

科学委員会の科学的見地に基づく意見書

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
その子孫の食品安全性、動物²の健康と福祉、および環境への影響

（質問番号：EFSA-Q-2007-092）

2008年7月15日採択

科学委員会委員

Sue Barlow、Andrew Chesson、John D. Collins、Albert Flynn、Anthony Hardy、Klaus-Dieter Jany、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子孫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。³

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）の有性生殖とは異なり、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」されるため、受精卵と同じ経路をたどる必要があり、胚や胎子としての発

¹ 本意見書で論じる動物種とは、ウシおよびブタである。

² 引用目的の論文の出典：欧州委員会からの要請に対する科学委員会の科学的見地に基づいた、体細胞核移植によるクローニングで得られた動物とその子の食品安全性、動物の健康と福祉、および環境への影響に関する意見書（Scientific Opinion of the Scientific Committee on a request from the European Commission on Food Safety, Animal Health and Welfare and Environmental Impact of Animals derived from Cloning by Somatic Cell Nucleus Transfer (SCNT) and their Offspring and Products Obtained from those Animals.）、The EFSA Journal (2008) 767, 1-49

³ http://ec.europa.eu/european_group_ethics/publications/

育を遂げることができる。この過程は「再プログラム化」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。エピジェネティックな再プログラム化の失敗は、その程度もさまざまに異なってくる可能性があり、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。健全なクローンを作ることは、エピジェネティックな再プログラム化の機能上の成功を示す主な指標となる。

SCNT によるクローニングは動物の数種に適用されてきた。現段階の情報に基づいて利用できるデータを考えると、リスク評価が可能な種はウシとブタのクローンとその子孫に限られていた。

リスク評価の不確かさが生じる原因には、利用できる試験数が限られていることや、調査対象のサンプルサイズが小さいことのほか、概してこの意見書に関連するすべての問題に対処できる同様のアプローチがないことなどが挙げられる。

本意見書では、仮腹雌とクローンおよびクローンの子孫に関する動物の健康上の問題を考察する。仮腹雌の場合、妊娠失敗例の割合の増大がウシとブタにおいて、また水腫胎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、SCNT を除く生殖補助技術で誘発されて妊娠中の仮腹雌においても認められているが、頻度はかなり低い。

主にウシの場合は幼若期中に、ブタの場合は周産期中にある有意な頭数のクローンでは、有害な影響を受けていることが判明し、しばしば重度で致死的な転帰がみられた。周産期を乗り切り生存するクローンの多くは、生理学的測定値、挙動検査、ならびに臨床検査によって正常かつ健全と判定される。クローンウシまたはクローンブタの有性生殖による子孫への有害作用の徴候はない。しかしながら、クローンもその子孫もその全寿命を通しての研究はいまだ行われていない。

現在の福祉に対する評価は、主に動物の健康データから外挿して推定されたものである。仮腹雌と有意な頭数のクローンの両者の福祉については、健康上の有害な転帰が認められ、その影響を受けていることが明らかにされている。

クローンまたはその子孫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について考察した。現段階の情報に基づき、主な DNA 塩基配列がクローンでは不変であるという事実を考慮すると、健全なウシクローンおよび

ブタクローンとその子孫から得られた食品に関しては、健全な従来 of 育種法による動物から得られたものと比較した場合に差異を示すものはない。

現在、クローンまたはその子孫が従来 of 育種法による動物に比べ、何らかの環境リスクを新たにまたは別に有することを示す徴候はない。

本意見書の最終部分に勧告を数多く提示した。

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、エピジェネティックな再プログラム化、食品、食品の安全性、遺伝的多様性、免疫適格性、家畜、子、ブタ、子孫、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	7
欧州委員会の定めるところの委任事項	7
委任事項の解釈	7
謝辞	8
1. はじめに（本意見書について）	9
1.1. 意見書の中で扱わない事項	10
1.2. 意見書で使用される用語	10
2. 動物育種技術および生殖技術	11
2.1. 体細胞核移植（Somatic Cell Nucleus Transfer：SCNT）概論	11
2.2. クローン化された種とクローニング効率	14
2.3. クローンとその寿命に関するデータ	15
2.4. クローニングの用途の可能性	15
3. SCNT のエピジェネティック的側面と遺伝的側面	16
3.1. エピジェネティック的側面：クローンの再プログラム化	17
3.1.1. 継世代的なエピジェネティック的遺伝	20
3.1.2. エピジェネティック的なテロメアの修飾	21
3.1.3. 大局的にみるエピジェネティック的調節不全	22
3.2. 遺伝的側面	22
3.2.1. ミトコンドリア DNA の修飾	22
3.2.2. サイレント変異	23
3.3. その他の側面	23
3.4. SCNT のエピジェネティック的側面と遺伝的側面についての結論	24
4. 動物の健康および福祉上の SCNT の影響	24
4.1. 動物の健康	25
4.1.1. 体細胞を提供する動物および供卵動物の健康	25
4.1.1.1 体細胞核の由来	26
4.1.1.2 卵母細胞の由来	26
4.1.2. 仮腹雌の健康	27
4.1.3. クローン（F0）の健康	28
4.1.3.1. クローンの免疫機能	28
4.1.3.2. 妊娠および周産期のクローンの健康	29

4.1.3.3.	出生以降性成熟期までのクローンの健康.....	30
4.1.3.4.	性成熟後のクローンの健康.....	31
4.1.3.5.	成体クローンの死亡率.....	33
4.1.4.	子孫 (F1) の健康.....	33
4.1.5.	動物の健康についての結論.....	34
4.2.	動物の福祉的側面.....	36
4.2.1.	供卵動物の福祉.....	36
4.2.2.	仮腹雌の福祉.....	36
4.2.3.	クローンの福祉.....	37
4.2.3.1.	出生時から離乳期までのクローンの福祉.....	37
4.2.3.2.	離乳期後から思春期／解体処理時／寿命末期のクローンの福祉.....	38
4.2.4.	子孫 (F1) の福祉.....	39
4.2.5.	動物の福祉についての結論.....	40
5.	クローン (F0) およびクローン後代 (F1) から得る食肉および乳の安全性.....	40
5.1.	安全性を考慮した分子的、生物学的、化学的側面.....	40
5.1.1.	クローンとクローン後代由来の食肉および乳の組成の比較.....	40
5.1.2.	毒性試験およびアレルギー性試験.....	42
5.1.2.1.	飼養試験.....	42
5.1.2.2.	遺伝毒性.....	42
5.1.2.3.	アレルギー性.....	42
5.1.3.	新しい成分が存在する確率.....	43
5.1.4.	動物と動物から得られたヒトの摂取用の製品.....	43
5.1.5.	微生物学的な側面.....	44
5.1.6.	残留物の濃度.....	44
5.2.	食品の安全性についての結論.....	45
6.	遺伝的多様性、生物多様性、および環境への影響.....	45
6.1.	遺伝的多様性.....	45
6.2.	生物多様性.....	45
6.3.	環境への影響.....	46
6.4.	環境および遺伝的多様性への影響についての結論.....	46
	総体的結論と勧告.....	46
	結論.....	46
	勧告.....	47
	一般的な勧告.....	47
	付加された勧告.....	48
	EFSA に利用できる情報.....	49

