雄の配偶子の結合によって生まれる。クローンの両親から新しく生じたこれらの配偶子の発生は、核移植と関連のある何らかの残余的な後成的リプログラミング上のエラーをリセットするとみられる。したがって、クローン内で認められる異常は、次世代に伝達されるとは考えられず、生まれる子は正常で健康である。このように、有性生殖を経て生まれたほかの動物に比べて食品の安全性に関する懸念が何かしら新たに付随することから、クローンの子孫については予測しない。

E. クローニングに関わる動物に対するリスク（第 V 章）

クローニングと関連のある動物に何らかのリスクをもたらす潜在的な有害性を確認するため、第 V 章では、全 5 種の発達ノード（妊娠と分娩期、周産期、若年期、生殖期、思春期後）のクローンの健康に焦点を合わせる。クローン胎児を妊娠中の代理母の健康リスクについても検討を行い、SCNT の健康上の転帰はほかの ART の転帰と比較する。第 V 章の全体的な結論は、クローニング法に関わる動物（すなわちウシおよびヒツジの代理母とクローン）の健康上の有害転帰のリスクが高まっているというものである。クローンウシとクローンヒツジにおけるリスクの増大は、ライフサイクルの初期に限定されているものと考えられる。有害転帰のいずれもクローニングに特有のものではないにもかかわらず、SCNT によって生まれた動物に認められるこれらの異常は、ほかの ART で生まれた動物と比べると、発生率が高い。

SCNT 由来で妊娠中の代理母として用いられる雌ウシと雌ヒツジは、妊娠と分娩の期間中に健康上の問題のリスクが増大する。これらの問題には、異常な胎盤の発生と機能、および水症（尿膜の水症）³や過大な胎児が原因の異常分娩（難産）などの妊娠後期の合併症がある。胎児の過成長と妊娠後期の合併症は、総合して過大子症候群（large offspring syndrome : LOS）と呼ばれている。頻度は低いですが、生体外培養の重要な構成要素をもつほ

³ ウシの胎児は、羊膜腔と呼ばれる液体を満たした膜の中で育つ。羊膜腔を囲むのは、第 2 の液体を満たした膜の尿膜である。胎児からの老廃物は、尿膜に含まれる液に溜められる。水症とも呼ばれる尿膜の水症は、妊娠中に尿膜中に液体が過剰に蓄積する。

かの ART でもこれらの症状が発生している。ウシやヒツジとは対照的に、クローンを妊娠中の代理母のブタとヤギは、妊娠中の合併症のリスク増大がみられない。

クローンが生まれると、健康リスクに関して種ごとに明確な差異がある。クローンブタとクローンヤギの場合、周産期の罹患率と死亡率は上昇しないものとみられる。しかしながら、クローン子ウシとクローン子ヒツジの場合、ほかの ART を用いて生まれた子ウシと子ヒツジに比べ、両者の罹患率と死亡率が周産期に上昇する。LOS と関連のある周産期のクローンの臨床徴候には、呼吸系疾患、長期にわたる横臥位⁴、臍帯腫大、高熱症および低体温症、屈筋腱の収縮、および主要器官の異常な発育を伴う症状などがある。これらのクローンの生存については、臨床徴候の重度と適切な出生後の処置の両者が作用した結果とみられる。

周産期と同じく、若年期間のクローンの罹患率と死亡率のリスクは種ごとにさまざまである。自然交配または ART によって生まれた動物に比べ、クローンウシは、生後約 6 ヶ月まで罹患率または死亡率のリスクが増大し続ける。これらのリスクは、初期の発達段階で最初に注目される異常が後遺症となって周産期を越えて持続したものとみられる。対照的に、クローンブタとクローンヤギは、若年期の罹患率または死亡率のリスク増大はみられない。先天異常による有害な影響を受けていないクローン子ウシと同じく、クローンブタとクローンヤギは、若年期全体を通して健常にみえ、成長と発達の正常なパターンを示す。

健康上の有害な影響のリスク増大は、クローンが成長し思春期に近づくに従い、評価の対象となっただけの種においても報告されていない。クローンは雌雄ともに正常な生殖機能を持ち、受精能があるとみられ、有性生殖を経て正常な子が生まれる可能性がある。最終的に、現在利用できる情報が示すところでは、成熟したクローンは正常で健常であり、通常飼育動物に比べ、この発達ノードでの健康上のリスク増大は認められない。

クローニングと関連してのクローンの最長寿命や、長期にわたり健康状態が続く可能性に関し何らかの結論を引き出すことは、この技術が誕生してから比較的時間がないため、現段階では不可能である。

有性生殖由来のクローン動物の子孫は、正常で健常であるとみられている。第 IV 章に記載のとおり、クローンにおける何らかの残余的な後成的リプログラミング上のエラーは、配偶子形成期にリセットされ、結果的に有性生殖により正常な子が生まれると見込まれている。これらの予測と整合性のある、クローンの子孫の健康状態に関するデータは、通常飼育動物に比べ、健康問題のリスク増大が認められないことを示している。

⁴ 呼吸系疾患と長期間にわたる横臥位は、クローン子ウシの周産期死亡を伴う問題が最も多くみられる。

F. 摂食リスク（第VI章）

1. 摂食リスクの確認と特徴付けの2通りのアプローチ

後成的に生じた潜行性の有害性が摂食リスクを有するか否かを判定するため、CVM は 2 通りのアプローチを開発した。第 1 のアプローチの Critical Biological Systems Approach (CBSA) には、クローン動物またはその子孫の健康の系統的レビューが組み込まれている。摂食リスクの評価におけるこのアプローチの役割は、健全な動物からは安全な食品が生まれる可能性が高いという仮説を前提とするものである。この時点でこれは、SCNT は生物学的に不正確で非効率的なプロセスであることを認めるものであるが、動物には生物学的な修復や順応の能力があるという認識でもある。CBSA の蓄積的な性質は、望ましい転帰も望ましくない転帰も共に組み入れることを可能にする。ただし前者は、ほかのすべての計測値が正常とみられる場合、結果的に、クローンが摂食リスクを有していない食料品を生産する可能性があるという所見に至る。後者が意味するところは、異常を伴うクローンは食物には不適當であるとみなされる可能性が高いという所見である。第 2 のアプローチの組成分析法では、健全なクローン動物とその子孫から得られた食品は、通常飼育動物から得られた相当製品と著しく異なることはなく、新たな別のリスクを何ら有していないことを想定している。これは、食料品の個々の成分の比較と、適切な比較対象動物を見極めることに依拠するものである。

クローン動物とその子孫⁵から得た食品の安全性の評価は、発達と成熟の生物系の知識を前向きに活かして研究し、食品の分析からは後向きに研究するという両方のアプローチを用いることで、最高の成果が得られる。潜行性の有害性と潜在的リスクはクローン動物によって有するおそれがあるが、すべての食用の動物集団で生じるほかの突然変異と後成的変化を背景に検討を進める必要がある。有害転帰はクローンに一切みられず、また、ほかの ART または自然交配を経て生まれた動物でも認められていない。

2. 潜在的な摂食リスクに関する結論

クローン動物の健康に関するデータの主要部分のほか、これらの動物から得た食肉および乳の組成と、クローンの子孫についてのこれに相当する情報を今回レビューした結果をもとに、CVM は以下の結論を得た。

⁵ クローンから得た乳がヒトの摂取用に市場に出る可能性があるにもかかわらず、CVM は比較的少ないクローン動物が食肉として食物供給ルートに入ることと予測する（損傷または老化により群から選別される場合など）。クローンに比べ、クローンの子孫はヒトの摂取目的の食肉および乳を生産するために今後用いられていく可能性が高い。

a. クローンウシ

健全な若年期のクローンウシから得た食料品が現代の通常飼育の比較対象動物から得られる相当製品と比べ、新たに別のリスクを有することはない。

この発達ノードでは、根本的な生物学的仮説は、異常が最も若年のクローンで見つかった場合、若年期の発達ノードは、それらの動物が成人期に向かって進むにつれ、均衡化と基準化が行われる時期となる。重度の発育異常を経験する動物は生存の見込みがない。データはこのような仮説と整合する。

