

体細胞核移植（SCNT）によるクローニングで得られた動物¹とその産子の食品安全性、動物の健康と福祉、および環境への影響に関する科学的見地に基づく意見書（草案）

科学委員会の科学的見地に基づく意見書（草案）

（質問番号：EFSA-Q-2007-092）

公開協議に向けて 2007 年 12 月 19 日に承認済み

科学委員会委員

Sue Barlow、Andrew Chesson、John D. Collins、Erik Dybing、Albert Flynn、Claudia Fruijtier Pölloth、Anthony Hardy、Ada Knaap、Harry Kuiper、Pierre Le Neindre、Jan Schans、Josef Schlatter、Vittorio Silano、Staffan Skerfving、Philippe Vannier。

概要

欧州食品安全機関（European Food Safety Authority：EFSA）は 2007 年に、欧州委員会（European Commission）より、体細胞核移植（somatic cell nucleus transfer：SCNT）技術によって得られた動物のクローンとその産子ならびにそれらの動物から得られた製品について、食品の安全性、動物の健康、動物福祉、および環境への影響に関する科学的見地に基づく意見書を提出するよう要請を受けた。本任務は、この課題がもつ学際的な性質を考慮して EFSA の科学委員会に割り当てられた。クローニングの倫理的な問題については EFSA が委託された権限の範囲外にあたるため、欧州委員会は科学および新技術の倫理に関する欧州グループ（European Group on Ethics in Science and New Technologies）に対し、この問題に関する意見書の提出を要請した。

SCNT では、除核した卵母細胞に分化した体細胞（非生殖系列細胞）の核を細胞の融合または直接注入によって移植する。再構成胚は人工的に発育を開始させられた胚で、代理母の体内に移植されて成長を続け、成功例の場合は健常な新生児として産まれる。クローニングは無性生殖的であるため、ほかの生殖様式とは異なる。つまり、新個体の産生に卵子と精子の結合を必要としない。SCNT の場合、既知の表現型を呈する動物の生殖が単体の動物で可能となる。クローニングは動物育種プログラムの中で利用すると、証明済みの望ましい特性（耐病性など）を取り入れて動物の妊孕性に関係なく繁殖することができる。

¹ 本意見書で論じる動物種とは、ウシおよびブタである。

SCNT は、分化したドナーの体細胞の核の活動が全能性の胚の状態にリセットされたうえで新しい胚が胚および胎児としての発育を遂げて初めて成功したことになる。この過程は「リプログラミング」と呼ばれ、遺伝子発現を制御する生化学的信号に変化を与える。受精卵が全能性（結果的に生じる有機体のいかなる細胞にもなり得る能力）の有性生殖の例とは異なり、SCNT の場合はまず、分化した体細胞を含有する活性化した胚は全能性をもつように「リセット」されたうえで、受精胚と同じ経路をたどる必要がある。後成的なりプログラミングの失敗は、その程度もさまざまに異なるものとされ、クローンに影響を及ぼし結果的に発育異常をもたらすおそれのある健康上有害な作用が潜在する原因となる。クローンの正常で健康な状態は、後成的なりプログラミングの機能上の主な指標となる。

SCNT によるクローニングは動物の数種に適用されてきたが、利用できるデータを考えると、科学的な評価が可能な種はウシとブタのみであった。

本意見書では、代理母とクローンおよびクローンの産子に関する健康上の問題を考察する。代理母の場合、妊娠失敗例の割合の増大がウシとブタにおいて、また胎児水腫および難産の頻度の上昇が特にウシにおいて認められている。このことと子の大きさの増大（過大子症候群）は、クローンを宿すウシの帝王切開の頻度を従来の妊娠法よりも高い値にしている。これらの影響は、妊娠を SCNT 以外の生殖補助技術で誘発されて妊娠中の代理母においても、頻度は低いものの認められており、またしばしば重度は低い。クローンの死亡率と罹患率は有性生殖による動物に比べて高いが、周産期を乗り切り生存するクローンの多くは、行動検査ならびに臨床検査をはじめとする生理学的な測定法で正常かつ健常と判定される。ウシまたはヒツジのクローンの有性生殖による産子について、有害な転帰を示す証拠は一切ない。しかしながら、クローンもその産子もその全寿命はまだ研究されていない点に留意すべきである。

現在の福祉の評価は主に動物の身体的な健康に関連したデータに基づいており、性質上、定性的なものに留まる。代理母とクローンの両者の福祉は、健康上の有害な転帰が認められたことによる影響を受けることがある。

クローンまたはその産子に由来するウシとブタから得られた牛乳および食肉の安全性を評価するため、組成データと栄養データ、新成分が存在する確率、動物の健康状態、毒性とアレルギー性に関する入手データ、および微生物学的な側面について考察した。健常なクローンとクローンの産子から得た食肉（ウシおよびブタ）と牛乳（ウシ）の成分に関しては、関連の試験が複数実施されている。食肉および乳の成分と栄養価については、健常なクローンやクローンの産子と従来の妊娠法での個体やその産子の間で、正常な変動性を越える差異はみられなかった。ただし、獣医学検査や品質管理において健康を害したクロー

ンが検出されたことを受けて食物連鎖への侵入が防止される場合は、ウシとブタとその産子のクローンから得られた食品が従来の繁殖法により誕生した家畜の食品と同程度に安全であることが現在有用なデータにより示されている。

現在の認識に基づくと、クローンやその産子が従来の方法で繁殖した動物に比して、何らかの環境リスクを新たにまたは別に有するという予測はまったくない。ほかの生殖補助技術と同様に、クローニングを広範囲に、あるいは不適切に用いると、所定の集団内で特異的な遺伝子型が占める割合を増大させることにより、意図せずに遺伝的多様性に影響を及ぼすことになる。

キーワード： 動物のクローニング、動物の健康、動物福祉、ART、生殖補助技術、ウシの、ウシ、クローン、環境への影響、後成的なリプログラミング、食品、食品の安全性、遺伝的多様性、家畜、子、ブタ、産子、リスク評価、SCNT、体細胞核移植、ブタの。

目次

科学委員会委員.....	1
概要.....	1
目次.....	4
欧州委員会の定めるところの背景.....	6
コミュニティの利益.....	6
欧州委員会の定めるところの委任事項.....	6
委任事項の解釈.....	6
謝辞.....	7
評価.....	8
1. はじめに（本意見書について）.....	8
1.1. 意見書の中で扱わない事項.....	9
1.2. 意見書で使用される用語.....	9
2. 動物育種技術および生殖技術.....	9
2.1. 体細胞核移植（Somatic Cell Nucleus Transfer：SCNT）概論.....	10
2.2. クローン化された種とクローニング効率.....	12
2.3. クローン数と寿命に関するデータ.....	13
2.4. クローニングの用途の可能性.....	13
3. SCNT の後成的側面と遺伝的側面.....	14
3.1. 後成的側面：クローンのリプログラミング.....	15
3.1.1. 継世代的な後成的遺伝.....	17
3.1.2. 後成的なテロメアの修飾.....	18
3.1.3. 大局的にみる後成的調節不全.....	19
3.2. 遺伝的側面.....	19
3.2.1. ミトコンドリア DNA の修飾.....	20
3.2.2. サイレント変異.....	20
3.3. その他の側面.....	21
3.4. SCNT の後成的側面と遺伝的側面についての結論.....	21
4. 動物の健康および福祉上の SCNT の影響.....	21
4.1. 動物の健康.....	22
4.1.1. 体細胞および卵母細胞の供給源動物の健康.....	22
4.1.1.1 体細胞核の供給源.....	23
4.1.1.2 卵母細胞の供給源.....	23
4.1.2. 代理母の健康.....	24
4.1.3. クローン（F0）の健康.....	25

4.1.3.1. 妊娠および周産期のクローンの健康	25
4.1.3.2 出生以降性成熟期までのクローンの健康	26
4.1.3.3. 性成熟後のクローンの健康	28
4.1.3.4. 成体クローンの死亡率	29
4.1.4. 産子 (F1) の健康	29
4.1.5. 動物の健康についての結論	30
4.2. 動物の福祉的側面	31
4.2.1. 供給源動物の福祉	32
4.2.2. 代理母の福祉	32
4.2.3. クローンの福祉	32
4.2.3.1. 出生時のクローンの福祉	32
4.2.3.2. 出生から離乳期のクローンの福祉	33
4.2.3.3. 離乳期から思春期／解体処理時／寿命末期のクローンの福祉	34
4.2.4. 産子 (F1) の福祉	35
4.2.5. 動物の福祉についての結論	35
5. クローン (F0) およびその産子 (F1) から得る食肉および乳の安全性	35
5.1. 食肉および乳の安全性評価の判定基準	35
5.2. クローン (F0) およびクローンの産子 (F1) から得る食肉および乳の成分	37
5.3. 毒性試験およびアレルゲン性試験	38
5.3.1. 給餌試験	38
5.3.2. 遺伝毒性	39
5.3.3. アレルゲン性	39
5.4. 食品の安全性についての結論	40
6. 環境および遺伝的多様性への影響	40
6.1. 環境および遺伝的多様性への影響についての結論	41
ウシおよびブタに関する総体的結論と勧告	41
結論	41
勧告	42
特定のセクションから追加された勧告	42
本意見書で使用された用語集および略語集	45

欧州委員会の定めるところの背景

専門家によれば、体細胞核移植（SCNT）で行う動物のクローニングは、今まさに商用目的で広範に普及しようとするところであり、2010年までには世界的な食物連鎖の中で広がりを見せるものと予測されている。したがって、食物（例えば食肉や乳）の中でも、特に従来の方法で生まれたクローンの子由来の食物は、今後消費者が購入できるようになるものとされる。

米国では、米国食品医薬品局（Food and Drug Administration : FDA）が2006年12月28日に動物のクローニング産業に向けて、包括的なリスク評価の草案や、リスク管理法の提案ならびに手引きを公表した。FDAのリスク評価の草案では、クローンとその子から製造した食品が従来の妊娠法で生まれた個体から製造した食品と同程度に安全であるとの結論が下された。予想通りにFDAがリスク評価の最終版を発行し、クローンとその産子から得た食物の自主的な保留を撤廃した場合、上述の開発は今後促進されることになる。

SCNTにより、成体動物の遺伝子的複製物（クローン）の産生が可能となる。EUは、胚（クローンの子）の問題と、近い将来は動物の生殖細胞系の製品用に世界市場で提供されるクローンから得た精液（精子）の問題にすでに直面している。

コミュニティの利益

欧州委員会の健康消費者保護総局（DG SANCO）は、新種の食品、畜産物、動物の健康および福祉に関する法令の枠組みの中での当該領域の方針の展開について現在検討中である。

欧州委員会の定めるところの委任事項

欧州委員会はEFSAに対し、SCNTの技術により得られた生存動物のクローンとその子ならびにそれらの動物から得られた製品について、食品の安全性、動物の健康、動物福祉、および環境への影響に関する勧告を求めた。

委任事項の解釈

欧州委員会からの要請への回答としてEFSAは、種が異なるデータの有用性を考慮し、意見書の範囲をウシとブタのクローンとその子の動物の健康ならびに動物福祉、これらの動物由来の製品の食品安全性、環境に対するSCNTの考えられる影響、および遺伝的多様性に限定することを決定した。

謝辞

欧州食品安全機関は作業部会（Working Group）に携わった方々のご芳名をここに記し、謝意を表する次第である。Henrik Callesen、Giuliano D'Agnolo、Andras Dinnyés、Wenche Farstad、Jörg Hartung、Louis Marie Houdebine、Peter Jinman、Pierre Le Neindre、David Morton、Heiner Niemann、Jean-Paul Renard、Larisa Rudenko、Josef Schlatter、Vittorio Silano（WG Chair）、Eckhard Wolf。

評価

1. はじめに（本意見書について）

本意見書は、ピアレビューを受けた既発表の学術論文、データ、および信頼性が高いとみなされたその他の情報に基づくものである。EFSA は、第三者に本課題への科学的貢献を要請したことについて、諮問フォーラム（Advisory Forum）を通して、またウェブサイト上で発表した。EFSA が利用できたすべての文書の一覧は、本意見書の最後にまとめた。

クローニングは動物の数種に適用されてきたが、本意見書に向けた科学的評価が可能なデータが十分に揃ったのは、ウシとブタの例のみであった。必要に応じ、他の種に関するデータも参照した。

初の家畜クローンは1984年に誕生した。このときのクローニング法で使用した核の供給源は胚細胞であった。1995年には胚由来の細胞を *in vitro* で数週間培養した後、クローニングに使用し、「Megan」と「Morag」と名付けた子羊が誕生した。飛躍的な進展を遂げたのは、1996年にクローニング法で成体の体細胞核移植（SCNT）を用いて「Dolly」と名付けた子羊が誕生したときであった（Wilmut ら、1997年）。

大まかにまとめると、人工的な手段により妊娠に至らせるための方法という点では、クローニングは生殖補助技術（ART）の一種とみなすことができる。しかしながら、無性生殖的な性質をもつ点、また既知の表現型を呈する単体の動物から動物を誕生させることを可能にする点から SCNT は独特な手法であるため、本意見書においては、現在使用されている ART という用語の中に SCNT を含めない。現在の意見書では、ART（体外受精、胚移植、胚分裂など）および自然な交配によって産生された動物を背景にしたクローンの観察を適宜考慮に入れている。また、現在の ART が根本的な正式のリスク評価が行われなまま畜産学の現場で広く使用されていることも認知されている。例えば、クローニング関連の現象であると考えられることもある過大子症候群は、ウシおよびヒツジでの体外受精卵の移植による妊娠において初めて記述された（Farin および Farin、1995年、Walker、1996年、Kruip および den Daas、1997年、Sinclair ら、1999年）。

SCNT が有意差をまねくか否かを判断する際には、クローニングに使用した体細胞ならびに卵母細胞の供給源のみならず、適切な比較器についても十分に検討して選択する必要がある。これは、それらの細胞の発現時に一般に従来の集団でみられる特性を反映しない比較器が選択される場合があるためである。例えば、精選された動物がその種や品種の系列の平均値よりもその値の範囲のトップ領域に位置する特性を備えていることがある。よっ

て、その場合は正常範囲の値との直接の比較が困難になるおそれがある。

1.1. 意見書の中で扱わない事項

初期胚細胞（割球）を用いる胚細胞核移植（embryonic cell nucleus transfer : ECNT）のような、SCNT 以外のクローニングの手法が実施されながら、文献に記載もある動物は SCNT に比べ相対的に少ない（Yang ら、2007b 年）。SCNT を用いて繁殖した遺伝子組み替え動物（iDNA 動物）と同じく、ECNT については現在の意見書でも評価が行われておらず、また ART（体外受精、胚移植、胚分裂など）の影響の評価もない。

1.2. 意見書で使用する用語

関連性のあるいくつかの用語を以下の通り定義する。その他用語については、本意見書の最後にまとめた。

ークローニング

本意見書で評価される場合のクローニングとは、体細胞核移植（SCNT）の技法と定義する。クローンという語はギリシャ語で「小枝」を意味する *clonos* と「小枝を切るためのもの」の意の *clonizo* に由来する。クローニングは、動物が無性生殖で繁殖するプロセスを言う。SCNT による動物のクローニングでは、一倍体の未受精卵（卵母細胞）の遺伝物質が胎児または成体組織に由来する二倍体の体細胞の遺伝物質に置換される。対照的に、遺伝子組み替え（本意見書では評価の対象としていない）は、遺伝子 DNA の塩基配列を直接変えることにより、動物の特性を変化させる。

ークローン

クローンとは、SCNT を用いた動物の無性生殖の結果として誕生する動物である。現在の意見書では、クローンを F0 とも呼ぶ。

ークローンの産子（子）

クローンの産子とは、祖先のうち少なくとも 1 個体がクローン（F0）で有性生殖により誕生した子を指す。現在の意見書では、クローンの産子を F1 とも呼ぶ。

2 動物育種技術および生殖技術

生殖補助技術（ART）は、過去数十年間で遺伝学的選択法を大いに向上させた。この技術には、性交後の精液、選択した種雌から採取した卵母細胞、選択した父親から選択した胚

とその移植、体外受精、配偶子と胚の長期保存によるものまで、種雄側の解釈を広げた人工授精が含まれる。

動物種または品種の遺伝的多様性は原則として、種内雑種および種間雑種による産生や、遺伝子組み替え動物の産生による父親の選択を通して管理される。従来の遺伝学的選択法の長所は、減数分裂組換え（有性生殖）のプロセスや個々の配偶子内で組み換えられた染色体の分離を通し、各世代で新しい遺伝子型を生み出すことにある。有性生殖とは対照的に、有性生殖を迂回する SCNT は、特定の望ましい表現型（耐病性、繁殖力の向上、製品または食品の高品質性など）を繁殖させる見込みが有性生殖よりも高い。

2.1. 体細胞核移植（Somatic Cell Nucleus Transfer : SCNT）概論

SCNT の場合、核を除去した卵母細胞内に、分化した体細胞（非生殖系列細胞）の核を細胞融合もしくは直接注入によって移植する。実際には、家畜のクローニングでは通常、体細胞全体（核を含む）を移植する。再構成胚は代理母の体内に移植される前に人工的に発育を開始させられ、成功例の場合は代理母の体内で成長を続け、健常な新生クローン（F0）として分娩される（図 1 参照）。

生物学的には、この手法のほとんどのステップが難問を抱えていることが示されている。例えば、核のドナーとして用いる体細胞を選択して用意する方法、核のレシピエントとして用いる卵母細胞を用意する方法、これらの 2 つの細胞を結合させる方法（すなわち融合プロセス）、融合後に胚の発現を開始させる方法などである

技術は時間と共に改良を重ね、クローンの誕生率を徐々に上げている（体外培養の条件の改善など）。また、胚の取扱いに関する技術革新は核の移植方法のすぐれた調節を可能にしている。

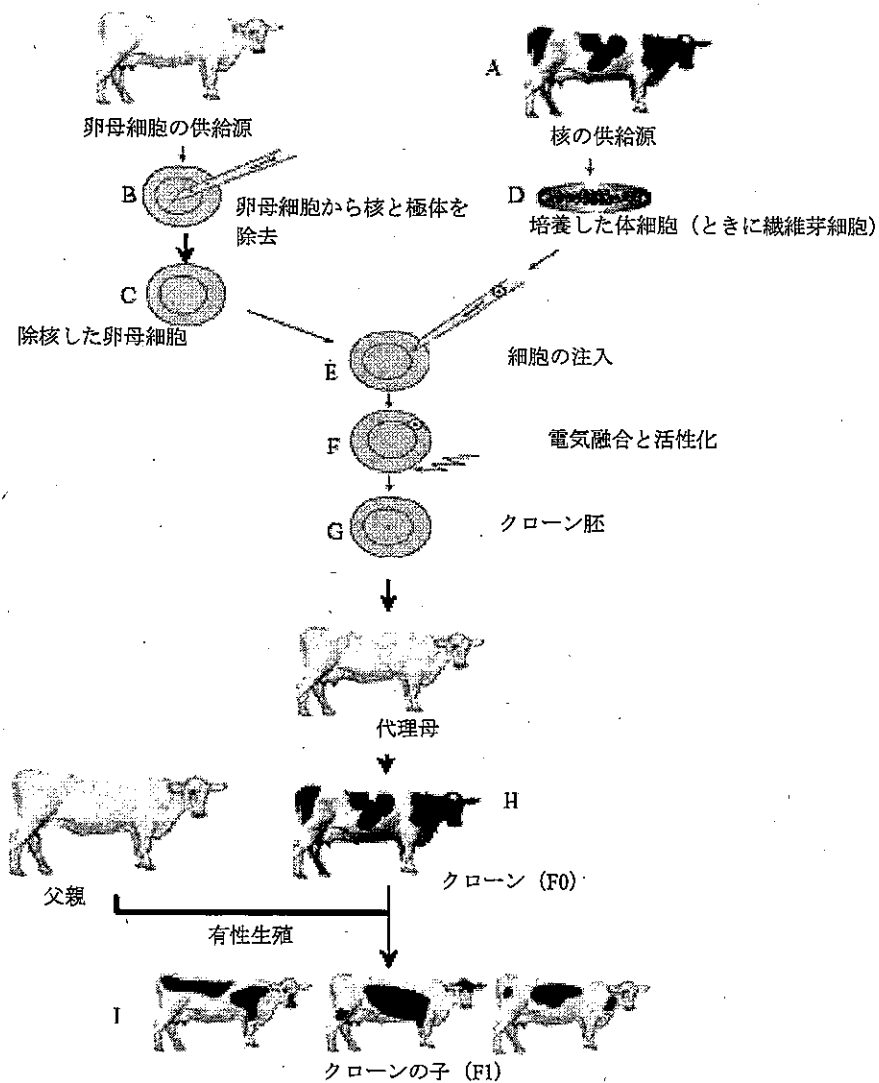


図1 体細胞核移植 (SCNT) の主なステップ。(A) 核細胞の供給源。(B) 卵母細胞から核と極体を吸引して除去する。除核した卵母細胞を与える (C)。(D) 核のドナーから得られた体細胞の培養。(E) 除核した卵母細胞の透明帯と膜の間の体細胞の注入。(F) 除核した卵母細胞と体細胞の中間部の結合後、卵母細胞と細胞膜の電気融合により卵母細胞の細胞質内に体細胞核 (および細胞質) を移入。(G) 卵母細胞の細胞質と染色体の2つの複製を含む体細胞核によりクローン胚が形成される。(H) 核の供給源 (A) のものと同様の外被の色を呈するクローン (F0) を産生する代理母内に胚を移植。(I) 正常なパートナーとクローン (F0) の有性生殖により産生されたクローンの子 (F1)。これらの動物の外被の色はクローンの外被とは異なり、また個体ごとに異なる。

2.2. クローン化された種とクローニング効率

1996年にヒツジの「Dolly」が誕生して以来、SCNTは家畜をはじめ、いくつか他の種にも適用されている。SCNTで最も多く使用される動物と報告されているウシは1998年に（Cibelliら、1998年、Yangら、2005年）、ヤギは1998年に（Keeferら2002年）、ブタは2000年に（Onishiら、2000年）、ウサギは2001年に（Chesneら、2002年）、ウマは2003年に（Galliら、2003年）初めてクローン化された。

家畜種の場合、健常な産子（F1）はクローンの有性生殖後に得られた。さらに研究目的で、クローンはクローンから採取した細胞を用いても産生されている（すなわち反復クローニング）（Choら、2007年）。

クローニング法の全体的な成功率は未だ低いものであり、種間によって大きく異なる。この全体的な成功率は、移植されたクローン胚から生まれた成育可能な子のパーセンテージとして表し、種によって約0.5～5%の範囲に及ぶ。

Walkerらがブタのクローニングの方法について記述したところによると、全体的なクローニング効率は1%未満から5%まで改善され、後に行われた試験では最高17%にも上る効率が報告された（移植した58個の胚からの誕生数は10）（Walkerら、2002年）（Duら、2007年）。

Panaraceらはブラジル、アルゼンチン、USAの3カ国で5年にわたって行われたウシのクローニングの効率を報告している（Panaraceら、2007年）。代理母に移植された3374個のクローン胚からは317頭（9%）の子ウシが誕生し、そのクローンのうち出生後24時間の時点では278頭（8%）が、また出生後150日以上経過した時点では225頭（7%）が生存していた。ウシの場合、育種法や経済面での乳生産の中で生殖管理が重要な問題であることから、主としてこの種の雌（および雄）の生殖生理学の学識は広範にあるため、全体的な成功率がほかの種よりも高い。

しかしながら、体細胞や卵母細胞の選択、細胞周期の段階、培養条件などのクローニングの過程に関するさまざまな因子の役割が完全には理解されていないことが影響し、特定の種に限定した成功率は大幅に変化する可能性がある。理由は不明であるが、ドナーの培養細胞株の約3分の1の成功率を、妊娠を開始させて得た生存している子ウシのパーセンテージで表すと40%と高く、一方でドナーの培養細胞株の4分の1は完全に失敗する（Panaraceら、2007年）。生存している子ウシの出生率におけるこれらの差異は、異常な染色体構造の証拠がみられないドナーの培養細胞株が同様の実験プログラムの範囲内で同

時に運用される場合でも生じる。予想外にも、その後の発現の成功率にかかわらず、異なる培養細胞株が核移植の後に *in vitro* での胚盤胞について同様の高い数値を示した。この効率の可変性は、分娩に至るまで発育しない培養細胞株の染色体異常に起因し得るものではなかった (Renard ら、2007 年)。

2.3. クローン数と寿命に関するデータ

世界的なクローンの登録簿はないため、生存中のクローンの数の推定は困難であるが、EFSA はこのような情報の収集を試みている。EU 内には、約 100 頭のウシのクローンとこれより少ない数のブタのクローンが存在する。USA 内のクローンの推定数は、ウシ約 570 頭とブタ 10 頭である。アルゼンチン、オーストラリア、中国、日本、ニュージーランドなど、ほかの地域で産生されたクローンもあり、EFSA では 2007 年に世界で生存するクローンの総数をウシは 4000 未満、ブタは 1500 未満と推定している。相対的に少ない数は、技術的に困難である点や規制されている状態などを反映しており、世界のいずれかの地域でクローニングが市販の食品用として承認されれば、効率の向上につれてこの数も増加するとの予測が可能である。クローンから得た精液は、USA の市場ですでに入手できる。しかしながら、F0 クローンの数が少数のままである場合でも、将来的に F1 とその次の世代の動物の数には F0 クローンから産生され食物連鎖に入る可能性が潜在的にある。

同様に、組み替えられて長期間生存したことが報告されているクローンの数は限られている。現在のところ、6〜7 歳の動物に言及したウシのクローンに関する報告数はごくわずかであり (Chavatte Palmer ら、2004 年、Heyman ら、2004 年、Panarace ら、2007 年)、家畜クローンのすべての自然寿命に関しては、未だ利用できるデータがない。

2.4. クローニングの用途の可能性

遺伝学的選択法は動物の産生を改善させる方法である。これは、生産性の高さや耐病性などの望ましい特性をもつ個体の識別を後に控えた、動物の生殖の制御に基づくものである。遺伝学的選択法は、従来の育種法で有性生殖を行う間に生じる自然な遺伝的変異と遺伝子の再分布に依存する手法である。

クローニングは、選択した特性をこれまでよりも急速に産生群に伝播できる方法を提供するものである。例えば、ある疾患に対する遺伝的抵抗性をもつ動物が同定された場合、その動物はクローニングによって、産生（または次の育種）群内に耐病性の特性を有性生殖により移入するために利用できる数頭の父親に発達する可能性がある。

SCNT には、種雄や種雌が価値の高い子をすでにもうけ、配偶子を効率的に産生する能力を越える年齢になっている場合や、生存または受胎能が故意か偶然にあるいは偶発事故により短くなっている場合に、その繁殖寿命を延長できる可能性もある。雄と雌の父親間の配偶子の有用性に関して現存する差異を低減させるためにクローニングが役立つこともある。生来、雄はそれらの精液を通して数千の子をもうけることができるのに対し、雌は最高でも数百の卵母細胞しか提供できない。したがってクローニングにより、育種法の範囲内で特定の雌の遺伝子型をより集中的に利用できるようになる。

科学委員会は、現在のクローン (F0) の主な用途は、育種の際に利用するために精選された動物を産生することであり、食物としての動物を産生することではない点に特に言及している。

3. SCNT の後成的側面と遺伝的側面

SCNT は、クローニングで使用される分化した体細胞の核の活動が未分化胚細胞の状態にリセットされ、新しい胚が胎児としての發育を遂げることができて初めて成功したことになる。体細胞核は、正常な發育のすべてのステップを再現できるようにするため、微環境の変化に対して遺伝子発現のパターンを変える必要がある。このプロセスは本質的に後成的で、主な DNA 塩基配列を変えないままとし、同時に可逆性である。後成的修飾には、DNA (すなわちクロマチン) を囲むタンパク質の生化学的に伝達された構造変化や、DNA の生化学的修飾、特にメチル化などが含まれる。クロマチンのタンパク質の修飾は、可逆的で動的なプロセスである。対照的に、DNA メチル化は安定性がかなり高い。体細胞のリプログラミングは、大部分が DNA 脱メチル化であり、その後特定の細胞型においてはサイレントなままでなければならない DNA 領域の特異的な再メチル化がある。後成的な機序はいくつかの遺伝子の発現に影響を及ぼし、このような修飾は娘細胞に伝達される可能性がある (Jablonka および Lamb, 2002 年)。

SCNT の成功率の低さと、しばしば胚および胎児の發育期間中のほか、出生後間もない時期にもクローンにおいて認められる根底にある生理的な異常は主に、ゲノムを不適切にリプログラミングする間に生じる後成的調節不全に起因すること考えられる。

SCNT が遺伝的变化を誘導する可能性に関するいくつかの考慮点を 3.2 に記すが、後成的側面についてはセクション 3.1 で論じる。

3.1. 後成的側面：クローンのリプログラミング

SCNT を行った後の核の活動のリプログラミングは、体細胞核が全能性の胚の状態に脱分化した後、胚細胞がその後に発育する間に異なる細胞型に再分化するという主に2つのステップを踏む時間依存的なプロセスである。(Yang ら、2007a 年)。総ゲノムのうち比較的小くわずかの割合が体細胞内で同時に活動的になる。これらの遺伝子の多くはハウスキーピング遺伝子として知られる遺伝子であり、すべての細胞型で発現される。その他は各細胞型に特定の機能を付与する遺伝子に相当する。したがって体細胞の場合、転写に利用できる遺伝子の大部分が実はサイレントである。これらの遺伝子の再活性化は通常、再活性化を可能にする因子を含む卵母細胞の細胞質により、配偶子形成の期間中に部分的に生じる。発育上のステップに必要な遺伝子が適切に活性化されない場合、胚または胎児の発育は中断され、通常は致死的な結果に至る。この現象は、発育の初期および出生直後の時点で、クローン胚がかなり欠損している点と一致する。