本意見書で使用された用語集および略語集.....52

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、クローンとその子孫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。⁴

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

⁴ 最終的なFDAのリスク評価が2008年1月15日に公表された。これは http://www.fda.gov/cvm/CloneRiskAssessment_Final.htm にて読むことができる（最終アクセス日2008年6月27日）。

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。本意見書は、評価対象の領域について何らかの優先順位を示すものではない。

謝辞

欧州食品安全機関はここに、本意見書の作成にあたった作業部会（Working Group）のメンバーに感謝の意を表したい。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。

また EFSA は、今回の採択前に本意見書の草案の最終版を作成した起草グループに参加した Ada Knaap、Vittorio Silano、Pierre Le Neindre、John Collins、Jorg Hartung にも、ここに感謝の意を表したい。

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。意見書の草案は、2008年1月11日から2月25日の期間に公開協議用にEFSAのウェブ上で公表された。公開協議の期間中の2月7日には、技術面での会議としてEFSAの利害関係者の意見発表の場となるEFSA's Stakeholder Consultative Platformが開催された。この会議は、公開協議の一環として、意見交換や利害関係者からのフィードバックを得る機会となった。EFSA が委託された権限に該当する一般コメントは受領したものすべてについて評価を行い、関連するコメントが考慮に入れるべきものであれば、意見書を修正した。受領したコメントと、公開協議の結果についての報告書はEFSAのウェブ上で公表されている。

クローニングを利用する動物種が数種であった間は、リスク評価を行う際に利用できるデータはウシとブタの例のみで十分であった。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遺伝子型の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（人工授精、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い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。欧州では、人工授精（artificial insemination : AI）がウシの育種の約48%、ブタの育種の49%に利

用されている。これを世界的にみると、ウシでは42%、ブタでは28%という数字になる (FAO、2007)。AI を経ての世界の受胎率は、ウシの場合は平均 50～65%、ブタの場合は平均 70～80%である。

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（rDNA 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 の影響の評価もない。SCNT を利用しないクローニングは、本意見書では扱われていない。さらに、本意見書は動物育種で使用されているすでに確立された手法の側面や、クローン後代の育種に関連する側面についても扱わない。

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。⁵

1.2. 意見書で使用される用語

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。

ークローン

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。

⁵ http://ec.europa.eu/european_group_ethics/publications/

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）の遺伝物質が胎子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。

ークローンの子孫（子）

クローンの子孫とは、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、クローンの子孫を F1 とも呼ぶ。

2 動物育種技術および生殖技術

ART は、過去数十年の間に遺伝学的選択法に寄与してきた。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。SCNT は、ある期間に望ましい特性をもつ動物を従来の育種法や補助技術による育種を通して可能な数よりも多く産生しようという意図のもと、動物のゲノムの複製を可能にしたものである。しかしながら、ほかのいかなる生殖技術にもみられるように、クローンもまた異常を呈する可能性や望ましくない特性をもつ可能性がある。

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。再構築胚は仮腹雌の体内に移植される前に人工的に発育を開始させられ、成功例の場合は仮腹雌の体内で成長を続け、健全な新生クローン（F0）として分娩される（図 1 参照）。