周産期も生存した若年期のクローンウシは主として健全で正常である。この発達ノードでは、やや若年のクローンは、これに相当する通常飼育動物以上に生理学的に不安定となる可能性があるにもかかわらず、ほとんどが生理学的状態を平衡化し、生育の正常パターンを示し続けることが可能である。この基準化は、出生時に呈した発育異常の後遺症として経験する場合を除き、若年期のクローンウシで一貫して認められてきたものである。場合によっては、これらの有害転帰は周産期を越えて持続することがあり、結果的にこれらのクローンの健康に対するリスクが出生後6ヵ月間で増大することがある。こうした問題を抱える動物が検査に合格する見込みはなく、食物供給ルートに入れられることはないため、予測ではこれらが摂食リスクに関与することはない。しかしながら、若年期の健全なクローンの発達上のサインに対する適切な生理的反応を示す臨床化学と血液学データの解析が証明するとおり、若年期に確認された摂食リスクを有する可能性のある潜行性の有害性が新たに確認されることはない。

成体のクローンウシに由来する食料品が現代の通常飼育の比較対象動物から得られる相当製品に比べ、新たに別のリスクを有することはない。

この結論は、リスク評価の2通りのアプローチ（CBSA および組成分析）を適用したことに基づいている。CBSA のアプローチを構成するデータの主要部分は、健全なクローン動物が同じ年齢と種の通常飼育動物より食品の安全性の懸念が大きい点に疑念を抱く根本的な生物学的理由は一切ないという生物学的予測との整合性がある。

健全な成体のクローンは、臨床化学と血液学の検査値においても比較対象動物と実質的に見分けがつかないことをデータは示している。また、クローンの出生後すぐに注目された生理学的不安定性は若年期の発達ノード(ほかの発達ノードについては既出の結論を参照)で解決され、クローンの加齢に伴い再び出現することはないという観察についても、これ

らのデータで確認されている。クローンの早期死については、いくつかの報告がある。これらの動物は食物供給ルートに入ることが禁じられているため、摂食リスクは有していない。この年齢コホートの雌ウシまたは雄ウシの生殖機能に関するデータは、生殖的機能が正常に成熟するまで生存している健常なクローンウシから健常な子が生まれることを示している。これらの観察は、研究全体で一貫してみられる。生殖が有機体に置かれた最も困難な「生物学的ハードル」であるとすれば、正常な生殖機能の観察は、これらの動物の正しい発育に関する結論に信頼度を加えるものである。

クローンウシから得た食肉や牛乳の組成分析についての報告はいずれも、クローンウシと非クローンウシ由来の牛乳の組成に生物学的有意差がないことを示している。さらに、1件の報告から得たデータは、非クローンの比較対象動物から得た食肉や牛乳との比較において、クローンウシ由来の食肉や牛乳にアレルギー性が存在する可能性の差異を示していない。また、クローンウシや非クローンウシから得られた食肉や牛乳のいずれも *in vitro* の突然変異を誘発しなかった。最終的に、ヒトが摂食した場合の有害性を有するエンドポイントを確認した報告はなかった。

b. クローンブタ

成体のクローンブタから得た食料品が現代の通常飼育による比較対象動物から得た相当製品に比べ、新たに別のリスクを有することはない。

この結論は、成体のクローンウシ用に引用したのと同じ根本的な生物学的仮説に基づいている。データは成体の市場サイズの動物のものが多いため、市場は動物の大きさを設定した、クローンブタから得た食品の安全性に関する判断は集積されたコメントの1セットの中で示される。

クローン子ブタが生まれた場合は健常であるとみられる。クローンブタの正常な健康状態に関し、最も説得力のある議論は、密接に関連性のある通常飼育のブタと比較した、比較的若年の（15 週）小規模コホートと、ほぼ市場に見合う年齢（27 週）のクローンブタの行動と生理学的状態の評価から生まれた。有意差は、行動、後成的測定値、生理学的測定値のいずれにおいても観察されず、比較対象動物と著しく異なることはないことが示されている。非常に特異な設定の中で育てられたクローンブタに関する小規模の別のデータセット（すなわち初乳の欠乏、病原体のない状況での初回の農業、商業的設定への切替）では、転帰に関して混乱がみられる。それにもかかわらず、これらのクローンは、このストレスのほかに、精液の質、通常飼育のブタの場合は正常な基準範囲内であった分娩率と一腹子数などの特徴ある生殖的能力に適切に応答することが可能である。これらのクローンまた

はその比較対象動物から得た食肉の成分において、生物学的に関連のある差異は認められなかった。

c. クローンヒツジ

根底にある生物学的仮説に依拠しない限り、そしてほかの種からの推論による場合には、食品の摂取が原因で潜在し得るリスクに関して結論を得ることを目的としたクローンヒツジの健康状態に関する情報は不十分である。

生存中のクローンヒツジの健康状態に関して一般公開されている報告は、ドリーについての報告を除き、CVM はまったく発見できなかった。クローンの産生を最も効果的にするための方法論的な問題に取り組んでいる研究が数件あるが、これらは出生後の健康を扱う研究ではない。死亡または終了された胎児のクローンヒツジに顕著にみられる異常の報告と、生存しない動物と関連のある病理学的な面からの報告がある。SCNT のプロセスの間に混乱する可能性のある分子レベルの経路と発達上の経路を理解するためにこれらは有益であるにもかかわらず、死亡した動物を食物供給ルートに入れることはできないため、本研究は食品の安全性を上げたものに関連した研究に限った。CVM は、クローンヒツジから得た乳または食肉の組成に関する報告を一切見つけられなかった。

d. クローンヤギ

クローンヤギから得た食料品が現代の通常飼育の比較対象動物から得た相当製品に比べ、新たに別の摂食リスクを有することはない。

この結論は、ほかの家畜種用に引用した同様の根本的な生物学的仮説と、比較的小規模であるが説得力のあるデータセットに基づくものである。クローン胚が代理母に移植され妊娠が確認されると、生児出産の「成功率」は非常に高くなる。動物は通常、生殖可能年齢を通して発達するとみられており、利用できるデータが示すところでは、その生理学的反応は年齢と品種に適正なものである。雄のクローン **Nigerian Dwarf** ヤギの生殖面の発達と機能は、それらの動物が年齢と品種をマッチさせた比較対象動物に比べ、適切に機能していることを証明している。1 匹の雄の後代ヤギは、この雄のクローンに由来した。この動物も年齢と品種に適切な方法で機能しているものとみられた。クローンヤギの食肉または乳の組成データは確認されなかった。

e. クローンの子孫

クローンの子孫に由来する食料品がほかの動物から得た相当製品に比べ、新たに別の摂食リスクを有することはない。

米国のクローンに直接由来した食肉と乳の量に比べ、さらに多くの食料品（食肉および乳製品のいずれも）がクローンの子孫から生産されている可能性がある。クローンとは異なり、これらの子孫は正常な両親の有性生殖によって生まれている。子孫の動物の健康に関する根本的な生物学的仮説（第 IV 章で説明）は、最終的に自然に卵細胞と精子になる細胞を作る過程を通じた継代が遺伝子発現の後成的信号をリセットし、効率的に不完全または不適切な信号を「クリアする」というものである。この仮説はマウスのモデルシステムで経験的⁶証拠によって裏付けられており、親のクローンで顕著にみられた表現型の変更が有性生殖で生まれた子孫には受け継がれないことを明らかに示すものである。クローンウシおよびクローンブタの子孫の詳細な観察は、これらの子孫が健常に生まれて正常に発育し、クローンで認められた異常を一切呈することがないことを証明している。その食肉の組成に関する直接的なデータを提供するクローンブタの子孫に関する広範な 1 つのデータセットは、これらの動物が非クローン動物のこれに相当する子孫とは基本的に見分けがつかないことを示す。これらの経験的データは、根本的な生物学的仮説と共に、クローンの子孫から得た食料品がほかの有性生殖で生まれた動物からの食料品に比べ、新たな別の摂食リスクを有することは一切ないという結論を裏付けるものである。

したがって、根本的な生物学的仮説の中に外の科学界（NAS 2002 a,b）が配する高い信頼度と同意見であり、クローンの子孫から得た食料品を摂取することは、有性生殖由来の動物から得た同様の製品を摂取した場合に比べ、何らかの新たな別の摂食リスクを有することにはならないという結論に至った。