体細胞核の脱分化には、DNA の変化と、レシピエント側の卵母細胞の細胞質で認められる成分に基本的に依存しているクロマチンの変化が必要となる。この変化は、受精後に生じるこれらを部分的に模倣する可能性がある (Jaenisch および Wilmut、2001 年)。結果的に、クローン胚は接合生殖の段階で全体的な DNA メチル化の異常なパターンをしばしば示す (Dean ら、2001 年、Kang ら、2001a 年、Kang ら、2001b 年)。後成的変化における変動性の高さは、遺伝子のメチル化のレベルと mRNA の発現パターンに関し、個々のクローン胚においても認められる (Dean ら、2001 年、Beaujean ら、2004 年、Wrenzycki ら、2005 年)。胚盤胞の段階で異常に発現された遺伝子の中には、出生直後に死亡したクローンの器官内で異常に発現しているものがあることが明らかになることもある (Li ら、2005 年)。ウシのクローンの胎児の場合、移植前の胚の発育期間の初期に証明されるメチル化のエラーが続くことがある (Hiendleder ら、2004 年)。卵母細胞の細胞質内に移入する前の体細胞核のメチル化の状態と関連するこれらの異常なメチル化のパターンの範囲は、主に定められていないままである。しかしながら、遺伝子発現に関しては、SCNT を行った後、胚盤胞の段階までに有意で比較的正常な核のリプログラミングが生じる可能性のあることがウシによるいくつかの試験で明らかにされている (Yang ら、2007a 年)。マウスの場合、転写活性とメチル化のプロフィールの両者から、*in vitro* においてクローン化された胚盤胞の内細胞塊由来の多能性細胞は、体内受精した胚から得た細胞との識別が不可能であることが明らかにされている (Brambrink ら、2006 年、Kishigami ら、2006 年)。これは、内細胞塊を形成する胚細胞の後成的状態が SCNT を行った後の胚盤胞期に比較的十分に再生されていることを示唆している。一方で、胎盤の前駆体である栄養外胚葉細胞の DNA は、過度にメチル化している (Yang ら、2007a 年)。このことは、試験を行った遺伝子 10,000 個中の約 400 個の遺伝子がマウスのクローンの胎盤の異常な発現を示す理由や、この器官がクロ

ーンの中でしばしば変化する理由の説明となり得る。

SCNT による胚の初期に認められるすべての後成的変化が結果的に異常を呈するわけではない。例えば、雌の胎児の2つのX染色体のうち1つの不活性化に関する複数の試験では、マウスの胚盤胞期のクローンの不活性化のパターンが明らかに正常であることが示されているが (Eggan ら、2000 年)、胎盤の X 連鎖遺伝子の発現が特に妊娠中期から後期に調節解除され得ることが明らかにされている (Senda ら、2004 年)。ウシの場合、X 染色体関連の遺伝子の発現は、*in vivo* で生じた胚と比較するとクローンの胚の初期の移植前の段階では遅れることが明らかにされている (Wrenzycki ら、2002 年)。X 染色体の不活性化の過程に関与する遺伝子の低メチル化は、死産の子ウシのさまざまな器官で認められる。しかしながら、クローン内で性別の発現を妨げるものは一切報告されていないため、死亡したクローンにみられる X 染色体の低メチル化の、健全なクローンに対して暗示する事柄は不明である。さらに一般的に考えると、遺伝子の2つの複製が同時にクローン内で後成的にサイレント化する機会はほとんどないとみなす必要がある。後成的機序による特異的遺伝子のサイレンシングや経路の不活性化は、クローンの正常な生命と矛盾しない。

胎盤の胎児の部分に関与していく胚体外の系統が、最初の発育の軸となる定義に至るパターン付けをするイベントが確立される胚の系統と異なる場合、クローン胚の異なる体細胞の系統への再分化は、胚盤胞期を経て開始される。ヒツジとウシを含む異なる国内種において、胎児の死亡の主な原因と考えられる組織学的異常および分子的異常のいくつかは、SCNT による胚の胎盤でも確認されている (Hill ら、2000 年、Heyman ら、2002 年、Wilmut ら、2002 年、Lee ら、2004 年)。

刷り込み遺伝子として知られる遺伝子のクラスは、代理母にクローン胚を移植した後に認められる胎児の高い死亡率において、明らかに重大な役を負っている。刷り込み遺伝子は、parent-of-origin の依存的な方法による遺伝子の2つの対立遺伝子の1つから発現される。それらの多くは特に胎盤で刷り込まれる (Coan ら、2005 年)。マウスのクローンの場合、いくつかの刷り込み遺伝子の発現が異常に低いことが胎盤でしばしば発見されたが、胎児の組織では認められなかった (Inoue ら、2002 年)。

流産した胎児のウシのクローンのさまざまな組織内の刷り込み遺伝子のメチル化状態を分析した報告が多数ある (Liu ら、2007 年、Long および Cai、2007 年、Lucifero ら、2007 年)。その結果は、SCNT を行った後に異常なメチル化のプロフィールと易感染性を示す発育過程の間の直接的な関連性を示唆している。同様の結論は、CpG アイランドを含め反復 DNA の塩基配列のゲノム全体のメチル化の解析結果から導き出すことができる (Kremenskoy ら、2006 年)。

またウシのクローンの場合、刷り込まれた *IGF2R* (Insulin Growth Factor II Receptor : インシュリン様成長因子 II 受容体) 遺伝子の異常な対立遺伝子の発現パターンが子ウシではなく胎盤で認められた (Yang ら、2005 年)。SCNT により誘導され胎児の発育期に特定の組織で観察される異常なメチル化のパターンが成体の健常なクローンに残る程度については、未だ判定されていない。DNA メチル化のパターンにおけるこれらの変化は体外受精および胚培養 (クローニングを伴わない) のほか、プロトコルに特異な方法および組織に特異な方法でも認められており、結果として内分泌変化と相関する胎児の過成長をもたらす (Hiendleder ら、2006 年)。

DNA メチル化などのいくつかの後成的変化は、外観上は正常にみえる異なるマウスのクローンの成功例において認められた (Ohgane ら、2001 年)。さらに広範な試験では、各マウスのクローンに異なる DNA メチル化のパターンがみられると結論付けられた (Shiota および Yanagimachi、2002 年)。これらの変動の程度も個々のクローン間で異なる。マウスでは、クローンの各組織内の 1,000 個の遺伝子座につき平均 2~5 個の異常にメチル化した遺伝子座が認められている。ゲノム DNA のメチル化状態が関与している限り、動物は明らかに最初の動物の完璧な複製ではないことをこのマウスのデータが示している。しかしながら、新生マウスと中年期または老年期の成体マウスのクローンから得た腎臓細胞の解析が近年示すように、これらの異常は動物の老化の進行とともに消失する可能性がある (Senda ら、2007 年)。

クローンのメチル化した状態の全体的な解析が国内種で不足しているにもかかわらず、ブタのクローンによる 1 件の試験には、ゲノムの 2 つの異なる領域でのメチル化の評価が含まれた (Archer ら、2003a 年)。対照群のブタとの比較では、ゲノムの転写領域および非転写領域の両者にメチル化の状態の差異があることをクローンが示した。また、クローニング法がブタにおける DNA メチル化のパターンを変える可能性があることを示した。しかしながら、この試験のすべてのクローンが試験実施時 (生後 27 週目) に健常で、明らかな発育異常が何ら認められなかったため、DNA メチル化のこれらの差異の生物学的関連は不明である。

3.1.1. 継世代的な後成的遺伝

限定的なデータは、クローン内での核の活動をリプログラミングする間に生じる後成的調節不全が有性生殖によって誕生した子に伝達され得るか否かによって、利用可能となる。マウスを使用したいくつかの報告が示すところによると、クローニング後に結果的に肥満の表現型となるような後成的異常は、クローン×クローンの交雑による子が肥満の表現型

を呈することがないように、クローンの生殖細胞において修正されている (Tamashiro ら、2000 年)。エピ対立遺伝子をもつ多くの遺伝子がゲノム内に存在する可能性があるものの、その検出にはクローンとその産子の両者の表現型に対する影響を可視化する必要がある (Peaston および Whitelaw、2006 年)。最近のデータでは、父親側で出生時および出生後に認められた異常を、同じ大型クローンで産生した雌 19 頭と雄 11 頭の子がすべて失していることを示した (Ortegon ら、2007 年)。

さまざまな条件に応答する継世代的な後成的遺伝は、多くの真核生物で実証されており、哺乳類において重要な役割を果たしている可能性がある。ことに雌が母体と胎児へのストレスをまねく条件化で妊娠を継続している場合は、特に環境影響が特異的遺伝子のサイレンシングまたは活性化をもたらす多くの後成的修飾を誘発する可能性がある。このような妊娠による子において認められる後成的修飾は、後の産子に伝達される可能性がある。これらの現象は適応の機序とみなされるが、3 世代後では可逆性であることが明らかになっている (Gluckman ら、2007a 年、Gluckman ら、2007b 年)。in vitro での実験の条件下では、後成的遺伝が時としてマウス胚にみられることも示されている (Roemer ら、1997 年)。異なるマウスのモデルは現在、刷り込まれていない特異的な対立遺伝子に存在する DNA メチル化などの後成的なマークが父系や母系の生殖細胞系列を通してどのようにエピ対立遺伝子として伝達されているかを調査する際に利用できる (Wolff ら、1998 年、Cooney ら、2002 年)。現在では、RNA が遺伝的表現型の決定要素となり得ることを示唆する証拠がある。アグーチのマウスの表現型の場合、尾部先端のホワイトの特性が伝達されるのは、メンデル式ではなく、精子内にセットされた RNA により、また機序を阻害する RNA により Kit 遺伝子の発現を下方制御する方法による (Rassoulzadegan ら、2006 年)。今回の科学的な意見書の対象である家畜種については、同様の試験や転帰は確認されていない。クローンとその産子に対するこれらの観察事項の関連性は、完全には明らかにされていない。クローンの後成的修飾がその後の世代では消失することも予測されており、現に自然に誘導されている例がある。

3.1.2. 後成的なテロメアの修飾

SCNT による胚を發育させるドナーの体細胞核の能力と関連のあった後成的機序のひとつには、クローンのテロメアの長さがある。テロメアとは短いもので、染色体の末端部に位置する高頻度反復配列 DNA であり、分解されたときには末端部の不適切な融合を防止して回復させる。テロメアは、DNA 複製と関連する問題があることから、細胞分裂の各期間で短くなる。そのため、テロメアには加齢の過程を制御する機能がある。酵素のひとつであるテロメラゼは、生殖細胞や胚細胞などのさまざまな再生組織内に存在し、伸展する能力や複数回の細胞分裂を経たテロメアの長さの定数を保持する能力がある。哺乳類初

クローン（「ドリー（Dolly）」）のテロメアは、年齢マッチさせた自然交配による対応動物に比べて短いことが明らかになっている（Shiels ら、1999 年）。これを理由に、クローンが早老化を示す点について最初に検討が行われた。しかしながらその後、大多数の試験において、ウシ、ブタ、ヤギのクローンのテロメア長が同等であるか、または年齢マッチさせた自然交配による対照群よりも長い例が、老化したドナーの細胞をクローニングに用いた場合でも報告されている（Lanza ら、2000 年、Jiang ら、2004 年、Betts ら、2005 年、Jeon ら、2005 年、Schaeetzlein および Rudolph、2005 年）。現在のデータは、主に使用されている細胞の繊維芽細胞のドナー細胞由来のクローンではテロメア長の回復は通常のことであることを示している。同様の大型クローンから得られた 30 頭の子のテロメア長は、年齢マッチさせた対照群と異ならなかった（Ortegon ら、2007 年）。

3.1.3. 大局的にみる後成的調節不全

後成的調節不全はクローニングに独特の現象ではなく、複製物のほかのすべての形状で認められるものであるが、特に *in vitro* の要素を相当量もつ ART の場合にみられる現象である。これは、SCNT を経て得られた体外受精卵と胚を *in vivo* で産生された胚と比較したところ、ウシにおいて観察され（Camargo ら、2005 年）、同様にほかの種でも認められた（Gardner および Lane、2005 年、Wrenzycki ら、2005 年）。これらの異常が SCNT 自体のもつストレスによるものであるのか、代理母に移入する前の初期胚がさらされる *in vitro* の環境の結果によるものであるのかは不明である。また、いかなる胎児の後成的状態も、いかなる有機体のあらゆる生命段階そのままの後成的状態でも、部分的には環境に対する反応である点を記憶に留めておくべきである。

3.2. 遺伝的側面

十分に維持されてきた機序は、変更されたゲノムに複雑な発現過程の影響が及ぶのを防止し、減数分裂的に派生した胚ゲノムと同様に SCNT により同程度の効率をもつものとみなすことができる。SCNT を行った後の染色体障害は、移植前の段階では日常的に高頻度で認められるが、主に形態学的に異常な胚にみられる（Booth ら、2003 年）。同様の大型クローンから得た 30 頭の健常な子の染色体には異常は一切みられなかった（Ortegon ら、2007 年）。

マウスの染色体安定性は *in vitro* でクローン化または受精した胚に由来する胚細胞間で異なる可能性があるが、これはおそらく遺伝的原因よりもむしろ後成的原因によるものである（Balbach ら、2007 年）。

3.2.1. ミトコンドリア DNA の修飾

クローン間での遺伝的な差異は、ミトコンドリア DNA に由来する可能性がある。ミトコンドリアは主に細胞のエネルギー源として用いられるが、胚の発育に必要とされるステロイド合成やプログラム細胞死においては特に、その他の細胞生理上重要な役割がある。有性生殖の場合、雄のミトコンドリアは異質なものとして認識され、卵母細胞の細胞質において種特異的な方法で除去される。このように、ミトコンドリアは厳しい母性遺伝を示す。SCNT が行われた後、胚は卵母細胞の細胞質（同質性）のみから得られるミトコンドリア DNA か、またはドナー細胞とレシピエント細胞質の両者から得られる（異形成）ミトコンドリア DNA を所有することができる（Steinborn ら、2000 年）。成体体細胞には、典型的に数百から数千ものミトコンドリアが含まれている。この数は生殖細胞系の特異化の時期にはこれより減少するものの、卵母細胞が成長する間は劇的に増加し、受精時のマウスの卵母細胞の 100,000 個ほどに増える（Shoubridge および Wai、2007 年）。これまでに分析された大多数のクローンが異形成である証拠はほとんど示されなかったが、試験の実施数は少数であり、このことはおそらく驚くべきことではない（Hiendleder ら、2005 年）。ミトコンドリアの複写数と機能における変化や、レシピエントの卵母細胞からのミトコンドリアの機能不全の伝達は、発育の起点で成体の代謝病の危険因子となり得ることが推測されている（McConnell、2006 年）。

3.2.2. サイレント変異

後の世代に（有性生殖を通して）伝達され得るクローンの核 DNA のサイレント変異を SCNT が誘発する範囲は、未だにほとんど確定されていない。

有性生殖による動物の誕生において、頻度は低いがこのような変異は自然発生的に生じており、おそらく同様のことが核移植後にも実際に生じているであろう。これらの突然変異は、個々の子の対立形質の組合せによっては次世代で異常表現型をもたらす得るが、スクリーニングが可能であり、また従来の交配プログラムで排除することができる。

通常の育種法での例は、自然発生的に DNA で生じる突然変異は発現を妨げ得るものの結果として子の表現型に貢献する修飾となる刷り込み遺伝子の後成的状態を妨げるものではないことを示している。これが雄親から突然変異を受けるヘテロ接合の個体のみに影響を及ぼす遺伝性の筋肥大である「キャリピージ表現型」を呈するヒツジの症例である（Charlier ら、2001 年）。関連した状況がブタにおいても認められている（Van Laere ら、2003 年）。現在では、DNA だけではなく RNA も遺伝性の表現型の決定要素となり得ることを示唆する証拠がある（Rassoulzadegan ら、2007 年）。

核のリプログラミングには体細胞核のクロマチンの著しい再構築が必要とされるため、SCNT は、家畜での今日の遺伝学的選択法として用いられる育種法の転帰により大きな影響を及ぼし得るドナーのゲノムにおいて、サイレント変異の発生を増大させることになる。

3.3. その他の側面

クローニングのプロセスには、卵母細胞の細胞質のいくつかの修飾が含まれる。卵母細胞の細胞質の一部は核を吸引する間に除去され、残存する細胞質は解体されることになる。これは、胚の発現に必要な完全に機能性を備えた細胞質の不足をもたらすおそれがある。卵母細胞の細胞質の回復を目的とするプロトコルの中には、外来性の卵母細胞の細胞質の追加やいくつかの除核した卵母細胞の融合などがある。細胞質の修飾は、除核した卵母細胞とドナー細胞の融合の結果として生じることもある。これは、機能性を備えたミトコンドリアを含め、ドナー細胞の細胞質を卵母細胞内に導入するものである。これらの細胞質にみられる障害は、細胞質とクローン胚の発育に影響を及ぼし得る細胞小器官の機能不全をまねくおそれがある。

3.4. SCNT の後成的側面と遺伝的側面についての結論

- ・ 成的調節不全は、クローンに影響を及ぼし、発育異常をまねくおそれがある有害作用が存在する可能性の主要な原因となる。
- ・ 臨床的に健常なクローンは、後成的なリプログラミングが十分に機能的であることを示す。
- ・ クローンの DNA 塩基配列はドナー動物の複製であるが、その他の差異が存在する可能性がある（例、ゲノム DNA のメチル化状態）。
- ・ 現在のところ、限られた入手データによると、SCNT によって誘発される後成的調節不全がウシおよびブタの産子（F1）に伝達されるとする証拠はない。

4. 動物の健康および福祉上の SCNT の影響

動物の健康には、身体的健康、感染性および非感染性疾患の排除および本質的な生命維持能が挙げられる。動物の福祉とは、疼痛、疲労および苦痛を取り除くことである。健康と福祉が不十分であるか、あるいはそれらが改善されているかを確認するには、クローンな

らびにクローンと非クローン動物との比較データを参照した、ある動物の生命における様々な段階に照らして調査する。

クローニング技術に関連したリスクについては、クローニング技術自体に直接関連したリスク、ならびに技術の開発段階および採用したプロセスの制御レベルに関連した危険を明確に区別することが重要である。

クローニングについての文献は高度監視下にある集団および環境で行われた作業の報告に基づいているので、観察および記録された効果は、日常的な生産システムでの管理状況を反映していない可能性がある。クローンは、有用であると考えられる性質を持つ動物に由来しており、その性質はその特別な形態により、その動物らを正常集団の枠外へと区分するような生産形態から成っていることが多い。したがって、ART で生産した動物との比較以外にも、クローンと正常集団のパラメータ間の比較には慎重さが必要である。

4.1. 動物の健康

動物の健康は、クローニング、代理母、クローン自体およびその産子に使用する体細胞および卵母細胞由来の動物に照らして検討される。

4.1.1. 体細胞および卵母細胞の供給源動物の健康

SCNT のプロセスでの核ドナーとして使用する細胞は通常、既存の細胞培養液あるいは目的の表現型を有する生きた動物の耳に付した穿孔などの低侵襲手技のいずれかから得る。卵母細胞ドナーとは、卵母細胞が解体処理後に取得可能である任意の同種動物、もしくは卵母細胞が *in vivo* で選別された卵子によって回収される、非常に有益および／または監視された動物であり得る。これらの技術はそれ自体では、供給源動物に対して重大な健康上のリスクをもたらすものではない。本項の後半では、供給源動物の健康上の役割およびその後のクローンの健康に対する影響を述べている。

供給源動物の疾病状態は、クローンへの感染リスクに影響を及ぼす。細胞内マイコプラズマやゲノムに組み込まれたウイルスヌクレオチド配列などの数種の疾患原因物質は、体細胞核および卵母細胞と直接に関連し得る (Philpott, 1993 年)。

現在、胚移植に携わる機関から発行された自主ガイドラインは、移植に伴う感染リスクの低減を目的としている。OIE (国際獣疫事務局、www.oie.int) は、IETS (International Embryo Transfer Society: 国際胚移植学会、www.iets.org) から密接な協力を得て胚移植に関するガ

イドラインを編集した。胚移植手技に供する動物 (*in vivo* 由来の配偶子および胚) のために、供給源動物および代理母を生物学的に安全に管理するための詳細なプロトコルが作成されたが、*in vivo* で産生された胚に適用されたプロトコルが全て *in vitro* 由来の胚、クローン胚および遺伝子導入した胚に応用できるわけではない (Stringfellow ら、2004 年)。

4.1.1.1 体細胞核の供給源

体細胞核の供給源の多くは、クローニング手技が繁殖用に設計されている目的の形態を有する動物であり、それ自体は生存期間中、健康の観察および調査に供されるものである。供給源動物の疾病状態 (感受性または耐性) の選択は、クローンがそのような疾病形態に影響を受ける可能性があることから重要である。病原体はある組織に対してそれぞれ異なる親和性を有すると考えられることから、疾病伝播は核が採取される組織型によって異なる可能性がある (Sharp、1971 年; Lilja ら、1997 年; Dinglasan および Jacobs-Lorena、2005 年; Erne ら、2007 年)。

SCNT により、体細胞中の細胞質内病原を受容卵母細胞へ移送することが可能となる。しかしながら、病原体が *in vitro* 受精および卵母細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) 中、病原体が精子あるいは器具に付着した場合の危険も存在する。このリスクは供給源動物の衛生管理により低減される (国際獣疫事務局および OIE、2007 年)。

4.1.1.2 卵母細胞の供給源

生きた動物あるいは食肉材料から卵母細胞を回収する手技ならびに *in vitro* での操作に関連した健康上のリスクは、移植用の胚を *in vitro* で採取する場合に発生するリスクと同等に重大である。解体処理された動物由来の卵母細胞を採取すると (外科的介入とは対照的に)、クローンによって保持され、子宮内または生後の生存能力に影響を及ぼす細菌およびウイルスによる汚染のリスクが増大することになる。これらのリスクはすでに慎重に確認しており (Bielanski、1997 年)、その予防のための手技は認可されたガイドラインとして IETS により提案され、OIE が採用している。*in vitro* 受精の手技とは異なる SCNT 技術での工程が存在する一方で、卵母細胞摘出、体細胞核を有する卵母細胞の融合、あるいは摘出した卵母細胞の細胞質への体細胞核の直接注入に関連する特異的な健康のリスクは報告されていない。

卵母細胞供給源動物の耐病性がどの程度クローンに影響を及ぼすかは定かではない。なぜならそれは体細胞核と同じ方法ではクローンの遺伝的性質に寄与しないからである。しかしながら摘出した卵母細胞の供給源動物は、卵母細胞質から生じるミトコンドリア関連遺

伝形質を経て寄与を行う場合がある。

4.1.2. 代理母の健康

代理母として供されたウシ（移植後、妊娠 50 日目）における初期妊娠率は、クローン保有ウシ（65%）と胚移植（58%）および人工受精（67%）などの他の人工法を使用したウシ間では大差がないことが分かった（Heyman ら、2002 年；Lee ら、2004 年）。しかし、クローン保有代理母の妊娠期間全体にわたって、他の ART では見られなかった妊娠損失が継続し、生存していた胚は *in vitro* での胚生産法にしたがった胚の 3 分の 1 にすぎない（Lee ら、2004 年；Wells、2005 年）。

妊娠第 2 期および第 3 期における代理母の妊娠損失は、胎盤異常、胎児水腫、血管の拡張を伴う臍帯の腫脹および胎盤葉の異常な腫脹および減少に関連している（Wells ら、1999 年；Hill ら、2000 年；Chavatte-Palmer ら、2002 年；Batchelder ら、2005 年）。

代理母の高流産率は、異常な、および／または発育の悪い胎盤形成の所見に関連付けられてきた。このような胎盤異常は初期胚損失、流産、死産、難産、出生前および出生後死に伴っている（Wakayama および Yanagimachi、1999 年；Hill ら、2001 年；Tanaka ら、2001 年；De Sousa ら、2002 年；Hashizume ら、2002 年；Humpherys ら、2002 年；Suemizu ら、2003 年）。胎盤を組織学的に詳細に研究し、7 頭のクローンウシにおいて妊娠が異常を伴っていたことが分かった（Lee ら、2004 年；Batchelder ら、2005 年；Constant ら、2006 年）。胎盤数の減少や母体・胎児交換の結果に現れる胎盤発育の異常が、反すう動物 SCNT の妊娠における主要な限定因子の 1 つとして見られる（Arnold ら、2006 年）。この胎盤発育の異常は着床後の初期段階から現れるが、生体クローンの発育および出生を必ずしも妨げるものではない（Hill ら、2000 年；Hoffert ら、2005 年；Chavatte-Palmer ら、2006 年）。胎盤異常を初期段階で検出すれば、代理母の健康を脅かすことなく妊娠を停止させることができる（Hill および Chavatte-Palmer、2002 年）。

興味深いことに、数種の反すう動物では、副腎皮質刺激ホルモン（adrenocorticotrophic hormone: ACTH）および胎児コルチゾールの放出により胎児は出生時間を決定するのに役立ち（Liggins ら、1967 年）、胎児下垂体が破壊されると妊娠は延長される。したがってクローンは下垂体機能不全を何度か経て難産の発症率に影響を及ぼす可能性がある。

帝王切開術が選択されることが多いことから因果関係を判定することがやや困難であるにもかかわらず、帝王切開術での出生率はウシまたはブタのクローン胎児を有する代理母で高いものとなっている。ウシにおける研究では、初期に帝王切開術を選択された割合は

2000 年で 100%であったが、2005 年には 54%に低下した (Panarace ら、2007 年)。

その後の代理母の受精率でクローニングに関する文献に記録されているものはない。正常な繁殖後、子ウシを分娩することを促進するために帝王切開を選択せざるを得ないウシの受精率は変わらないが、反面、重篤な難産 (Tenhagen ら、2007 年)、主に子宮内膜症を引き起こす感染 (Gschwind ら、2003 年) のために帝王切開が必要である場合の受精率は有意に減少する。

4.1.3. クローン (F0) の健康

クローンの健康について 4 つの異なる状態を判定することができる: (i) 重大な異常を示し、妊娠を停止する必要があるクローン; (ii) 障害を示し、出生後期間に死亡したクローン; (iii) 可逆的な障害を示したが出生後に生存しているクローン; および (iv) 欠陥が検出されなかったクローン。

周産期はクローンウシの健康と発育にとって最も重大な時期である (Chavatte-Palmer ら、2004 年; Wells ら、2004 年; Panarace ら、2007 年)。このことは、観察された病状のほとんどが胎盤機能不全を伴うか、それに続発するという事実から明白である (Constant ら、2006 年)。

ウシ内在性レトロウイルス (bovine endogenous retrovirus: BERV) が再活性化する可能性を分析し、有性生殖したウシおよびクローンウシ間で比較した (Heyman ら、2007a 年)。BERV 配列は転写されず、RNA は、クローン、ドナー動物または対照の血液からは検出されなかった。

SCNT の免疫機能に与える影響ならびにクローンの感染性物質に対する感受性を評価するにはより多くのデータが必要である。さらに、SCNT に特に関連していなくとも、代理母の感染状態に応じて、数種の特異性ウイルス (例えばペスチウイルス、ヘルペスウイルス) により母体からクローンへ経胎盤的に感染が起こることは留意する必要がある。このことは SCNT に特に関連しておらず、胚が代理母に導入される他の ART でも起こり得る。

4.1.3.1. 妊娠および周産期のクローンの健康

過大子症候群 (large offspring syndrome: LOS) は妊娠後期での変化と共にウシおよびヒツジ由来のクローンで見られ、周産期死亡の増加、過剰な胎児サイズ、胎盤発育異常 (胎児水腫発症率の増加など)、内臓の腫脹、疾病感受性の増強、突然死、吸乳の減少ならびに呼吸

および起立の困難を引き起こす (Kato ら、1998 年 ; Galli ら、1999 年 ; Wells ら、1999 年 ; Young および Fairburn、2000 年)。Heyman らによる研究では、出生時 LOS の発症率は、体細胞クローニングでは 13.3% であり、比較として胚クローニングでは 8.6%、IVF 子ウシの群では 9.5% であった (Heyman ら、2002 年)。体細胞クローニングでは、LOS 発症率は使用した体細胞の組織起源と関連付けることが可能であり、クローン子ウシが皮膚、耳または肝細胞由来であれば LOS 率は 47% まで上昇する (Kato ら、2000 年)。

SCNT によるクローン以外のものも使用した研究では、尿膜水症の全発生率は妊娠例全体の 6% ではあったが、妊娠が 60 日以上持続したクローン胎児の妊娠例中では 17% であった (Pace ら、2002 年)。クローン胚を移植された 2170 頭のウシから、106 頭が生きて出生し、このうち 82 頭は 2 日以上生存した。

in vitro 法および SCNT の両方から得られた胎児、胎盤および子ウシの形態、生理機能、発生能は、*in vivo* で生産した胚のものとは優位な差がある可能性がある (Farin ら、2006 年)。*in vitro* での条件が後の胚発育にどのように影響するかを明らかにするために提案されたメカニズムは、その DNA に関連した後成的パターンの修飾に注目しており、DNA 一次配列を改変せずに遺伝子発現に影響を及ぼし得る。

胎盤異常により出生前および出生後に子ヒツジが死亡したと考えられるヒツジには、類似した所見が見とめられる (Loi ら、2006 年)。初め移植胚盤胞は *in vitro* 由来受精 (*in vitro* derived fertilized: IVF) 胚のものと同等であったが、その後、発育満期に達した 93 頭のクローンのうち 12 頭のみに死亡が顕著に見られ、比較として IVF 対照胚から得た 123 頭の子ヒツジでは、このうち 51 頭にそれが見られた。

クローンウシおよびヒツジに見られる LOS と対照的に、SCNT で生産された数頭のブタでは子宮内発育遅延の発症率が増加している。SCNT での 23 の同腹仔群 (143 個体) を、人工授精 (artificial insemination: AI) での 112 の同腹仔群 (1300 個体) と比較して、同腹仔群当たりの子宮内発育遅延数が有意に増加 (SCNT の 1.8 ± 0.3 対 AI の 0.7 ± 0.1) していることが分かった (Estrada ら、2007 年)。

4.1.3.2 出生以降性成熟期までのクローンの健康

帝王切開により分娩したクローン子ウシの研究で、生後 48 時間目に赤血球および白血球数が、対照子ウシと比較して減少し、血漿中電解質はより変動しやすいことが報告され、クローン子ウシを正常子ウシのレベルにまで到達させるには対照子ウシよりも時間を要するということが示唆された (Batchelder ら、2007a 年)。またクローン子ウシの総ビリルビン

レベルおよびフィブリノーゲンレベルは正常子ウシと比較して高いことも報告された (Batchelder ら、2007b 年)。しかしながら、ビリルビンおよびフィブリノーゲンレベルの上昇は正常範囲内にあるので必ずしも異常とは言えない。