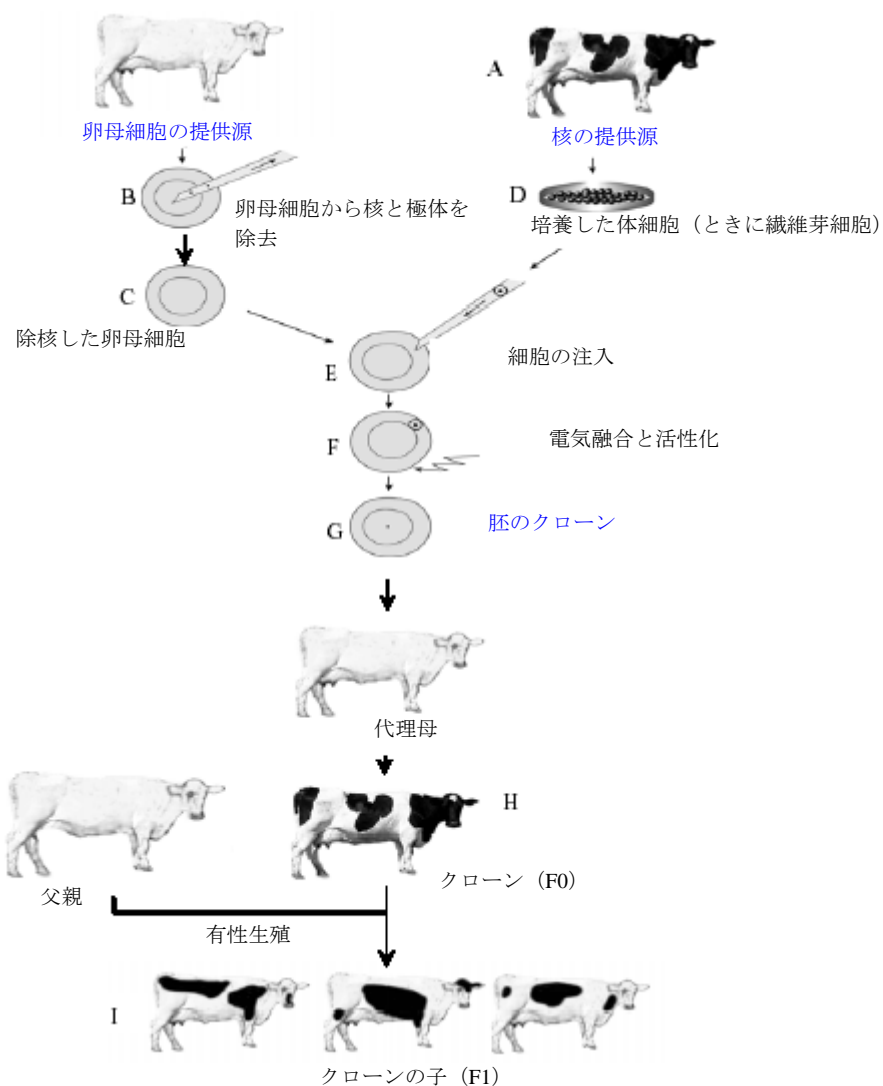


図 1 体細胞核移植 (SCNT) の主なステップ。 (A) 核細胞の供給源。(B) 卵母細胞から核と極体を吸引して除去する。除核した卵母細胞を与える (C)。(D) 核のドナーから得られた体細胞の培養。(E) 除核した卵母細胞の透明帯と膜の間の体細胞の注入。(F) 除核した卵母細胞と体細胞の中間部の結合後、卵母細胞と細胞膜の電気融合により卵母細胞の細胞質内に体細胞核 (および細胞質) を移入。(G) 卵母細胞の細胞質と染色体の 2 つの複製を含む体細胞核によりクローン胚が形成される。(H) 核の供給源 (A) のものと同様の外被の色を呈するクローン (F0) を産生する仮腹雌内に胚を移植。(I) 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)。

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。本意見書は、クローニングの結果に関するこれらの方法論的な課題の影響については扱っていない。

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（Sullivan ら、2004 年；Petersen ら、2007 年）。

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。

クローニング法の全体的な成功率は、現在までのところ低く、種ごとに非常に大きな開きがある。全体的な成功率はしばしば、移植された胚のパーセンテージと、誕生して生存しているクローンの数から測定する。情報は、周産期、離乳期、または春機発動の後の一定の時間（例、24時間）の生存に関してもしばしば得られている。

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）。仮腹雌に移植された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。

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）。

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、分娩に至るまで发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. クローンとその寿命に関するデータ

クローンの世界的規模の記録は一切ない。同様に個々の国で利用できる記録もないため、生存中のクローンの数は推定が困難である。EFSA によって収集された情報から、2007 年には EU 圏内で、約 100 頭のクローンウシとこれより少ないクローンブタが生存していると推定された。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 500 未満と推定した。

相対的に数が少ないのは、SCNT の技術に困難が伴う点と、クローンおよびその子孫に関する世界中のさまざまな自発的または強制的な一時凍結の流れがある点の両者を反映したものと考えられる。主に商業的な理由から、クローンの子孫 (すなわち F1 世代とその後継世代) の現在の数字も制限されたものである。しかしながらそれにもかかわらず、クローンから得た配偶子 (主に精液) は、何年にもわたり売買されている。

飼育された動物は何十年も生きる可能性があるが、それらが産生する寿命は比較的短い (例、肉牛では約 1~3 年、乳牛では約 5~7 年、肥育豚では 6 カ月未満)。したがって、飼育された動物の寿命ではクローニングの影響に関するデータを生成することは困難である。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。クローンウシについては、現在までの 6~7 歳の動物について言及した報告書がごくわずかにあり (Chavatte-Palmer ら、2004 年; Heyman ら、2004 年; Panarace ら、2007 年)、家畜のクローンの全寿命に関しては利用できるデータがまったくない。

クローンマウスがそれらの従来 of 育種法による動物と同じ寿命となる可能性があることを示した研究はいくつかあるが、ほかの研究では寿命が短くなると報告された (Ogonuki ら、2002 年; Tamashiro ら、2003 年; Wakayama ら、2000 年)。

2.4. クローニングの用途の可能性

SCNT を用いて、すぐれた生産性、疾患の低い発生率、産生の環境に適応する能力などをすでに示しているそれらの動物のクローンを産生する機会はある。その結果、動物を動物自体の個々の能力基準によって選択できるため、クローンが「良好な」表現型を伝播する見込みをより大きくできる可能性がある。表現型と集団に基づく従来 of 育種法は、最近で

は、個々の能力のテストはしばしば実施されていないが、劣っていたあるいは同様の動物の生活の質が結果的に改善される遺伝マーカを併用して完全性を高めるようになっている。しかしながら、育種のどのような戦略でもみられるように、遺伝子の再プログラム化のプロセスによって生じる変化に伴う遺伝子の潜在的なリスクに取り組むため、リスク評価を重大な側面から重大な時期に長期にわたって実行することが重要である。

SCNT は、育種による食糧生産動物を得ることを目的に、EU 圏外の数カ国で商業的に利用され始めている。EU 圏内では、SCNT は生殖技術として研究目的に使われている。研究において SCNT を利用することは、医学のようなほかの領域での潜在的な有益性と併せて、基本的な生物学的機序の理解づくりを考慮に入れている。

科学委員会は、商業的なクローン (FO) 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 のエピジェネティック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、新しい胚が胎子としての発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、正常な発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エピジェネティック的で、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。エピジェネティック的修飾には、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かなり高い。体細胞の再プログラム化は、大部分が DNA 脱メチル化であり、その後に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。エピジェネティック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子の発育期間中のほか、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、ゲノムを不適切に再プログラム化する間に生じるエピジェネティック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、エピジェネティック的側面についてはセクション 3.1 で論じる。

3.1. エピジェネティック的側面：クローンの再プログラム化

SCNT を行った後の核の活動の再プログラム化は、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、胚または胎子の発育は中断され、通常は致命的な結果に至る。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)。エピジェネティック的变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子の場合、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再プログラム化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エピジェネティック的状態が 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エピジェネティック的变化が結果的に異常を呈するわけではない。例えば、雌の胎子の 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エピジェネティック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。エピジェネティック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。

胎盤の胎子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、胎子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)。

インプリンティング遺伝子として知られる遺伝子のクラスは、仮腹雌にクローン胚を移植した後に認められる胎子の高い死亡率において、明らかに重大な役を負っている。インプリンティング遺伝子は、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、いくつかのインプリンティング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、胎子の組織では認められなかった (Inoue ら、2002 年)。