G. 結論（第 VII 章）

動物の健康に向けて：SCNT は結果的にクローニング法に関わる動物に健康リスクの増大の頻度を高めるが、ほかの ART または自然交配で認められるリスク増大と質的に異なるものではない。この時点では、SCNT の全体的な効率性は低い。ウシとヒツジは、ブタまたはヤギではみられないと考えられている総合して LOS と呼ばれる一連の臨床徴候を示す。胎児が LOS または、胎盤腔内の液体貯留（水症）に罹患している場合、代理母には出生による合併症のリスクがある。LOS を伴うクローンに対するリスクには、胎児および新生児の

⁶ 経験主義的とは、単独でみられたり認められたりできるものを参照し、しばしば理論に依存しない。このリスク評価との関連で、経験的実証を活かす結論とは、データに基づき厳密に引き出されるデータである。こうした結論は、根本的な生物学的仮説を背景に、後で入れられる可能性がある。

死亡の発生率の増加と、周産期の追加的な支持療法が必要となる可能性のある異常などである。LOSに罹患したクローンは回復して正常かつ健全な動物の成熟期に至ることができるが、多くは若年期のLOSの合併症で死亡する。罹患率と死亡率のリスクは経年的に減少するとみられるが、生後約6ヵ月後には、ほとんどのクローンウシが生理学的測定値、行動、および獣医学実験により正常で健全であると判定されている。クローン動物の子孫も正常かつ健全と報告されている。

摂食リスクに向けて：現在利用できるデータの広範な評価では、健全なクローンウシ、クローンブタ、またはクローンヤギの摂食リスクを示す可能性のある潜行性の有害性は一切認められなかった。このように、市販の食肉および乳の既存の要件を満たす健全なクローンから得た食料品は、有性生殖由来の動物から得た相当製品に比べて摂食リスクが増大することはない。この判断に伴う不確実性は、経験的観察の働きとクローンの産生に寄与している根本的な生物学的過程である。加齢に伴い、クローンの健康に関する不確実性は低減し、種畜の期待されるあらゆる機能性を示すための時間が多くなる。

根本的な生物学的仮説、モデルシステムからの証拠、および一貫した経験的観察に基づくと、クローンの子孫に由来する食料品に、ほかの動物から得た相当製品に比べて新たな別の摂食リスクはない。

この包括的なリスク評価の結果はNAS (2002a) の予備的調査結果と一致しており、「クローンの子の製品には…食品の安全性の懸念がないとみなした。理由はそれらが自然交配の結果であるためである」「要約すると、成体の体細胞クローンやその子孫に由来する食品が食品の安全性への懸念を示すという証拠は現在ない」と結論付けている。

Animal Cloning: A Risk Assessment

**Center for Veterinary Medicine
U. S. Food and Drug Administration
Department of Health and Human Services
7500 Standish Place
Rockville, MD 20855**

1/8/2008



Table of Contents

Preface.....	i
Chapter I: Executive Summary.....	3
A. Overview.....	3
B. Technology Overview (Chapter II).....	4
C. Risk Assessment Methodology (Chapter III)	5
D. The Implications of Epigenetic Reprogramming for Clones and their Progeny (Chapter IV).....	8
E. Risks to Animals Involved in Cloning (Chapter V).....	9
F. Food Consumption Risks (Chapter VI)	11
1. Two-Pronged Approach to Identifying and Characterizing Food Consumption Risks.....	11
2. Conclusions Regarding Potential Food Consumption Risks	11
a. Cattle Clones.....	11
b. Swine Clones	13
c. Sheep Clones.....	14
d. Goat Clones.....	14
e. Clone Progeny.....	14
G. Concluding Statements (Chapter VII)	15
Chapter II: Technology Overview: Somatic Cell Nuclear Transfer and Other Assisted Reproductive Technologies.....	19
A. What is Cloning?.....	20
B. Continuum of Reproductive Technologies	21
1. Natural Service.....	21
2. Artificial Insemination and Synchronized Estrus	22
3. Embryo Transfer	25
4. <i>In vitro</i> Fertilization	26
5. Embryo splitting.....	27
6. Blastomere Nuclear Transfer	28
7. Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT).....	29
a. Donor cell.....	30
b. Oöcyte.....	31
c. Fusion.....	31
d. Transfer to recipient.....	32
C. Critical Biological Events in SCNT.....	33
D. Outcomes Observed in ARTs	35
E. Future of Reproductive Technologies in Modern Agricultural Practice	36

Chapter III: Developing the Risk Assessment Methodology..... 41

A. Charge	41
B. General Discussion of Risk/Safety Analyses.....	41
1. Risk and Safety	41
2. Risk Assessment vs. Risk Management.....	42
C. Risk/Safety Assessment of Cloning.....	42
D. Transgenic Animal Clones.....	44
E. Methodology Development	45
1. Hazard Characterization.....	46
2. Potential Risks	47
3. Proposed Approaches.....	48
a. Animal Health Risks.....	48
b. Food Consumption Risks.....	49
F. Two-Pronged Approach to Assessing Food Consumption Risks.....	50
1. Critical Biological Systems Approach.....	51
a. Overview.....	51
b. Evaluation Nodes.....	52
G. The Weight of Evidence Approach.....	54
H. Limitations of the Risk Assessment.....	55

Chapter IV: Epigenetic Reprogramming: Implications for Clones and their Progeny 59

A. Overview of Epigenetic Reprogramming in Early Embryonic Development.....	61
1. Preimplantation Reprogramming.....	63
a. Fusion and Cleavage.....	63
b. Demethylation and Remethylation in Early Embryos	66
c. Epigenetic Reprogramming in Later Development.....	70
d. Studies of Gene Expression and Development in Clones and Animals Produced by Other ARTs.....	73
e. Studies of Technical Contributions to Epigenetic Variability in Clones and Other ARTs.....	78
2. Gametogenic Reprogramming.....	79
3. Mitochondrial Heteroplasmy	81
4. Conclusions from Studies of Epigenetic Reprogramming.....	82
B. Phenotypic Evidence for Gametogenic Reprogramming	83
1. Phenotypic Anomalies Observed in Mouse Clones.....	83
a. Utility of Mouse Model	83
b. Pregnancy (Developmental Node 1).....	84
c. Perinatal Period (Developmental Node 2).....	86
d. Juvenile Period to Reproductive Maturity (Developmental Nodes 3 and 4).....	86
e. Maturity and Aging (Developmental Node 5).....	88
2. Conclusions from Phenotypic Studies of Gametogenic Reprogramming in Mouse Clones and their Progeny for Reprogramming in Domestic Livestock Clones and their Progeny	90

C. Implications of Epigenetic Reprogramming for Animal Health and Food Consumption Risks	91
--	----

Chapter V: Animal Health Risks 95

A. Potential Hazards and Risks to Animals Involved in Cloning.....	95
B. The Critical Biological Systems Approach to the Analysis of Clone Animal Health: Cattle, Swine, Sheep, and Goats	96
1. Pregnancy and Parturition (Developmental Node 1)	96
2. Perinatal Period (Developmental Node 2)	98
3. Juvenile Developmental Node (Developmental Node 3)	99
4. Reproductive Development and Function Node (Developmental Node 4).....	100
5. Post-Pubertal Maturation and Aging (Developmental Node 5).....	101
a. Telomere Length as an Indicator of Aging	101
C. Data on Animal Health by Species	105
1. Cattle.....	105
a. Developmental Node 1: Pregnancy and Parturition.....	109
b. Developmental Node 2: Perinatal Period.....	123
c. Developmental Node 3: Juvenile Development	135
d. Developmental Node 4: Reproductive Development and Function.....	145
e. Developmental Node 5: Post-Pubertal Maturation and Aging	150
f. Progeny of Bovine Clones	153
g. Summary for Health of Bovine Clones and Their Progeny.....	156
2. Swine.....	157
a. Developmental Node 1: Pregnancy and Parturition.....	158
b. Developmental Node 2: Perinatal Period.....	159
c. Developmental Node 3: Juvenile Development	163
d. Developmental Node 4: Reproductive Development and Function	165
e. Developmental Node 5: Post-Pubertal Maturation and Aging	166
f. Progeny of Swine Clones.....	166
g. Summary for Health of Swine Clones and Their Progeny	167
3. Sheep.....	168
a. Developmental Node 1: Pregnancy and Parturition.....	169
b. Developmental Node 2: Perinatal Period.....	172
c. Developmental Node 3: Juvenile Development	174
d. Developmental Node 4: Reproductive Development and Function	175
e. Developmental Node 5: Post-Pubertal Maturation and Aging	175
f. Progeny of Sheep Clones	176
g. Summary for Health of Sheep Clones	176
4. Goats.....	176
a. Developmental Node 1: Pregnancy and Parturition.....	177
b. Developmental Node 2: Perinatal Period.....	178
c. Developmental Node 3: Juvenile Development	179
d. Development Node 4: Reproductive Development and Function.....	180
e. Developmental Node 5: Post-Pubertal Maturation and Aging	180
f. Progeny of Goat Clones	180
g. Summary for Health of Goat Clones	181
D. Conclusions.....	181