ウシについてのある研究では、クローンウシの平均 30%は月齢 6 ヶ月前に死亡することが報告され、その病理学的原因は広範にわたり、呼吸不全、腎臓発育異常および肝臓脂肪症 (脂肪肝) などが挙げられた (Chavatte-Palmer ら、2004 年)。心臓および肝臓の重量は体重と相対的に見て増加していた。しかし、1、2 ヶ月後、生存したクローン子ウシは、人工授精のものと区別がつかなくなっていた。出生から 2、3 ヶ月過ぎれば、ほとんどのクローン子ウシは正常に発育し、成体期に達する (Chavatte-Palmer ら、2004 年; Wells ら、2004 年; Heyman ら、2007a 年)。

受容ウシに移植された 988 個のウシのクローン胚から、133 頭が出生し、このうち 89 頭 (67%) が月齢 3 ヶ月の離乳期まで生存した (Wells ら、2003 年; Wells ら、2004 年)。同様の所見が Panarace らにより報告され、3 カ国でウシを 5 年にわたり商業的にクローニングしたことが要約されている (Panarace ら、2007 年)。クローンウシの平均 42%が分娩から生後 150 日の間で死亡し、最もよく見られた異常は臍帯の腫脹 (37%)、呼吸困難 (19%)、長期の横臥による減退または衰弱 (20%) および屈筋腱の収縮 (21%) であった。

EFSA に提供され、US の FDA によるリスク性評価の草案に使用された Viagen のデータセットは、クローンブタおよびその産子に関するデータを備えている (FDA、2006 年)。比較対照が経膈的に分娩された一方で、クローンブタは、帝王切開で分娩された。出生体重は同等だと考えられた。ある研究環境における対照試験から、同腹仔体長に応じて調製された同腹仔体重および平均出生体重は、AI による同腹仔の方が SCNT によるものと比較して有意に高い ($p < 0.05$)。また、SCNT 集団の方が死産傾向および出産後死亡率が高い傾向にあった (Estrada ら、2007 年)。

周産期後、ウシおよびブタの多数のパラメータには、クローンと対照間で有意な差異は見られなかった。多数の生化学的血液および尿パラメータ、免疫状態、ボディコンディションスコア、成長測定および生殖パラメータに関して、約 6 月齢のクローンウシと同齢の対照とでは有意な差異は見られなかった。同様に、クローンと同齢の対照とでは多数の生理学的パラメータ (血液プロファイル) に差異はなかった (Laible ら、2007 年; Panarace ら、2007 年; Walker ら、2007 年; Yamaguchi ら、2007 年; Heyman ら、2007a 年; Watanabe および Nagai、2008 年)。14 および 27 週齢のクローンブタの研究では、発育、健康、臨床化学および免疫機能に関してその比較対照と変わりはないことが分かった (Archer ら、2003a 年; Mir ら、2005 年)。

近年、胎盤過成長が、新生児期に胎児に供給されるフルクトースの増加を誘発し、心筋を含む筋機能に影響する低血糖および高フルクトース血症が引き起こされる (Batchelder ら、2007b 年)。これらのデータから、何故クローン子ウシの生命を調整するのに子宮外ではより困難になるのかを解明する第一の見識が得られる。

4.1.3.3. 性成熟後のクローンの健康

未経産雌牛のクローンと同条件下で飼育された対照を対応させた研究において、クローンは対照と比較して思春期に達するのに時間がかかった。しかし、妊娠期間および出生後の子ウシの生存率では有意な差異はなかった (Heyman ら、2007b 年)。健康パラメータである、後続の 305 日泌乳曲線でも、収率、脂肪および平均細胞数は同等であった。乳汁中の平均タンパク質含有量は有意に高かったが、このことは 3 頭のクローン未経産雌牛が、乳産生は乏しいがタンパク質含有量が高い同じ母親由来である事実、ならびにサンプルが少ない (クローン 12 頭および対照 12 頭) ことから説明がつく。健康への影響はなく、後続の生殖データからは有意な差異は見られなかった。

同様の研究から、健康への影響についての表面的な兆候は見られないにもかかわらず、クローンと対照ウシ間の他の有意な差異が観察された。8～12 月齢で、血液学的および生化学的パラメータ、筋肉代謝、脂肪酸組成物、および半腱様筋の筋生検における高い酸化活性にも差異が見られた (Tian ら、2005 年 ; Yonai ら、2005 年)。

15 月齢の Friesian 未経産雌牛のクローンにおいて、その成長率はニュージーランド産の非クローンのものと同等であった (Wells ら、2004 年)。同研究者により、52 頭のクローンウシに肥満の兆候はないことが報告された。クローンウシの生殖能には正常有性生殖によって生産された集団と有意な差異はなく、その後の胎児成熟および発育は正常であった (Enright ら、2002 年 ; Forsberg ら、2002 年 ; Wells ら、2004 年 ; Shiga ら、2005 年 ; Yonai ら、2005 年 ; Tecirlioglu および Trounson、2007 年)。

加齢の不妊症雄ウシ由来のクローンの研究では、該クローンの出生体重は人工授精で生産した子ウシよりも重いにもかかわらず、その精液の性質および受精率は正常であることが結論付けられた (Shiga ら、2005 年)。

クローン雌ブタで得られた妊娠率は対照のものと同様であった (Martin ら、2004 年 ; Williams ら、2006 年)。同腹仔の体長、生きて出生した割合、出生体重、先天性欠損レベルおよび 3 週目離乳期体重に関して、親がクローンであるブタと非クローン親のブタとで

はほとんど変わりはない（Martin ら、2004 年；Shibata ら、2006 年；Walker ら、2007 年）。

Viagen のデータセットから、1 頭のクローンを除いて対照群の範囲内レベルではあるが、出生後および解体処理前にクローンブタの IGF-I は対照群よりも低いことが分かる。同様にエストラジオール-17B レベルも、クローンは比較対照群よりも低かった。成長率または生殖機能の改変に対する内分泌の変動の影響は不明であり、これはクローンが正常期間内に商業的体重に達してしまい、上述のように生殖が良好に行われたためである（Walker ら、2007 年）。

4.1.3.4. 成体クローンの死亡率

SCNT は発生技術であるので、飼育され、自然な生産寿命まで生存していることが報告されている動物の数には限りがある。したがってレポート中に使用されている用語「年長」は離乳または出生から数年しか経ていない動物を意味することがある（Chavatte-Palmer ら、2004 年；Heyman ら、2004 年；Heyman ら、2007a 年）。生殖目的で飼育された動物が自然寿命まで生存したとは考えにくいので、寿命が低下しているのか、あるいは加齢に関連する他の影響なのかを判断することは現在、評価の上で難しい。

Wells らの報告によると、離乳から 4 歳までのクローンウシの年間死亡率は最低 8%（1～2 歳では 59 頭中 7 頭が死亡；2～3 歳では 36 頭中 3 頭が死亡；および 3～4 歳では 12 頭中 1 頭が死亡）で、その主な死亡要因は筋骨格異常の理由による安楽死である（Wells ら、2004 年）。4 つの異なる遺伝子型を持つ 21 頭のクローン未経産雌牛の研究においては、1 頭以外の全てが、研究期間の 4 月齢～3 歳まで生存した（Heyman ら、2007a 年）。例外の 1 頭は、2003 年の猛暑の夏に分娩直後死亡した。

マウスの寿命および加齢に関する比較研究から、クローンマウスは有性繁殖されたマウスよりも平均して 10% 寿命が短いことが示された（AFSSA、2005 年）。しかしながら、2 つの独立した系統で 4 および 6 世代にわたってマウスのクローニングを反復したところ、総行動パラメータで判断したような早期老化の兆候はなかった（Wakayama ら、2000 年）。

4.1.4. 産子（F1）の健康

ニュージーランドでは、経膈的に分娩されたクローンウシの 52 頭の産子のうち、85% が 24 時間後まで生存しており、その生存ウシは対照ウシの子（84%）とほとんど変わることはなかった（Wells ら、2004 年）。クローンの産子における疾病に関しても、有病率が通常

繁殖動物よりも高いということはないと報告されている。同様の結果がクローンの分娩に関する累積データから表れており、21頭の産子が自然分娩で生まれており、ほとんどの子ウシ（21頭中20頭）が分娩後生存していたことが示された（Heyman ら、2007a 年）。また、このような所見は、日本で生産されたクローンの総計 32 頭の産子について集められたデータに関する最近の調査からも確認されている（Watanabe および Nagai, 2008 年）。最後に、単一雄ウシクローンの血統の 19 頭の雌および 11 頭の雄について生理機能および遺伝的状況に関する報告があり、クローンの産子は初期生存期間において心拍数（ $P=0.009$ ）、呼吸数（ $P=0.007$ ）および体温（ $P=0.03$ ）が低めであるが、1 歳の正常動物と比較しても、染色体安定性、発育、肉体的、血液学的および生殖的パラメータは標準的であることが示された。さらに、通常の操作に対するストレス反応も適度であった（Ortegon ら、2007 年）。

4.1.5. 動物の健康についての結論

クローニング用動物を選択する場合、（細胞および DNA を採取する組織に特異的に関連している）体細胞および卵母細胞供給源動物ならびに代理母の感染状態を考慮しなければならない。

入手可能データから、主としてウシに関して、以下の結論が得られる。

代理母に関して、結論は以下のとおりである：

- ・ 流産はクローン胚の移植直後に多く見られる。このことは、他の ART から得た情報に基づいて、将来的に代理母の受精率に影響を及ぼす可能性がある。
- ・ 胎児水腫および難産の発症率ならびに結果的に選択する帝王切開は増加している。これらの作用は将来的に代理母の受精率に影響を及ぼす可能性がある。
- ・ 上述した健康への悪影響は全て SCNT を用いない ART により妊娠した代理母に見られるが、ごく低頻度である。

クローン (F0) に関して、結論は以下のとおりである：

- ・ クローンの死亡率および罹病率は有性繁殖した動物よりも高い。
 - 他の種よりもむしろ主にウシにおいて、妊娠中に胚損失および胎児死亡が多く見られる。
 - 妊娠中クローンウシで、主に LOS などの生理学的に有害な結果が他の ART よりも高頻度で見られる。
 - 成体ウシのクローンでは早期死亡率および罹病率が増加していることを示す研究もある。

- ・ 周産期に生存したクローンは生理学的測定、行動および他の臨床試験による判定の結果、その大多数が正常かつ健常であることが分かる。
 - － 周産期に生存したクローンは概して健常であるが、一部は体温調節異常および免疫系不全（ウシにおいて観察）など、一過性であり、死亡率／罹病率を押し上げる何らかの生理学的な悪影響を示す。
 - － 管理上、高度に注意を払えば若年期クローンの生存率および健康は改善され得る。
 - － クローンの生殖能には、長期的な影響は見られない。
 - － 依然として、その種の自然寿命を全うできるクローンはほとんどいない；したがって、寿命に対する SCNT の推定される影響について結論を出すことは困難である。さらに、生産動物の寿命は完全な自然寿命よりも短い。
- ・ 従来どおりに生産された動物でも見られるように、クローン動物の死亡原因および病態は発育不全もしくは感染症などの他の要因に起因すると考えられる。発育不全以外の欠陥がクローニングの作用にどの程度起因しているかは現在のところ不明である。

産子 (F1) に関して、結論は以下のとおりである：

- ・ 入手可能データからは、試験されたその種の異常な影響は全く明らかにならない。

4.2. 動物の福祉的側面

対象の動物に直接関連する福祉の指標を評価するには質的データ、好ましくは定量的データが必要とされる。動物クローニングは比較的新しい技術であるので、これらのデータは依然として不十分であり、したがってごく限られた入手可能データから直接結論を出すことは非常に困難である。現在の福祉評価は、動物の肉体的健康に関連する前項に記載されたデータを解釈することに基づいているところが大きく、定量的かつ、より一般的な性質しか持たない評価である。

クローニングの実情に即して、供給源（核ドナー）動物、妊娠動物（代理母）、クローン (F0) およびクローンの産子 (F1) は全て熟慮しなければならない。

4.2.1. 供給源動物の福祉

クローニング手技自体は体細胞核または卵母細胞供給源動物の福祉に通常影響を及ぼさない。

4.2.2. 代理母の福祉

妊娠中および分娩間近の代理母において過大子が発生するだけでなく、SCNT は胎盤および胎膜へ影響を及ぼすため、母体への福祉が脅かされる傾向にある。これらの作用は主にウシおよびヒツジのクローンでの妊娠で顕著であり；類似した作用はクローンブタの妊娠でも報告されている。

福祉の観点から、難産は過大子に起因する出産中の救いがたい「極度の」疼痛というリスクを伴う。帝王切開を選択せざるを得ない場合、その手技に起因する疼痛のリスクを負い、術後鎮痛が適切に行われないことにもつながる。もし帝王切開が計画どおりにいかなければ、難産および帝王切開の両疼痛という負荷が追加されることとなる。新生児にとっては帝王切開がストレス軽減になる場合がある。

クローン胚または体細胞クローンウシを有する代理母に見られる後期妊娠損失の発生は高レベルの特異性母体血清タンパク質 (PSP60) に関連しているとする報告がある (Heyman ら、2002 年)。PSP60 レベルの上昇は、代理母においてわずか妊娠 50 日目という初期に検出され、後に胎児死亡をまねき、また、胎児死亡の指標にすることができた。したがって、特に超音波検査法と併用し PSP60 を測定することによって、妊娠 50 日目あるいは同等の 34 日目までに胎盤発育を評価し、ウシ代理母に対して格別なケアを行うことが可能となった (Heyman ら、2002 年；Chavatte-Palmer ら、2006 年)。

4.2.3. クローンの福祉

SCNT が福祉を脅かしていることを、クローンの様々なライフステージに照らして立証する。データはクローンと、クローンではないが自然交配、人工授精あるいは配偶子および胚を使用する他の *in vitro* 技術で繁殖された動物とを比較することで編集されている。

4.2.3.1. 出生時のクローンの福祉

福祉の観点から、生理学的に呼吸困難の兆候を示すことはあるが、呼吸が始まるまで子ウシまたは子ヒツジが疼痛や苦痛を感じずにすむ可能性がある (Mellor ら、2005 年；Mellor

および Diesch、2006 年)。酸素を含んだ血液量が増加し、脳の認識能が高まった後に、子ウシが様々な周産期蘇生や延命技術、例えば平手打ち、口の洗浄、皮膚の強い摩擦、初乳の強制栄養などの強制給餌による苦痛を受けることがある。

報告では、死亡率および罹病率のリスクは周産期子ヒツジおよびウシのクローンにおいて上昇が見られるが、ブタおよびヤギの周産期クローンでは見られないことが示唆されている。LOS のクローンには出生時に補助的なケアを追加しなければならないことがある。クローン新生児に対して、特別な出産後蘇生の指標を帝王切開に併用すればこの問題は縮小すると考えられる。クローン子ウシは通常の子ウシと比較して様々な生理学的指標の正常レベルに達するのに時間がかかる (Chavatte-Palmer および Guillomot、2007 年 ; Batchelder ら、2007b 年)。対照は同じ方法では生まれないので Batchelder らの結果では解釈が難しいが、内分泌に関する研究から、クローン子ウシでは出生時コルチゾール濃度が低いことが分かった (Chavatte-Palmer ら、2002 年 ; Matsuzaki および Shiga、2002 年 ; Batchelder ら、2007b 年)。

胎児が妊娠の初期段階に疼痛を感じることができなくとも、初期に有害な刺激を受けると発育変動が永続するということは次々に立証されている。したがって、中枢神経系の発達に不可逆的变化を引き起こすには意識を考慮する必要はないと考えられる。妊娠後期における疼痛刺激も後の発達に不可逆的な影響をもたらすことが分かっている (Smythe ら、1994 年 ; Grunau ら、1994a 年 ; Grunau ら、1994b 年 ; Lloyd-Thomas および Fitzgerald、1996 年 ; Braastad ら、1998 年)。クローニングでは胎盤機能不全の発症率は上昇し、したがって胎児のストレスは、酸素交換あるいは血液胎盤関門の改変に起因していた。

クローン胎児を有する雌に、後期妊娠中の苦痛または疲労ならびに過大胎児に起因する分娩などのストレスを誘発させることもまた胎児に影響を及ぼすと考えられる。クローン胎児を有する雌における妊娠初期の苦痛の存在は不明である。内在性ステロイドホルモンにはわずかな変動があり、それが脳の発達に対するプログラミング効果を発揮することが分かっている (Ward および Weisz、1980 年 ; Sikich および Todd、1988 年 ; Grimshaw ら、1995 年 ; Martinez-Cerdeno ら、2006 年 ; Roselli ら、2007 年)。

4.2.3.2. 出生から離乳期のクローンの福祉

出生直後はすべての新生児にとって、心臓血管、呼吸器および他の器官系が子宮外で生きることに対応する重要な時期である。自然分娩の新生児動物は、出生におけるストレスを最小限にする多くの代償機構および制御機構を持つ。したがって、新生児動物は確実にいわゆる呼吸不全などの異常機能の重篤な兆候を呈するといっても、必ずしも成体が経験す

るように悪影響を経験し感じるという意味ではない。実際には、軽度の出産後ストレス因子は、ストレスへの対処、恐怖心および学習能力に関して有益な結果をもたらすことがある (Casolini ら、1997 年)。

LOS の子ウシおよび子ヒツジでは、これらのストレス因子は有害であり疼痛を引き起こす傾向にあるが、明らかに正常なクローンあるいは出生後効果的に蘇生されたクローンでは、分娩中または分娩後に感じる疼痛およびストレスが、自然にもしくは帝王切開で分娩された有性生殖でのその種よりも強いということはないと考えられる。

4.2.3.3. 離乳期から思春期／解体処理時／寿命末期のクローンの福祉

周産期後、ウシおよびブタの多くのパラメータにおいて、クローンと対照間で有意な差異は見られなかった。クローンにおける福祉効果に関するデータも報告されておらず、通常の動物と比較した生殖的成熟度を検討している。しかしながら、これらの指標は応用可能な研究が少ないことを考慮に入れて示される必要があり、現在のところ、クローン動物の寿命に応用可能な研究はない。

供給源動物における遺伝学的に根拠のない異常行動特性が、クローン (F0) で発生することは考えられない。1 頭の 13 歳の Holstein ウシ由来の F0 クローン 4 頭と同齢の対照未経産雌牛 4 頭を比較し、加齢の成体由来の若年クローンが同齢の対照と類似した行動をとるか、また、同一の遺伝子構造を有するクローンには行動性傾向があるかを判定した (Savage ら、2003 年)。行動指標および行動負荷試験を行ったが、他のウシよりも行動が少ない傾向にあるクローンは例外として、有意な差異は見られなかった。クローンウシが「対照よりも好奇心レベルが高く、身づくろい行動が多く、積極的に優位にある」傾向が見られた。

5 頭のクローン (3 頭の異なる起源) および 5 頭の子クローン Holstein 未経産雌牛を観察したところ、社会的関係 (敵対行動および非敵対行動) は 2 群で差は示されなかった (Coulon ら、2007 年)。不慣れた環境に置かれた場合、クローン未経産雌牛は対照よりも顕著な探検行動を示したが、著者らはこの差異は恐らく動物を初期に管理したことに関連していると結論付けた。

Archer および共働者 (Archer ら、2003b 年; Archer ら、2003c 年) は、それぞれ 5 頭および 4 頭のブタから成る 2 組の遺伝学的に同一の Duroc のクローン同腹仔群、ならびに各 4 頭から成る 2 組の Duroc の非クローン同腹仔群について、日周活動、慣れない事象に対する反応および食べ物の嗜好を観察し、クローンは似通ってはいるが、非クローンである対照と比較すると変動性があることが分かった。しかしながら、Shutler らにしたがうと、研

究計画は、研究での統計ノイズが多量であるだけでなく、推測統計学的に修正が不可能なものとなる (Shutler ら、2005 年)。

入手可能な文献が少ないことから、また、使用のサンプルが非常に少ないことを考慮すると、クローンとその同齢の対照間に推定される行動の違いを結論付けることは困難である。さらに、社会的行動および反応性は動物の初期環境 (Veissier ら、1994 年) および遺伝的背景 (Le Neindre、1989 年) に依存していることから、観察される違いはどんなものでも慎重に熟慮されなければならない。特に、クローン子ウシには集中的なケアを行い、数少ない観察された違いを明らかにした。もう 1 つの説明としては、数少ない観察された違いはクローンウシが妊娠中にストレスを感じたことに起因している可能性がある。母体と胎児間の出産前ストレスの 1 つの原因は母体のグルココルチコイドであり、この作用は少なくとも妊娠の終盤において、母体から胎児へとグルココルチコイドが経胎盤交差して媒介される。通常の動物ではこのようなストレスは雄ヤギ (Roussel ら、2005 年) および子ウシ (Lay ら、1997 年) の出産後行動を変えるものであるという記述がある。

4.2.4. 産子 (F1) の福祉

家畜種では、クローンの産子の福祉に関する研究は報告されていない。

4.2.5. 動物の福祉についての結論

- ・ クローニング手技自体は体細胞核または卵母細胞供給源動物の福祉に影響を及ぼさない。
- ・ クローンへの福祉を縮小すれば健康上の有害な結果をまねくと考えられる。
- ・ SCNT における妊娠損失、難産および過大子の発生は、クローン子ウシを有する代理母の福祉に影響を及ぼす傾向にある。この健康上の有害な結果に関し、SCNT は *in vitro* または *in vivo* での生殖よりも高い発生頻度を示す。
- ・ クローニングプロセスの効率が低いため、少数のクローンを生産するのに多数の代理母が供されている。
- ・ クローンの福祉について長期にわたる研究を行うことができない。

5. クローン (F0) およびその産子 (F1) から得る食肉および乳の安全性

5.1. 食肉および乳の安全性評価の判定基準

食物の分子的、生物学および化学的特性の個別的検討や、従来の毒性試験 (WHO、1990

年)の必要性和対象範囲の決定に関し、推奨されている安全性評価の戦略に沿って、科学委員会では、クローンとその子由来のウシおよびブタから得た牛乳と食肉の安全性の評価について、有性生殖による動物から得た乳と食肉と比較しながら下記の6つの面を検討した。

従来の繁殖法による動物との比較:動物のクローン(F0)とその産子(F1)由来の製品の組成上のデータを、長期にわたり安全に利用されてきた経緯のある、有性生殖による動物から得た対応製品のデータと比較する。比較には、獣医学の医薬品の残留物を含有する不純物の栄養学的組成と比較分析の細目が含まれていることが望ましい。

新成分が存在する確率:食品製造用に一般に使用されている動物は、器官を発達させたり、野生動物の数種の例のように被食者を殺す目的かそのまま捕食を回避する目的に特化して毒物を産生する代謝経路を発達させたりしたことがない。したがって、家畜化された動物の場合、内因的な毒を産する「サイレント」経路をコードする遺伝子が存在する可能性や、その遺伝子の発現が後成的調節不全の場合さえも可能であるという可能性は非常に低い。これは多くの食用植物科とは対照的であり、ジャガイモのグリコアルカロイド、セロリのフロクマリン、またはナスのニコチンなどの、有機体の固有の毒性成分をコードする遺伝子を含む。また、クローンに導入された新たなDNA塩基配列はないため、毒物やアレルゲンなどの新しい物質の発生は見込まれていない。

健全な動物:EU圏内で、食肉生産用に使用する種に属している動物が既存の調節法の要件を満たしているか否かを調べるため、育種法の中で採用される方法に関係なく、死前および死後に個別検査が行われている点は考慮に値する。さらに特別に規定された欧州の条項により、食肉と乳は、ヒトの摂取用に利用可となる前に安全性と品質の規制の対象となる。したがって、獣医学検査では従来の育種法による動物との見分けがつかない健全な動物のクローンとその産子から得た食品のみが食物連鎖に入ることになる。このことは、ゲノムのリプログラミングに成功していないクローンや、疾患を呈するクローンなどの動物はすべて解体処理前に廃棄処分となり、そのためヒトの食物供給からは除外されることを意味している。

毒性検査:従来の毒性試験は低分子量の化学物質に向けてデザインされており、無添加食品を検査するには大きな限界がある。食料品はかさばるうえ、飽食に至る現在、実験動物の食物の中に含まれる分は、予測されるヒトの摂取量の少ない倍数に過ぎない。また、有害作用の誘発を防止するため、無添加食品に関する動物試験を実施する際に考慮する主要素は、使用される食事の栄養価とバランスである。これは直接的には材料自体との関連はない(新規食品および加工に関する諮問委員会[Advisory Committee on Novel Foods and

Processes : ACNFP], 1998 年)。大量の乳と食肉の検査は、通常の食事からの脱却に関して実験用の齧歯類における特定の問題となる可能性がある。これは主に植物ベースの場合である。

残留物濃度：食肉および乳の化学汚染のレベルは、給餌、環境条件、ならびに獣医薬品の投薬の影響を受ける。動物のクローン (F0) は概して集中治療を必要とすることが多いため、特に成長と発育という生命の初期にあたる段階では、獣医薬品の投薬レベルは天然の繁殖法による比較器役の動物の値より高くなる可能性があるが、獣医薬品の残留物濃度の比較レベルに関し、利用できる信頼性の高いデータはない。しかしながら、食肉と乳の獣医薬品の残留物については既存の EU 規則に従う必要がある。

微生物学的な側面：クローンを含む臨床的に疾患を呈する動物とその製品は食物連鎖から除外されるにもかかわらず、関心事項として人畜共通性の物質やその他食品伝染性の物質を運搬する可能性のある臨床的に健常な動物のクローン由来の食肉および乳などの製品にまで、検討範囲を広げるか否かを考慮することも未だに重要とされている。臨床徴候がみられないままクローンの免疫能力が弱まっていた場合、VTEC や *Coxiella burnettii* などの何らかの人畜共通の物質は、食用動物でのビルレンスや病原性はヒトの場合よりも少なく、臨床的に健常なウシまたはブタのクローン由来の食肉または乳でない限り、有意な水準で存在する可能性があった。例えば、抗菌治療薬の幅広い（さもないと望ましくない）使用は採用されることになっていた。現在、入手できる限られたデータでは、健常なクローンは従来の育種法によるそれらよりも免疫系の機能が少ないが、さらに詳細なデータは、免疫負荷の前後でクローンとこれに対応する従来の育種法による動物との免疫状態と機能の比較に有用となる。

5.2. クローン (F0) およびクローンの産子 (F1) から得る食肉および乳の成分

ウシの牛乳と食肉の成分は、通常飼育動物由来の食品には広範な個体相互の変動性をもたらす飼料の性質と生存環境によってとりわけ影響を受ける (Palmquist ら、1993 年、Mir ら、2005 年)。重要な栄養分の存在を変える微妙な変化が生じた場合、ヒトの食事のリスクとして最も可能性の高いものは、ビタミンおよびミネラルの値の欠乏または著しい低下となる。これらの 1 日所要量の条件を満たすものは、主に牛乳または食肉である。したがって、牛乳や食肉がヒトの 1 日の総摂取量に大いに貢献する栄養分である点を考慮する必要がある。有性生殖による動物から得た関連のデータベースに基づいた食肉と牛乳の成分データは、クローンとその産子のデータとの比較に利用できる (Jensen ら、1995 年、Caballero、2003 年、Belitz、2004 年)。

クローン (F0) またはその産子 (F1) 由来のウシおよびブタから得た牛乳および食肉の成分について、ヒトの栄養に関するいくつかの関連した試験が実施されている。これらの解析の対象には、カーカスの特性、水、脂肪、タンパク質、および炭水化物の含有量のほか、アミノ酸、脂肪酸、ビタミン、およびミネラルの総量と配分、牛乳の場合は乳汁分泌あたりの量などが含まれていた (Diles、1996 年、Walsh ら、2003 年、Takahashi および Ito、2004 年、Tome ら、2004 年、Norman および Walsh、2004a 年、Norman ら、2004b 年、Tian ら、2005 年、Shibata ら、2006 年、Walker ら、2007 年、Heyman ら、2007a 年、Yang ら、2007b 年)。

大規模なある試験において、3 件の独立したクローニングの実験で得られた 37 頭のウシのクローン (F0) における 150 を超えるパラメータと、38 頭の対照動物について、3 年の期間にわたって検討が行われた。これは 10,000 を超える個々の測定値から成る試験であった (Heyman ら、2007a 年)。この試験では、対照群と比較したクローンの 3 群すべてにおいて、ウシのクローン (F0) の牛乳と筋肉の脂肪酸組成や、牛乳と筋肉内のステアロイル CoA デサチュラーゼのわずかな増加などの若干の変化が認められた。しかしながら、これらの変動はまだ正常範囲内であった。

Viagen 社のデータには 5 頭のブタのクローンと比較器役の 15 頭の動物の食肉の成分データが含まれていた。また、脂肪酸、アミノ酸、コレステロール、ミネラル、およびビタミンの値については、生物学的に関連した差異は認められなかった。ブタのクローンの子の構造についての試験では、1 頭の雄のクローンから得た 242 頭の子 (F1) と同じ品種から得た対照群のブタ 162 頭が比較された (Walker ら、2007 年)。この試験では、24000 を超える個々の測定値から成る 58 項目のパラメータについて検討された。USDA データベースによると、この子の個々の値は 3 項目のみが対照群の正常範囲とは異なっており、3 項目のうち 2 項目はブタで認められた正常範囲内の値であった。

要約すると、このセクションで触れた試験のうち、食肉 (ウシおよびブタ) と牛乳 (ウシ) の成分において、クローンまたはクローンの産子とその比較器役の動物間に正常な変動性の範囲外の差異が認められた試験は一切なかった。また、クローンまたはその産子から得られた製品において、新たな成分は検出されなかった。

5.3. 毒性試験およびアレルギー性試験

5.3.1. 給餌試験

胚および体細胞のクローンに由来した食肉および乳を含有する食餌の効果을判定するため、

亜慢性経口投与（給餌）試験（14 週）をラットにおいて実施した。ラットはウシのクローンから得られた食肉と牛乳の摂取による影響を受けなかった（Yamaguchi ら、2007 年）。同様の結果は、ウシのクローン（F0）からの牛乳および食肉を含有する食餌を用いた 21 日間の給餌試験から得られている（Heyman ら、2007a 年）。ラット（生殖したラットを含む）に対し、ウシのクローン（F1）の産子から得た食肉および牛乳を与える 12 ヶ月間の経口毒性試験が日本で進行中であり、結果は 2008 年前半に出ると予測されている。