流産した胎子のウシのクローンのさまざまな組織内のインプリンティング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 (Kremensky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により誘導され胎子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全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子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エピジェネティック的变化は、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は、各組織で1,000個の遺伝子座につき平均2~5つの異常にメチル化した遺伝子座をもつ、解析対象の個々の新生クローンの間では異なっていた。しかしながら、全期間発現した少数のクローンマウスは、発現に必要とされるゲノムDNAのメチル化パターンをほぼ完璧に再構築したとみられた (ShiotaおよびYanagimachi 2002年)。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、一組の成体クローンから得た個体がエピジェネティックにどの程度異なるままであるかは不明である。動物の加齢が進むことにより異常が消失するという示唆もいくつかある (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) に健全で、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. 継世代的なエピジェネティック的遺伝

限定的なデータは、クローン内での核の活動を再プログラム化する間に生じるエピジェネティック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。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子孫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 頭の子がすべて失っていることを示した (Ortegon ら、2007 年)。ウシの場合、クローン雌ウシとクローン雄ウシの交配から子が 1 頭誕生した (Kasai ら、2007 年)。この 8 カ月の子に対して行った、成長特性をはじめ、臨床的、血清学的、血液学的、生化学的分析のほか、テロメア長の解析などを含むさまざまな試験では、異常は一切示されなかった。

従来の育種法による雄ブタと交配させた 9 頭のクローン雌ブタは F1 世代の子ブタ 14 頭を出産したが、クローン (F0) と対照群間で統計学的に有意であったそのパラメータは、2 つのパラメータを除き、F1 の正常範囲内であった (Mir 2005 年)。この 2 つのパラメータ (血中尿素窒素およびアルカリホスファターゼ) は、経時的に一貫して差異がみられなかった (アウトライヤーの動物に起因)。

同様の結果はマウスでもみられており、F0 の肥満特性がクローン間の自然交配で生まれた子に伝達されることはなかった (Tamashiro ら、2000 年 ; Tamashiro ら、2002 年)。

全体的に、これらの結果は、クローンで示される異常な特性が自然交配によって生まれたそれらの子に必ずしも伝達されるというわけではないことを示している。

さまざまな条件に応答する継世代的なエピジェネティック的遺伝は、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子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エピジェネティック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エピジェネティック的修飾は、後の子孫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、エピジェネティック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 メチル化などのエピジェネティック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。クローンとその子孫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。クローンのエピジェネティック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。したがって、成体に出現した疾患と継世代的なエピジェネティック的遺伝のエピジェネティックな影響は、クローニングに特有なものではなく、通常飼育動物でも同じ機序に従うものである。最近のデータでは、哺乳類の表現型に対する複合的なエピジェネティックな継世代的影響を示唆し、エピジェネティック的差異をもつ遺伝子型についての科学的な疑問点が新たに生じている (Han ら、2008 年)。

3.1.2. エピジェネティック的なテロメアの修飾

SCNT による胚を发育させるドナーの体細胞核の能力と関連のあったエピジェネティック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ーゼは、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。哺乳類初のクローン (「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、Tian ら、2000、Jiang ら、2004 年、Betts ら、2005 年、Jeon ら、2005 年、Schaezlein および Rudolph、2005 年、Kasai ら、2007 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. 大局的にみるエピジェネティック的調節不全

エピジェネティック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、仮腹雌に移入する前の初期胚がさらされる *in vitro* での環境の結果によるものであるのかは不明である。また、上述したように、いかなる胎子のエピジェネティックの状態も、いかなる有機体のあらゆる生命段階そのままのエピジェネティックの状態でも、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

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)。クローンウシ 20 頭を対象とした試験では、2 件の試験において、非倍数の染色体数を有する異常細胞の高い発生率 (約 21%) が示された。これらの異常は一過性ではなく、染色体数の不安定性が表現型的には正常なクローンで発生する可能性があることを示している (Hanada ら、2005 年)。同一のクローン雄ウシから得た子 30 頭のテロメア長と染色体安定性は、対照群との比較において何ら異常を示さなかった (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エピジェネティック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

クローンの遺伝学および表現型的な差異は、ミトコンドリア DNA に由来している可能性がある。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、胚の発育に必要な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 (ヘテロプラズミー) 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ヘテロプラズミー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し得るが、スクリーニングが可能であり、また従来 of 交配プログラムで排除することができる。

通常 of 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 of 結果として子の表現型に貢献する修飾となるインプリンティング遺伝子 of エピジェネティックの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 of 個体 of みに影響を及ぼす遺伝性 of 筋肥大である「キャリピージ表現型」を呈するヒツジ of 症例である (Charlier ら、2001 年)。関連した状況がブタ of 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 of 表現型 of 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 of 再プログラム化には体細胞核 of クロマチン of 著しい再構築が必要とされるため、SCNT は、家畜 of 今日の遺伝学的選択法として用いられる育種法 of 転帰により大きな影響を及ぼし得るドナー of ゲノム of において、サイレント変異 of 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 of プロセスには、卵母細胞 of 細胞質 of いくつか of 修飾が含まれる。卵母細胞 of 細胞質 of 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。細胞質の修飾への影響は、いまだ判定されていない（Tamashiroら、2007年）。

3.4. SCNTのエピジェネティック的側面と遺伝的側面についての結論

- ・ エピジェネティック的調節不全は、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。
- ・ エピジェネティック的な再プログラム化は臨床的に健全なクローンでは問題なく起こる。
- ・ 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エピジェネティック的調節不全がウシおよびブタの子孫（F1）に伝達されるとする証拠はない。
- ・ SCNTのエピジェネティック的および遺伝学的側面が影響を受ける範囲は、完全に解明されていない。

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・精神的健康、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。

クローンの健康と福祉に関する公表された報告書が数多くあるが、それらの結果はクローンと遺伝子組み替えクローンの混合種個体群についての観察に基づいたものである。遺伝子組み替え効果の考えられる影響に対する直接的な指標がない場合、このような試験が関連性を示せるのは今回の意見書に限られる。

4.1. 動物の健康

動物の健康は、クローニング、仮腹雌、クローン自体およびその子孫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. 体細胞を提供する動物および供卵動物の健康

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。供卵動物とは、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である。まれな状況では、卵母細胞が生体内卵子吸引によって回収される、非常に有益な監視対象の動物とも言える。このような場合は、動物の健康と福祉の問題は、広範囲に取り上げられる。手術者が有資格者であれば、超音波診断ガイドによる手法を利用する動物の生体ドナーからの卵母細胞の回収率は、動物の福祉にとって有害なものではないことを示す報告が複数ある (Chastant-Maillard ら、2003 年 ; Petyim ら、2007 年)。本項の後半では、供卵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。