Chapter VI: Food Consumption Risks 187

A. Potential Hazards and Food Consumption Risks Associated with Food Products from Animal Clones and their Progeny	187
1. Assumptions.....	187
2. Critical Biological Systems Approach to Clones of Cattle, Swine, Sheep, and Goats	188
a. Bovine Clones.....	188
b. Swine Clones	243
c. Sheep Clones.....	260
d. Goat Clones.....	264
3. Compositional Analysis Method.....	268
a. Overview.....	268
b. Nutritional Risk.....	269
c. Characterization of Milk from Cow Clones.....	278
d. Characterization of Meat from Clones and Their Progeny	288
B. Drawing Conclusions Regarding Risks Associated with Consumption of Food Products from Animal Clones.....	309
1. Approaches for Decreasing Uncertainties	309
2. Bounding the Risk Space	310
3. Developing Conclusions Regarding Food Consumption Risks.....	310
4. Weight of Evidence Conclusions Regarding Food Consumption Risks for Clones and their Progeny	312
a. Cattle Clones.....	312
b. Swine Clones	316
c. Sheep Clones.....	317
d. Goat Clones.....	318
e. Clone Progeny.....	319
5. Summary of Risk Hypotheses.....	319
a. Additional Issues.....	320
6. How Much (Information) Is Enough?.....	323

Chapter VII Summary and Conclusions 327

A. Methodology	327
B. Conclusions Regarding Risks to Animal Health	328
C. Conclusions Regarding Food Consumption Risks	329
D. Conclusions Regarding Food Consumption Risks from Clone Progeny.....	330
E. Weight of Evidence Evaluations.....	330

Glossary	333
----------------	-----

References.....	349
-----------------	-----

Appendices

Appendix A: Risk and Safety Assessment Primer for Animal Cloning	425
--	------------

A. How has Risk Assessment Evolved?	425
B. Thinking About Risk.....	426
C. How Do We Think About Safety?.....	428

Appendix B: Overall Reproductive Efficiency and Health Statistics for US Animal Agriculture.....	431
---	------------

A. Dairy cattle.....	431
B. Beef Cattle	433
C. Swine.....	436
D. Sheep.....	437
E. Goats	439

Appendix C: Comparisons of Outcomes Among Assisted Reproductive Technologies (ARTs).....	443
---	------------

A. Successes and Failures of AI, IVP, and ET	449
B. Outcomes for BNT, Fetal- and Adult-Cell SCNT	453
C. Conclusions regarding outcomes for ARTs.....	454

Appendix D Transgenic Clones	457
---	------------

A. Issues.....	457
B. Cattle.....	458
C. Swine.....	460
D. Sheep.....	462
E. Goats	463
F. Conclusions Regarding Transgenic Clones	466

Appendix E: The Cyagra Dataset	471
---	------------

A. Response to CVM Data Requests	471
B. Cyagra Dataset.....	472

1. Description of Clones	474
2. Evaluations Performed.....	476
3. CVM's Analysis of Cyagra Data: Method.....	477
4. CVM's Analysis of Cyagra Data: Results	479
a. Comprehensive Veterinary Examinations	479
b. Conclusions from Veterinary Examinations.....	480
c. Laboratory Values: Selection of Most Appropriate Comparator.....	481
d. Conclusions Regarding Clone and Comparator Population Cohorts in Aggregate	482
e. Animal and Analyte Specific Analyses	484
f. Animals with Measurements at Different Developmental Nodes	487
5. Charts and Tables.....	500
Cyagra Data Chart Interpretations	501
Cyagra Raw Data	523

Appendix F: The ViaGen Dataset 571

A. Background.....	571
B. Experimental Design.....	571
1. Study 1: Clones vs. Comparators.....	573
a. Animal Health, Hematology, Clinical Chemistry, and Urinalysis.....	574
b. Boar Semen Evaluation.....	574
c. Farrowing Rate.....	574
2. Study 2: Progeny of Clone Boars vs. Progeny of Conventional Boars	575
a. Statistical Analysis.....	575
b. Specific Methods for the Analysis of Animal Health, Hematology, Clinical Chemistry, and Urinalysis Data	578
c. Meat Composition, Carcass Characteristics, and Meat Quality Assessments for Clones, Comparators, and Progeny.....	578
C. Results.....	579
1. Study 1	579
a. Survival.....	579
b. Animal Health, Growth, Blood Clinical Chemistry, Hematology, and Urinalysis	580
c. Carcass Characteristics	588
d. Meat Composition Analysis for Clones and Comparators	589
e. Semen and Breeding Evaluation.....	591
f. Farrowing Rate.....	592
2. Study 2: Progeny of Clones vs. Comparators	594
a. Survival.....	594
b. Growth, Hematology, Clinical Chemistry, and Urinalysis	600
c. Carcass Characteristics	608
d. Meat Composition from the Progeny of Clones and Comparators.....	609
D. Conclusions from the ViaGen Dataset.....	614
1. Study 1: Clones vs. Comparators.....	614
a. Animal Health.....	614

b. Food Safety	615
2. Progeny of Clone Boars vs. Progeny of Comparator Boars	615
a. Animal Health.....	615
b. Food Safety	616
E. Addendum.....	617
ViaGen Data Chart Interpretations	621
ViaGen Raw Data	695

Appendix G: Unpublished Data 857

A. Perinatal Development in Cattle Clones (Node 2).....	857
B. Juvenile Development in Cattle Clones (Node 3).....	859
C. Reproductive Development and Function in Cattle Clones (Node 4)	865
D. Post-pubertal Maturation in Cattle Clones (Node 5)	867
E. Summary of Cloning Studies at University of Tennessee	868
1. Developmental Node 1: Pregnancy and Parturition.....	868
2. Developmental Node 2: Perinatal Period.....	869
3. Developmental Node 3: Juvenile Period.....	869
4. Developmental Node 4: Reproductive Development and Function	869
5. Developmental Node 5: Post-pubertal Maturation and Aging.....	870
F. Perinatal Development in Swine Clones (Node 2)	870
G. Conclusions for unpublished data.....	872

Appendix H: The Comprehensive Veterinary Examination 877

A. Introduction to the Comprehensive Veterinary Examination	877
B. The Importance of Species-Specific Standards	878
C. How a Veterinarian Performs a Comprehensive Veterinary Examination	878
1. Specific Considerations for Neonatal CVEs.....	880
2. Specific Considerations for Juvenile CVEs.....	881
3. Specific Considerations for Mature Animal CVEs.....	881
4. Specific Consideration for Reproductive Stage Examinations.....	881
a. Males.....	881
b. Females	882
D. Interpreting the Comprehensive Veterinary Examination for Animal Clones	883
E. Parameters Evaluated in the Comprehensive Veterinary Exam for a Risk Assessment.....	883

Appendix I: Investigation on the Attributes of Cloned Bovine Products 895

Preface

Preface

The following Risk Assessment is the result of a multi-year effort by staff from the US Food and Drug Administration's (FDA's) Center for Veterinary Medicine (CVM or the Center). Since the late 1990s, CVM has been gathering data and meeting with clone producers and other stakeholders interested in cloning to discuss the safety and regulatory implications of somatic cell nuclear transfer (SCNT), the process most commonly used to generate animal clones during this time period. In the fall of 2000, CVM tasked the National Academy of Sciences (NAS) to perform an independent, scientific review of the available data on the safety of cloning, including holding a public meeting to identify science-based concerns and elicit data and information on clones and their food products from the scientific community. In July of 2001, the Center issued a CVM Update requesting that clone producers not introduce meat or milk from clones or their progeny into food or feed until the NAS report had been completed, and the agency had had a chance to complete its own review of the safety of those food products.¹

In October of 2002, NAS issued its report "*Animal Biotechnology: Science-Based Concerns*." Following an overview of the available data on animal clones, the report indicated that the most likely mechanism for generating hazards to clones would stem from reprogramming of the donor cell genome, and that any harms that might result from that reprogramming would be observed early in a clone's development. They further noted that there were no published data comparing the composition of meat or milk from clones with that from conventionally-bred animals. Nonetheless, the report concluded that there is "no evidence that food products derived from adult somatic cell clones or their progeny pose a hazard (i.e., there is no evidence that they present a food safety concern)" (page 65).