5.3.2. 遺伝毒性

マウスの小核試験では、ウシのクローンに由来する食肉に潜在的な遺伝毒性は何ら示されなかった（Takahashi および Ito、2004 年）。

5.3.3. アレルゲン性

ウシのクローンと対照群から得た牛乳と食肉を数週間給餌されたラットは、予想通り弱い免疫反応を呈した。この反応は、クローンまたは対照群のいずれかから得た牛乳もしくは食肉を与えられたラットにおいて、定性的にも定量的にも同様であった。その抗体はいずれの症例も IgE ではなく、IgG、IgA、および IgM であり、ウシから生産された食品の摂取は古典的な免疫応答を誘発したものの、アレルゲン性の影響は何らみられなかったことが示された（Takahashi および Ito、2004 年）。

ウシのクローン（F0）と対照群から得た食肉および牛乳のサンプルをそれぞれ *in vitro* で消化した場合のアレルギー誘発能について、古典的な免疫法のプロトコルを作成後、マウスに腹腔内注射を行って詳細に評価した。クローンと比較器役の対照群のウシから採取したサンプル間に、アレルギー誘発能の統計的有意差は認められなかった（Takahashi および Ito、2004 年）。また Heyman らはラットにおいて、クローンから得た牛乳と食肉のアレルゲン性の差異を、年齢および性別をマッチさせて同条件下で続行した非クローン化動物由来の同様の食品との比較で検出しなかった（Heyman ら、2007a 年）。

これらの結果は、ラットならびにマウスのモデルがヒトのアレルゲン性試験に特異的なものではないことを示すに留まっているが（WHO/FAO、2001 年）、クローニングの場合、主なタンパク質構造の変化や、クローンとその産子の食用製品中に新しいタンパク質が存在することを予測しているわけではない。

5.4. 食品の安全性についての結論

検討事項

- ・ 健常なクローンは、これに対応する従来の繁殖法による健常な動物（第4章参照）からの生理学的パラメータにおいて有意差を示さない。
- ・ 欧州で合法的に市場に出すためには、すべての食用動物が既存の調節法の要件を満たす必要があるため、ルーチンの検査と品質管理の段階で、臨床的な疾患の証拠を示す動物はクローンを含めすべて検出される。このような検査や品質管理により、疾患の症候、病変、異常を呈する動物は、クローンであるか有性生殖による動物であるかに関係なく、食物連鎖から除外されるもの考えられる。
- ・ 食肉（ウシおよびブタ）と牛乳（ウシ）の成分と栄養価において、健常なクローンまたはクローンの産子とこれに対応する従来の繁殖法による健常な動物間に、正常な変動性の範囲外の差異はみられなかった。
- ・ 牛乳と食肉の毒性学的作用は、実施された試験の中では認められなかった。

ウシおよびブタから得たクローン、その産子、およびそれらの動物由来の食物は、食品の安全性に影響を及ぼす可能性のあるパラメータに関し、これに対応する従来の繁殖法によるものとは異なる可能性はほとんどないと結論付けることができる。

6. 環境および遺伝的多様性への影響

クローニングは絶滅危機種または家畜の品種を保護する機会を提供するものであり、不妊や去勢された動物の集団を復元するために利用できる。これには当然、冷凍した細胞中のDNAの保存の意味も含まれる。配偶子または胚、もしくは不妊の動物から得た組織よりも容易に採取できる低温保存した組織標本（例えば皮膚）は、集団を拡大するため引き続き育種プログラムに利用できる繁殖能力のある動物を産生する際に利用できる。

クローンやその産子が従来の方法で繁殖した動物に比して、何らかの環境リスクを新たにまたは別に示すという予測はまったくない。そのようなリスクが存在する可能性があることを示唆する情報も一切ない。クローニングはDNA塩基配列における変化に関与しておらず、このように新しい遺伝子が環境内に投入されることはない。

新たな遺伝子組み替えを導入しないという点で、クローニングが遺伝的多様性に直接的な影響をもつとは考えられないものの、育種プログラムの中で繁殖する限られた数の動物を濫用することによる間接的な影響は生じうる。集団内の遺伝子型の均質性が上昇すると、動物の集団の感染症やその他の危険因子に対する感受性が増大する。これは従来の育種法

の場合にも言えることであり、よってクローニングに起因するものではない。動物の集団の遺伝的多様性の低減はこの100年で生じたものである。これは、家畜の品種数が有意に減少すると、家畜を集中的に産生する動きが急速に広まるためである（食料・農業遺伝資源委員会[Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, 2007]）。

SCNT のためにクローンにおいて獣医薬品の利用が全体的に増加した場合、環境への影響がみられる可能性があるが、SCNT における獣医薬品の利用について ART または従来の繁殖法と比較できる信頼性の高いデータはない。

6.1. 環境および遺伝的多様性への影響についての結論

現在の知識に基づくもの

- ・ クローンやその産子が従来の育種法による動物に比して、何らかの環境リスクを新たにまたは別に示すという予測はまったくない。そのようなリスクが存在する可能性があることを示唆する情報もない。
- ・ このように、SCNT 技術が国内の種の遺伝的多様性に有害な影響を与えるとは考えられない。しかしながら、ほかの ART と同様に、SCNT は広範囲あるいは不適切に利用されると、集団内での遺伝子型の均質性を上昇させることになり、よって病原菌やその他の危険因子に対する動物の集団の感受性が増大する。

ウシおよびブタに関する総体的結論と勧告

結論

体細胞核移植（SCNT）は比較的新しい技術であり、リスク評価のために利用できるデータは限られている。その評価には、多くの試験で調査されたサンプルのサイズが小規模であること、また SCNT のプロセスの基礎を成す生物学的変動性があることから不確実性が生じる。この科学的な意見書の中で評価が行われた試験は、ひとまとまりの疑問点を系統的に取り扱うために実施されたものではないが、一般的な結果に収束している。現在の意見書では、今のところ利用できるデータは、ウシおよびブタのクローンとその産子の評価となっている。

健全なクローンとその子は、SCNT がウシおよびブタの生殖技術として問題なく利用できることを示している。これらの健全なクローンと健全な子は、生理学的パラメータ、行動検査、および臨床検査などの評価が行われているいかなる測定値においても、これに対応

する従来の繁殖法による動物との有意差を何ら示していない。

クローンにおいてかなりの割合を占める健康と福祉に有害な影響が及んでいることが明らかにされた。有害な影響を受けるクローンの割合は、良好な動物管理を行えば、また技術が向上すれば低減できる。健康ではないクローンを交配に使用してはならない。

SCNT の評価と関連した主たる不確実性は、後成的調節不全がクローンの健康と生理学に大きな影響を与える可能性があったために、分化した状態からのゲノムのリプログラミングに成功しているか否かを判定することから来る。

不健康なクローンは、おそらく検査や品質管理の時点で除外されるものとみなされる。したがって食物連鎖に入れるべきではない。また、従来の方法で繁殖した健康ではない動物も除外される。健康なウシとブタのクローンとその子から得た食品（すなわち食肉および牛乳）は、従来の育種法による動物から得られる同様の製品の成分に関しては、正常範囲内である。従来の育種法による動物との比較において、クローンとその産子から得られた食品間に差異が存在する可能性は、食品の安全性の面からも非常に低い。現在、予見される環境への影響はないが、利用できるデータはわずかに限られている。

現在の知識に基づくと、従来の方法で繁殖した動物に比して、クローンやその産子が食品の安全性の何らかのリスクを新たに投入することになるとの予測は一切ない。

勧告

- ・ 科学委員会は、クローンの健康と福祉について、すべての自然寿命の期間においてモニタリングを行うことを推奨している。
- ・ ほかの食物の種が SCNT を経ても産生されていることが認められている。関連データが利用できるようになった場合は、これらの種についてリスク評価を行う必要がある。
- ・ 科学委員会は、本意見書がクローニングのデータや新しい関連データを備えて発展を踏まえて更新されることも推奨している。

特定のセクションから追加された勧告

SCNT の後成的側面と遺伝的側面に関して以下の事項を推奨する。

- ・ クローンに生じる後成的調節不全が産子 (F1) に伝達されていないことを確認

する。

- ・ SCNT が DNA 突然変異を誘発する可能性が及ぶ範囲を調査する。
- ・ SCNT 内でのミトコンドリアの異質性により考えられる帰結を明らかにする。
- ・ 異なる細胞の供給源由来のクローンのテロメア長の再現性とこれらの所見の影響を調査する。

動物の健康に関して以下の事項を推奨する。

- ・ ウシおよびブタのクローンの長命と老化するクローンの健康に対する SCNT の考えられる影響を検討する。
- ・ 妊娠期間および出生後期間にクローンに認められ、時には成体期に認められる未解明の病理学的原因と死亡率を調査する。
- ・ 特定の疾患と病原菌に関してクローンとその子の潜在的な感受性を確認するため、永続的なサーベイランスとクローンの健康状態の登録を行う。
- ・ 従来の畜産条件下での免疫負荷の前後に、さまざまな年齢の時点で免疫状態とクローンの機能を従来の方法で繁殖した動物と比較する。
- ・ クローンへの特異的な物質と感染症の伝播を防止するため、体細胞核と卵母細胞の供給源動物の健康状態と代理母の健康状態を検討する。

動物福祉に関して以下の事項を推奨する。

- ・ 正常な畜産条件下での健常なクローンにおいて、行動試験を含む動物福祉に関する比較試験を行う。
- ・ 妊娠したウシの代理母に対し、胎児の異常な発育の早期の予測因子として妊娠初期（50 日目または 34 日目でも）の母体に特異的な血清タンパク（例、PSP60）を測定し、代理母に対して具体的な治療を施せるようにする。

食品の安全性に関して以下の事項を推奨する。

- ・ ウシとブタのクローンから得た食肉とウシのクローンから得た牛乳の特性に関するデータに加え、異なる生命の段階においてクローン（F0）の健康に関するデータをさらに収集する。
- ・ クローン動物の食肉と乳における汚染化学物質、特に獣医薬品の残留物の濃度をルーチンでモニタリングし、絶対にクローン動物からのこれらの食肉と乳が許容レベルを超えて食物連鎖に入ることがないようにする。

環境と遺伝的多様性への影響に関して以下の事項を推奨する。

- ・ SCNT を含む育種プログラムを始める際には、遺伝的に伝播される症状と疾患の感受性に特に気をつける。
- ・ 遺伝的多様性の低減を回避するような方法で SCNT 技術を使用する。

本意見書で使用された用語集および略語集

キーワードとなる重要な用語については、本意見書全体を通して確実に一貫性をもって使用し共通理解を得るため、いくつかを以下に挙げて定義する。

用語集

用語	本意見書で 사용되는場合の定義
対立遺伝子	特定の染色体座位を占める遺伝子。二倍体生物はそれぞれの染色体において2つの対立遺伝子をもつ。
割球	動物の発生学上、最初の数回の細胞分裂で形成される細胞をいう。胚は通常、2割球、その後4割球、さらに8割球というふうに分割する。
胚盤胞	哺乳類の胚の発育段階の初期。胚盤胞には、後に胎児となる内細胞塊と、後に胎盤の一部になる栄養膜（栄養外胚葉）がある。
帝王切開	外科的処置による出産。
クロマチン	染色体を形成するDNAとさまざまなタンパク質の複合体。
クローン胚	体細胞核移植から得た胚。
CpG	リン酸塩によりシトシンヌクレオチドがグアニンヌクレオチドと分かれるDNAの領域。CpGアイランドは高濃度のCpG部位がある領域である。
細胞質	生細胞の内容物のうち、核を除いたもので、水性の基質タンパク質またはゲルから成り、生体の細胞小器官（例、ミトコンドリア）が位置するところ。
DNAメチル化	メチル基の追加を通したDNAに対する生化学的修飾。
ドナー動物	クローニング法で使用される細胞を提供する動物。
難産	出産や分娩における異常または困難な状態。
胚	多細胞で、卵母細胞の受精後に形成された細胞の二倍体構造をもつ。胎児と呼ばれるようになってからすべての器官が形成されるまでの段階。
胚（再構成）	<i>in vitro</i> での顕微操作によりその構成部分から再構成される胚。
後成的プロセス	DNAまたはDNA結合タンパク質の生化学的修飾（例、メチル化）による遺伝子発現の変化。このプロセスはDNA塩基配列の変更を必要としない。
後成的調節不全	遺伝子発現の制御の異常または正常に機能しない状態。
エピ対立遺伝子	後成的に変更される対立遺伝子。

胎児	胚期後の出生前の発育中の哺乳類。
配偶子	新たな有機体の発現が可能となる接合体（二倍体）を形成する、元になる同類の細胞だが異性の細胞と融合できる成熟した生殖細胞（一倍体）。卵母細胞と精母細胞は配偶子である。
配偶子形成	一倍体の配偶子の形成過程。
遺伝子型	個体の全体的な遺伝子構成。
生殖系列細胞	精母細胞や卵母細胞などの生殖細胞、または生殖細胞に発達する細胞。
異形成	細胞内に複数種の細胞小器官（例、ミトコンドリア DNA）が存在すること。
健常	食品の安全性または動物福祉の観点から、ある特性に関する平均値の畜産学的・生理学的パラメータの範囲内にあること。
未経産雌牛	子ウシをまだ出産したことの無いメスのウシ。
尿膜の水症	胎盤の尿膜腔内に異常に液が蓄積すること。
胎児水腫	2 つ以上のコンパートメント内（例、皮下組織、胸膜、心膜、腹部）での液の蓄積に特徴づけられる胎児の状態。胎児水腫によって自然流産に至ることがある。
刷り込み	特定の遺伝子が parent-of-origin の特定の 방법으로発現される遺伝現象。
LOS	過大子症候群。子の大きさが種属または品種の平均以上の 20% を超えること（ $> \text{平均} + 2\text{SD}$ ）。
卵母細胞	未受精卵、雌性配偶子。
卵母細胞ドナー	クローニング法で使用される卵母細胞を提供する動物。
分娩	子を出産する行為または過程。
周産期	家畜の出生前後の約 7 日間の種依存的な期間。
表現型	遺伝子型と環境との相互作用により確定される有機体の全体的な観察可能な構造特性。
胎盤数	胎児側胎盤分葉と、胎盤葉胎盤を形成する反すう動物の母親の子宮小丘の間の界面数。
多能性	3 つの胚葉のいずれかに分化するという幹細胞の可能性。多能性細胞は胎児または成体の何らかの細胞型をもたらしうるが、全能細胞ほど強力ではない。
出生後期	出生後の時期。
クローンの子	祖先のうち一個体以上がクローン動物の、有性生殖によって生まれた動物の F1 とその次の世代。

有性生殖	精子と卵母細胞間の融合を含む雌雄間の正常な生殖方法。
体細胞	生殖系列細胞以外の動物の何らかの細胞。
代理母	クローン胚を保有する動物。
テロメア	染色体の末端部分の反復性の高い DNA の領域。
全能性	どのような分化細胞にでも分化するという単細胞の可能性。「多能性」の項も参照。
導入遺伝子	細胞、胚または有機体などに挿入される異質な遺伝物質（遺伝子組み替えも含む）。
栄養外胚葉	胎盤およびその他の非胎児の組織を形成する胚盤胞内の細胞群。
透明帯	卵母細胞の原形質膜周囲の糖タンパク質の膜。
接合体	2 つの一倍体細胞（通常は精子と卵母細胞）が受精した後に生じる細胞。

略語

用語	本意見書で使用される場合の定義
AI	人工授精
ART	生殖補助技術
IVF	体外受精
LOS	過大子症候群
mtDNA	ミトコンドリア DNA
SCNT	体細胞核移植

DRAFT Scientific Opinion on Food Safety, Animal Health and Welfare and Environmental Impact of Animals¹ derived from Cloning by Somatic Cell Nucleus Transfer (SCNT) and their Offspring and Products Obtained from those Animals

DRAFT Scientific Opinion of the Scientific Committee

(Question No EFSA-Q-2007-092)

Endorsed for public consultation on 19 December 2007

SCIENTIFIC COMMITTEE MEMBERS

Sue Barlow, Andrew Chesson, John D. Collins, Erik Dybing, Albert Flynn, Claudia Fruijtier-Pölloth, Anthony Hardy, Ada Knaap, Harry Kuiper, Pierre Le Neindre, Jan Schans, Josef Schlatter, Vittorio Silano, Staffan Skerfving and Philippe Vannier.

SUMMARY

In 2007 the European Food Safety Authority (EFSA) was asked by the European Commission to provide a scientific opinion on the food safety, animal health, animal welfare and environmental implications of animal clones, obtained through somatic cell nucleus transfer (SCNT) technique, of their progeny and of the products obtained from those animals. In view of the multidisciplinary nature of this subject this task was assigned to the EFSA Scientific Committee. The ethical aspects of cloning are outside the remit of EFSA and the European Commission has asked the European Group on Ethics in Science and New Technologies to provide an opinion on the ethical aspects of cloning.

In SCNT the nucleus of a differentiated somatic cell (a non germ-line cell) is transferred by cell fusion or direct injection into an oocyte that has had its nucleus removed. The reconstructed embryo is artificially activated to start its development and is implanted into a surrogate dam where it continues to develop and is delivered in successful cases as a healthy newborn. Cloning differs from other modes of reproduction because it is asexual i.e., it does not require the union of an egg and sperm to produce a new individual. SCNT allows the reproduction of animals with a known phenotype from a single animal. Cloning has its use in animal breeding programs where it allows the introduction of proven desirable characteristics (such as disease resistance) and the propagation of animals regardless of their fertility.

Successful SCNT requires that the nuclear activities of a differentiated donor somatic cell are reset to a totipotent embryonic state and that the new embryo is then able to complete embryonic and foetal development. This process, called "reprogramming" changes the biochemical signals that control gene expression. Unlike the case for sexual reproduction, in which the fertilized egg is totipotent (capable of becoming all cells in the resulting organism),

¹ The animal species covered in this opinion are cattle and pigs

35 in SCNT, the activated embryo containing a differentiated somatic cell first must be “reset” to
36 totipotency, and then follow the same path as a fertilized embryo. Failure of the epigenetic
37 reprogramming, which may occur to varying degrees, is the source of potential adverse health
38 effects which may affect clones and may result in developmental abnormalities. The normal
39 health status of clones is the main indicator of the functioning of epigenetic reprogramming.

40 Cloning by SCNT has been applied to several animal species but, given the available data, it
41 was only possible to make a scientific assessment for cattle and pigs.

42 This opinion considers health aspects in relation to the surrogate dams, to clones and clone
43 progeny. For surrogate dams, an increased proportion of pregnancy failure has been observed
44 in cattle and pigs and increased frequencies of hydrops and dystocia have been observed
45 especially in cattle. This and the increased size of the offspring (large offspring syndrome)
46 make Caesarean sections more frequent in cattle carrying a clone than with conventional
47 pregnancies. These effects have also been observed in surrogate dams carrying pregnancies
48 induced by assisted reproductive technologies not involving SCNT, albeit at a lower frequency
49 and often with less severity. Mortality and morbidity rates in clones are higher than in sexually
50 reproduced animals but most clones that survive the perinatal period are normal and healthy as
51 determined by physiological measurements as well as by behaviour and clinical examinations.
52 There is no evidence indicating adverse outcomes for the sexually reproduced progeny of cattle
53 or sheep clones. However, it should be noted that neither clones nor their progeny have yet
54 been studied for their full natural life.

55 The current welfare assessment is largely based on data related to the physical health of the
56 animals and is only qualitative in nature. The welfare of both the surrogate dam and the clone
57 can be affected due to the adverse health outcomes observed.

58 For the evaluation of the safety of bovine milk and meat from cattle and pigs derived from
59 clones or their progeny, the following aspects were considered: compositional and nutritional
60 data, probability of novel constituents to be present, health status of the animal, available data
61 on toxicity and allergenicity and microbiological aspects. Relevant studies have been
62 conducted on the composition of meat (cows and pigs) and milk (cows) from healthy clones
63 and from clone progeny. No difference exceeding the normal variability have been observed in
64 the composition and nutritional value of meat and milk between healthy clones or the progeny
65 of clones and their conventional counterpart. Provided that unhealthy clones would be detected
66 at veterinary inspections and quality controls and thus be prevented from entry into the food
67 chain, the currently available data indicate that food products from clones of cattle and pigs and
68 their progeny are as safe as food products of livestock derived by conventional breeding.

69 Based on current knowledge there is no expectation that clones or their progeny would pose
70 any new or additional environmental risks compared with conventionally bred animals. As with
71 other assisted reproduction technologies, cloning could, by extensive or inappropriate use,
72 unintentionally affect the genetic diversity by increasing the proportion of a specific genotype
73 within a given population.

74 **Key words:** Animal Cloning, Animal Health, Animal Welfare, ART, Assisted Reproduction
75 Technology, Bovine, Cattle, Clone, Clones, Environmental Impact, Epigenetic
76 Reprogramming, Food Product, Food Safety, Genetic Diversity, Livestock,
77 Offspring, Pig, Progeny, Risk Assessment, SCNT, Somatic Cell Nucleus
78 Transfer, Swine.

79	TABLE OF CONTENTS	
80	Scientific Committee Members	1
81	Summary	1
82	Table of Contents	3
83	Background as provided by the European Commission	5
84	Terms of reference as provided by the European Commission	5
85	Acknowledgements	5
86	Assessment	6
87	1. Introduction to the opinion	6
88	1.1. Matters not addressed in the opinion	6
89	1.2. Terms used in the opinion	6
90	2. Animal breeding and reproductive techniques	7
91	2.1. Introduction to Somatic Cell Nucleus Transfer (SCNT)	7
92	2.2. Cloned species and cloning efficiency	8
93	2.3. Number of clones and data on life span	9
94	2.4. Possible use of cloning	10
95	3. Epigenetic and genetic aspects of SCNT	10
96	3.1. Epigenetic aspects: Reprogramming in clones	10
97	3.1.1. Transgenerational epigenetic inheritance	13
98	3.1.2. Epigenetic telomere modifications	13
99	3.1.3. Epigenetic dysregulation in perspective	14
100	3.2. Genetic aspects	14
101	3.2.1. Mitochondrial DNA modifications	14
102	3.2.2. Silent mutations	14
103	3.3. Other aspects	15
104	3.4. Conclusions of epigenetic and genetic aspects of SCNT	15
105	4. Animal health and welfare implications of SCNT	15
106	4.1. Animal health	16
107	4.1.1. Health of source animals for somatic cells and oocytes	16
108	4.1.1.1. The somatic cell nucleus source	16
109	4.1.1.2. The oocyte source	17
110	4.1.2. Health of surrogate dams	17
111	4.1.3. Health of clones (F0)	18
112	4.1.3.1. Health of clones during gestation and the perinatal period	18
113	4.1.3.2. Health of clones after birth up to sexual maturation	19
114	4.1.3.3. Health of clones after sexual maturation	20
115	4.1.3.4. Mortality of adult clones	21
116	4.1.4. Health of progeny (F1)	21
117	4.1.5. Conclusion on animal health	22
118	4.2. Animal welfare aspects	23
119	4.2.1. Welfare of the source animals	23
120	4.2.2. Welfare of the surrogate dam	23
121	4.2.3. Welfare of clones	24
122	4.2.3.1. Welfare of clones at the time of birth	24
123	4.2.3.2. Welfare of clones between birth and weaning	24
124	4.2.3.3. Welfare of clones between weaning and puberty/slaughter/end of their natural life	25
125	4.2.4. Welfare of progeny (F1)	25
126	4.2.5. Conclusions on animal welfare	26
127	5. Safety of meat and milk from clones (F0) and their progeny (F1)	26
128	5.1. Criteria for safety evaluation of meat and milk	26
129	5.2. Meat and milk composition from clones (F0) and progeny of clones (F1)	27
130	5.3. Toxicity and allergenicity studies	28
131	5.3.1. Feeding studies	28
132	5.3.2. Genotoxicity	28

133	5.3.3. Allergenicity	28
134	5.4. Conclusions on food safety	29
135	6. Impact on the environment and genetic diversity	29
136	6.1. Conclusions on Impact on the Environment and Genetic diversity	30
137	Overall Conclusions and Recommendations in Relation to Cattle and Pigs	30
138	Conclusions	30
139	Recommendations	30
140	Additional recommendations arising from the specific sections	31
141	Information made available to EFSA	33
142	References	35
143	Glossary and abbreviations used in the opinion	46
144		

BACKGROUND AS PROVIDED BY THE EUROPEAN COMMISSION

According to experts, animal cloning carried out through somatic cell nucleus transfer (SCNT) is on the verge of widespread commercial use and expected to spread within the global food chain before 2010. Food (e.g. meat and milk) derived, in particular from traditionally produced offspring of clones might therefore be available to consumers in the future.

In the USA, the Food and Drug Administration (FDA) published on 28 December 2006 its comprehensive draft risk assessment, risk management proposal and guidance for industry on animal cloning. The FDA draft risk assessment concluded that edible products from clones and their offspring are as safe as their conventional counterparts. The above mentioned developments will be facilitated if the FDA, as expected, will issue the final version of the Risk Assessment and lift the voluntary moratorium on food from clones and their progeny.

SCNT allows the production of genetic replicas (clones) of adult animals. The EU is already faced with embryos (offspring of a clone) and soon with semen (sperm) from clones offered in a global market for animal germ line products.

Community Interest

The European Commission (DG SANCO) is currently reflecting on the development of its policy in this area, in the framework of legislation on novel foods, zootechnics, animal health and welfare.

TERMS OF REFERENCE AS PROVIDED BY THE EUROPEAN COMMISSION

The European Commission requests the EFSA to advise on food safety, animal health, animal welfare and environmental implications of live animal clones, obtained through SCNT technique, their offspring and of the products obtained from those animals.

INTERPRETATION ON TERMS OF REFERENCE

In reply to the request from the European Commission, EFSA, having considered data availability of different species, decided to restrict its opinion to animal health and animal welfare of cattle and pig clones and their offspring, the food safety of products derived from those animals, and the possible implications of SCNT for the environment and genetic diversity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The European Food Safety Authority wishes to thank the members of the Working Group: Henrik Callesen, Giuliano D'Agnolo, Andras Dinnyés, Wenche Farstad, Jörg Hartung, Louis-Marie Houdebine, Peter Jinman, Pierre Le Neindre, David Morton, Heiner Niemann, Jean-Paul Renard, Larisa Rudenko, Josef Schlatter, Vittorio Silano (WG Chair) and Eckhard Wolf.

178 ASSESSMENT

179 1. Introduction to the opinion

180 This opinion is based upon published peer reviewed scientific papers, data and other
 181 information deemed reliable. EFSA launched through its Advisory Forum and on its website a
 182 request for scientific contributions on this subject from third parties; a list of all documents
 183 made available to EFSA can be found at the end of the opinion.

184 Cloning has been applied to several animal species, but only in the case of cattle and pigs were
 185 there sufficient data to make possible a scientific assessment for this opinion. Where
 186 appropriate, reference is made also to data concerning other species.

187 The first farm animal clone was born in 1984, based on the use of embryonic cells as nucleus
 188 source for the cloning procedure. In 1995, the lambs “Megan” and “Morag” were born, for
 189 which embryo-derived cells had been cultured *in vitro* for several weeks and then used for
 190 cloning. The major breakthrough came with the birth of the lamb “Dolly” in 1996, using adult
 191 somatic cell nucleus transfer (SCNT) in the cloning procedure (Wilmut *et al.*, 1997).

192 Broadly speaking, cloning can be regarded as an assisted reproductive technology (ART) in the
 193 sense that it is a method used to achieve pregnancy by artificial means. However, in the context
 194 of this opinion, SCNT is not included in the current use of the term ART, as it is unique due to
 195 its asexual nature and permits the production of animals from a single animal with a known
 196 phenotype. The present opinion takes into account observations on clones in the context of
 197 animals produced by ART (such as *in vitro* fertilization, embryo transfer and embryo splitting)
 198 and natural mating as appropriate. It is also acknowledged that current ARTs are widely used in
 199 the zootechnical practice without any underlying formal risk assessment. For example, large
 200 offspring syndrome, often thought to be a cloning-related phenomenon, was first described in
 201 pregnancies derived from the transfer of *in vitro* fertilized embryos in cattle and sheep (Farin
 202 and Farin, 1995; Walker, 1996; Kruip and den Daas, 1997; Sinclair *et al.*, 1999).

203 In deciding whether significant differences are incurred by SCNT, the choice of appropriate
 204 comparators has to be considered as well as the origin of the somatic cells and oocytes used for
 205 cloning, since they may have been selected for characteristics whose expression does not
 206 reflect those commonly found in a conventional population. For example, an elite animal would
 207 have characteristics that might be found at the top of the range compared with the average
 208 values of that species or breed line. This therefore might complicate a direct comparison with
 209 the normal range.

210 1.1. Matters not addressed in the opinion

211 Approaches to cloning other than SCNT, such as embryonic cell nucleus transfer (ECNT) using
 212 early embryonic cells (blastomeres) have been carried out, but in comparison with SCNT,
 213 relatively few animals have been described in the literature (Yang *et al.*, 2007b). ECNT as well
 214 as genetically modified animals (rDNA animals) that have been propagated by the use of
 215 SCNT are not assessed in the present opinion, nor are the effects of ARTs (e.g. *in vitro*
 216 fertilization, embryo transfer and embryo splitting).

217 1.2. Terms used in the opinion

218 Some relevant terms relevant are defined below. A glossary of other terms is found at the end
 219 of the opinion.

- Cloning

Cloning, as assessed in this opinion, is defined as the technique of somatic cell nucleus transfer (SCNT). The word clone is derived from the Greek words *clonos*, “twig” and *clonizo* “to cut twigs”. Cloning is a process by which animals are reproduced asexually. In the cloning of animals with SCNT, the haploid genetic material of an unfertilized ovum (oocyte) is replaced by the diploid genetic material of a somatic cell derived from foetal or adult tissue. In contrast, genetic modification (which is not assessed in this opinion) alters the characteristics of animals by directly changing the genetic DNA sequence.

- Clone

A clone is the animal born as a result of asexual reproduction of animals using SCNT; in the present opinion clones are also referred to as F0.

- Progeny (offspring) of clone

Clone progeny refers to offspring born by sexual reproduction, where at least one of the ancestors was a clone (F0); in the present opinion clone progeny is also referred to as F1.

2. Animal breeding and reproductive techniques

Assisted reproductive technologies (ARTs) have greatly improved genetic selection during past decades. These technologies include: artificial insemination from selected sires with its possible extension to sexed semen, oocyte collection from selected dams, embryo selection and transfer from selected genitors, *in vitro* fertilisation, and the long term storage of gametes and embryos.