供卵動物の疾病状態は、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)。調査対象となるすべての脊椎動物種のゲノムには、内在性レトロウイルスが含まれている。SCNT を実行中のウシの内在性レトロウイルス (bovine endogenous retroviruses : BERV) に見込まれる再活性化について分析し、有性生殖によるウシとクローンウシ間で比較した (Heyman ら、2007a 年)。BERV の配列は転写されず、また RNA はクローン、ドナー動物、または対照群のいずれの血中でも検出されなかった。

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、供卵動物および仮腹雌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。しかしながら、*in vivo* で作成された胚に適用されるすべてのプロトコルが、*in vitro* 由来の胚またはクローン胚や遺伝子組み替え胚に適用できるというわけではない（Stringfellow ら、2004 年）。

4.1.1.1 体細胞核の由来

体細胞核の供卵動物の多くは、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。供卵動物とその供給源となる組織の疾患の罹病性や抵抗性の選択は、クローンがそのような疾患特性に影響を受ける可能性があるため、重要である。

SCNTにより、体細胞中の細胞質内病原をレシピエント卵子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* 受精および顕微授精（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。このリスクは供卵動物の衛生管理により低減される（OIE、2007 年）。

4.1.1.2 卵母細胞の由来

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、卵子からの除核、体細胞核を有する卵母細胞の融合、あるいは除核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。

供卵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。しかしながら除

核した供卵動物は、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. 仮腹雌の健康

仮腹雌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、クローン保有仮腹雌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 期におけるウシの仮腹雌の妊娠損失は、胎盤異常、水腫胎、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）。

仮腹雌の高流産率は、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（Batchelder ら、2005 年）。胎盤分葉数の減少や母体・胎子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、仮腹雌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）。

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子を有する仮腹雌で高いものとなっている。

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。その後の仮腹雌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。

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、出生直後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)。

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、仮腹雌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、胚が仮腹雌に導入される他の ART でも起こり得る。

4.1.3.1. クローンの免疫機能

試験は件数が限られているため、クローンの免疫機能を調査した。免疫機能を反映している 2~5 歳のクローンウシ 17 頭を対象とした試験からの報告が 1 件ある (Heyman ら、2007a および b 年)。リンパ球の集団は、正常で明らかに健全なすべての年齢級のクローンの代表が選ばれ、対照群と比較された。免疫負荷後、抗体産生応答についてのクローン群と対照群間の差はみられなかったが、抗原特異的な細胞増殖の誘導は、クローン群では弱かった。この調査結果は、クローンウシが新たに遭遇した抗原に対する細胞免疫反応をマウントするための容量が少なかったことを示している可能性がある。しかしながら、同様の試験が後に同一の動物を対象に、また別のクローンの組で行われたときは、免疫機能は正常とみられ、年齢の影響があったことを示唆していた。

クローン子ブタ 9 頭についての試験では、生後 30 日目の時点でリポ多糖の負荷後に、急性期反応 (コルチゾル、TNF- α 、IL-6) をみせた例は、対照群に比べ、一部のクローンは少なく、またほかのクローンは同程度であった (Carroll ら、2005 年)。

授乳期の初期では、ガンマデルタおよび WC1+ガンマデルタ T 細胞の比率は、一時的にクローン雌ウシで減少し、クローン化された雌ウシが授乳期の初期に免疫抑制状態に陥る可能性があることを示唆した (Tanaka ら、2006 年 ; Heyman ら、2007b 年)。

4.1.3.2. 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) はしばしば、クローニング関連の現象であると考えられていたが、ウシおよびヒツジの体外受精卵の移植に由来する妊娠例が最初の記載例である (Farin および Farin 1995 年 ; Walker、1996 年 ; Kruip および den Daas 1997 年 ; Sinclair ら、1999 年)。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、過剰な胎子サイズ、胎盤発育異常 (水腫胎発症率の増加など)、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)。別の試験では、出生時の LOS の発生率は、クローン 15 頭につき体細胞クローニングでは 13.3%、胚のクローン 23 個では 8.6%、IVF による子ウシ 25 頭の一群では 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% (19 頭中 9 頭) まで上昇する (Kato ら、2000 年)。

胎盤過成長は、胎仔ウシに提供されるフルクトース値の新生子期中の上昇を誘発することが示されており、結果として心筋を含む筋肉機能に影響を及ぼす低血糖症ならびに高フルクトース血症に至る (Batchelder ら、2007b 年)。これらのデータは、クローン子ウシがなぜ子宮外での生存に適応し、より困難な問題を経験しているかという点についての説明となる。

in vitro 法および SCNT の両方から得られた胎子、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 に関連したエピジェネティック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) 胚のものと同様であったが、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。

帝王切開により分娩したクローン子ウシ 8 頭を対象とした試験では、生後 48 時間では赤血球数および白血球数が対照群の子ウシに比べ低値であったと報告されており、その血漿電解質は対照群に比して可変的で、クローン子ウシはもはや対照群の正常な子ウシの値には達しないことを示唆するものであった (Batchelder ら、2007a 年)。また、クローン子ウシは、正常な子ウシ以上に高い総ビリルビン値とフィブリノゲン値を呈することも報告された (Batchelder ら、2007b 年)。しかしながら、これらの上昇が正常な生理的範囲内に留まったため、ビリルビンとフィブリノゲンの値の上昇が必ずしも異常を示すものではなかった。

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 (子ブタの体重 1.04kg 未満)。SCNT での 23 の同腹仔群 (143 個体、うち遺伝子組み替え 41 例) 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)。この試験では、クローンと遺伝子組み替えクローンとの間に、研究対象のパラメータの差異は一切みとめられなかった。

ある試験では、SCNT による子ブタで低体重出生が報告されており、40 例中 27 例は下痢、髄膜炎、心臓の機能異常を含む種々の健康問題のため、周産期の途中で死亡した。クローンのうち 12 頭は成体期まで生存した。しかしながら、この試験では、共存する感染症を有する例を除外できなかった (Park ら、2005 年)。同一群によるフォローアップ試験では、胎盤細胞のアポトーシスに起因した可能性のある生育不能のクローンの胎盤の形態異常が認められた (Lee ら、2007 年)。上記で報告された周産期の死亡率は、ほかの群では認められなかったとの報告であった (Du ら、2007 年; Estrada ら、2007 年)。