This Risk Assessment is CVM's subsequent independent analysis of all of the available data relevant to assessing the health of clones and their progeny (and other animals involved in the cloning process) or food consumption risks resulting from edible products from these animals. In order to make the Risk Assessment as transparent as possible, all of this information is available to the public, either by virtue of its publication in peer-reviewed journals, or by "publication" in this risk assessment. We have actively sought independent peer-review of these data by providing all of the data in raw form (not summaries) either in the text of the risk assessment or in appendices. In addition, we have also described the means by which the methodology was developed to facilitate peer-review by risk assessors.

¹ http://www.fda.gov/cvm/CVM_Updates/clones.htm

CVM has attempted to be as comprehensive as possible about identifying and using all of the relevant data in its analysis. We have performed extensive literature reviews, engaged in conversations with scientists involved in cloning animals, and requested data on animal health and food composition from scientists, breeders, and food producers. Unpublished data were provided to us in raw, unanalyzed form, which we subsequently analyzed. CVM determined whether a particular publication or dataset was relevant to the analysis. These judgments were framed by the two overarching objectives of the Risk Assessment: determining whether cloning poses any health risks to the animals involved in the cloning process, and whether any hazards arise during the development of clones or their progeny that may pose food consumption risks.

Literature searches for the draft version of the Draft Risk Assessment ceased in early 2006. For the final version of the Risk Assessment, we have conducted updated literature searches (through mid-year 2007), thoroughly reviewed hundreds of additional relevant papers from the peer-reviewed literature, and incorporated this information into the Risk Assessment. The final version also includes additional, unpublished data that were submitted to CVM after the release of the Draft Risk Assessment. We reviewed all of the public comments that we received on the Draft Risk Assessment and associated documents. Careful consideration was given to relevant, science-based information in the comments, and parts of the Risk Assessment have been revised in response to these comments.

In addition to understanding the Risk Assessment's goals, it is equally important to understand what it does not consider. It does not attempt to address the question of whether clones are "normal;" rather it concentrates on identifying the risks that cloning poses to animal health or to humans and animals consuming food derived from clones and their progeny. It also does not attempt to explore issues such as the influence of different donor cell types or cell cycle stages in the "success rate" for producing clones, or the degree to which clones are more or less identical at the phenotypic level. Studies addressing these questions have been used, however, when they provided data useful to the identification of hazards or risks. Similarly, the Risk Assessment does not attempt to parse out the relative effectiveness of different cloning techniques or different laboratories in generating live animals. Results of cloning in species not commonly used for food have been employed only as they have utility as model systems (e.g., mice as models for livestock). Uncertainties associated with those models have been identified.

It is important to note that this Risk Assessment is a scientific document that provides a framework by which science-based questions regarding animal health and food consumption risks are evaluated. CVM recognizes that cloning raises many ethical and

economic concerns. These issues may be important to members of the public, however, they are not within FDA's mission and therefore not within the purview of this Risk Assessment.

Finally, the measures we will take to manage the risks associated with cloning and our recommendations regarding the use of clones or their progeny as food or feed are not included in the Risk Assessment, but are addressed in the accompanying Risk Management Plan and Guidance for Industry.

Chapter I:

Executive Summary

Chapter I: Executive Summary

Cloning is the colloquial term used to describe the process of somatic cell nuclear transfer (SCNT) that falls on a continuum of assisted reproductive technologies (ARTs) currently used in agriculture. In this Risk Assessment, the Center for Veterinary Medicine (CVM or the Center) at the US Food and Drug Administration (FDA) presents a science-based review of the available information on cloning in species traditionally used for food (*i.e.*, cattle, swine, sheep, and goats).

A. Overview

This Risk Assessment addresses SCNT technology, its impact on the health of animals involved in that process, and food consumption hazards that may arise in animal clones and their progeny² in the context of the use of ARTs in conventional animal agriculture. Chapter II is a summary of ARTs currently used in food animal breeding and a detailed explanation of SCNT. Chapter III describes the process of risk assessment, its application to animal cloning, and the nature of the hazards that may arise as the result of cloning. A synopsis of the processes involved in epigenetic reprogramming and their relevance to adverse outcomes noted in animals derived via SCNT and other ARTs is found in Chapter IV. Chapter V addresses potential health risks to animals involved in the process of cloning, including surrogate dams, clones, and their progeny. Chapter VI addresses potential food consumption risks that may result from edible products derived from animal clones or their progeny. Each chapter contains conclusions relevant to that subject; the Risk Assessment is summarized in Chapter VII, and our overall conclusions are presented there. In order to make this process as transparent as possible, all of our methodologies are presented in the text of the risk assessment; the information and data that CVM evaluated are publicly available, either in peer-reviewed publications, or in Appendices to this document. The process by which CVM drew its conclusions is presented in the Risk Assessment, along with explicit statements of potential bias and uncertainty. The document concludes with a complete bibliography, a glossary of terms, and appendices containing data and background information.

The Risk Assessment is the result of a qualitative analysis that identifies and characterizes the nature of hazards that may be introduced into animals as a result of cloning, and puts them in the context of other ARTs currently practiced in the United States. The strongest conclusions that

² For the purposes of this analysis, a clone is defined as an animal produced asexually from a single animal by somatic cell nuclear transfer. Clones are thus genetically identical to their nuclear donor animal. Progeny of clones have at least one animal clone as a parent (but could also result from mating two animal clones) and are produced by sexual reproduction. Clones of clones would be considered as clones (*i.e.*, directly arising from an SCNT process).

can be drawn regarding positive outcomes in risk assessments of this type are “no additional risk” because outcomes are weighed against known comparators. If a finding of “no additional risk” were to be applied to the health of animal clones, it would mean that the cloning process would not pose any greater risk to the health of the animals involved than other ARTs. Applied to the safety of edible products derived from clones, a finding of “no additional risk” would mean that food products derived from animal clones or their progeny would not pose any additional risk relative to corresponding products from conventional animals, or that they are as safe as foods that we eat every day. As with all risk assessments, some uncertainty is inherent either in the approach we have used or in the data themselves. Where uncertainties exist, CVM has attempted to identify the degree of uncertainty and the reasons for its existence.

B. Technology Overview (Chapter II)

Assisted reproductive technologies (ARTs) have been employed extensively in animal agriculture for over a century, and at least one (artificial insemination) has been practiced for several hundred years. These technologies form a continuum that ranges from the fairly minimal assistance provided to animals engaged in natural service through the more recent development of SCNT. ARTs have aided in the genetic improvement of domestic livestock species by the selection and propagation of desirable phenotypes, and accelerating the rate at which those characteristics have been incorporated into national herds. Artificial insemination, for example, permitted the propagation of valuable genomes without the sire being physically present, thereby allowing superior genetics to be spread beyond relatively small geographical areas.

Most commonly used ARTs rely on fertilization as a first step. This joining of egg and sperm is accompanied by the recombination of the genetic material from the sire and dam, and is often referred to as “shuffling the genetic deck.” From a breeder’s perspective, phenotypes resulting from sexual reproduction cannot be predicted—that is, the characteristics of the offspring from a mating may be estimated, but not predicted with certainty. Nuclear transfer, the most advanced of these technologies, does not require fertilization and allows for the propagation of known genotypes and phenotypes without the risk of genetic reshuffling. Thus, SCNT’s greatest immediate impact on animal agriculture may be that it allows the propagation of genomes whose phenotypes are proven. It also allows the propagation of animals whose reproductive function may be impaired, or of very valuable animals that have died. SCNT, like the other newer forms of ARTs (*e.g.*, *in vitro* fertilization, embryo splitting) results in some known adverse outcomes to the animals and possibly the dams bearing those pregnancies.