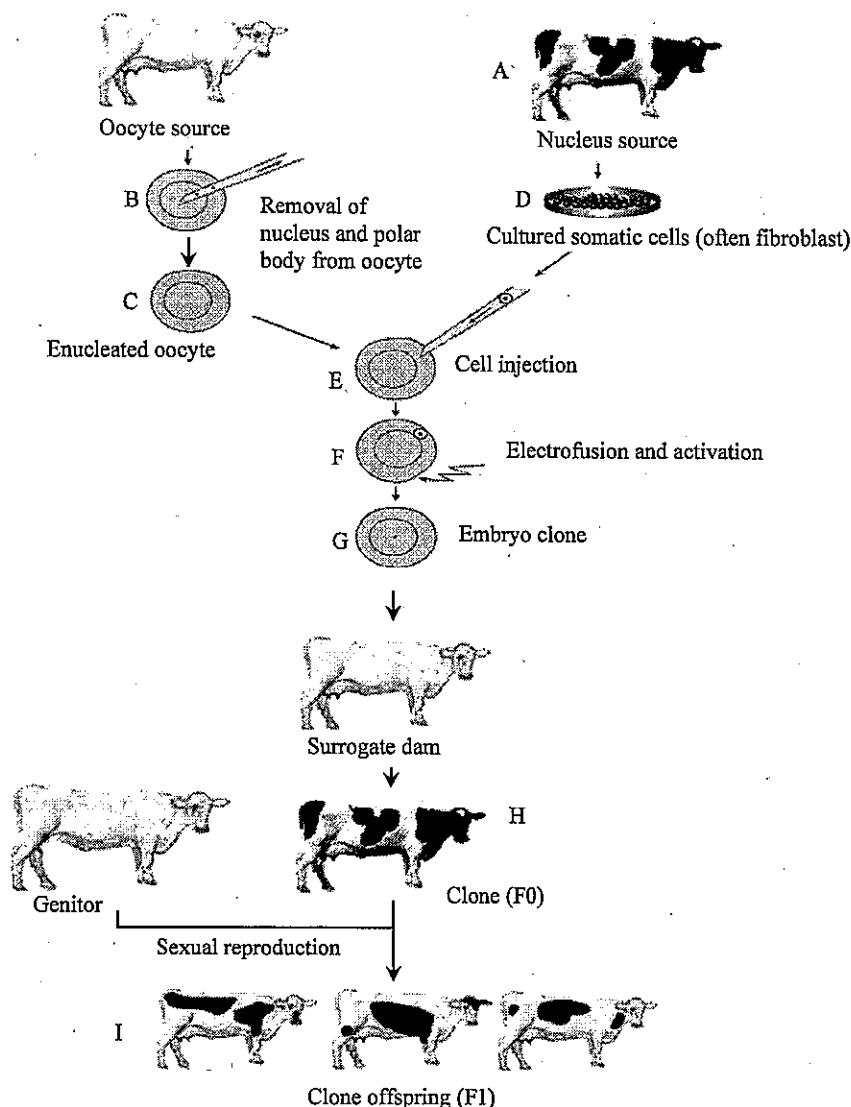
The genetic diversity of animal species or breeds may, in principle, be managed through the selection of genitors, by generating intra- and inter-hybrids or by generating genetically modified animals. The advantage of conventional genetic selection is that it creates new genotypes at each generation through the process of meiotic recombination (sexual reproduction) and the segregation of recombined chromosomes into individual gametes. In contrast to sexual reproduction, SCNT, by by-passing the sexual reproduction, will reproduce a particular desired phenotype (such as disease resistance, improved welfare, production or food product quality) with a higher likelihood than sexual reproduction.

2.1. Introduction to Somatic Cell Nucleus Transfer (SCNT)

In SCNT, the nucleus of a differentiated somatic cell (a non-germline cell) is transferred, by cell fusion or direct injection, into an oocyte that has had its nucleus removed. In practice, in livestock cloning the whole somatic cell (including the nucleus) is usually transferred. The reconstructed embryo is artificially activated to start its development before implantation into a surrogate dam where it continues to develop and is delivered, in successful cases, as a healthy newborn clone (F0) (see Figure 1).

Biologically, most steps in the procedure present their own challenges. Examples include how to select and prepare the somatic cell to be used as the nucleus donor; how to prepare the oocyte used as the nucleus recipient; how to combine these two cells, i.e. the fusion process; and how to initiate embryo development after fusion.

Technical improvements over time are gradually increasing the proportion of clones born (e.g. better *in vitro* culture conditions) and technical innovations in the handling of embryos allow better control of nucleus transfer procedures.



263

264

265 **Figure 1. Main steps of somatic cell nucleus transfer (SCNT).** (A) nucleus cell source; (B)
 266 the nucleus and the polar body are removed from oocyte by aspiration giving an enucleated oocyte (C); (D)
 267 culture of somatic cells from the nucleus donor; (E) injection of a somatic cell between the zona pellucida and the
 268 membrane of the enucleated oocyte; (F) intermediate association of enucleated oocyte and somatic cell followed
 269 by introduction of the somatic cell nucleus (and cytoplasm) into the oocyte cytoplasm by electrofusion of the
 270 oocyte and cell membranes; (G) embryo clone formed by an oocyte cytoplasm and a somatic cell nucleus
 271 containing two copies of chromosomes; (H) embryo transfer into a surrogate dam generating clone (F0) with coat
 272 colour similar to that of the nucleus source (A); (I) clone offspring (F1) generated by the sexual reproduction of
 273 the clone (F0) with a normal partner, the colour coat of these animals is different from that of the clone and
 274 different from each other.

275

276 2.2. Cloned species and cloning efficiency

277 Since the birth of the sheep “Dolly” in 1996, SCNT has been applied to livestock and to several
 278 other species. Cattle, which are reported to be the animals most frequently used for SCNT,
 279 were first cloned in 1998 (Cibelli *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2005), goats in 1998 (Keefer *et al.*,
 280 2002), pigs in 2000 (Onishi *et al.*, 2000), rabbits in 2001 (Chesne *et al.*, 2002) and horses in
 281 2003 (Galli *et al.*, 2003).

In livestock species, healthy progeny (F1) have been obtained after the sexual reproduction of a clone. Furthermore, for research purposes, clones have also been produced by using cells taken from clones (i.e. repetitive-cloning) (Cho *et al.*, 2007).

The overall success rate of the cloning procedure is still low and differs greatly between species. The overall success rate, expressed as the percentage of viable offspring born from transferred embryo clones, ranges approximately from 0.5 to 5 %, depending on the species.

Walker *et al.* described a method for porcine cloning where the overall cloning efficiency was improved from less than 1% to 5 % and a later study reported an efficiency of up to 17 % (10 live births out of 58 embryos transferred) (Walker *et al.*, 2002); (Du *et al.*, 2007).

Panarace *et al.* report the efficiency of cloning cattle in three countries, Brazil, Argentina and the USA, over five years (Panarace *et al.*, 2007). From the 3374 embryo clones transferred into surrogate dams, 317 (9 %) live calves were born, 24 hours after birth 278 of these clones (8 %) were alive and 225 (7 %) were alive at 150 days or more after birth. The higher overall success rates in cattle are largely due to the extensive knowledge of the female (and male) reproductive physiology in that species because of the importance of reproductive management in breeding schemes and in the economy of milk production.

However, within a given species, success rates can vary extensively reflecting a lack of full understanding of the role of various factors involved in the cloning process, such as somatic cell and oocyte selection, cell cycle stage, culture conditions, etc. For unknown reasons, about one third of the donor cell lines lead to a success rate, expressed as the percentage of live calves obtained from initiated pregnancy, as high as 40 % while one quarter of donor cell lines totally failed (Panarace *et al.*, 2007). These differences in the birth rate of live calves occur even when donor cell line cultures, with no evidence of abnormal chromosomal constitution, are run simultaneously within the same experimental programme. Unexpectedly, the different cell lines gave the same high number of blastocysts *in vitro* after nucleus transfer, irrespective of the subsequent success rate of development. This variable efficiency could not be attributed to chromosomal abnormalities in the cell lines resulting in the failure to develop to term (Renard *et al.*, 2007).

2.3. Number of clones and data on life span

There is no world-wide register of clones and therefore the number of living clones is difficult to estimate but EFSA has attempted to collect such information. In the EU there are about 100 cattle clones and fewer pig clones. The estimated number in the USA is about 570 cattle and 10 pig clones. There are also clones produced elsewhere e.g. Argentina, Australia, China, Japan and New Zealand, and EFSA estimates that the total number of clones alive world-wide in 2007 is less than 4000 cattle and 1500 pigs. The relatively small number is a reflection of e.g., technical difficulties and the regulatory status, and it can be expected that the number would increase as the efficiency is improved and if cloning is approved for commercial food purposes somewhere in the world. Semen from clones is already available on the market in the USA. However, even if the number of F0 clones remains small, there is potential in the future for a number of F1 and subsequent generation animals that could be produced from F0 clones and enter the food chain.

Similarly, the number of clones reported as reared and living for a considerable time is limited. Only a few reports on cattle clones to date refer to animals of 6-7 years of age (Chavatte-Palmer *et al.*, 2004; Heyman *et al.*, 2004; Panarace *et al.*, 2007) and no data on the full natural life span of livestock clones are available yet.

327 **2.4. Possible use of cloning**

328 Genetic selection is a method to improve animal production. It is based on the controlled
329 reproduction of animals followed by the identification of individuals with desirable traits, such
330 as high productivity, disease resistance etc. Genetic selection relies on the natural genetic
331 variation and gene redistribution which occurs during sexual reproduction in conventional
332 breeding.

333 Cloning provides a way in which selected characteristics can be propagated into production
334 herds more rapidly. For example, if an animal with a genetic resistance to a disease has been
335 identified, that animal could be expanded by cloning into several genitors which could then be
336 used to introduce the disease resistance trait via sexual reproduction into the production (or
337 subsequent breeding) herd.

338 SCNT may also prolong the reproductive life of sires or dams that have already produced high
339 value offspring and are aged beyond their ability to produce gametes effectively or for those
340 whose lives or fertility were shortened by design, accident or misadventure. Cloning may also
341 help to reduce the difference that exists regarding the availability of gametes between male and
342 female genitors. Naturally, females can provide at most a few hundred oocytes whereas males,
343 through their semen can generate thousands of offspring. Cloning, therefore, makes possible a
344 more intensive use of specific female genotypes within a breeding scheme.

345 The Scientific Committee noted that the primary use of clones (F0) currently is to produce elite
346 animals to be used in breeding and not to produce animals as food.

347 **3. Epigenetic and genetic aspects of SCNT**

348 Successful SCNT requires that the nuclear activities of the differentiated somatic cell used in
349 cloning are reset to those of an undifferentiated embryonic cell and that the new embryo is able
350 to complete foetal development. The somatic cell nucleus has to change its gene expression
351 pattern in relation to changes in its microenvironment in order to be able to replicate all steps of
352 normal development. This process, which is by essence epigenetic, leaves the primary DNA
353 sequence unchanged and is reversible. Epigenetic modifications include biochemically-
354 mediated conformational changes of the proteins surrounding the DNA (i.e. chromatin) and
355 also biochemical modifications of the DNA, particularly methylation. Modifications of
356 chromatin proteins are a reversible and dynamic process. In contrast DNA methylation can be
357 much more stable. Somatic cell reprogramming consists to a large extent of DNA
358 demethylation followed by a specific re-methylation of those DNA regions which must remain
359 silent in a given cell type. Epigenetic mechanisms affect the expression of some genes and such
360 modifications may be transmitted to daughter cells (Jablonka and Lamb, 2002).

361
362 The low success rates of SCNT and the underlying physiological abnormalities, frequently
363 observed in clones during embryonic and foetal development and also soon after their birth,
364 appear to be caused mainly by epigenetic dysregulation occurring during inappropriate
365 reprogramming of the genome.

366 Some considerations about the possibility that SCNT induces genetic alterations are given in
367 3.2, whereas the epigenetic aspects are discussed in Section 3.1.

368 **3.1. Epigenetic aspects: Reprogramming in clones**

369 Reprogramming of nuclear activities after SCNT is a time dependent process which involves
370 two main steps: the de-differentiation of the somatic cell nucleus to a totipotent embryonic
371 state, followed by the re-differentiation of embryonic cells to different cell types during later

development (Yang *et al.*, 2007a). Only a relatively small proportion of the total genome is active in a somatic cell at any one time. Many of these genes are known as housekeeping genes and are expressed in all cell types; others corresponds to the genes that grant specific functions to each cell type. In a somatic cell, therefore, most of the genes available for transcription are actually silent. The reactivation of these genes occurs normally in part during gametogenesis, with the cytoplasm of the oocytes containing the factors allowing reactivation. When genes required for a developmental step are not properly activated, the development of the embryo or fetus is interrupted, usually with fatal consequences. It is this phenomenon that is consistent with the considerable loss of embryo clones at early development and shortly after birth.

The de-differentiation of the somatic nucleus requires changes of the DNA and the chromatin which are essentially dependent on components found in the cytoplasm of the recipient oocyte. These changes may partially mimic those taking place after fertilization (Jaenisch and Wilmut, 2001). Consequently the clone embryos often show aberrant patterns of global DNA methylation at the zygotic stages (Dean *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2001a; Kang *et al.*, 2001b). A high degree of variability in the epigenetic changes is also observed among individual embryo clones with regard to methylation levels and mRNA expression patterns of genes (Dean *et al.*, 2001; Beaujean *et al.*, 2004; Wrenzycki *et al.*, 2005). Some genes aberrantly expressed in blastocyst stage are also found aberrantly expressed in the organs of clones that died shortly after birth (Li *et al.*, 2005). Methylation errors evidenced early in the preimplantation period of embryonic development can persist in bovine clone fetuses (Hiendleder *et al.*, 2004). The extent to which these aberrant methylation patterns are linked to the methylation status of the somatic cell nucleus before its transfer into the oocyte cytoplasm remains largely undetermined. However, several studies in cattle reveal that significant and relatively normal nuclear reprogramming, in terms of gene expression, can occur by the blastocyst stage after SCNT (Yang *et al.*, 2007a). In the mouse, the pluripotent cells derived *in vitro* from the inner cell mass of cloned blastocysts have been found to be indistinguishable from those obtained from *in vivo* fertilised embryos, both for their transcriptional activities and their methylation profile (Brambrink *et al.*, 2006; Kishigami *et al.*, 2006). This suggests that the epigenetic status of embryonic cells forming the inner cell mass is relatively well restored after SCNT at the blastocyst stage. On the other hand, the DNA of trophoblast cells, that are the precursors of the placenta, is excessively methylated (Yang *et al.*, 2007a). This may explain why about 400 genes out of 10,000 examined showed abnormal expression in the placenta of mouse clones and why this organ is often altered in clones.

Not all epigenetic alterations observed in early SCNT embryos result in abnormalities. For example, studies of the inactivation of one of the two X chromosomes in female embryos show that the pattern of inactivation in mouse blastocyst clones is apparently normal (Eggan *et al.*, 2000), but that the expression of X-linked genes in the placenta can be deregulated, particularly in mid-to-late gestation (Senda *et al.*, 2004). In cattle, the expression of X-chromosome related genes has been found to be delayed at early preimplantation stages in embryos of clones compared with *in vivo* derived embryos (Wrenzycki *et al.*, 2002). Hypomethylation of the genes involved in the X-chromosome inactivation process has been observed in various organs of stillborn calves. However, as no disturbance of sex development has been reported in clones, the implications for healthy clones of the hypomethylation of the X-chromosome observed in dead clones are unclear. More generally, it must be considered that the two copies of a gene have little chance to be simultaneously, epigenetically silenced in a clone. The silencing of specific genes by epigenetic mechanisms or the inactivation of a pathway may be compatible with a normal life of the clones.

Re-differentiation of the cloned embryo into different somatic cell lineages is initiated after the blastocyst stage when the extra-embryonic lineages, which will contribute to the foetal part of the placenta, differentiate from those embryonic lineages where the patterning events leading to the definition of the first developmental axis become established. In different domestic species including sheep and cattle, several histological and molecular abnormalities thought to be major causes of foetal death have also been identified in the placenta of SCNT embryos (Hill *et al.*, 2000; Heyman *et al.*, 2002; Wilmut *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004).

A class of genes known as imprinted genes has apparently an important role in the high foetal mortality observed after the transfer of embryo clones into surrogate dams. Imprinted genes are expressed from only one of the two alleles of a gene in a parent-of-origin dependent manner. Many of them are imprinted specifically in the placenta (Coan *et al.*, 2005). In mouse clones an abnormally low expression of several imprinted genes is frequently detected in the placenta but not in foetal tissues (Inoue *et al.*, 2002).

A number of reports have analysed the methylation status of imprinted genes in various tissues of aborted foetal cattle clones (Liu *et al.*, 2007; Long and Cai, 2007; Lucifero *et al.*, 2007). The results suggest a direct link between aberrant methylation profiles and the compromised development after SCNT. A similar conclusion can be drawn from a genome-wide methylation analysis of repeated DNA sequences containing CpG islands (Kremensky *et al.*, 2006).

Also in cattle clones abnormal allelic expression patterns of the imprinted *IGF2R* (Insulin Growth Factor II Receptor) gene have been observed in the placenta but not in calves (Yang *et al.*, 2005). The extent to which abnormal methylation patterns, induced by SCNT and observed in a specific tissue during foetal development, will persist in adult healthy clones remains to be determined. These changes in DNA methylation patterns, which have also been observed in *in vitro* fertilisation and embryo culture (without cloning) and in a protocol- and tissue-specific manner, result in a foetal overgrowth correlated with endocrine changes (Hiendleder *et al.*, 2006).

Several epigenetic changes such as DNA methylation have been observed among different successful mouse clones that look normal in their appearance (Ohgane *et al.*, 2001). A more extensive study concluded that each mouse clone has a different DNA methylation pattern (Shiota and Yanagimachi, 2002). The degree of these variations also differs among individual clones. An average of two to five aberrantly methylated loci per 1,000 loci in each tissue of a clone has been observed in mice. The mouse data indicate that animals are obviously not perfect copies of the original animals as far as the methylation status of their genomic DNA is concerned. However, these abnormalities can disappear with the advancement of animals' aging, as shown recently from the analysis of kidney cells from new born and adult mouse clones in mid-age or senescence (Senda *et al.*, 2007).

Although global analysis of the methylated status of clones is lacking in domestic species, one study in swine clones included evaluation of methylation in two different regions of the genome (Archer *et al.*, 2003a). Compared with control pigs, clones demonstrated differences in the methylation status in both transcribed and untranscribed regions of the genome, indicating that the cloning process may alter the pattern of DNA methylation in swine. However, because all of the clones in this study were healthy at the time of study (27 weeks of age) and had no apparent developmental defects, the biological relevance of these differences in DNA methylation is unclear.

3.1.1. Transgenerational epigenetic inheritance

Limited data are available on whether epigenetic dysregulations occurring during the reprogramming of nuclear activities in clones can be transmitted to their sexually reproduced offspring. Several reports in the mouse indicate that, after cloning, epigenetic abnormalities such as those resulting in an obese phenotype are corrected in the germ cells of clones such that the offspring of clone \times clone crosses do not exhibit the obese phenotype (Tamashiro *et al.*, 2000). Many genes with epi-alleles may exist in the genome but their detection requires a visible effect on the phenotype in both the clone and its progeny (Peaston and Whitelaw, 2006). Recent data indicated that 19 female and 11 male offspring generated by the same bull clone, lost all the abnormalities observed at birth and postnatally in the genitor (Ortegon *et al.*, 2007).

Transgenerational epigenetic inheritance in response to various conditions has been documented in many eukaryotes and may play an important role in mammals. In particular, environmental influences may induce a number of epigenetic modifications leading to the silencing or activation of specific genes, especially when pregnant females are maintained in conditions resulting in stress in the dam and foetus. The epigenetic modifications observed in the offspring of those pregnancies may then be transmitted to their progeny. These phenomena, which are considered as mechanisms of adaptation, have been found to be reversible after three generations (Gluckman *et al.*, 2007a; Gluckman *et al.*, 2007b). Epigenetic inheritance has also been shown to occur occasionally in mouse embryos under *in vitro* experimental conditions (Roemer *et al.*, 1997). Different mouse models are now available to investigate how epigenetic marks, such as DNA methylation, existing in specific non-imprinted alleles are transmitted as epi-alleles through the paternal and/or maternal germ cell line (Wolff *et al.*, 1998; Cooney *et al.*, 2002). There is now evidence suggesting that RNA can be a determinant of inherited phenotype. In the mouse *Agouti* phenotype, the white tail tip trait is not transmitted in a Mendelian fashion but by RNAs packaged in sperm and down regulating *Kit* gene expression by an RNA interfering mechanism (Rassoulzadegan *et al.*, 2006). No similar studies or outcomes have been identified in the livestock species that are the subject of this scientific opinion. The relevance of these observations to clones and their progeny is not entirely clear. It is also expected that the epigenetic modifications of clones will disappear in future generations as it is the case for those that are naturally induced.

3.1.2. Epigenetic telomere modifications

One epigenetic mechanism that has been linked to the ability of donor somatic nuclei to drive the development of SCNT embryos is the length of telomeres of clones. Telomeres are short, highly repetitive DNA sequences located at the ends of chromosomes that prevent those ends from inappropriate fusions and heal them when they are degraded. Telomeres shorten at each round of cell division due to problems associated with DNA replication. Thereby, telomeres have a function in the control of the ageing process. An enzyme, telomerase, present in various renewal tissues including germ cells and embryonic cells has the ability to extend, or to hold constant, the length of the telomere over multiple cell divisions. Telomeres of the first mammalian clone, ("Dolly") were found to be shorter than those of the age-matched, naturally bred counterparts (Shiels *et al.*, 1999). For this reason, clones were first considered to show premature ageing. Subsequently however, the vast majority of studies have reported that telomere length in cattle, pig and goat clones are comparable with or even longer than age-matched naturally bred controls, even when senescent donor cells were used for cloning (Lanza *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2004; Betts *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2005; Schaetzlein and Rudolph, 2005). Current data indicate that telomere length restoration is normal in clones derived from fibroblast donor cells (which are the cells predominantly used). The telomere lengths of 30

516 offspring from the same bull clone were not different from age-matched controls (Ortegon *et*
517 *al.*, 2007).

518 3.1.3. Epigenetic dysregulation in perspective

519 Epigenetic dysregulation is not a phenomenon unique to cloning and has been observed in all
520 other forms of reproduction, but particularly in ARTs that have a considerable *in vitro*
521 component. This has been observed in cattle when *in vitro* fertilized embryos and embryos
522 derived via SCNT were compared with *in vivo* produced embryos (Camargo *et al.*, 2005), as
523 well as in other species (Gardner and Lane, 2005; Wrenzycki *et al.*, 2005). It is not known
524 whether these abnormalities are due to the stresses of SCNT *per se*, or are the result of the *in*
525 *vitro* environment, that the early embryos are exposed to, prior to transfer to the surrogate dam.
526 Furthermore, it should be remembered that the epigenetic status of any embryo is in part a
527 response to its environment, as is the epigenetic status of any life stage of any organism.

528 3.2. Genetic aspects

529 It can be considered that the well-conserved mechanisms that prevent an altered genome from
530 affect the complex process of development have the same efficiency with SCNT as with
531 meiotically-derived embryonic genomes. Chromosomal disorders after SCNT are routinely
532 observed at a high frequency during the preimplantation stages but mainly in morphologically
533 abnormal embryos (Booth *et al.*, 2003). The chromosomes of 30 healthy offspring from the
534 same bull clone showed no abnormalities (Ortegon *et al.*, 2007).

535 Chromosome stability may differ in the mouse between embryonic cells derived *in vitro* from
536 cloned or fertilised embryos but this is probably because of epigenetic rather than genetic
537 causes (Balbach *et al.*, 2007).

538 3.2.1. Mitochondrial DNA modifications

539 Genetic differences between clones might derive from mitochondrial DNA. Mitochondria serve
540 mainly as a source of energy for the cell but have other important roles in cellular physiology,
541 notably in steroid synthesis and in programmed cell death, both of which are required for
542 embryonic development. In sexual reproduction, male mitochondria are recognized as foreign
543 and are eliminated in the oocyte cytoplasm in a species-specific manner. Thus the mitochondria
544 show a strict maternal inheritance. After SCNT, embryos can possess mitochondrial DNA from
545 the oocyte cytoplasm only (homoplasmy) or from both the donor cell and the recipient
546 cytoplasm (heteroplasmy) (Steinborn *et al.*, 2000). Adult somatic cells typically contain from a
547 few hundred to several thousand mitochondria. This number is even lower during the
548 specification of the germ line but increases dramatically during oocyte growth and may become
549 as high as 100,000 in the mouse oocyte at the time of fertilisation (Shoubridge and Wai, 2007).
550 It is perhaps not surprising that the vast majority of clones analysed so far have shown little
551 evidence of heteroplasmy but the number of studies is small (Hiendleder *et al.*, 2005). It has
552 been speculated that changes in mitochondrial copy number and function, or the transmission
553 of mitochondrial dysfunction from the recipient oocyte could be risk factors for adult metabolic
554 diseases with a developmental origin (McConnell, 2006).

555 3.2.2. Silent mutations

556 The extent to which SCNT induces silent mutations in the nuclear DNA of clones that could be
557 transmitted to later generations (through sexual reproduction) remains largely undetermined.

Such mutations occur spontaneously although at a low frequency in animals born from sexual reproduction and the same is probably true after nuclear transfer. These mutations can lead to aberrant phenotypes at the next generation, depending on the allelic combination of individual offspring, and can be screened for and eliminated in conventional breeding programs.

There are examples in normal breeding showing that mutations occurring spontaneously in the DNA can interfere with the expression but not with the epigenetic status of imprinted genes resulting in a modification of their contribution to the phenotype of offspring. This is the case in the sheep with the “callipyge phenotype”, an inherited muscular hypertrophy that affects only heterozygous individuals receiving a mutation from their male parent (Charlier *et al.*, 2001). A related situation has also been observed in the pig (Van Laere *et al.*, 2003). There is now evidence to suggest that RNA and not only DNA can be a determinant of inherited phenotype (Rassoulzadegan *et al.*, 2007).

Since nuclear reprogramming requires a marked reorganisation of the somatic cell nucleus chromatin, SCNT could increase the occurrence of silent mutations in the donor genome which could further affect the outcome of the breeding schemes used today for genetic selection in livestock.

3.3. Other aspects

The cloning process includes several modifications of the oocyte cytoplasm. Part of the oocyte cytoplasm is removed during the nucleus aspiration and the remaining cytoplasm may become disorganized. This may result in a lack of fully functional cytoplasm required for embryo development. Some protocols, aiming at restoring oocyte cytoplasm, involve the addition of exogenous oocyte cytoplasm or the fusion of several enucleated oocytes. Cytoplasmic modification may also result from the fusion of the enucleated oocyte with the donor cell. This introduces donor cell cytoplasm, including functional mitochondria, into the oocyte. These cytoplasm disturbances may result in the malfunctioning of the cytoplasm and its organelles which could have an impact on the development of the embryo clone.

3.4. Conclusions of epigenetic and genetic aspects of SCNT

- Epigenetic dysregulation is the main source of potential adverse effects that may affect clones and result in developmental abnormalities.
- Clinically healthy clones show that epigenetic reprogramming is functioning satisfactorily.
- The DNA sequence of a clone is a copy of the donor animal, but other differences may exist (e.g. the methylation status of genomic DNA).
- Currently, based on the available limited data, there is no evidence that epigenetic dysregulation induced by SCNT is transmitted to the cattle and pig progeny (F1).

4. Animal health and welfare implications of SCNT

Animal health includes physical fitness, freedom from infectious and non-infectious diseases and the ability to carry out essential life-maintaining tasks. Animal welfare includes the absence of pain, distress and suffering. The evidence for poor health and welfare, or improved health and welfare, is reviewed in the context of the various phases in the life of an animal with reference to clones and to data derived by comparing clones with animals that are not clones.

It is important, in regard to the risks associated with the cloning technology, to distinguish clearly between the risks directly related to the technology of cloning itself, and those related to

the stage of development of the technology and the degree of the control of the processes which are used.

As the literature on cloning is based on reports of work carried out in highly monitored populations and environments, the effects observed and recorded may not reflect the conditions of husbandry that exist in everyday production systems. Clones are derived from animals with characteristics deemed valuable often consisting of production traits that may place them outside of the normal distribution of a population for that particular trait. Therefore, care must be exercised in making comparisons between clone and normal population parameters as well as with animals produced with ARTs.

4.1. Animal health

Animal health is considered in relation to the animals originating the somatic cells and oocytes used in cloning, the surrogate dams, the clones themselves and their progeny.

4.1.1. Health of source animals for somatic cells and oocytes

Cells used as nucleus donors in the SCNT process are usually obtained either from existing cell cultures or from minimally invasive procedures such as ear punches of live animals with desirable phenotypes. The oocyte donor could be any animal of the same species whose oocytes are available after slaughter or it could be a highly valued and/or monitored animal whose oocytes are collected by ovum pick up *in vivo*. As such, these techniques do not pose significant health risks to the source animals. In the remainder of this section, the role of the health of the source animals and the implications of their health for the health of subsequent clones are discussed.

The disease status of the source animals can have an impact on the infection risk for the clone. Some disease causing agents, such as intracellular mycoplasma and viral nucleotide sequences integrated in the genome, can be directly associated with the somatic cell nucleus and oocyte cells (Philpott, 1993).

At present, voluntary guidelines published by organisations involved with embryo transfer, are aimed at reducing the risk of infection in relation to trade. The OIE (World Organisation for Animal Health, www.oie.int) has developed guidelines for embryo transfer in close cooperation with IETS (International Embryo Transfer Society, www.iets.org). Detailed protocols for the biosecure management of source animals and surrogate dam have been developed for animals involved in embryo transfer procedures (*in vivo* derived gametes and embryos) but not all protocols applied to embryos produced *in vivo* are applicable to *in vitro* derived embryos, cloned and transgenic embryos (Stringfellow *et al.*, 2004).

4.1.1.1. The somatic cell nucleus source

The source of the somatic cell nucleus is often an animal with the desirable trait that the cloning procedure is designed to propagate, and as such would be subject to health monitoring and surveillance during its lifetime. Selection of the disease status (susceptibility or resistance) of the source animal is important as the clone may be affected by such disease traits. The likelihood of disease transmission may vary with the type of tissue from which the nucleus is collected, since pathogens may vary in their affinity for certain tissues (Sharp, 1971; Lilja *et al.*, 1997; Dinglasan and Jacobs-Lorena, 2005; Erne *et al.*, 2007).

With SCNT there is the possibility of bringing intracytoplasmic pathogens within the somatic cell into the recipient oocyte. However, this hazard also exists if and when pathogens adhere to sperm or to instruments during *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). This risk is reduced by sanitary management of source animals ((World Organisation for Animal Health and OIE, 2007).