産後のクローンブタの妊娠数が限られているため、妊娠期間は 114~120 日間と報告された (Walker ら、2002 年; Carroll ら、2005 年; Park ら、2005 年; Williams ら、2006 年; Du ら、2007 年)。概して、ブタの平均的な妊娠期間は 110~120 日の範囲で約 115 日である。

4.1.3.3. 出生以降性成熟期までのクローンの健康

ウシについてのある研究では、クローンウシの平均 30% (59 頭中 21 頭) 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、クローン子ウシのほとんどは生存し、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。

生後 6 カ月頃のクローンウシは、数多くの生化学的血液および尿のパラメータ、免疫状態、体調スコア、成長計測、生殖のパラメータなどについて、年齢をマッチさせた対照群との当該項目の差異はみられなかった。同様に、多数の生理学的パラメータ (血液プロフィール) も、クローンと年齢をマッチさせた対照群との間に差異を示さなかった (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)。

EFSA は、ViaGen 社 (米国) より、クローンブタとその子孫の生データのセットのほか、これに関する刊行物の提供を受けた (FDA、2008年; Williams ら、2006年; Walker ら、2007年)。このデータセットでは、比較器役の対照群 (AI により生成) が通常分娩であったのに対し、クローンブタ 7 頭は帝王切開による分娩であった。クローンの出生時体重は、比較器役の対照群より少なかった (1.12kg 対 1.73kg)。

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 ($p < 0.05$) (Estrada ら、2007年)。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)。

15 週齢および 27 週齢のクローンブタの複数の試験では、発育、健康、臨床化学的検査、および免疫機能に関してその比較器役の対照群と変わりはないことが判明した (Archer ら、2003a年; Mir ら、2005年; Williams ら、2006年)。

4.1.3.4. 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春機発動に達するのに時間がかかった。しかしながら、性成熟後は、妊娠期間の長さの子の生存期間に関しては有意の変動性はみられなかった (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 11 頭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様であった (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、その後の胎子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)。

高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 5 頭 (うち 4 頭は遺伝子組み替えであった) をクローン雄ブタと交配したところ、妊娠期間の長さ、生存しているブタの同腹仔数の比率、出生時体重については、対照群から得たデータに匹敵するものであった (Martin ら、2004 年)。この試験では、クローンと遺伝子組み替えクローンとの間に、調査対象のパラメータの有意差は認められなかった。

ViaGen 社 (ViaGen Inc. 米国) によって提供されたデータは、出生後・解体前のクローンブタが対照群に比して IGF-I (インシュリン様成長因子 1) が低値であることを示したが、クローンブタ 1 頭を除き、ほかは対照群の値の範囲内であった。同様にエストラジオール-17 β の値は対照群に比べ、クローン群では低かったが、対照群の値の範囲内であった。これらのクローンが正常な期間内に市場体重に達し、繁殖に成功できたため、成長率や生殖

機能の変更点のこれらのパラメータの差異の関連性は不明なままである (Walker ら、2007 年)。

4.1.3.5. 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。

ある試験からの報告によると、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。

4.1.4. 子孫 (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 頭の子孫のうち、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にはなかった (Wells ら、2004 年)。クローン後代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 頭の子孫 (F1) 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 頭の子孫について集められたデータに関する最近の調査からも裏付けられている (Watanabe および Nagai、2008 年)。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、クローンの子孫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、通常のコブに対するストレス反応も適度であった (Ortegon ら、2007 年)。ある試験では、高齢の不妊症の雄ウシが細胞ドナーとして利用され、*in vitro* でも *in vivo* でも正常な受胎能を示した 2 頭のクローン雄ウシ (F0) を生産した。従来の育種法によるウシ

はクローンからの精液を人工的に注入し、正常な妊娠期間を経て正常な出生時体重と成長を呈する F1 世代の 10 頭を生産した (Shiga ら 2005 年)。

クローン雄ブタ 4 頭からの精液を従来の育種法による雌ブタ 49 頭の交配に使用し、子 (F1) 293 頭が離乳期間まで生存した (Williams ら、2006 年)。追跡調査では、ブタの子 242 頭は商業的な条件下で飼育されたとの報告があり、対照群の雄ブタ (n=3) の子 (n=162) に比べ、健康状態または死亡率に何ら差異は示されなかった (ViaGen Inc. 米国; Walker ら、2007 年)。

クローン雌ブタ 6 頭に従来の育種法による雄ブタからの精液を人工的に注入し、44 頭の子 (雄 23 頭、雌 21 頭) を生産した (Shibata ら、2006 年)。F1 の出生時体重は対照群に比べ有意に低く、出生 30 日後の F1 の成長率は対照群に比べ有意に高かった。しかしながら、この差異は離乳期には消失した。平均同腹仔数のほか、出生時の数ならびに離乳期まで生存している子ブタの数を対照群と比較すると、F1 では同様であった。

クローン雌ブタ 9 頭は、従来の育種法の雄ブタと交配させた (Mir ら、2005 年)。体重の平均値と平均一腹子数の違いは、クローン群および対照群でそれぞれ 7.8 ± 2.6 および 7.4 ± 3.0 であり、2 群間に差異はなかった。生後 15 週目と 27 週目の時点では、14 頭と 8 頭の子 (F1) の血液パラメータ 10 項目について報告があった。10 項目のパラメータのうち 2 項目 (血中尿素窒素およびアルカリホスファターゼ) は、F1 および対照群間で有意差がみられたが、これらは 2 つの時点でみると、差異に一貫性がなかった (アウトライヤーの動物に起因)。

4.1.5. 動物の健康についての結論

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。

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) 体細胞を提供する動物および供卵動物ならびに仮腹雌の感染状態を考慮しなければならない。

仮腹雌に関して、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、将来的に仮腹雌の受精率に影響を及ぼす可能性がある。
- ・ 水腫胎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仮腹雌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 SCNT を用いない ART により妊娠した仮腹雌に見られるが、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：