C. Risk Assessment Methodology (Chapter III)

Risk assessment is a science-based process used to identify hazards that may be present in predefined exposure scenarios, and to estimate the severity and chances of the outcome(s) occurring once that exposure occurs. Because many, if not all, of the individual steps that comprise a risk assessment contain various degrees of uncertainty, risk assessors should explicitly describe the sources of uncertainty and the effect(s) that the uncertainties may have on any judgment of risk. Risk assessment serves as the scientific underpinning from which risk managers may choose different options based on their understanding of, and responsibilities to, the broader contexts within which they operate.

Qualitatively, risk may be thought of as some function of the combination of exposure and the intrinsic properties of the substance or process under consideration by linking an exposure to the likelihood of an outcome. When performing a risk analysis, it is critically important to distinguish between a *hazard* and the potential *risk(s)* that may result from exposure. A *hazard* can be defined as an act or phenomenon that has the potential to produce an adverse outcome, injury, or some sort of loss or detriment. These are sometimes referred to as *harms*, and are often identified under laboratory conditions designed to maximize the opportunity to detect adverse outcomes. Thus, such observational summaries are often referred to as “*hazard identification*” or “*hazard characterization*.” Risk, then, is the conditional probability that estimates the probability of harm given that exposure has occurred. In a qualitative assessment such as this, however, risks can be discussed only within a qualitative context, and no quantitative interpretations should be made.

In order to address the hazards and risks to animals involved in cloning and the food products derived from them four issues must be addressed: identifying hazards and risks; determining the degree to which existing data address the question of risk; characterizing residual uncertainties; and selecting the most appropriate definition of risk for the risk assessment.

This Risk Assessment explicitly excludes transgenic clones from the identification of hazards or risks experienced by “just clones” because of the inability to determine whether the transgenic event or cloning was causally associated with an adverse outcome. In addition, the Risk Assessment has assumed that, at minimum, animal clones, their progeny, and food products derived from them would be subject to the same laws and regulations as conventional animals and their food products.

Source of Hazards/Risks: Because no exogenous genes have been introduced into animals derived via SCNT, the underlying assumption regarding potential hazards that could arise is that anomalies observed in animal clones are due to incomplete or inappropriate reprogramming of

the donor cell nucleus. These anomalies may be macroscopic (e.g., anatomical abnormalities, difference in size or growth rate, reduced fertility, morbidity, mortality) or they may be more subtle in nature. Potential *subtle hazards* would allow an animal clone to develop with apparently normal appearance and functions, but with sub-clinical physiological changes.³ These include alterations in clinical chemistry, hematology, or changes in physiological set-points (e.g., changes in hormone levels). For food consumption risks, relevant subtle hazards that might result from inappropriate or incomplete reprogramming include alterations in the expression of key proteins affecting the nutritional content of food, possibly leading to dietary imbalances. Similar hazards arise in animals generated via other ARTs or natural breeding. The goal of this risk assessment is to determine whether any unique hazards arise that are not noted in comparators, or have not been identified in cattle, swine, sheep, or goats produced via other ARTs or natural breeding.

To address animal health and food consumption risks associated with cloning, two complementary approaches were employed. First, information on the health of animal clones was evaluated within a framework developed by CVM called the *Critical Biological Systems Approach* (CBSA). For food consumption risks, the CBSA was applied in combination with a second approach referred to as *Compositional Analysis*. Following review of all of the available data using the CBSA and Compositional Analysis, a *weight of evidence approach* was then used to draw conclusions regarding risks to animals associated with cloning, and risks to humans from consuming foods produced by animal clones.

The CBSA: This approach divides the life cycle of an animal clone into five functional developmental nodes. Developmental Node 1 incorporates the initial technical steps involved in SCNT (cell fusion) and continues through fetal development. Developmental Node 2 encompasses the perinatal period, including labor induction in the dam, delivery, and the critical few days after birth. The third developmental node, Juvenile Development and Function, covers the period of rapid growth between birth and the onset of puberty. The Reproductive Development and Function Node (Developmental Node 4) includes puberty and reproductive function throughout the reproductive life of clones. The Post-Pubertal Maturation Node (Developmental Node 5) consists of all non-reproductive functions of sexually maturing or mature clones, including growth, weight gain, disease frequency, aging, and, where available, lifespan.

The nature of each component of the risk assessment (i.e., animal health or food consumption risks) shaped the manner in which the available data were evaluated using the CBSA. For example, identification of adverse outcomes for animal health included both the animal clone

³ Such subtle hazards are not typically included in standard food safety assessments.

and the surrogate dam carrying the pregnancy. Emphasis was placed on the clones' development and probability of normal development, compared with other ARTs such as artificial insemination (AI), *in vitro* fertilization (IVF), and blastomere nuclear transfer (BNT). In our assessment of animal health, we considered a wide range of hazards, ranging from macroscopic to biochemical changes (e.g., changes in gene expression, differences in enzyme activity) that might affect the well-being of animal clones. For food consumption risks, animal clones bearing gross anomalies were excluded from the analysis, and emphasis was placed on identifying unique subtle hazards that could have arisen as the result of the SCNT process. The rationale for this approach is found in Chapter IV, and provides the molecular evidence for the role of epigenetic reprogramming as the source of these subtle hazards. Because of the assumption that hazards would be subtle, datasets were evaluated on as fine a level of resolution as possible, including individual animals or even individual analytes per animal in order to have as sensitive a screen as possible for adverse outcomes (and thus potential food consumption risks). In this risk assessment, the most detailed level of resolution used for evaluating animal health has been physiological and biochemical measures of individual animals. It is likely, as technologies mature, that molecular techniques such as genomics, proteomics, and their integrated metabolomic measures will assist in such determinations (NAS 2004).

Compositional Analysis: To reach conclusions about the risks of consuming food produced by animal clones, findings regarding animal health (derived from the CBSA) were considered in conjunction with results of the Compositional Analysis approach. In an attempt to find potential subtle hazards, the data considered in this part of the risk assessment included measurements of gross composition (e.g., carcass composition, percent fat and protein) as well as detailed analyses of vitamins and minerals, fatty acid profiles, and protein characterization of meat and milk produced by clones. The composition of foods produced by clones was compared to the composition of foods produced by comparator animals, and also to published reference ranges for meat and milk. These comparisons formed the basis of our determination of whether meat or milk from clones differs materially from meat or milk from conventional animals, and thus contributed to the overall conclusions regarding food consumption risks.

Weight of evidence: Weight of evidence evaluations do not rely on a single study or even a subset of studies. Instead, they are based on expert judgments on all of the information gathered in the course of a risk assessment. This allows for variability in the amount of information on any particular aspect of the evaluation, as well as inconsistency in endpoints evaluated. Chapters IV, V, and VI contain detailed descriptions of studies that were considered relevant to the hazard identification and characterization, and subsequent risk evaluation. For each adverse outcome identified, the empirical evidence for the causal association of cloning with that outcome was weighed against the empirical evidence indicating that there were associations with other causal agents or processes.

D. The Implications of Epigenetic Reprogramming for Clones and their Progeny (Chapter IV)

Epigenetics has been defined as the study of stable alterations in gene expression potentials that arise during development and cell proliferation. In sexual reproduction, a new diploid genome is created by the fusion of two haploid genomes. The subsequent expression of that genome into a functional organism is governed by a “program.” There are several examples of epigenetic control of gene expression, of which DNA methylation is likely the best characterized.

Mammalian embryos experience major epigenetic reprogramming primarily at two times in their development, both of which have significant implications for cloning. One of these takes place soon after fertilization, and is referred to as preimplantation reprogramming; the other occurs during gametogenesis (the development of cells that ultimately become the sperm and egg). Because preimplantation reprogramming occurs after fertilization, and in the case of nuclear transfer, after fusion of the donor nucleus with the oöplast, it is the most immediately affected by the cloning process, and may be most directly implicated in the development of clones with defects. Gametogenic reprogramming may also be involved in the abnormalities noted in clones, but it likely has more far-reaching implications for progeny, because it generates the gametes used for the sexual reproduction of clones.