4.1.1.2. The oocyte source

Health risks related to the procedures for oocyte recovery from live animals or from abattoir material and their handling *in vitro* are of equal importance to those encountered in the *in vitro* collection of embryos for transfer. The collection of oocytes from animals at slaughter (as opposed to surgical interventions) increases the risk of contamination with bacteria and viruses which may be retained by the clones and may affect their viability *in utero* or after birth. These risks have already been carefully identified (Bielanski, 1997) and procedures for their prevention have been proposed by the IETS as licensing guidelines and have been adopted by the OIE. While there are steps in the SCNT technique which differ from the *in vitro* fertilisation procedure, no specific health risks related to oocyte enucleation, the fusion of oocyte with a somatic cell nucleus or the injection of the somatic cell nucleus directly into the cytoplasm of the enucleated oocyte have been reported.

It is not known to what extent the disease resistance of the oocyte source animal will affect the clone as it does not contribute to the genetics of the clone in the same way as the somatic cell nucleus. The source animal of the enucleated oocyte may, however, contribute through mitochondria-associated inheritance stemming from the oocyte cytoplasm.

4.1.2. Health of surrogate dams

Initial pregnancy rates (at Day 50 of gestation after transfer) in cattle serving as surrogate dams were found to be similar between those carrying clones (65 %) and those produced through the use of other artificial methods such as embryo transfer (58 %) and artificial insemination (67 %) (Heyman *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004). However, there is a continued pregnancy loss throughout the entire gestation period in those surrogate dams carrying clones which is not observed in other ARTs, and embryo survival is only one-third of that following *in vitro* embryo production (Lee *et al.*, 2004; Wells, 2005).

Losses of pregnancy in surrogate dams in the second and third trimester are associated with placental abnormalities, hydrops, enlarged umbilical cords with dilated vessels, and abnormally enlarged and fewer placental cotyledons (Wells *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2000; Chavatte-Palmer *et al.*, 2002; Batchelder *et al.*, 2005).

The high rate of pregnancy failure in the surrogate dam has been linked to the finding of abnormal and/or poorly developed placental formation. Such placental defects have been associated with early embryonic loss, abortions, stillbirths, dystocia and pre- and post-natal deaths (Wakayama and Yanagimachi, 1999; Hill *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2001; De Sousa *et al.*, 2002; Hashizume *et al.*, 2002; Humpherys *et al.*, 2002; Suemizu *et al.*, 2003). A detailed histological study of the placenta found that pregnancies of seven cattle clones were associated with abnormalities (Lee *et al.*, 2004; Batchelder *et al.*, 2005; Constant *et al.*, 2006). Abnormal placental development expressed as a reduction in placentome number and consequences on maternal, foetal exchange is seen as one of the main limiting factors in ruminant SCNT pregnancies (Arnold *et al.*, 2006). This abnormal placental development is present from the early stages after implantation but does not necessarily prevent the development and birth of

live clones (Hill *et al.*, 2000; Hoffert *et al.*, 2005; Chavatte-Palmer *et al.*, 2006). An early detection of placental abnormalities offers the possibility to terminate pregnancy without threatening the health of the surrogate dam (Hill and Chavatte-Palmer, 2002).

It is interesting to note that, in some ruminants, it is the foetus that helps determining the time of birth through the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and foetal cortisol (Liggins *et al.*, 1967) and that gestation is prolonged when the foetal pituitary gland is destroyed. The clone may therefore affect the incidence of dystocias through some pituitary malfunction.

The incidence of birth by Caesarean section is higher in surrogate dams carrying cattle or pig clone foetuses although there is some difficulty in determining causation since elected Caesarean sections were often carried out. In a cattle study an initial elective Caesarean rate of 100 % in 2000 dropped to 54 % in 2005 (Panarace *et al.*, 2007).

The future fertility of the surrogate dams is not recorded in the literature on cloning. After normal breeding, the fertility of cows requiring an elective Caesarean section to assist the delivery of their calf is not altered whereas the fertility is significantly reduced if the Caesarean section is needed because of severe dystocia (Tenhagen *et al.*, 2007), principally due to infection resulting in endometriosis (Gschwind *et al.*, 2003).

4.1.3. Health of clones (F0)

Four different conditions can be identified concerning the health of clones: (i) clones which present serious abnormalities and where the pregnancy needs to be terminated; (ii) clones which present disorders and die during the postnatal period; (iii) clones which present reversible disorders but which survive after birth; and (iv) clones with no detectable defects.

The most critical time for the health and development of cattle clones occurs during the perinatal period (Chavatte-Palmer *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2004; Panarace *et al.*, 2007). This can be explained by the fact that most of the observed pathologies are associated with, and secondary to, placental dysfunctions (Constant *et al.*, 2006).

Possible reactivation of bovine endogenous retroviruses (BERV) was analysed and compared between sexually reproduced cattle and cattle clones (Heyman *et al.*, 2007a). BERV sequences were not transcribed and no RNA was detected in the blood of clones, donor animals or controls.

Further data are required to evaluate whether SCNT has an impact on immune functions and susceptibility of clones to infectious agents. Moreover, it should be noted that, although not specifically related to SCNT, depending on the infectious status of the surrogate dam, transplacental infection from the dam to the clone may occur with some specific viruses (e.g. pestiviruses, herpesviruses). This is not specifically related to SCNT and would also be encountered with other ARTs in which an embryo is introduced into a surrogate dam.

4.1.3.1. Health of clones during gestation and the perinatal period

Large Offspring Syndrome (LOS) has been observed in clones from cattle and sheep together with changes observed in late gestation that give rise to an increase in perinatal deaths, excess foetal size, abnormal placental development (including an increased incidence of hydrops), enlarged internal organs, increased susceptibility to disease, sudden death, reluctance to suckle and difficulty in breathing and standing (Kato *et al.*, 1998; Galli *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999;

Young and Fairburn, 2000). In a study by Heyman *et al.* the incidence of LOS at birth was 13.3 % for somatic cloning, compared with 8.6 % for embryonic cloning and 9.5 % for a group of IVF calves (Heyman *et al.*, 2002). For somatic cloning the incidence of LOS could be related to the tissue origin of the somatic cells used and an LOS rate of up to 47 % has been observed when calf clones were derived from skin, ear or liver cells (Kato *et al.*, 2000).

In a study where not all the clones were derived by SCNT, the overall incidence of hydroallantois was 6 % of all pregnancies but 17 % for pregnancies with cloned fetuses where pregnancies lasted more than 60 days (Pace *et al.*, 2002). Out of 2170 cattle receiving embryo clones, 106 live births occurred and 82 survived for more than 2 days.

Foetuses, placentas and calves resulting from both *in vitro* production and SCNT can differ significantly in morphology, physiology and developmental competence compared with embryos produced *in vivo* (Farin *et al.*, 2006). Mechanisms proposed to explain how *in vitro* conditions may influence subsequent embryo development focus on the modification of epigenetic patterns associated with the DNA, which can affect gene expression without altering the primary DNA sequence.

There are similar findings in sheep where peri- and post-natal lamb losses were considered to be due to placental abnormalities (Loi *et al.*, 2006). Initially the implanted blastocyst was comparable with that of *in vitro* derived fertilised (IVF) embryos but losses after that time were marked with only 12 out of 93 clones reaching full-term development, compared with 51 out of 123 lambs born from the IVF control embryos.

In contrast to the LOS syndrome observed in cattle and sheep clones, some pigs produced by SCNT have an increased incidence of intrauterine growth retardation. A comparison of 23 SCNT litters (143 individuals) with 112 artificial insemination (AI) litters (1300 individuals) showed a significant increase (1.8 ± 0.3 for SCNT versus 0.7 ± 0.1 for AI) in the number of intrauterine growth retardations per litter (Estrada *et al.*, 2007).

4.1.3.2. Health of clones after birth up to sexual maturation

A study of calf clones delivered by Caesarean section, reported that in the first 48 hours of life the red and white cell counts were reduced in comparison with control calves and their plasma electrolytes were more variable, suggesting that calf clones take longer to reach normal calf levels than the controls (Batchelder *et al.*, 2007a). Calf clones were also reported to have higher total bilirubin levels and fibrinogen levels than normal calves (Batchelder *et al.*, 2007b). However an increase in the level of bilirubin and fibrinogen is not necessarily abnormal since these increases remained within the normal range.

One study in cattle reported that a mean of 30 % of the calf clones died before reaching 6 months of age with a wide range of pathological causes, including respiratory failure, abnormal kidney development, and liver steatosis (fatty livers) (Chavatte-Palmer *et al.*, 2004). Heart and liver weights were increased relative to body weight. However after 1 to 2 months the surviving calf clones became indistinguishable from calves born from artificial insemination. Once past the first few months after birth most calf clones develop normally to adulthood (Chavatte-Palmer *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2004; Heyman *et al.*, 2007a).

From 988 bovine embryo clones transferred into recipient cows, 133 calves were born and 89 (67 %) of those survived to weaning at 3 months of age (Wells *et al.*, 2003; Wells *et al.*, 2004). Similar findings were reported by Panarace *et al.* who summarised 5 years of commercial experience of cloning cattle in 3 countries (Panarace *et al.*, 2007). On average 42 % of cattle

clones died between delivery and 150 days of life and the most common abnormalities were enlarged umbilical cords (37 %), respiratory problems (19 %), depressed or weak calves displayed by prolonged recumbency (20 %) and contracted flexor tendons (21 %).

The Viagen data set provided to EFSA and used in the US FDA draft risk assessment provides data on porcine clones and their progeny (FDA, 2006). Pig clones were delivered by Caesarean section whilst comparator controls were delivered vaginally. Birth weights were considered comparable. A controlled study in a research environment indicates that litter weight and average birth weight, when adjusted for litter size, are significantly ($p < 0.05$) higher in AI derived litters compared with SCNT derived litters. Additionally, there was a trend towards higher stillbirths and higher postnatal mortality in the SCNT population (Estrada *et al.*, 2007).

After the perinatal period, no significant differences were detected between clones and controls for a number of parameters in cattle and pigs. Cattle clones at about 6 months of age showed no significant differences from age-matched controls with regard to numerous biochemical blood and urine parameters, immune status, body condition score, growth measures and reproductive parameters. Similarly a large number of physiological parameters (blood profile) showed no differences between clones and age-matched controls (Laible *et al.*, 2007; Panarace *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007; Heyman *et al.*, 2007a; Watanabe and Nagai, 2008). Studies on swine clones at 14 and 27 weeks of age showed that they were indistinguishable from their comparators in terms of growth, health, clinical chemistry and immune function (Archer *et al.*, 2003a; Mir *et al.*, 2005).

Placental overgrowth has been recently shown to induce an increase in the fructose provided to the foetus during the neonatal period resulting in hypoglycaemia and hyperfructosaemia affecting muscle functions including cardiac muscle (Batchelder *et al.*, 2007b). These data provide the first insight to explaining why calves clones experience greater difficulty adjusting to life *ex utero*.

4.1.3.3. Health of clones after sexual maturation

In a matched study of heifer clones and controls reared under the same conditions, the heifer clones reached puberty later than the controls. However, there was no significant variation regarding gestation length, and calf survival after birth (Heyman *et al.*, 2007b). Subsequent 305-day lactation curves, as a health parameter, were also comparable for yield, fat and mean cell counts. The mean protein content in milk was significantly higher but this could be accounted for by the fact that three of the heifer clones were from the same source mother, which had a lower milk production but higher protein content, and by the small sample size (12 clones and 12 controls). There were no effects on health and subsequent reproductive data showed no significant differences.

The same study found other significant differences between clones and control cattle although there were no outward signs of health effects. Variations have also been observed in haematological and biochemical parameters, muscle metabolism, fatty acid composition and higher oxidative activity in the muscle biopsies of the semitendinosus muscle at the 8 to 12 month stage (Tian *et al.*, 2005; Yonai *et al.*, 2005).

The growth rates of 11 Friesian heifer clones at 15 months of age was comparable with that seen in non-clones reared in New Zealand (Wells *et al.*, 2004). The same workers report that in 52 cattle clones there had been no sign of obesity. Reproductive ability in cattle clones showed no significant variation from that found within a population derived by normal sexual

reproduction, and subsequent foetal maturation and development were normal (Enright *et al.*, 2002; Forsberg *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 2004; Shiga *et al.*, 2005; Yonai *et al.*, 2005; Tecirlioglu and Trounson, 2007).

A study of clones derived from an aged infertile bull concluded that although their birth weights were heavier than those of calves produced using artificial insemination, their semen characteristics and fertility were normal (Shiga *et al.*, 2005).

Pregnancy rates achieved from female porcine clones were comparable with those achieved from controls (Martin *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2006). Litter size, the proportion of pigs born live, birth weight, level of congenital defects and three-week weaning weights were similar in pigs born to clones as for those born to non-clone parents (Martin *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2007).

The Viagen data set shows that the porcine clones had lower IGF-I than the comparator group after birth and before slaughter, although the levels, with the exception of one pig clone, were within the comparator range. Similarly, oestradiol-17B levels were lower in the clones than in the comparator controls. The implications of these endocrine differences for alterations in growth rate or reproductive function are unknown, as these clones reached market weight within normal times and as cited above, were able to reproduce successfully (Walker *et al.*, 2007).

4.1.3.4. Mortality of adult clones

As SCNT is a developing technology, the numbers of animals reported as reared and remaining alive for their natural productive lifespan remains limited. Thus the use of the word 'old' in reports often refer to animals only a few years past weaning or birth (Chavatte-Palmer *et al.*, 2004; Heyman *et al.*, 2004; Heyman *et al.*, 2007a). It is unlikely that animals reared for production purposes would ever reach their natural lifespan and therefore judgements as to reduction of lifespan or other aging related effects will be difficult to assess at present.

Wells *et al.* reported that between weaning and 4 years of age the annual mortality rate in cattle clones is at least 8 % (7 out of 59 died in the age period 1-2 years; 3 out of 36 died within the age period 2-3 years and 1 out of 12 died in the age period 3-4 years) and that the main mortality factor is euthanasia due to musculoskeletal abnormalities (Wells *et al.*, 2004). In a study with 21 heifer clones of 4 different genotypes, all but one animal survived the study period of 4 months to 3 years of age (Heyman *et al.*, 2007a). The one animal that did not survive died just after calving during the hot summer of 2003.

A comparison in mice, where lifespan and ageing were studied, showed that, on average, mouse clones live for a 10 % shorter life than sexually bred mice (AFSSA, 2005). However, where mice were subject to reiterative cloning for 4 and 6 generations in two independent lines, there was no sign of premature ageing as judged by gross behavioural parameters (Wakayama *et al.*, 2000).

4.1.4. Health of progeny (F1)

In New Zealand it was found that out of 52 progeny of cattle clones delivered vaginally, 85 % survived after 24 hours and their survival was similar to the calves of control cows (84 %) (Wells *et al.*, 2004). Illness in the progeny of clones was also reported to be of no greater prevalence than in conventionally-bred animals. Similar results have been published from cumulated data on calvings from clones, showing that 21 offspring were naturally delivered.

and most calves (20 out of 21 animals) survived after birth (Heyman *et al.*, 2007a). Also a recent review of the data collected on a total of 32 offspring from clones produced in Japan confirms these findings (Watanabe and Nagai, 2008). Finally, a report on the physiology and genetic status of 19 females and 11 males sired by a single bull clone showed that the offspring from clones had normal chromosomal stability, growth, physical, haematological and reproductive parameters compared with normal animals at one year of age, although they displayed lower heart rates ($P=0.009$), respiratory rates ($P=0.007$) and body temperature ($P=0.03$) in their early period of life. Furthermore, they showed moderate stress responses to routine handling (Ortega *et al.*, 2007).

4.1.5. Conclusion on animal health

The infection status of the somatic cells and oocytes source animals (specifically concerning the tissues where the cells and the DNA are taken) and of the surrogate dam must be taken into consideration in the choice of the animals for cloning.

From the available data, mainly concerning cattle, the conclusions below can be drawn.

In relation to surrogate dams it is concluded that:

- Increased pregnancy failure is observed following the implantation of cloned embryos. Based on information from other ARTs this may affect the future fertility of the surrogate dam.
- Increased frequencies of hydrops, dystocia and consequential Caesarean section are observed. These effects may affect the future fertility of the surrogate dam.
- All the above-mentioned adverse health effects have all been observed in surrogate dams carrying pregnancies produced by ARTs not involving SCNT, albeit at much lower frequencies

In relation to clones (F0) it is concluded that:

- Mortality and morbidity of clones are higher than in sexually produced animals.
 - Increased embryonic and foetal losses occur during pregnancy, mostly observed in cattle rather than other species.
 - During gestation, mainly physiological adverse outcomes, including Large Offspring Syndrome (LOS), are observed in cattle clones at a higher frequency than with other ARTs.
 - A few studies have indicated that adult clones of cattle may have an increased early mortality and morbidity.
- Most clones that survive the perinatal period appear to be normal and healthy as determined by physiological measurements, behaviour, and other clinical examination.
 - Clones that survive the perinatal period are generally healthy but a proportion may show some adverse physiological effects, such as thermo-dysregulation and immune system deficiencies (observed in cattle), which may be transient and contribute to mortality/morbidity.
 - High levels of husbandry care can enhance the survival and health of clones during early life.
 - No long-term effects have been observed on the reproductive ability of clones.
 - Most clones have not yet reached the end of their natural life span for their species; therefore it is difficult to draw any conclusions on possible effects of SCNT on their longevity. Further, the production life of animals is shorter than the full natural life span.

- 906
 907 ▪ The causes of death and pathological conditions in cloned animals may be attributable
 908 to developmental defects or to other causes including infections, as is also the case in
 909 conventionally produced animals. The extent to which defects other than developmental
 910 defects are attributable to the effects of cloning is currently unknown.

911
912 *In relation to progeny (F1) it is concluded that:*

- 913 ▪ From the data available there is no evidence of any abnormal effects in those species
914 examined.

915 **4.2. Animal welfare aspects**

916 Qualitative and preferably quantitative data are required to assess welfare indicators directly on
917 the animals concerned. Since animal cloning is a relatively recent technology these data are
918 still lacking and it is therefore very difficult to draw any direct conclusions from the very
919 limited data available. The current welfare assessment is largely based on the interpretation of
920 data presented in the previous section related to the physical health of the animals and is of a
921 qualitative and more general nature only.

922 In the context of cloning, the welfare of the source (nucleus donor) animal, the gestation animal
923 (surrogate dam), the clone (F0), and the progeny of the clone (F1) should all be considered.

924 **4.2.1. Welfare of the source animals**

925 The cloning procedure itself does not normally affect the welfare of the somatic cell nucleus or
926 oocyte source animals.

927 **4.2.2. Welfare of the surrogate dam**

928 Due to the effects of SCNT on the placenta and foetal membranes, as well as the large foetuses
929 carried by some of the surrogate dams both during gestation and around parturition, the welfare
930 of the dam is likely to be affected. These effects have been noted primarily in cattle and sheep
931 clone pregnancies; similar effects have not been reported for swine clone pregnancies.

932 From a welfare viewpoint, dystocia carries the risk of unrelieved “extra” pain during birth due
933 to the large offspring. If the dam has to have a Caesarean section then that itself carries the risk
934 of pain due to the procedures involved, including a failure to provide adequate post-operative

935 pain relief. If the Caesarean section is performed, the dam will experience pain during the recovery period.

946 **4.2.3. Welfare of clones**

947 The evidence for an impact of SCNT on welfare is reviewed in the context of the various life
 948 stages of a clone. Data have been compiled by comparing clones with animals that are not
 949 clones, but which have been bred by natural mating, artificial insemination, or some other *in*
 950 *vitro* techniques using gametes and embryos.

951 **4.2.3.1. Welfare of clones at the time of birth**

952 From the welfare viewpoint, the calf or lamb may not be able to experience any pain or distress
 953 until it has breathed, although physiologically it may show signs of respiratory distress (Mellor
 954 *et al.*, 2005; Mellor and Diesch, 2006). After the brain has raised awareness due to the
 955 increased flow of oxygenated blood, calves may experience distress due to various perinatal
 956 resuscitation and survival techniques e.g. slaps, clearing out the mouth, vigorous rubbing of the
 957 skin, forced feeding including gavage with colostrum.

958 Reports suggest that there is an increased risk of mortality and morbidity in perinatal lamb and
 959 cattle clones but not in perinatal clone of swine and goat. Clones exhibiting LOS may require
 960 additional supportive care at birth. Planned Caesarean sections combined with special postnatal
 961 resuscitation measures for the clone neonates may reduce this problem. Calf clones are slower
 962 to reach normal levels of various physiological measures than their conventional counterparts
 963 (Chavatte-Palmer and Guillomot, 2007; Batchelder *et al.*, 2007b). Endocrine studies of cloned
 964 calves have shown lower cortisol concentrations at birth, although according to Batchelder *et*
 965 *al.* these results are difficult to interpret because controls were not born by the same method
 966 (Chavatte-Palmer *et al.*, 2002; Matsuzaki and Shiga, 2002; Batchelder *et al.*, 2007b).

967 Even though the foetus is not able to feel pain at early stages of gestation, there is increasing
 968 evidence that early exposure to noxious stimuli may produce permanent developmental
 969 changes. Hence, noxious stimuli may not need to penetrate consciousness in order to cause
 970 irreversibly changes in central nervous system development. Painful stimuli in late gestation
 971 have also been shown to cause irreversible effects on later development (Smythe *et al.*, 1994;
 972 Grunau *et al.*, 1994a; Grunau *et al.*, 1994b; Lloyd-Thomas and Fitzgerald, 1996; Braastad *et*
 973 *al.*, 1998). In cloning the frequency of placenta dysfunction is increased and, therefore, foetal
 974 stress could arise due to altered oxygen exchange or altered placental blood barrier.

975 Stress elicited in the dam carrying cloned foetuses, such as pain or distress during late gestation
 976 and calving due to large foetuses, may also affect the foetus. It is not known whether early
 977 pregnancy distress exists in dams carrying cloned foetuses. Small variations in endogenous
 978 steroid hormones have been shown to exert programming effects on the developing brain
 979 (Ward and Weisz, 1980; Sikich and Todd, 1988; Grimshaw *et al.*, 1995; Martinez-Cerdeno *et*
 980 *al.*, 2006; Roselli *et al.*, 2007).

981

982 **4.2.3.2. Welfare of clones between birth and weaning**

983 The period immediately after birth is a critical time for all newborns as the cardiovascular,
 984 respiratory and other organ systems adapt to life outside the womb. Neonatal animals delivered
 985 naturally show a number of compensatory and regulatory mechanisms to minimize the stress of
 986 birth. Hence, even though a neonatal animal can certainly show severe signs of abnormal
 987 function e.g. so-called respiratory distress, it does not necessarily mean it is experiencing or
 988 feeling an adverse effect, as adults might experience. In fact, mild postnatal stressors might
 989 instigate beneficial consequences relating to stress coping, fearfulness and learning ability
 990 (Casolini *et al.*, 1997).

In LOS calves and lambs these stressors are likely to be detrimental and cause pain, but in apparently normal clones or clones that can be effectively resuscitated after birth the pain and stress experienced during birth or postnatally may be no greater than in their sexually reproduced counterparts, whether they are delivered naturally or by Caesarean section.

4.2.3.3. *Welfare of clones between weaning and puberty/slaughter/end of their natural life*

After the perinatal period, no significant differences were detected between clones and controls for a number of parameters in cattle and pigs. Also no data on welfare effects have been reported in clones approaching reproductive maturity compared with conventional animals. However, these indications have to be seen in the light of the few available studies and at present there are no studies available on the longevity of animal clones.

It is unlikely that non-genetically based abnormal behaviour traits of the source animal will occur in the clone (F0). A comparison of four F0 clones from one 13-year old Holstein cow with four age-matched control heifers was made to determine whether juvenile clones from an aged adult behave similarly to their age-matched controls and whether clones with identical genetic makeup exhibit any behavioural trends (Savage *et al.*, 2003). A range of behavioural indicators and behaviour challenge tests were performed but no significant differences were observed except that the clones tended to exhibit less play behaviour than the others. Trends were observed indicating that the cattle clones “exhibited higher levels of curiosity, more grooming activities and were more aggressive and dominant than controls.”

An observation of 5 clones (from 3 different origins) and 5 non-clone Holstein heifers has indicated that social relationships (agonistic and non-agonistic behaviours) were not different between the two groups (Coulon *et al.*, 2007). When exposed to an unfamiliar environment, heifer clones showed more exploratory behaviour than controls, however the authors concluded that this difference was probably related to the early management of the animals.

Archer *and co-workers* (Archer *et al.*, 2003b; Archer *et al.*, 2003c) observed daily activity, reactions to new events, and food preferences in two genetically identical Duroc clone litters consisting of 5 and 4 pigs, respectively, and two non-clone Duroc litters each of 4 pigs. They found that the clones were similar but more variable than the non-clone controls. However according to Shutler *et al.*, the study design was not amendable for inferential statistics, in addition to the considerable statistical noise in the study (Shutler *et al.*, 2005).

From the few publications available, and taking into account the very small sample sizes used, it is difficult to draw any conclusions on possible behavioural differences between clones and their age-matched controls. In addition any observed differences should be considered with caution as the social behaviour and reactivity are dependent on the early environment of the animal (Veissier *et al.*, 1994) and on their genetic background (Le Neindre, 1989). In particular calf clones were subjected to more intensive care which could explain the few differences observed. Another explanation is that the few differences observed could be due to the fact that the calf clones had experienced stress during the gestation. One route of prenatal stress between mother and foetus involves maternal glucocorticoids and this effect is mediated through the transplacental crossing of glucocorticoids from mother to foetus, at least in the last part of gestation. In conventional animals, such stress has been described as changing the post-natal behaviour of male goats (Roussel *et al.*, 2005) and calves (Lay *et al.*, 1997).

4.2.4. *Welfare of progeny (F1)*

No studies on the welfare of the progeny of clones have been reported in livestock species.

4.2.5. Conclusions on animal welfare

- The cloning procedure itself does not affect the welfare of the animals from which the somatic cell nucleus and oocyte are obtained.
- Reduced welfare of clones is assumed to occur as a consequence of adverse health outcomes.
- The occurrence of late gestational losses, dystocia and large offspring in SCNT is likely to affect the welfare of the surrogate dams carrying calf clones. The frequency of those adverse health outcomes is higher in SCNT than *in vitro* or *in vivo* reproduction.
- Due to the low efficiency of the cloning process, a high number of surrogate dams are required to produce a low number of clones.
- No long term studies on welfare of clones are available.

5. Safety of meat and milk from clones (F0) and their progeny (F1)

5.1. Criteria for safety evaluation of meat and milk

In line with the recommended safety assessment strategy on a case-by case consideration of the molecular, biological and chemical characteristics of the food and the determination of the need for, and scope of, traditional toxicological testing (WHO, 1990), the Scientific Committee considered the following six aspects for the evaluation of the safety of bovine milk and meat from cattle and pigs derived from clones and their progeny in comparison with milk and meat from sexually reproduced animals.

Comparison with conventional counterparts: Compositional data of products derived from animal clones (F0) and their progeny (F1) are compared with the corresponding products obtained from sexually generated animals which have a long term history of safe use. Comparisons preferably include details of nutritional composition and comparative analyses of contaminants including veterinary medicinal products residues.

Probability of novel constituents to be present: Animals commonly used for food production have never developed organs and/or metabolic pathways specialized for producing toxicants to kill prey or avoid predation as is the case for some wild animal species. Therefore, it is highly unlikely in domesticated animals that genes, coding for “silent” pathways to produce intrinsic toxicants, exist or that their expression is possible even in the case of epigenetic dysregulation. This is in contrast to many food plant families, which do contain genes that code for inherent toxic constituents of the organism such as glycoalkaloids in potatoes, furocoumarins in celery or nicotine in eggplants. Further, as no new DNA sequences have been introduced into the clones, the occurrence of new substances, such as toxicants or allergens, is not expected.

Healthy animals: It is worth considering that, within the EU, animals belonging to species used for meat production are individually inspected ante- and post-mortem to check whether they meet existing regulatory requirements, without regard for the method employed in their breeding. Moreover, meat and milk are subjected to safety and quality controls, under specific European provisions, before they can be used for human consumption. Therefore, only food products from healthy animal clones and their progeny, which are indistinguishable at veterinary inspection from conventionally-bred animals, would enter the food chain. This means that all animals, including clones for which genome reprogramming has not been successful and which show ill health, would be condemned prior to or at slaughter and would, therefore, be excluded from the human food supply.

Toxicity testing: Conventional toxicity tests are designed for low molecular weight chemicals and have major limitations for the testing of whole food. Foodstuffs are bulky, lead to satiation and can only be included in laboratory animal diets at lower multiples of expected human

intakes. In addition, a key factor to consider in conducting animal studies on whole foods is the nutritional value and balance of the diets used, to avoid the induction of adverse effects, which are not related directly to the material itself (Advisory Committee on Novel Foods and Processes and ACNFP, 1998). The testing of large amounts of milk and meat may be a particular problem in laboratory rodents with respect to departure from their normal diet, which is primarily plant-based.

Residue levels: The level of chemical contamination of meat and milk is influenced by feeding, environmental conditions and veterinary medication. As animal clones (F0) generally need more intensive care, especially in the early life stages of growth and development, the levels of veterinary medicinal products treatment are likely to be higher than those of their natural comparators, but no reliable data are available on comparative levels of veterinary drug residue levels. However, veterinary medicinal products residues in meat and milk have to comply with existing EU regulations.

Microbiological aspects: Although clinically ill animals, including clones, and their products, are excluded from the food chain, it remains important to also consider whether and to what extent products such as meat and milk derived from clinically-healthy animal clones may carry zoonotic and other food-borne agents of concern. If the immunological competence of clones were compromised in the absence of clinical signs, some zoonotic agents, such as VTEC and *Coxiella burnettii*, whose virulence or pathogenicity for food animals is less than that for humans, could be present at significant levels in meat or milk derived from clinically healthy cattle or pig clones unless, for instance an (otherwise undesirable) wider use of antimicrobial therapeutic agents were to be adopted. At present, from the limited data available there are no indications that healthy clones have less functional immune systems than their conventional counterparts, however further data would be useful to compare the immune status and function of clones with conventionally bred animals before and following immune challenge.