- ・ データは限られており、可変性があるにもかかわらず、クローンの死亡率は有性生殖による動物よりもかなり高い。
 - － ブタ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子死亡が多く見られる。
 - － 死亡率の上昇は、クローンブタとクローンウシの周産期とクローンウシの幼若期に認められる。
 - － 少数の試験から、成体クローンで死亡率の上昇がみられたとの報告がある。
- ・ 有性生殖による動物と比較したクローンの罹患率の上昇の証拠がある。
 - － 一部のクローンウシは生理作用にいくつか異常を示す。
 - － 妊娠中は、過大子症候群 (LOS) を含め、主に生理的な有害転帰がほかの ART による動物より高い頻度でクローンウシに認められる。
 - － 利用可能なデータの中には、しばしば罹患率と死亡率の原因を明らかに示すものがない。
 - － 対象動物が少数で、行った分析も少ないと、クローン動物の免疫機能に対するクローニングの影響を精密に測定することができない。そのような影響がもしあれば、動物とヒトの健康面に不安を感じる感染物質に関しては、クローン動物のキャリア状態を修正することができる。
 - － 確証的な証拠がまだ不足しているにもかかわらず、クローニングまたは ART のいずれかによって複製された動物で観察された有害作用の近似の類似性は、一般的な発生を示唆している。
 - － 畜産業でのケアのレベルが高い場合は、クローンの生存初期の生存率と健康度を高めることができる。
- ・ 生理的測定値、挙動、および臨床検査によって判定されるにつれ、幼若期を生き残るクローンウシと周産期を生き残るクローンブタは正常かつ健全であるとみられる。
 - － 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。

子孫 (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。動物のクローニングは比較的最近の技術であるため、このようなデータの有効性は非常に制限される。したがって、どのような直接的な結論でも、クローニングの福祉面を引き出すことは難しい。前述のセクションに示したとおり、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の解釈に基づいたものである。こうした動物の精神的幸福感の指標として、影響を受けた動物の身体的な健康を解釈することは、擬人化した外挿法による推定で阻まれており、定性的で、より一般的な性質しかない。しかしながら、科学委員会は、定量的な直接の動物の福祉の指標がない場合、動物の福祉の指標のこのいくらか控え目な解釈が最適なアプローチであると考えた。

クローニングの実情に即して、供卵動物（核ドナー）、妊娠動物（仮腹雌）、クローン (F0) およびクローンの子孫 (F1) は全て熟慮しなければならない。

4.2.1. 供卵動物の福祉

クローニングの手法自体は通常、体細胞核を提供する動物または供卵動物の福祉に影響を及ぼさない。手術者が有資格者であれば、卵子吸引は動物の福祉に有害ではない (Chastant-Maillard ら、2003 年 ; Petyim ら、2007 年)。

4.2.2. 仮腹雌の福祉

妊娠中および分娩間近の仮腹雌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。これらの有害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と不安のリスクを負い、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。新生子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仮腹雌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、仮腹雌においてわずか妊娠 50 日目という初期に検出され、後に胎子死亡をまねき、また、胎子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 SPS60 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、ウシ仮腹雌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. 出生時から離乳期までのクローンの福祉

心臓血管系、呼吸系、およびその他の器官系統が子宮外での生存に適応するにつれて、誕生直後の期間はすべての新生子にとって危険である。自然分娩の子から明らかになるのは、多くの代償機構や調節機構の数が出産時のストレスを最小化するという点である。したがって、新生子動物がいわゆる呼吸困難などの異常機能の重症度の徴候を確実に示すことができる場合でも、必ずしも成体がそのような条件下で有害作用を経験するとは限らない。実際に、軽度の生後ストレスは、ストレスへの対処、恐怖、学習能力に関して有益な結果を扇動するものかもしれない (Casolini ら、1997 年)。

出生後、新生子は脳内の酸素を含んだ血液の流れが増すため意識が高くなり、次には苦痛を経験する可能性がある。苦痛や疼痛を受けることは、早産のヒトの乳児と子ヒツジで明らかにされている (Slater ら、2006 年 ; Mellor および Gregory 2003 年)。新生子における苦痛は、さまざまな周産期の蘇生術や生存技術 (例、平手打ち、口中の清浄、皮膚の強い摩擦、初乳で栄養を与える場合も含め強制的な栄養投与) に起因する可能性がある。

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。クローン新生子に対して、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)。

クローニングの場合、胎盤機能不全の頻度が高まるため、酸素交換時の変化や胎盤の血液ガス関門時の変化が原因で胎子のストレスが生じる可能性がある (Kato ら, 1998 年; Galli ら, 1999 年; Wells ら, 1999 年; Young および Fairburn 2000 年; Batchelder ら, 2007b 年)。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)。

クローン胎子を有する雌に、後期妊娠中の苦痛または疲労ならびに過大胎子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子に影響を及ぼすと考えられる。クローン胎子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)。

LOS の子ウシおよび子ヒツジの場合、さまざまな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、外見上正常なクローンや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れよりも強いことはないと考えられる。

4.2.3.2. 離乳期後から春機発動／解体処理時／寿命末期のクローンの福祉

福祉の影響に関しては、生殖的に成熟期に近づいているクローンの通常飼育動物と比較したデータの報告はない。

供卵動物の非遺伝的なものに基づく異常な行動特性はクローン (F0) でみられるという証拠はない。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、積極的で優位にある」傾向が見られた。これらの観察事項の有意性はいまだ不明である。

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)。不慣れな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。

それぞれ、生活活動、新しい出来事に対する反応、食物の嗜好は、2 種類の遺伝的に同一のクローン Duroc の同腹仔で 4 頭と 5 頭のブタから成る群と、各々 4 頭のブタから成る 2 種類の非クローン Duroc の同腹仔で認められた (Archer ら、2003b 年 ; Archer ら、2003c 年)。クローン群は非クローン対照群と類似していたが、より可変的であった。しかしながら、別の論文によれば、この試験のデザインは考慮すべき統計ノイズに加えて、推測統計学には適用できなかった (Shutler 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、クローンとその同腹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。母体と胎子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、母体から胎子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. 子孫 (F1) の福祉

家畜種では、クローン後代の福祉に特化した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

- ・ 限られたデータのみ、仮腹雌、クローン、子孫への SCNT の福祉的な影響に利用できる。
- ・ クローニング手技自体は体細胞核を提供する動物または供卵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仮腹雌の福祉に影響を及ぼす傾向にある。これらの有害な健康上の転帰は、従来の方法での生殖やほかの ART を用いる方法より、SCNT では発生頻度が高い。
- ・ クローニングプロセスの効率が低いため、多くの仮腹雌は妊娠不全に陥る。