The efficiency of producing clones (*i.e.*, the number of live offspring born compared to the number of embryos transferred) by SCNT is very low. The reasons for this low efficiency may be related to inappropriate epigenetic reprogramming. When cloning, the donor nucleus must be coaxed to direct embryonic development as if it were a fertilization-derived zygote. Most of the time, this is not successful. Anomalous epigenetic reprogramming is observed at the global genomic and individual gene level in clone embryos and fetuses, and in similar developmental stages of animals produced using ARTs with significant *in vitro* culturing components. Many of these are lethal, as demonstrated by the low success rate of IVF and the even lower success rate of SCNT. In the small number of successful cases that ultimately result in clones that appear normal and healthy, reprogramming in SCNT-derived embryos appears to be as successful as reprogramming in fertilization-derived embryos. Live and apparently healthy clones may exhibit some level of epigenetic differences relative to fertilization-derived animals, but these differences do not appear to have adverse effects on their well-being or ability to grow and develop normally.

The Center assumes that if clones were to pose food consumption risks, the only mechanism by which those risks could arise would be from inappropriate epigenetic reprogramming, similar to those observed for other ARTs. It is important to note that the genes that are being dysregulated are the “normal,” naturally present genes that comprise the animal’s genome, and have not been

introduced via recombinant DNA techniques from other sources (*i.e.*, clones are not transgenic or genetically engineered animals).

Inappropriate epigenetic reprogramming is not expected in the sexually reproduced progeny of animal clones at levels that exceed those observed in other ARTs or natural reproduction. Unlike their clone parent(s), the progeny of clones are produced by the union of male and female gametes. Production of these gametes *de novo* by the clone parents appears to reset any residual epigenetic reprogramming errors associated with nuclear transfer. Therefore, anomalies present in clones do not appear to be transmitted to the next generation, and the offspring that are produced are normal and healthy. Progeny of clones are thus not anticipated to pose any additional food safety concerns compared with other animals produced via sexual reproduction.

E. Risks to Animals Involved in Cloning (Chapter V)

To identify the potential hazards and assess any resulting risks to animals associated with cloning, Chapter V focuses on the health of clones at all five developmental nodes (pregnancy and parturition, perinatal, juvenile, reproductive, post-pubertal). Health risks to surrogate dams carrying clone fetuses are also considered, and the health outcomes of SCNT are compared with the outcomes of other ARTs. The overall conclusion of Chapter V is that animals involved in the cloning process (*i.e.*, cattle and sheep surrogate dams, and clones) are at increased risk of adverse health outcomes. The increased risks in cattle and sheep clones appear to be limited to the early stages of the life cycle. Although none of the adverse outcomes is unique to cloning, the incidence of these abnormalities observed in animals produced by SCNT is increased compared to animals produced by other ARTs.

Cows and ewes used as surrogate dams for SCNT-derived pregnancies are at increased risk of health problems during pregnancy and parturition. These problems include abnormal placental development and function and complications during late gestation such as hydrops (hydroallantois)⁴ and dystocia (difficult birth) due to excessive fetal size. Overgrowth of the fetus and complications during late pregnancy are collectively referred to as large offspring syndrome (LOS). These conditions also occur with other ARTs that have a significant *in vitro* culturing component, but at a lower frequency. In contrast to cattle and sheep, surrogate swine and goat dams bearing clones do not appear to be at increased risk of complications during pregnancy.

Once clones are born, there are distinct differences between the species with respect to health

⁴The bovine fetus develops in a fluid-filled membrane called the amniotic sac. Surrounding the amniotic sac is a second fluid-filled membrane, the allantoic sac. Wastes from the fetus accumulate in the fluid contained in the allantoic sac. Hydroallantois, also referred to as hydrops, is excessive accumulation of fluid within the allantoic sac during pregnancy.

risks. In swine and goat clones, morbidity and mortality do not appear to be increased during the perinatal period. In calf and lamb clones, however, the incidence of both morbidity and mortality are increased during the perinatal period compared to calves and lambs produced using other ARTs. Clinical signs in perinatal clones associated with LOS include respiratory problems, prolonged recumbency,⁵ enlarged umbilical cord, hyper/hypothermia, contracted flexor tendons, and symptoms associated with abnormal development of the major organs. Survival of these clones appears to be a function of both the severity of the clinical signs and appropriate post-natal management.

Similar to the perinatal period, the risk of morbidity and mortality in clones during the juvenile period varies among species. Compared with animals produced by natural service or ARTs, bovine clones continue to be at an increased risk of morbidity or mortality up to approximately six months of age. These risks appear to be sequelae of the abnormalities first noted in earlier stages of development that persist beyond the perinatal period. In contrast, swine and goat clones do not appear to be at increased risk of morbidity or mortality during the juvenile period. Swine and goat clones, as well as clone calves that are not adversely affected by congenital abnormalities, appear healthy throughout the juvenile period and exhibit normal patterns of growth and development.

As clones approach puberty, no increased risk of adverse health effects have been reported in any of the species evaluated. Clones of both sexes appear to have normal reproductive function, are fertile, and can produce normal offspring via sexual reproduction. Finally, the available information indicates that mature clones are normal and healthy, and there are no increased health risks at this developmental node relative to conventional animals.

Currently, it is not possible to draw any conclusions regarding the longevity of livestock clones or possible long-term health consequences associated with cloning due to the relatively short time that the technology has existed.

Sexually derived progeny of animal clones appear to be normal and healthy. As described in Chapter IV, any residual epigenetic reprogramming errors in clones are expected to be reset during gametogenesis, resulting in production of normal offspring by sexual reproduction. Consistent with these predictions, the data on the health status of clone progeny indicate that there is no increased risk of health problems in these animals compared with conventional animals.

⁵ Respiratory problems and prolonged recumbency appear to be the most common problems associated with perinatal death in clone calves.

F. Food Consumption Risks (Chapter VI)**1. Two-Pronged Approach to Identifying and Characterizing Food Consumption Risks**

In order to determine whether epigenetically-caused subtle hazards pose food consumption risks, CVM has developed a two-pronged approach. The first component, the *Critical Biological Systems Approach* (CBSA), incorporates a systematic review of the health of the animal clone or its progeny. Its role in the evaluation of food consumption risks is premised on the hypothesis that a healthy animal is likely to produce safe food products. It accepts that at this time, SCNT is a biologically imprecise and inefficient process, but recognizes that animals are capable of biological repair or adaptation. The cumulative nature of the CBSA allows for the incorporation of both favorable and unfavorable outcomes. The former, provided that all other measures appear to be normal, will result in the finding that the clone is likely to produce edible products that pose no food consumption risks; the latter implies that clones with anomalies are likely to be considered unsuitable for food. The second component, the *Compositional Analysis Method*, assumes that food products from healthy animal clones and their progeny that are not materially different from corresponding products from conventional animals pose no additional risks. It relies on the comparison of individual components of edible products, and the identification of appropriate comparators.

Assessing the safety of food products from animal clones and their progeny⁶ is best accomplished by using both approaches: prospectively drawing on our knowledge of biological systems in development and maturation, and in retrograde, from an analysis of food products. Subtle hazards and potential risks that may be posed by animal clones must, however, be considered in the context of other mutations and epigenetic changes that occur in all food animal populations. No adverse outcomes have been noted in clones that have not also been observed in animals derived via other ARTs or natural mating that enter the food supply unimpeded.

2. Conclusions Regarding Potential Food Consumption Risks

Based on this review of the body of data on the health of animal clones, the composition of meat and milk from those animals and corresponding information on clone progeny, CVM has drawn the following conclusions:

a. Cattle Clones

⁶ Although milk from clones might be marketed for human consumption, CVM anticipates that relatively few animal clones will enter the food supply as meat (e.g., if culled from the herd due to injury or senescence). Relative to clones, it is more likely the progeny of clones will be used to produce meat and milk for human consumption.

Edible products from healthy juvenile bovine clones pose no additional risk(s) relative to corresponding products from contemporary conventional comparators.

The underlying biological assumption for this developmental node is that if anomalies were found in the youngest clones, the juvenile developmental node would be a period of equilibration and normalization as those animals proceeded toward adulthood. Animals experiencing severe developmental abnormalities are not expected to survive. The data are consistent with such a hypothesis.