5.2. Meat and milk composition from clones (F0) and progeny of clones (F1)

The composition of milk and meat from cows is influenced *inter alia* by the nature of the animal feed and environment they live in, leading to large inter-individual variability in foods derived from conventional animals (Palmquist *et al.*, 1993; Mir *et al.*, 2005). If subtle changes have occurred that would alter the presence of important nutrients, the most likely dietary risk for humans would be the absence of, or significant decrease in levels of vitamins and minerals whose daily requirements are in large part met by milk or meat. Therefore, nutrients for which milk or meat make a large contribution to the total daily dietary intake in humans should be considered. Compositional data of meat and milk based on reference databases obtained from sexually-reproduced animals are available for comparison with that of clones and their progeny (Jensen *et al.*, 1995; Caballero, 2003; Belitz, 2004).

Several relevant studies with respect to human nutrition have been conducted on the composition of bovine milk and meat from cattle and pigs derived from clones (F0) or their progeny (F1). These analyses included carcass characteristics, water, fat, proteins and carbohydrate content, amounts and distribution of amino acids, fatty acids, vitamins and minerals, and in the case of milk, volume per lactation (Diles, 1996; Walsh *et al.*, 2003; Takahashi and Ito, 2004; Tome *et al.*, 2004; Norman and Walsh, 2004a; Norman *et al.*, 2004b; Tian *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2007; Heyman *et al.*, 2007a; Yang *et al.*, 2007b).

In an extensive study, more than 150 parameters in 37 cow clones (F0) from 3 independent cloning experiments and 38 control animals were examined over a 3-year period and consisted of more than 10,000 individual measurements (Heyman *et al.*, 2007a). In this study some slight

1128 changes were observed in all 3 groups of clones, compared with their controls, e.g. in fatty acid
1129 composition of milk and muscle of bovine clones (F0) and a slight increase of stearoyl-CoA
1130 desaturase in milk and muscle. However, these variations were still within the normal range.

1131 The Viagen data included meat composition data for five pig clones and 15 comparator animals
1132 and no biologically relevant differences were observed in fatty acid, amino acid, cholesterol,
1133 mineral and vitamin values. In a study of the composition of pig clone offspring, 242 offspring
1134 (F1) from one boar clone and 162 control pigs from the same breed were compared (Walker *et al.*,
1135 2007). In this study 58 parameters consisting of more than 24 000 individual measurements
1136 were examined. Only 3 individual values of the offspring were different from the normal range
1137 of the controls and 2 out of the 3 were within the normal range found in pigs, according to the
1138 USDA database.

1139 In summary, none of the studies mentioned in this section has identified any differences outside
1140 the normal variability in the composition of meat (cattle and swine) and milk (cattle) between
1141 clones or clone progeny, and their comparators. In addition no novel constituents have been
1142 detected in products from clones or their progeny.

1143 5.3. Toxicity and allergenicity studies

1144 5.3.1. Feeding studies

1145 A subchronic oral feeding study (14 weeks) was conducted in rats to determine the effects of a
1146 diet containing meat and milk derived from embryonic and somatic clones. Rats were not
1147 affected by the consumption of meat and milk from bovine clones (Yamaguchi *et al.*, 2007).
1148 Similar results were obtained by in a 21-day feeding test with a diet containing milk and meat
1149 from cattle clones (F0) (Heyman *et al.*, 2007a). A 12-month oral toxicity study in the rat
1150 (including reproduction) with meat and milk from the progeny of cattle clones (F1) is under
1151 way in Japan and results are expected early 2008.

1152 5.3.2. Genotoxicity

1153 Meat derived from cattle clones did not show any genotoxic potential in the mouse
1154 micronucleus assay (Takahashi and Ito, 2004).

1155 5.3.3. Allergenicity

1156 Rats fed for several weeks with milk and meat from cattle clones and controls developed, as
1157 expected, a weak immune reaction. This reaction was qualitatively and quantitatively similar in
1158 rats given milk or meat either from clones or controls. The antibodies were in both cases IgG,
1159 IgA and IgM but not IgE, indicating that the consumption of the cattle products induced a
1160 classical immune response but no allergenic effect (Takahashi and Ito, 2004).

1161 The allergenic potential of several *in vitro* digested samples of meat and milk from cattle
1162 clones (F0) and controls was further assessed by intraperitoneal injection into mice following a
1163 classical immunization protocol. No statistically significant difference in the allergenic
1164 potential was observed between samples from clones and comparator control cattle (Takahashi
1165 and Ito, 2004). Also Heyman *et al.* did not detect differences in the allergenicity of milk and
1166 meat obtained from clones, in the rat compared with the same food products derived from non-
1167 cloned animals, age and sex-matched, maintained under the same conditions (Heyman *et al.*,
1168 2007a).

Although these results are only indicative as the rat and mouse models are not specific for human allergenicity testing (WHO/FAO, 2001), in the case of cloning, changes in the primary protein structure or the presence of novel proteins in the edible products of clones and their progeny are not expected.

5.4. Conclusions on food safety

Considering that:

- Healthy clones show no significant differences in physiological parameters from their healthy conventional counterparts (see Chapter 4).
- Any animal including clones, showing evidence of clinical disease would be detected during routine inspections and quality controls, since all food animals must meet existing regulatory requirements in order to be lawfully marketed in Europe. It is assumed that such inspections and quality controls would exclude from the food chain animals with signs of disease, lesions or abnormalities, regardless of whether they are clones or sexually-reproduced animals.
- No differences outside the normal variability have been observed in the composition and nutritional value of meat (cattle and swine) and milk (cattle) between healthy clones or clone progeny and their healthy conventional counterparts.
- No toxicological effects of milk and meat have been observed in the studies performed.

It can be concluded that it is unlikely that clones from cattle and swine, their progeny, and food derived from them, might differ from their conventional counterparts with regard to parameters which may affect food safety.

6. Impact on the environment and genetic diversity

Cloning offers opportunities to save endangered species or livestock breeds and can be used to restore populations from infertile or castrated animals. This implies preservation of the DNA in frozen cells. Cryopreserved tissue samples (for example skin), which are easier to obtain than gametes or embryos, or tissue obtained from infertile animals, can be used to generate reproductively capable animals that could be used in subsequent breeding programs to expand endangered populations.

There is no expectation that clones or their progeny would pose any new or additional environmental risks compared to conventionally bred animals. There is also no information to suggest that such risks may exist. Cloning does not involve changes in DNA sequences and thus no new genes would be introduced into the environment.

Cloning does not appear to have a direct effect on genetic diversity in that no new genetic modifications are introduced, but there could be an indirect effect due to overuse of a limited number of breeding animals in breeding programmes. An increased homogeneity of a genotype within a population may increase the susceptibility of an animal population to infection and other risk factors. This would also be the case in conventional breeding schemes and is not caused by cloning as such. Reduction of genetic diversity of an animal population has happened in the last 100 years when the number of livestock breeds has been significantly reduced because of the rapid spread of intensive livestock production (Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, 2007).

In the event of an overall increase in the use of veterinary medicinal products in clones due to SCNT there might be an impact on the environment, but no reliable data are available comparing veterinary medicinal product use in SCNT with ARTs or with conventional production.

6.1. Conclusions on Impact on the Environment and Genetic diversity

Based on current knowledge:

- There is no expectation that clones or their progeny would pose any new or additional environmental risks compared to conventionally-bred animals. There is also no information to suggest that such risks may exist.
- SCNT technology as such is not expected to adversely affect the genetic diversity of domestic species. However, as with other ARTs, SCNT could, by extensive or inappropriate use, increase homogeneity of a genotype within a population, and therefore increase susceptibility of the animal population to infectious agents and other risk factors.

OVERALL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS IN RELATION TO CATTLE AND PIGS

CONCLUSIONS

Somatic cell nucleus transfer (SCNT) is a relatively new technology and the available data for risk assessment are limited. Uncertainties in the assessment arise from the small sample sizes investigated in most studies and the biological variability underlying the SCNT process. Although the studies assessed in this scientific opinion were not conducted to address a systematic set of questions, they are, however, convergent in their general results. In the present opinion, the current available data allowed an assessment of cattle and pig clones and their progeny.

Healthy clones and their offspring indicate that SCNT can be successfully used as a reproductive technique in cattle and pigs. These healthy clones and healthy offspring do not show any significant differences from their conventional counterparts in any of the measures that have been evaluated, such as physiological parameters, behaviour, and clinical examination.

The health and welfare of a significant proportion of clones has been found to be adversely affected. The proportion of adversely affected clones could decrease as a result of good animal management and as the technology improves. Unhealthy clones must not be used for breeding.

The main uncertainties associated with the assessment of SCNT come from determining whether the reprogramming of the genome from a differentiated state is successful, since epigenetic dysregulation may have a major impact on the health and physiology of the clone.

Unhealthy clones are presumed to be removed at clinical inspections and quality controls and therefore should not enter the food chain, as also unhealthy conventionally bred animals are excluded. Food products obtained from healthy cattle and pig clones and their offspring, i.e. meat and milk, are within the normal range with respect to the composition of similar products obtained from conventionally-bred animals. It is very unlikely that any difference exists in terms of food safety between food products from clones and their progeny compared with conventionally-bred animals. Currently no environmental impact is foreseen but there are only limited data available.

Based on current knowledge there is no expectation that clones or their progeny would introduce any new food safety risks compared with conventionally bred animals.

RECOMMENDATIONS

- The Scientific Committee recommends that the health and welfare of clones are monitored during their full natural life.

- 1258 ▪ It is acknowledged that other food species have also been produced via SCNT and risk
 1259 assessments should be performed on these species when relevant data become available.
- 1260 ▪ The Scientific Committee also recommends that this opinion be updated in the light of
 1261 developments with cloning and/or with new relevant data.

1262 **Additional recommendations arising from the specific sections**

1263 In relation to epigenetic and genetic aspects of SCNT it is recommended to:

- 1264 ▪ Confirm that epigenetic dysregulation occurring in clones is not transmitted to the
 1265 progeny (F1).
 1266 ▪ Investigate the extent to which SCNT may induce DNA mutations.
 1267 ▪ Clarify the possible consequences of mitochondrial heterogeneity in SCNT.
 1268 ▪ Investigate the reproducibility of telomere length in clones derived from different cell
 1269 sources and the implications of these findings.
 1270

1271 In relation to animal health it is recommended to:

- 1272 ▪ Consider the possible effects of SCNT on the longevity of cattle and swine clones and
 1273 on the health of aging clones.
 1274 ▪ Investigate the causes of unexplained pathologies and mortality observed in clones
 1275 during the gestational and postnatal periods and occasionally observed in adulthood.
 1276 ▪ Implement permanent surveillance and registration of the health conditions of clones to
 1277 allow the identification of the possible sensitivity of clones and their offspring in regard
 1278 to certain diseases and infectious agents.
 1279 ▪ Compare the immune status and function of clones with conventionally bred animals, at
 1280 different ages, before and following immune challenge under conventional husbandry
 1281 conditions.
 1282 ▪ Consider the health status of the animals being sources of the somatic cell nucleus and
 1283 oocyte and the surrogate dams to avoid the transmission of specific agents and
 1284 infections to clones.
 1285

1286 In relation to animal welfare it is recommended to:

- 1287 ▪ Perform comparative studies on animal welfare, including behavioural studies, in
 1288 healthy clones under normal husbandry conditions.
 1289 ▪ Measure in the pregnant bovine surrogate dam, specific maternal pregnancy serum
 1290 proteins (e.g. PSP60) at an early pregnancy stage (Day 50 or even Day 34) as an early
 1291 predictor of abnormal foetal development and which could lead to a more specific care
 1292 of the surrogate dam.
 1293

1294 In relation to food safety it is recommended to:

- 1295 ▪ Collect additional data on the health of clones (F0) at different life stages, as well as
 1296 data on the characteristics of meat from cattle and swine clones and milk from cattle
 1297 clones.
 1298 ▪ Routinely monitor the levels of chemical contaminants, in particular of veterinary
 1299 medicinal product residues, in the meat and milk of cloned animals, to ensure that such
 1300 meat and milk from cloned animals entering the food chain do not exceed permitted
 1301 levels.
 1302

- 1303 In relation to the impact on the environment and genetic diversity it is recommended to:
- 1304 ▪ Take specific care of genetically-transferred conditions and disease susceptibility when
- 1305 setting up breeding programs involving SCNT.
- 1306 ▪ Use SCNT technology in such a way as to prevent the reduction of genetic diversity.

1307 **INFORMATION MADE AVAILABLE TO EFSA**

1308 EFSA published a call for data on its website between 27 April and 29 May 2007.

1309 Information was received from the following organisations:

1310

1311

1312 **AAVS (American Anti-Vivisection Society), USA**

- 1313 - Comments on the FDA Draft Risk Assessment. 47 pages.

1314

1315 **BIO (Biotechnology Industry Organisation), Belgium**

- 1316 - BIO Comments to EFSA, Implications of animal cloning, May 29, 2007. 5
- 1317 pages

1318

1319 **Center for Food Safety, USA**

- 1320 - Report: Not Ready for Prime Time. FDA's Flawed Approach To Assessing The
- 1321 Safety Of Food From Animal Clones. 25 Pages
- 1322 - Citizen Petition before the United States Food and Drug Administration,
- 1323 Petition seeking regulation of cloned animals. 24 Pages.

1324

1325 **CIWF (Compassion in World Farming), United Kingdom**

- 1326 - Report: Farm Animal Cloning from an Animal Welfare Perspective. 10 pages

1327

1328 **Danish Centre for Bioethics and Risk Assessment Institute of Food and Resource**
1329 **Economics, Denmark**

- 1330 - Information on current research activities and selected references.

1331

1332 **EFFAB (European Forum of Farm Animal Breeders), The Netherlands**

- 1333 - The importance of cloning in bovine selection. 2 pages
- 1334 - The European Perspective for Livestock Cloning. 19 pages
- 1335 - Summary. 2 pages
- 1336 - Possibilities and Concerns – Perspectives of Farm Animal Breeders. 24 pages

1337

1338 **Faculty of Agricultural Sciences at Aarhus University, Denmark**

- 1339 - Information on current research activities and selected references.

1340

1341 **IETS (International Embryo Transfer Society), USA**

- 1342 - Terms of Reference for Food Safety Subcommittee of the International Embryo
- 1343 Transfer Society (IETS) Health and Safety Advisory Committee (HASAC). 2
- 1344 pages

1345

- 1346 - Terms of Reference for Research Subcommittee of the International Embryo
- 1347 Transfer Society (IETS) Health and Safety Advisory Committee (HASAC). 2
- 1348 Pages

1349

1350 **Institut national de la recherche agronomique INRA (Jouy-en-Josas), France**

- 1351 - Information on current research activities and selected references.

1352

1353 **I-SiS (Institute of Science in Society), United Kingdom**

- 1354 - Is FDA Promoting or Regulating Cloned Meat and Milk? 7 pages
- 1355 - Cloned BSE-Free Cows, Not Safe Nor Proper Science. 8 pages

1356

1357 **ViaGen Inc, USA**

1358

– Letter. 3 pages

1359

– Data (29 files, XL and Word) provided to US FDA. This data is publicly available in the US FDA 2006 Report. “Animal Cloning: A draft risk assessment”, Appendix F, which can be found at:

1360

1361

<http://www.fda.gov/cvm/CloneRiskAssessment.htm>

1362

1363

(Accessed 14 December 2007)

REFERENCES

- Advisory Committee on Novel Foods and Processes (ACNFP) 1998. Toxicological assessment of novel (including GM) foods. HMSO, London
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) 2005. Risks and benefits related to livestock cloning applications. pages 1-54.
- Archer, G. S., Dindot, S., Friend, T. H., Walker, S., Zaunbrecher, G., Lawhorn, B. and Piedrahita, J. A. 2003a. Hierarchical phenotypic and epigenetic variation in cloned swine. *Biol Reprod* 69 (2): 430-6.
- Archer, G. S., Friend, T. H., Piedrahita, J., Nevill, C. H. and Walker, S. 2003b. Behavioral variation among cloned pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 82 (2): 151.
- Archer, G. S., Friend, T. H., Piedrahita, J., Nevill, C. H. and Walker, S. 2003c. Behavioral variation among cloned pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 81 (4): 321.
- Arnold, D. R., Bordignon, V., Lefebvre, R., Murphy, B. D. and Smith, L. C. 2006. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction* 132 (2): 279-90.
- Balbach, S. T., Jauch, A., Bohm-Steuer, B., Cavaleri, F. M., Han, Y. M. and Boiani, M. 2007. Chromosome stability differs in cloned mouse embryos and derivative ES cells. *Dev Biol* 308 (2): 309-21.
- Batchelder, C. A., Bertolini, M., Mason, J. B., Moyer, A. L., Hoffert, K. A., Petkov, S. G., Famula, T. R., Angelos, J., George, L. W. and Anderson, G. B. 2007a. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. *Cloning Stem Cells* 9 (1): 63-82.
- Batchelder, C. A., Bertolini, M., Mason, J. B., Moyer, A. L., Hoffert, K. A., Petkov, S. G., Famula, T. R., Angelos, J., George, L. W. and Anderson, G. B. 2007b. Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematologic and biochemical profiles. *Cloning Stem Cells* 9 (1): 83-96.
- Batchelder, C. A., Hoffert, K. A., Bertolini, M., Moyer, A. L., Mason, J. B., Petkov, S. G., Famula, T. R. and Anderson, G. B. 2005. Effect of the nuclear-donor cell lineage, type, and cell donor on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Cloning Stem Cells* 7 (4): 238-54.
- Beaujean, N., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R. and Young, L. 2004. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 71 (1): 185-93.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P., 2004. Food Chemistry. Editor. Springer-Verlag GmbH, Pages.
- Betts, D. H., Perrault, S. D., Petrik, J., Lin, L., Favetta, L. A., Keefer, C. L. and King, W. A. 2005. Telomere length analysis in goat clones and their offspring. *Mol Reprod Dev* 72 (4): 461-70.
- Bielanski, A. 1997. A review on disease transmission studies in relationship to production of embryos by in vitro fertilization and to related new reproductive technologies. *Biotechnol Adv* 15 (3-4): 633-56.
- Booth, P. J., Viuff, D., Tan, S., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. 2003. Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. *Biol Reprod* 68 (3): 922-8.

- 1408 Braastad, B. O., Osadchuk, L. V., Lund, G. and Bakken, M. 1998. Effects of prenatal handling
1409 stress on adrenal weight and function and behaviour in novel situations in blue fox cubs
1410 (Alopex lagopus). *Applied Animal Behaviour Science* 57 (1-2): 157-169.
- 1411 Brambrink, T., Hochedlinger, K., Bell, G. and Jaenisch, R. 2006. ES cells derived from cloned
1412 and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. *Proc Natl*
1413 *Acad Sci USA* 103 (4): 933-8.
- 1414 Caballero, B. 2003. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Editor. Elsevier Science Ltd.
- 1415 Camargo, L. S., Viana, J. H., Sa, W. F., Ferreira, A. M. and Vale Filho, V. R. 2005.
1416 Developmental competence of oocytes from prepubertal Bos indicus crossbred cattle. *Anim*
1417 *Reprod Sci* 85 (1-2): 53-9.
- 1418 Casolini, P., Cigliana, G., Alema, G. S., Ruggieri, V., Angelucci, L. and Catalani, A. 1997.
1419 Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid
1420 receptors, stress response and learning in offspring in the early stages of life. *Neuroscience*
1421 79 (4): 1005-12.
- 1422 Charlier, C., Segers, K., Karim, L., Shay, T., Gyapay, G., Cockett, N. and Georges, M. 2001.
1423 The callipyge mutation enhances the expression of coregulated imprinted genes in cis
1424 without affecting their imprinting status. *Nat Genet* 27 (4): 367-9.
- 1425 Chavatte-Palmer, P., de Sousa, N., Laigre, P., Camous, S., Ponter, A. A., Beckers, J. F. and
1426 Heyman, Y. 2006. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein
1427 secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology* 66
1428 (4): 829-840.
- 1429 Chavatte-Palmer, P. and Guillomot, M. 2007. Comparative implantation and placentation.
1430 *Gynecol Obstet Invest* 64 (3): 166-74.
- 1431 Chavatte-Palmer, P., Heyman, Y., Richard, C., Monget, P., LeBourhis, D., Kann, G., Chilliard,
1432 Y., Vignon, X. and Renard, J. P. 2002. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics
1433 of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* 66 (6): 1596-603.
- 1434 Chavatte-Palmer, P., Remy, D., Cordonnier, N., Richard, C., Issenman, H., Laigre, P., Heyman,
1435 Y. and Mialot, J. P. 2004. Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells*
1436 6 (2): 94-100.
- 1437 Cho, S. K., Kim, J. H., Park, J. Y., Choi, Y. J., Bang, J. I., Hwang, K. C., Cho, E. J., Sohn, S.
1438 H., Uhm, S. J., Koo, D. B., Lee, K. K., Kim, T. and Kim, J. H. 2007. Serial cloning of pigs
1439 by somatic cell nuclear transfer: Restoration of phenotypic normality during serial cloning.
1440 *Dev Dyn* 236 (12): 3369-82.
- 1441 Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.
1442 A. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal
1443 fibroblasts. *Science* 280 (5367): 1256-8.
- 1444 Coan, P. M., Burton, G. J. and Ferguson-Smith, A. C. 2005. Imprinted genes in the placenta--a
1445 review. *Placenta* 26 Suppl A: S10-20.
- 1446 Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, F. 2007. The State of the World's
1447 Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO. 1-523.
- 1448 Constant, F., Guillomot, M., Heyman, Y., Vignon, X., Laigre, P., Servely, J. L., Renard, J. P.
1449 and Chavatte-Palmer, P. 2006. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric
1450 analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies
1451 complicated by hydrallantois. *Biol Reprod* 75 (1): 122-30.

- 1452 Cooney, C. A., Dave, A. A. and Wolff, G. L. 2002. Maternal methyl supplements in mice affect
 1453 epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 132 (8 Suppl): 2393S-2400S.
- 1454 Coulon, M., Baudoin, C., Depaulis-Carre, M., Heyman, Y., Renard, J. P., Richard, C. and
 1455 Deputte, B. L. 2007. Dairy cattle exploratory and social behaviors: is there an effect of
 1456 cloning? *Theriogenology* 68 (8): 1097-103.
- 1457 De Sousa, P. A., Dobrinsky, J. R., Zhu, J., Archibald, A. L., Ainslie, A., Bosma, W., Bowering,
 1458 J., Bracken, J., Ferrier, P. M., Fletcher, J., Gasparrini, B., Harkness, L., Johnston, P.,
 1459 Ritchie, M., Ritchie, W. A., Travers, A., Albertini, D., Dinnyes, A., King, T. J. and Wilmut,
 1460 I. 2002. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and
 1461 integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol*
 1462 *Reprod* 66 (3): 642-50.
- 1463 Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E. and Reik, W.
 1464 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant
 1465 reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (24): 13734-8.
- 1466 Diles, J. J. B., Green, R. D., Shepherd, H. H., Mathiews, G. L., Hughes, L. J., Miller, M. F.
 1467 1996. Relationships between body measurements obtained on yearling Brangus bulls and
 1468 measures of carcass merit obtained from their steer clone-mates. *The Professional Animal*
 1469 *Scientist* (12): 244-249.
- 1470 Dinglasan, R. R. and Jacobs-Lorena, M. 2005. Insight into a conserved lifestyle: protein-
 1471 carbohydrate adhesion strategies of vector-borne pathogens. *Infect Immun* 73 (12): 7797-
 1472 807.
- 1473 Du, Y., Kragh, P. M., Zhang, Y., Li, J., Schmidt, M., Bogh, I. B., Zhang, X., Purup, S.,
 1474 Jorgensen, A. L., Pedersen, A. M., Villemoes, K., Yang, H., Bolund, L. and Vajta, G. 2007.
 1475 Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without
 1476 micromanipulation. *Theriogenology* 68 (8): 1104-10.
- 1477 Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W., 3rd, Yanagimachi, R. and Jaenisch, R.
 1478 2000. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* 290 (5496): 1578-81.
- 1479 Enright, B. P., Taneja, M., Schreiber, D., Riesen, J., Tian, X. C., Fortune, J. E. and Yang, X.
 1480 2002. Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biol*
 1481 *Reprod* 66 (2): 291-6.
- 1482 Erne, J. B., Walker, M. C., Strik, N. and Alleman, A. R. 2007. Systemic infection with
 1483 *Geomyces* organisms in a dog with lytic bone lesions. *J Am Vet Med Assoc* 230 (4): 537-40.
- 1484 Estrada, J., Sommer, J., Collins, B., Mir, B., Martin, A., York, A., Petters, R. M. and
 1485 Piedrahita, J. A. 2007. Swine generated by somatic cell nuclear transfer have increased
 1486 incidence of intrauterine growth restriction (IUGR). *Cloning Stem Cells* 9 (2): 229-36.
- 1487 Farin, P. W. and Farin, C. E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro:
 1488 survival and fetal development. *Biol Reprod* 52 (3): 676-82.
- 1489 Farin, P. W., Piedrahita, J. A. and Farin, C. E. 2006. Errors in development of fetuses and
 1490 placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65 (1): 178-91.
- 1491 FDA 2006. Animal Cloning: A draft risk assessment. Center for Veterinary Medicine, US Food
 1492 and Drug Administration. 1-358, Appendix A-H.
- 1493 Forsberg, E. J., Strelchenko, N. S., Augenstein, M. L., Betthauser, J. M., Childs, L. A.,
 1494 Eilertsen, K. J., Enos, J. M., Forsythe, T. M., Golueke, P. J., Koppang, R. W., Lange, G.,
 1495 Lesmeister, T. L., Mallon, K. S., Mell, G. D., Misica, P. M., Pace, M. M., Pfister-Genskow,

- 1496 M., Voelker, G. R., Watt, S. R. and Bishop, M. D. 2002. Production of cloned cattle from in
1497 vitro systems. *Biol Reprod* 67 (1): 327-33.
- 1498 Galli, C., Duchi, R., Moor, R. M. and Lazzari, G. 1999. Mammalian leukocytes contain all the
1499 genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning* 1 (3): 161-
1500 70.
- 1501 Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R. and Lazzari,
1502 G. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424 (6949): 635.
- 1503 Gardner, D. K. and Lane, M. 2005. Ex vivo early embryo development and effects on gene
1504 expression and imprinting. *Reprod Fertil Dev* 17 (3): 361-70.
- 1505 Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Beedle, A. S. 2007a. Early life events and their
1506 consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol*
1507 19 (1): 1-19.
- 1508 Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Beedle, A. S. 2007b. Non-genomic transgenerational
1509 inheritance of disease risk. *Bioessays* 29 (2): 145-54.
- 1510 Grimshaw, G. M., Sitarenios, G. and Finegan, J. A. 1995. Mental rotation at 7 years: relations
1511 with prenatal testosterone levels and spatial play experiences. *Brain Cogn* 29 (1): 85-100.
- 1512 Grunau, R. V. E., Whitfield, M. F. and Petrie, J. H. 1994a. Pain sensitivity and temperament in
1513 extremely low-birth-weight premature toddlers and preterm and full-term controls. *Pain* 58
1514 (3): 341-346.
- 1515 Grunau, R. V. E., Whitfield, M. F., Petrie, J. H. and Fryer, E. L. 1994b. Early pain experience,
1516 child and family factors, as precursors of somatization: a prospective study of extremely
1517 premature and fullterm children. *Pain* 56 (3): 353-359.
- 1518 Gschwind, D., Hassig, M. and Bleul, U. 2003. [Retrospective study of the fertility outlook in
1519 cows after caesarean section]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 145 (4): 161-7.
- 1520 Hashizume, K., Ishiwata, H., Kizaki, K., Yamada, O., Takahashi, T., Imai, K., Patel, O. V.,
1521 Akagi, S., Shimizu, M., Takahashi, S., Katsuma, S., Shiojima, S., Hirasawa, A., Tsujimoto,
1522 G., Todoroki, J. and Izaike, Y. 2002. Implantation and placental development in somatic cell
1523 clone recipient cows. *Cloning Stem Cells* 4 (3): 197-209.
- 1524 Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., Berthelot, V., Fromentin, G., Hocquette, J. F., Martignat, L.
1525 and Renard, J. P. 2007a. Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative
1526 approach. *Theriogenology* 67 (1): 134-41.
- 1527 Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., Fromentin, G., Berthelot, V., Jurie, C., Bas, P., Dubarry, M.,
1528 Mialot, J. P., Remy, D., Richard, C., Martignat, L., Vignon, X. and Renard, J. P. 2007b.
1529 Quality and safety of bovine clones and their products. *Animal* (1): 963-972.
- 1530 Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., LeBourhis, D., Camous, S., Vignon, X. and Renard, J. P.
1531 2002. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol*
1532 *Reprod* 66 (1): 6-13.
- 1533 Heyman, Y., Richard, C., Rodriguez-Martinez, H., Lazzari, G., Chavatte-Palmer, P., Vignon,
1534 X. and Galli, C. 2004. Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary
1535 results. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 111-20.
- 1536 Hiendleder, S., Mund, C., Reichenbach, H. D., Wenigerkind, H., Brem, G., Zakhartchenko, V.,
1537 Lyko, F. and Wolf, E. 2004. Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels
1538 are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro
1539 techniques. *Biol Reprod* 71 (1): 217-23.