Juvenile bovine clones that survive the perinatal period are largely healthy and normal. Although some younger clones in this developmental node may be more physiologically unstable than their conventional counterparts, most are able to equilibrate their physiological status and go on to exhibit normal patterns of growth and development. This normalization has been observed consistently in juvenile bovine clones except for those experiencing the sequellae of the developmental abnormalities present at birth. In some cases, these adverse outcomes can persist beyond the perinatal period, resulting in an increased risk to the health of these clones during the first six months of life. Animals bearing these problems are not expected to pass inspection and would not be allowed into the food supply, and therefore are not expected to contribute to food consumption risks. However, no additional subtle hazards that could pose food consumption risks were identified during the juvenile period, as demonstrated by the analysis of clinical chemistry and hematology data, demonstrating that healthy juvenile clones exhibit appropriate physiological responses to developmental signals.

Edible products derived from adult bovine clones pose no additional risk(s) relative to corresponding products from contemporary conventional comparators.

This conclusion is based on application of both prongs (CBSA and Compositional Analysis) of the risk assessment approach. The body of data comprising the CBSA approach is consistent with the biological prediction that there are no underlying biological reasons to suspect that healthy animal clones pose more of a food safety concern than conventional animals of similar age and species.

The data show that healthy adult clones are virtually indistinguishable from their comparators even at the level of clinical chemistry and hematology. These data also confirm the observation that physiological instabilities noted earlier in the lives of the clones are resolved in the juvenile developmental node (see previous conclusions regarding other developmental nodes), and do not reappear as the clones age. There are some reports of early deaths of clones; as these animals would be prohibited from entering the food supply, they do not pose a food consumption risk. Data on reproductive function in cows or bulls of this age cohort indicates that healthy bovine

clones surviving to reproductive maturity function normally and produce healthy offspring. These observations are consistent across studies. Given that reproduction is the most difficult “biological hurdle” placed on an organism, the observation of normal reproductive function provides an additional degree of confidence in the conclusion regarding the appropriate development of these animals.

All of the reports on the compositional analysis of meat or milk from bovine clones show that there are no biologically significant differences in the composition of milk derived from clone and non-clone cattle. Additionally, data from one report show no difference in allergenic potential for meat or milk derived from clone cattle compared to meat or milk from non-clone comparators, and neither meat nor milk from clone or non-clone cattle induced mutations *in vitro*. Finally, none of the reports identified an endpoint that would pose a hazard for human consumption.

b. Swine Clones

Edible products from adult swine clones pose no additional risk(s) relative to corresponding products from contemporary conventional comparators.

This conclusion is based on the same underlying biological assumption as cited for adult bovine clones. Because the data are more heavily weighted towards adult, market sized animals, judgments regarding the safety of food products from swine clones are provided in one aggregate set of comments.

Once piglet clones are born, they appear to be healthy. The most compelling argument for the normal health status of swine clones results from the evaluation of the behavior and physiological status of a small cohort of relatively young (15 weeks), and approximately market age (27 weeks) swine clones relative to closely related conventional pigs. No significant differences were observed in either behavior, epigenetic, or physiological measurements, indicating that these animals were not materially different from the comparators. Another small dataset on swine clones reared in very unusual settings (i.e., deprivation of colostrums, initial husbandry in pathogen-free conditions, switching to commercial settings) is confounded with respect to outcome. Nonetheless, these clones were able to respond appropriately to this stress, and their carcass characteristics, reproductive performance, including semen quality, farrowing rates and litter sizes were within normal reference ranges for conventional swine. No biologically relevant differences were observed in the composition of meat from these clones or their comparators.

c. Sheep Clones

Except by relying on underlying biological assumptions, and by inference from other species, there is insufficient information on the health status of sheep clones to draw conclusions with respect to potential risks that could be posed from the consumption of food products.

With the exception of reports on Dolly, CVM was unable to find any publicly available reports on the health status of live sheep clones. There are several studies addressing methodological issues for optimizing the generation of clones, but these do not address post-natal health. There are reports of anomalies noted in fetal sheep clones that have died or been terminated, and reports on the pathology associated with animals that do not survive. Although these are instructive for understanding the molecular and developmental pathways that may be perturbed during the process of SCNT, these studies have limited relevance to addressing food safety because the deceased animals would not have been allowed to enter the food supply. CVM was not able to find any reports on the composition of milk or meat from sheep clones.

d. Goat Clones

Edible products from goat clones pose no additional food consumption risk(s) relative to corresponding products from contemporary conventional comparators.

This conclusion is based on the same underlying biological assumption cited for the other livestock species, and a relatively small but compelling dataset. Once clone embryos are transferred to surrogate dams and pregnancies are confirmed, the “success rate” for live births is quite high. The animals appear to develop normally through reproductive age, and the available data indicate their physiological responses are appropriate for age and breed. The reproductive development and function of male Nigerian Dwarf goat clones demonstrate that those animals functioned appropriately relative to age- and breed-matched comparators. One male progeny goat was derived from the buck clones; this animal also appeared to function in an age- and breed-appropriate manner. No meat or milk composition data were identified for goat clones.

e. Clone Progeny

Edible products derived from the progeny of clones pose no additional food consumption risk(s) relative to corresponding products from other animals.

Relative to the amounts of meat and milk derived directly from clones in the U.S., it is likely that more edible products (both meat and dairy) will be produced by the progeny of clones. These progeny, unlike their clone parents, are produced by normal sexual reproduction. The underlying biological assumption for health of progeny animals (explained in Chapter IV) is that passage through the process of creating the cells that ultimately become ova and sperm naturally resets epigenetic signals for gene expression, and effectively “clears” the genome of incomplete or

inappropriate signals. This assumption has been supported by empirical⁷ evidence in the mouse model system, which clearly indicates that phenotypic alterations noted in the parent clones are not passed to their sexually-derived progeny. Detailed observations of the progeny of bovine and swine clones demonstrate that these progeny are born healthy, develop normally, and do not exhibit any of the anomalies observed in clones. One extensive dataset on the progeny of swine clones providing direct data on the composition of their meat indicates that these animals are essentially indistinguishable from the comparable progeny of non-clone animals. These empirical data, together with our underlying biological assumption, support the conclusion that edible products from clone progeny pose no additional food consumption risk(s) relative to edible products from any other sexually reproduced animals.

We therefore concur with the high degree of confidence that the outside scientific community (NAS 2002 a,b) places in the underlying biological assumption, and conclude that consumption of edible products from clone progeny would not pose any additional food consumption risk(s) relative to consumption of similar products from sexually-derived animals.

G. Concluding Statements (Chapter VII)

For Animal Health: SCNT results in an increased frequency of health risks to animals involved in the cloning process, but these do not differ qualitatively from those observed in other ARTs or natural breeding. At this time, the overall efficiency of SCNT is low. Cattle and sheep exhibit a set of clinical signs collectively referred to as LOS that do not appear to be present in swine or goats. Surrogate dams are at risk of complications from birth if the fetus suffers from LOS, or from accumulation of fluid in the cavities of the placenta (hydrops). Risks to clones associated with LOS include increased incidence of fetal and neonatal death, and abnormalities that may require additional supportive care during the perinatal period. Clones affected by LOS can recover and mature into normal, healthy animals, but many succumb to complications of LOS during the juvenile period. The risk of morbidity and mortality appears to decrease with age, and after approximately six months of age most bovine clones are normal and healthy as determined by physiological measurements, behavior, and veterinary examinations. Progeny of animal clones also have been reported as normal and healthy.

For Food Consumption Risks: Extensive evaluation of the available data has not identified any subtle hazards that might indicate food consumption risks in healthy clones of cattle, swine, or goats. Thus, edible products from healthy clones that meet existing requirements for meat and milk in commerce pose no increased food consumption risk(s) relative to comparable products

⁷ Empirical refers to that which can be seen or observed alone, often without reliance on theory. In the context of this risk assessment, conclusions drawn on empirical evidence are those that are drawn strictly based on the data. These conclusions may later be put in the context of underlying biological assumptions.

from sexually-derived animals. The uncertainties associated with this judgment are a function of the empirical observations and underlying biological processes contributing to the production of clones. There is less uncertainty about the health of clones as they age and have more time to exhibit the full range of functionality expected of breeding stock.

Edible products derived from the progeny of clones pose no additional food consumption risk(s) relative to corresponding products from other animals based on underlying biological assumptions, evidence from model systems, and consistent empirical observations.

The results of this comprehensive risk assessment agree with the preliminary findings of the NAS (2002a) conclusions that “The products of offspring of clone[s] ... were regarded as posing no food safety concern because they are the result of natural matings,” and “In summary there is no current evidence that food products derived from adult somatic cell clones or their progeny present a food safety concern.”