- 1540 Hiendleder, S., Wirtz, M., Mund, C., Klempt, M., Reichenbach, H. D., Stojkovic, M., Weppert,
1541 M., Wenigerkind, H., Elmlinger, M., Lyko, F., Schmitz, O. J. and Wolf, E. 2006. Tissue-
1542 specific effects of in vitro fertilization procedures on genomic cytosine methylation levels in
1543 overgrown and normal sized bovine fetuses. *Biol Reprod* 75 (1): 17-23.
- 1544 Hiendleder, S., Zakhartchenko, V. and Wolf, E. 2005. Mitochondria and the success of somatic
1545 cell nuclear transfer cloning: from nuclear-mitochondrial interactions to mitochondrial
1546 complementation and mitochondrial DNA recombination. *Reprod Fertil Dev* 17 (1-2): 69-
1547 83.
- 1548 Hill, J. and Chavatte-Palmer, P. 2002. Pregnancy and neonatal care of cloned animals. In:
1549 Principles of cloning. J. B. Cibelli, R. P. Lanza, K. Campbell and M. D. West. Academic
1550 Press, New York, 247-266.
- 1551 Hill, J. R., Burghardt, R. C., Jones, K., Long, C. R., Looney, C. R., Shin, T., Spencer, T. E.,
1552 Thompson, J. A., Winger, Q. A. and Westhusin, M. E. 2000. Evidence for placental
1553 abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine
1554 fetuses. *Biol Reprod* 63 (6): 1787-94.
- 1555 Hill, J. R., Winger, Q. A., Burghardt, R. C. and Westhusin, M. E. 2001. Bovine nuclear transfer
1556 embryo development using cells derived from a cloned fetus. *Anim Reprod Sci* 67 (1-2): 17-
1557 26.
- 1558 Hoffert, K. A., Batchelder, C. A., Bertolini, M., Moyer, A. L., Famula, T. R., Anderson, D. L.
1559 and Anderson, G. B. 2005. Measures of maternal-fetal interaction in day-30 bovine
1560 pregnancies derived from nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 7 (4): 289-305.
- 1561 Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Friedman, A., Hochedlinger, K., Yanagimachi, R.,
1562 Lander, E. S., Golub, T. R. and Jaenisch, R. 2002. Abnormal gene expression in cloned mice
1563 derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 99
1564 (20): 12889-94.
- 1565 Inoue, K., Kohda, T., Lee, J., Ogonuki, N., Mochida, K., Noguchi, Y., Tanemura, K., Kaneko-
1566 Ishino, T., Ishino, F. and Ogura, A. 2002. Faithful expression of imprinted genes in cloned
1567 mice. *Science* 295 (5553): 297.
- 1568 Jablonka, E. and Lamb, M. J. 2002. The changing concept of epigenetics. *Ann N Y Acad Sci*
1569 981: 82-96.
- 1570 Jaenisch, R. and Wilmut, I. 2001. Developmental biology. Don't clone humans! *Science* 291
1571 (5513): 2552.
- 1572 Jensen, R. G., Couch, S. C., Bitman, J., Carlson, S. E., Hamosh, M., Newburg, D. S. and
1573 Robert, G. J. 1995. Handbook of Milk Composition. Editor. Academic Press, San Diego,
1574 Pages.
- 1575 Jeon, H. Y., Hyun, S. H., Lee, G. S., Kim, H. S., Kim, S., Jeong, Y. W., Kang, S. K., Lee, B.
1576 C., Han, J. Y., Ahn, C. and Hwang, W. S. 2005. The analysis of telomere length and
1577 telomerase activity in cloned pigs and cows. *Mol Reprod Dev* 71 (3): 315-20.
- 1578 Jiang, L., Carter, D. B., Xu, J., Yang, X., Prather, R. S. and Tian, X. C. 2004. Telomere lengths
1579 in cloned transgenic pigs. *Biol Reprod* 70 (6): 1589-93.
- 1580 Kang, Y.-K., Koo, D.-B., Park, J. S., Choi, Y.-H., Lee, K.-K. and Han, Y.-M. 2001b.
1581 Differential inheritance modes of DNA methylation between euchromatic and
1582 heterochromatic DNA sequences in ageing fetal bovine fibroblasts. 498 (1): 1-5.

- 1583 Kang, Y. K., Koo, D. B., Park, J. S., Choi, Y. H., Lee, K. K. and Han, Y. M. 2001a. Influence
1584 of oocyte nuclei on demethylation of donor genome in cloned bovine embryos. *FEBS Lett*
1585 499 (1-2): 55-8.
- 1586 Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda,
1587 Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282 (5396): 2095-
1588 8.
- 1589 Kato, Y., Tani, T. and Tsunoda, Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of
1590 male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* 120 (2): 231-7.
- 1591 Keefer, C. L., Keyston, R., Lazaris, A., Bhatia, B., Begin, I., Bilodeau, A. S., Zhou, F. J.,
1592 Kafidi, N., Wang, B., Baldassarre, H. and Karatzas, C. N. 2002. Production of cloned goats
1593 after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod* 66 (1): 199-203.
- 1594 Kishigami, S., Hikichi, T., Van Thuan, N., Ohta, H., Wakayama, S., Bui, H. T., Mizutani, E.
1595 and Wakayama, T. 2006. Normal specification of the extraembryonic lineage after somatic
1596 nuclear transfer. *FEBS Lett* 580 (7): 1801-6.
- 1597 Kremenskoy, M., Kremenska, Y., Suzuki, M., Imai, K., Takahashi, S., Hashizume, K., Yagi, S.
1598 and Shiota, K. 2006. DNA methylation profiles of donor nuclei cells and tissues of cloned
1599 bovine fetuses. *J Reprod Dev* 52 (2): 259-66.
- 1600 Kruip, T. A. M. and den Daas, J. H. G. 1997. In vitro produced and cloned embryos: Effects on
1601 pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47 (1): 43-52.
- 1602 Laible, G., Brophy, B., Knighton, D. and Wells, D. N. 2007. Compositional analysis of dairy
1603 products derived from clones and cloned transgenic cattle. *Theriogenology* 67 (1): 166-77.
- 1604 Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Blackwell, C., Cristofalo, V. J., Francis, M. K., Baerlocher, G. M.,
1605 Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E. A., Sawyer, N., Lansdorp, P. M. and West, M. D. 2000.
1606 Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic
1607 cells. *Science* 288 (5466): 665-9.
- 1608 Lay, D. C., Randel, R. D., Friend, T. H., Carroll, J. A., Welsh, T. H., Jenkins, O. C.,
1609 Neuendorff, D. A., Bushong, D. M. and Kapp, G. M. 1997. Effects of prenatal stress on the
1610 fetal calf. 14 (2): 73.
- 1611 Le Neindre, P. 1989. Influence of cattle rearing conditions and breed on social behaviour and
1612 activity of cattle in novel environments. *Applied Animal Behaviour Sciences* 23: 129-140.
- 1613 Lee, R. S., Peterson, A. J., Donnison, M. J., Ravelich, S., Ledgard, A. M., Li, N., Oliver, J. E.,
1614 Miller, A. L., Tucker, F. C., Breier, B. and Wells, D. N. 2004. Cloned cattle fetuses with the
1615 same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from
1616 artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first
1617 trimester. *Biol Reprod* 70 (1): 1-11.
- 1618 Li, N., Wells, D. N., Peterson, A. J. and Lee, R. S. 2005. Perturbations in the biochemical
1619 composition of fetal fluids are apparent in surviving bovine somatic cell nuclear transfer
1620 pregnancies in the first half of gestation. *Biol Reprod* 73 (1): 139-48.
- 1621 Liggins, G. C., Kennedy, P. C. and Holm, L. W. 1967. Failure of initiation of parturition after
1622 electrocoagulation of the pituitary of the fetal lamb. *Am J Obstet Gynecol* 98 (8): 1080-6.
- 1623 Lilja, M., Myklebust, R., Raisanen, S. and Stenfors, L. E. 1997. Selective attachment of beta-
1624 haemolytic streptococci group A to oropharyngeal epithelium in health and disease. *Acta*
1625 *Otolaryngol* 117 (5): 744-9.

- 1626 Liu, G., Kato, Y. and Tsunoda, Y. 2007. Aging of Recipient Oocytes Reduces the Development
1627 of Cloned Embryos Receiving Cumulus Cells. *J Reprod Dev* 53 (4): 785-90.
- 1628 Lloyd-Thomas, A. R. and Fitzgerald, M. 1996. Do fetuses feel pain? Reflex responses do not
1629 necessarily signify pain. *Bmj* 313 (7060): 797-8.
- 1630 Loi, P., Clinton, M., Vackova, I., Fulka, J., Jr., Feil, R., Palmieri, C., Della Salda, L. and Ptak,
1631 G. 2006. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell
1632 clones. *Theriogenology* 65 (6): 1110-21.
- 1633 Long, J. and Cai, X. 2007. Igf-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus
1634 of gene imprinting disrupted in cloned cattle. *GENE* 388 (1-2): 125-134.
- 1635 Lucifero, D., La Salle, S., Bourc'his, D., Martel, J., Bestor, T. H. and Trasler, J. M. 2007.
1636 Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. *BMC Dev*
1637 *Biol* 7: 36.
- 1638 Martin, M., Adams, C. and Wiseman, B. 2004. Pre-weaning performance and health of pigs
1639 born to cloned (fetal cell derived) swine versus non-cloned swine. *Theriogenology* 62 (1-2):
1640 113-22.
- 1641 Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S. C. and Kriegstein, A. R. 2006. Estradiol stimulates
1642 progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic
1643 neocortex. *Eur J Neurosci* 24 (12): 3475-88.
- 1644 Matsuzaki, M. and Shiga, K. 2002. Endocrine characteristics of cloned calves. *Cloning Stem*
1645 *Cells* 4 (3): 261-7.
- 1646 McConnell, J. M. L. 2006. A mitochondrial component of developmental programming. In:
1647 Developmental origins of health and disease. P. D. Gluckman and M. A. Hanson.
1648 Cambridge University Press, Cambridge, 75-81.
- 1649 Mellor, D. J. and Diesch, T. J. 2006. Onset of sentience: The potential for suffering in fetal and
1650 newborn farm animals. *Applied Animal Behaviour Science* 100 (1-2): 48-57.
- 1651 Mellor, D. J., Diesch, T. J., Gunn, A. J. and Bennet, L. 2005. The importance of 'awareness' for
1652 understanding fetal pain. *Brain Res Brain Res Rev* 49 (3): 455-71.
- 1653 Mir, B., Zaunbrecher, G., Archer, G. S., Friend, T. H. and Piedrahita, J. A. 2005. Progeny of
1654 somatic cell nuclear transfer (SCNT) pig clones are phenotypically similar to non-cloned
1655 pigs. *Cloning Stem Cells* 7 (2): 119-25.
- 1656 Norman, H. D., Lawlor, T. J., Wright, J. R. and Powell, R. L. 2004b. Performance of Holstein
1657 clones in the United States. *J Dairy Sci* 87 (3): 729-38.
- 1658 Norman, H. D. and Walsh, M. K. 2004a. Performance of dairy cattle clones and evaluation of
1659 their milk composition. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 157-64.
- 1660 Ohgane, J., Wakayama, T., Kogo, Y., Senda, S., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R. and
1661 Shiota, K. 2001. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30 (2): 45-50.
- 1662 Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry,
1663 A. C. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289 (5482):
1664 1188-90.
- 1665 Ortegon, H., Betts, D., Lin, L., Coppola, G., Perrault, S., Blondin, P. and King, W. 2007.
1666 Genomic stability and physiological assessments of live offspring sired by a bull clone,
1667 Starbuck II. *Theriogenology* 67 (1): 116-126.
- 1668 Pace, M. M., Augenstein, M. L., Betthausen, J. M., Childs, L. A., Eilertsen, K. J., Enos, J. M.,
1669 Forsberg, E. J., Golueke, P. J., Graber, D. F., Kemper, J. C., Koppang, R. W., Lange, G.,

- 1670 Lesmeister, T. L., Mallon, K. S., Mell, G. D., Misica, P. M., Pfister-Genskow, M.,
1671 Strelchenko, N. S., Voelker, G. R., Watt, S. R. and Bishop, M. D. 2002. Ontogeny of cloned
1672 cattle to lactation. *Biol Reprod* 67 (1): 334-9.
- 1673 Palmquist, D. L., Beaulieu, A. D. and Barbano, D. M. 1993. Feed and animal factors
1674 influencing milk fat composition. *J Dairy Sci* 76 (6): 1753-71.
- 1675 Panarace, M., Agüero, J. I., Garrote, M., Jauregui, G., Segovia, A., Cane, L., Gutierrez, J.,
1676 Marfil, M., Rigali, F., Pugliese, M., Young, S., Lagioia, J., Garnil, C., Forte Pontes, J. E.,
1677 Ereno Junio, J. C., Mower, S. and Medina, M. 2007. How healthy are clones and their
1678 progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology* 67 (1): 142-51.
- 1679 Peaston, A. E. and Whitelaw, E. 2006. Epigenetics and phenotypic variation in mammals.
1680 *Mamm Genome* 17 (5): 365-74.
- 1681 Philpott, M. 1993. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo
1682 transfer. *Br Vet J* 149 (4): 339-69.
- 1683 Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P. and Cuzin, F. 2007. Inheritance of an
1684 epigenetic change in the mouse: a new role for RNA. *Biochem Soc Trans* 35 (Pt 3): 623-5.
- 1685 Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I. and Cuzin, F. 2006.
1686 RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441
1687 (7092): 469-74.
- 1688 Renard, J. P., Maruotti, J., Jouneau, A. and Vignon, X. 2007. Nuclear reprogramming and
1689 pluripotency of embryonic cells: Application to the isolation of embryonic stem cells in
1690 farm animals. *Theriogenology* 68 Suppl 1: S196-205.
- 1691 Roemer, I., Reik, W., Dean, W. and Klose, J. 1997. Epigenetic inheritance in the mouse. *Curr*
1692 *Biol* 7 (4): 277-80.
- 1693 Roselli, C. E., Stadelman, H., Reeve, R., Bishop, C. V. and Stormshak, F. 2007. The ovine
1694 sexually dimorphic nucleus of the medial preoptic area is organized prenatally by
1695 testosterone. *Endocrinology* 148 (9): 4450-7.
- 1696 Roussel, S., Boissy, A., Montigny, D., Hemsworth, P. H. and Duvaux-Ponter, C. 2005. Gender-
1697 specific effects of prenatal stress on emotional reactivity and stress physiology of goat kids.
1698 *Hormones and Behaviour* 47 (3): 256-266.
- 1699 Savage, A. F., Maull, J., Tian, X. C., Taneja, M., Katz, L., Darre, M. and Yang, X. 2003.
1700 Behavioral observations of adolescent Holstein heifers cloned from adult somatic cells.
1701 *Theriogenology* 60 (6): 1097-110.
- 1702 Schaetzlein, S. and Rudolph, K. L. 2005. Telomere length regulation during cloning,
1703 embryogenesis and ageing. *Reprod Fertil Dev* 17 (1-2): 85-96.
- 1704 Senda, S., Wakayama, T., Arai, Y., Yamazaki, Y., Ohgane, J., Tanaka, S., Hattori, N.,
1705 Yanagimachi, R. and Shiota, K. 2007. DNA methylation errors in cloned mice disappear
1706 with advancement of aging. *Cloning Stem Cells* 9 (3): 293-302.
- 1707 Senda, S., Wakayama, T., Yamazaki, Y., Ohgane, J., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R.
1708 and Shiota, K. 2004. Skewed X-inactivation in cloned mice. *Biochem Biophys Res Commun*
1709 321 (1): 38-44.
- 1710 Sharp, J. T. 1971. Mycoplasmas. *Arthritis Rheum* 14 (2): 286-8.
- 1711 Shibata, M., Otake, M., Tsuchiya, S., Chikyu, M., Horiuchi, A. and Kawarasaki, T. 2006.
1712 Reproductive and growth performance in Jin Hua pigs cloned from somatic cell nuclei and
1713 the meat quality of their offspring. *J Reprod Dev* 52 (5): 583-90.

- 1714 Shiels, P. G., Kind, A. J., Campbell, K. H., Wilmut, I., Waddington, D., Colman, A. and
1715 Schnieke, A. E. 1999. Analysis of telomere length in Dolly, a sheep derived by nuclear
1716 transfer. *Cloning* 1 (2): 119-25.
- 1717 Shiga, K., Umeki, H., Shimura, H., Fujita, T., Watanabe, S. and Nagai, T. 2005. Growth and
1718 fertility of bulls cloned from the somatic cells of an aged and infertile bull. *Theriogenology*
1719 64 (2): 334-43.
- 1720 Shiota, K. and Yanagimachi, R. 2002. Epigenetics by DNA methylation for development of
1721 normal and cloned animals. *Differentiation* 69 (4-5): 162-6.
- 1722 Shoubridge, E. A. and Wai, T. 2007. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Curr Top*
1723 *Dev Biol* 77: 87-111.
- 1724 Shutler, D., Weary, D., McLellan, N. 2005. The clones need to return: A comment on Archer et
1725 al. (2003). *Applied Animal Behaviour Science* 91 (3-4): 363-365.
- 1726 Sikich, L. and Todd, R. D. 1988. Are the neurodevelopmental effects of gonadal hormones
1727 related to sex differences in psychiatric illnesses? *Psychiatr Dev* 6 (4): 277-309.
- 1728 Sinclair, K. D., McEvoy, T. G., Maxfield, E. K., Maltin, C. A., Young, L. E., Wilmut, I.,
1729 Broadbent, P. J. and Robinson, J. J. 1999. Aberrant fetal growth and development after in
1730 vitro culture of sheep zygotes. *J Reprod Fertil* 116 (1): 177-86.
- 1731 Smythe, J. W., McCormick, C. M., Rochford, J. and Meaney, M. J. 1994. The interaction
1732 between prenatal stress and neonatal handling on nociceptive response latencies in male and
1733 female rats. *Physiology & Behavior* 55 (5): 971-974.
- 1734 Steinborn, R., Schinogl, P., Zakhartchenko, V., Achmann, R., Schernthaner, W., Stojkovic, M.,
1735 Wolf, E., Muller, M. and Brem, G. 2000. Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle
1736 produced by fetal and adult cell cloning. *Nat Genet* 25 (3): 255-7.
- 1737 Stringfellow, D. A., Givens, M. D. and Waldrop, J. G. 2004. Biosecurity issues associated with
1738 current and emerging embryo technologies. *Reprod Fertil Dev* 16 (2): 93-102.
- 1739 Suemizu, H., Aiba, K., Yoshikawa, T., Sharov, A. A., Shimozawa, N., Tamaoki, N. and Ko, M.
1740 S. 2003. Expression profiling of placentomegaly associated with nuclear transplantation of
1741 mouse ES cells. *Dev Biol* 253 (1): 36-53.
- 1742 Takahashi, S. and Ito, Y. 2004. Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and
1743 biochemical properties. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 165-71.
- 1744 Tamashiro, K. L., Wakayama, T., Blanchard, R. J., Blanchard, D. C. and Yanagimachi, R.
1745 2000. Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus
1746 cells. *Biol Reprod* 63 (1): 328-34.
- 1747 Tanaka, S., Oda, M., Toyoshima, Y., Wakayama, T., Tanaka, M., Yoshida, N., Hattori, N.,
1748 Ohgane, J., Yanagimachi, R. and Shiota, K. 2001. Placentomegaly in cloned mouse concepti
1749 caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol Reprod* 65 (6): 1813-21.
- 1750 Tecirlioglu, R. T. and Trounson, A. O. 2007. Embryonic stem cells in companion animals
1751 (horses, dogs and cats): present status and future prospects. *Reprod Fertil Dev* 19 (6): 740-7.
- 1752 Tenhagen, B. A., Helmbold, A. and Heuwieser, W. 2007. Effect of various degrees of dystocia
1753 in dairy cattle on calf viability, milk production, fertility and culling. *J Vet Med A Physiol*
1754 *Pathol Clin Med* 54 (2): 98-102.
- 1755 Tian, X. C., Kubota, C., Sakashita, K., Izaike, Y., Okano, R., Tabara, N., Curchoe, C., Jacob,
1756 L., Zhang, Y., Smith, S., Bormann, C., Xu, J., Sato, M., Andrew, S. and Yang, X. 2005.
1757 Meat and milk compositions of bovine clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (18): 6261-6.

- 1758 Tome, D., Dubarry, M. and Fromentin, G. 2004. Nutritional value of milk and meat products
1759 derived from cloning. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 172-7.
- 1760 Van Laere, A. S., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L.,
1761 Archibald, A. L., Haley, C. S., Buys, N., Tally, M., Andersson, G., Georges, M. and
1762 Andersson, L. 2003. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle
1763 growth in the pig. *Nature* 425 (6960): 832-6.
- 1764 Veissier, I., Gesmier, V., Le Neindre, P., Gautier, J. Y. and Bertrand, G. 1994. The effects of
1765 rearing in individual crates on subsequent social behaviour of veal calves. *Applied Animal*
1766 *Behaviour Science* 41 (3-4): 199-210.
- 1767 Wakayama, T., Shinkai, Y., Tamashiro, K. L., Niida, H., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J.,
1768 Ogura, A., Tanemura, K., Tachibana, M., Perry, A. C., Colgan, D. F., Mombaerts, P. and
1769 Yanagimachi, R. 2000. Cloning of mice to six generations. *Nature* 407 (6802): 318-9.
- 1770 Wakayama, T. and Yanagimachi, R. 1999. Cloning the laboratory mouse. *Semin Cell Dev Biol*
1771 10 (3): 253-8.
- 1772 Walker, S., Christenson, R., Ruiz, R., Reeves, D., Pratt, S., Arenivas, F., Williams, N., Bruner,
1773 B. and Polejaeva, I. 2007. Comparison of meat composition from offspring of cloned and
1774 conventionally produced boars. *Theriogenology* 67 (1): 178-184.
- 1775 Walker, S. C., Shin, T., Zaunbrecher, G. M., Romano, J. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W. and
1776 Piedrahita, J. A. 2002. A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer
1777 using in vitro-matured oocytes. *Cloning Stem Cells* 4 (2): 105-12.
- 1778 Walker, S. K., Hartwich, K.M., Seamark, R.F. 1996. The production of unusually large
1779 offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. *Theriogenology*, 45 (1):
1780 111-120.
- 1781 Walsh, M. K., Lucey, J. A., Govindasamy-Lucey, S., Pace, M. M. and Bishop, M. D. 2003.
1782 Comparison of milk produced by cows cloned by nuclear transfer with milk from non-
1783 cloned cows. *Cloning Stem Cells* 5 (3): 213-9.
- 1784 Ward, I. L. and Weisz, J. 1980. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males.
1785 *Science* 207 (4428): 328-9.
- 1786 Watanabe, S. and Nagai, T. 2008. Health status and productive performance of somatic cell
1787 cloned cattle and their offspring produced in Japan. Accepted for publication. *The Journal of*
1788 *reproduction and development* 54 (2).
- 1789 Wells, D. N. 2005. Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech* 24 (1): 251-64.
- 1790 Wells, D. N., Forsyth, J. T., McMillan, V. and Oback, B. 2004. The health of somatic cell
1791 cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 101-10.
- 1792 Wells, D. N., Laible, G., Tucker, F. C., Miller, A. L., Oliver, J. E., Xiang, T., Forsyth, J. T.,
1793 Berg, M. C., Cockrem, K., L'Huillier, P. J., Tervit, H. R. and Oback, B. 2003. Coordination
1794 between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle.
1795 *Theriogenology* 59 (1): 45-59.
- 1796 Wells, D. N., Misica, P. M. and Tervit, H. R. 1999. Production of cloned calves following
1797 nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60 (4): 996-1005.
- 1798 WHO 1990. Principles for the toxicological assessment of pesticide residues in food.
- 1799 WHO/FAO 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods.
- 1800 Williams, N. E., Walker, S. C., Reeves, D. E., Sherrer, E., Galvin, J. M., Polejaeva, I.,
1801 Rampacek, G., Benyshek, L., Christenson, R. K., Graves, W. M. and Pratt, S. L. 2006. A

- 1802 comparison of reproductive characteristics of boars generated by somatic cell nuclear
 1803 transfer to highly related conventionally produced boars. *Cloning Stem Cells* 8 (3): 130-9.
- 1804 Wilmut, I., Beaujean, N., de Sousa, P. A., Dinnyes, A., King, T. J., Paterson, L. A., Wells, D.
 1805 N. and Young, L. E. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419 (6907): 583-6.
- 1806 Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. 1997. Viable
 1807 offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 (6619): 810-3.
- 1808 Wolff, G. L., Kodell, R. L., Moore, S. R. and Cooney, C. A. 1998. Maternal epigenetics and
 1809 methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *Faseb J* 12 (11): 949-57.
- 1810 World Organisation for Animal Health and OIE 2007. Terrestrial Animal Health Code.
 1811 Appendix 3.3.2. *In vitro* fertilised bovine embryos/*in vitro* maturing oocytes.
- 1812 Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Korsawe, K., Lemme, E. and Niemann, H.
 1813 2005. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro
 1814 procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* 17 (1-2): 23-35.
- 1815 Wrenzycki, C., Lucas-Hahn, A., Herrmann, D., Lemme, E., Korsawe, K. and Niemann, H.
 1816 2002. In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked
 1817 gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod* 66
 1818 (1): 127-34.
- 1819 Yamaguchi, M., Ito, Y. and Takahashi, S. 2007. Fourteen-week feeding test of meat and milk
 1820 derived from cloned cattle in the rat. *Theriogenology* 67 (1): 152-165.
- 1821 Yang, L., Chavatte-Palmer, P., Kubota, C., O'Neill, M., Hoagland, T., Renard, J. P., Taneja,
 1822 M., Yang, X. and Tian, X. C. 2005. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased
 1823 newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol Reprod Dev* 71
 1824 (4): 431-8.
- 1825 Yang, X., Smith, S. L., Tian, X. C., Lewin, H. A., Renard, J. P. and Wakayama, T. 2007a.
 1826 Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat*
 1827 *Genet* 39 (3): 295-302.
- 1828 Yang, X., Tian, X. C., Kubota, C., Page, R., Xu, J., Cibelli, J. and Seidel, G., Jr. 2007b. Risk
 1829 assessment of meat and milk from cloned animals. *Nat Biotechnol* 25 (1): 77-83.
- 1830 Yonai, M., Kaneyama, K., Miyashita, N., Kobayashi, S., Goto, Y., Bettpu, T. and Nagai, T.
 1831 2005. Growth, reproduction, and lactation in somatic cell cloned cows with short telomeres.
 1832 *J Dairy Sci* 88 (11): 4097-110.
- 1833 Young, L. E. and Fairburn, H. R. 2000. Improving the safety of embryo technologies: possible
 1834 role of genomic imprinting. *Theriogenology* 53 (2): 627-48.
- 1835
 1836

1837 **GLOSSARY AND ABBREVIATIONS USED IN THE OPINION**

1838 To assure a consistent use and understanding throughout this opinion, some words of key
 1839 importance are defined.

1840 **Glossary**

Term	Definition used in the opinion
Allele	A gene that occupy a particular chromosomal locus. A diploid organism has two alleles, one on each chromosome.
Blastomere	Any one of the cells formed from the first few cell divisions in animal embryology. The embryo usually divides into two, then four, then eight blastomeres, and so on
Blastocyst	The early stage in the development of mammalian embryos. The blastocysts have an inner cell mass which will become the foetus and an outer cell mass (trophectoderm) that will become part of the placenta.
Caesarian section	Birth by surgical intervention
Chromatin	The complex of DNA and various proteins that makes up the chromosomes
Cloned embryo, embryo clone	Embryo resulting from somatic cell nuclear transfer
CpG	A region of DNA where a Cytosine nucleotide is separated by a phosphate to Guanine nucleotide. A CpG island is a region which has a high concentration of CpG sites.
Cytoplasm	The living content of the cell, except the nucleus, consisting of an aqueous protein matrix or gel, and where vital cellular organelles (e.g. mitochondria) are located
DNA methylation	Biochemical modification to the DNA through the addition of a methyl group.
Donor animal	Animal delivering the cell used in the cloning procedure
Dystocia	Abnormal or difficult birth giving or labour
Embryo	A multicellular, diploid structure of cells formed after fertilization of the oocyte and until all organs have been formed, from then it is called a foetus
Embryo, Reconstructed	An embryo that has been reassembled from its component parts by micro manipulations <i>in vitro</i>
Epigenetic processes	Alteration of gene expression by biochemical modifications (e.g. methylation) of the DNA or of DNA-binding proteins. The process does not involve changes of the DNA sequence
Epigenetic dysregulation	Abnormal or impaired control of gene expression
Epi-alleles	Alleles that are epigenetically modified
Foetus	A developing mammal after the embryo stage and before birth
Gamete	A mature reproductive cell (haploid) capable of fusing with a cell of similar origin but of opposite sex to form a zygote (diploid) from which a new organism can develop. The oocyte and spermatozoa are gametes.
Gametogenesis	The process of the formation of haploid gametes
Genotype	The entire genetic constitution of an individual
Germ line cell	A reproductive cell such as a spermatocyte or an oocyte, or a cell that will develop into a reproductive cell
Heteroplasmy	The presence of more than one type of organelle (e.g. mitochondrial DNA) within a cell
Healthy	Within the range of zootechnical and physiological parameters of mean of any given character from the point of view of food safety or animal welfare
Heifer	A female bovine that has not yet produced a calf

Hydroallantois	Abnormal fluid accumulation in the allantoic cavity of the placenta
Hydrops (fetalis)	A condition in the foetus characterized by accumulation of fluid, in at least two compartments (e.g. subcutaneous tissue, pleura, pericardium, abdomen). Hydrops sometimes leads to spontaneous abortion
Imprinting	A genetic phenomenon by which certain genes are expressed in a parent-of-origin specific manner.
LOS	Large Offspring Syndrome. The size of the offspring is greater than 20 % above the average for the species or breed ($> \text{mean} + 2\text{SD}$).
Oocyte	Unfertilized egg, the female gamete
Oocyte donor	Animal delivering the oocyte used in the cloning procedure
Parturition	The act or process of giving birth to offspring
Perinatal period	A species dependent time period around 7 days before and after birth for livestock
Phenotype	The totality of the observable and structural characteristics of an organism as determined by genotype and its interaction with the environment
Placentome number	The number of interfaces between the cotyledons of the foetus and the caruncles of the dams forming the cotyledonary placenta in ruminants
Pluripotent	The possibility of a stem cell to differentiate into any of the three germ layers. A pluripotent cell can give rise to any foetal or adult cell type but is not as potent as a totipotent cell.
Postnatal period	Time period after birth
Progeny of clone	F1 and subsequent generations of animals born by sexual reproduction where at least one of the ancestors were clone animals
Sexual reproduction	normal way of reproduction between male and female, involving fusion between sperm and oocyte
Somatic cell	Any cell of an animal that is not a germ line cell
Surrogate dam	Animal carrying the cloned embryos
Telomere	A region of highly repetitive DNA at the end of a chromosome
Totipotent	The possibility of a single cell to divide into any differentiated cell. See also pluipotent
Transgene	Foreign genetic material inserted, e.g. in a cell, embryo or organism (also: genetically modified)
Trophectoderm	The group of cells in the blastocyst that form the placenta and other non-foetal tissues
Zona pellucida	The glycoprotein membrane surrounding the plasma membrane of an oocyte.
Zygote	The cell that results after fertilization of two haploid cells (usually the sperm and the oocyte)

1841

1842

Abbreviations

Term	Definition used in the opinion
AI	Artificial insemination
ART	Assisted reproductive technology
IVF	<i>In vitro</i> fertilization
LOS	Large offspring syndrome
mtDNA	mitochondrial DNA
SCNT	Somatic Cell Nucleus Transfer

1843