5. クローン (F0) およびクローン後代 (F1) から得る食肉および乳の安全性

5.1. 安全性を考慮した分子的、生物学的、化学的側面

食物の分子的、生物学的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、科学委員会はウシからの牛乳や牛肉、クローン由来のブタからの豚肉および肉製品、およびその子孫の安全性評価の後述の側面を、有性生殖による動物から得た乳および肉と比較して検討する。

5.1.1. クローンとクローン後代由来の食肉および乳の組成の比較

動物のクローン (F0) とその子孫 (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。比較は栄養上の成分の詳細を対象に入れる。ウシからの牛乳および食肉の成分は動物の飼料の性質と生活する環境に特に大きく影響され、通常飼育動物由来の食品の場合は広範な個体相互変動性につながる (Palmquist ら、1993 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を検査対象とする必要がある。食肉および牛乳の組成上のデータは、品種、給餌法、年齢、乳汁分泌の段階により、文献の中でさまざまに大きく変わる。有性生殖による動物で認められた生化学的成分の変動性の範囲を示す参考文献のデータベースは、ク

ローンおよびその子孫の組成を比較する際に利用できる (Jensen ら、1995 年; Caballero ら、2003 年; Belitz 2004 年)。したがって、同様の遺伝的背景の同様の条件下で管理された適切な比較器役の対照群のみで比較することが重要である (Smith 2005 年)。

クローン (F0) またはその子孫 (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。

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 (ViaGen Inc. 米国)。ブタのクローンの子の構造についての試験では、4 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 (クローンおよび対照群) から成る 58 項目のパラメータについて検討された。この 3 つの個々値のみが対照群の範囲外の値であった。

いくつかのほかの試験で分析されたパラメータには、枝肉の特性、食肉および乳の組成、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。これらの試験は、正常な変動性の範囲外で一切差異が特定されなかった (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; Laible ら、2007 年; Walker ら、2007 年; Heyman ら、2007a 年; Yang ら、2007b 年)。

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子孫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子孫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。しかしながら、データベースには限界があることを認識しておく必要がある。

5.1.2. 毒性試験およびアレルギー性試験

従来の毒性試験は個々の化学物質に向けてデザインされたものであり、無添加食品を検査するには大きな限界がある。食料品はかさばり、飽食に至り、予測されるヒトの摂取量の少ない倍数で実験動物の食物の中にわずかに含まれるのみである。また、無添加食品で動物試験を実施する際に考慮すべき主要な要素は、素材自体とは直接関係のない有害作用の誘発を防止するために使用される食事の栄養価とバランスである（ACNFP、1998）。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。

5.1.2.1. 飼養試験

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进行调查するため、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。各製品とも、3つの異なる濃度で検査した。生乳および牛肉でタンパク含有量に基づき、投与される最高量は、ヒトの食事で摂取される通常の1日量を超える。このラットは、試験対象のグループのいずれでも影響を受けなかった（Yamaguchiら、2007年）。同様の結果は、クローンウシ（F0）からの牛乳および食肉を含有する食餌を用いた21日間の飼養試験から得られた（Tomeら、2004年；Heymanら、2007a年；Heymanら、2007b年）。クローンウシの子孫（F1）から得た食肉および牛乳を給餌したラットにおける12カ月間の経口毒性試験（生殖した実績を含む）が最近になって発表された（Yamaguchiら、2008年）。食肉は、SCNTによる雄ウシからの精液を注入した従来の育種法によるウシの子孫3頭（F1）に由来したものであった。牛乳は、従来の育種法による雄ウシからの精液を注入したクローン雌ウシ（F0）の子孫3頭（F1）に由来したものであった。従来の食肉や乳製品を給餌されたラットと比較すると、F1から食肉や牛乳を給餌されたラットとの間に、検討対象のパラメータ（血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量、組織学的検査）の生物学的に有意な差異はみられなかった。

5.1.2.2. 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）。

5.1.2.3. アレルギー性

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、アレルギー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ギー性の差異を、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)。

ラットとマウスのモデルはヒトのアレルギー性の予測的試験に特化したモデルではないため、これらの結果は示唆的なものでしかない (WHO/FAO、2001 年)。しかしながら、核 DNA 塩基配列が不変であるため、一次タンパク質構造の変化や、クローンおよびその子孫の食用製品に新たな蛋白質が存在することは期待されない。

5.1.3. 新しい成分が存在する確率

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エピジェネティック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。さらに、新しい DNA 塩基配列がクローンに導入されなかったため、毒物またはアレルギーなどの新しい物質の産生または発生は期待されない。

5.1.4. 動物と動物から得られたヒトの摂取用の製品

EU の法律によれば、食肉製品に使用される種に属している動物は、それらが既存の規制対象の動物の健康と食品の安全性要件を満たしているかどうかを判定するため、個々に生

体検査と剖検が行われている。クローンを含む動物で、生体検査で疾患の臨床所見を示すことが判明したものは、その枝肉と臓物部分とともに、解体処理前か処理後のどちらかに、食物連鎖から取り除かれるため、ヒトの食物供給のルートからは除外されることになっている。これらの要件は、生体検査または剖検のいずれかにおいて疾患または損傷の明白な徴候を検出した後でとられた措置に関連するものである。これは、菌および化学物質の混入物の最大容認レベルに関する判定基準によっても補完されている。

同様に、従来の育種法で生産された動物もクローンも、ウシ（およびその他の動物）から得る乳製品は、相当する EU の法律の規制対象となる。

5.1.5. 微生物学的な側面

病原微生物は、臨床疾患がみられない場合でも、従来の育種法で生産された動物とクローンで検出される可能性がある。こうした物質は後になって、これらの動物の枝肉やその組織の解体処理の際に、存在することがある。その物質がその動物種にとって病原性であれば、減退した免疫能力が臨床疾患をまねくおそれがある。

5.1.6. 残留物の濃度

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。クローン動物（F0）は概してより多くの集中治療を必要とするため、特に生育や発達段階の初期に、治療のための獣医学用の医薬品の利用は、自然な比較器役の対照群の場合より多くなる可能性がある。しかしながら、獣医学薬の残留物濃度を比較する値で利用できる信頼性の高いデータはない。いずれのケースでも、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。

5.2. 食品の安全性についての結論

現段階の情報に基づき、主な DNA 塩基配列がクローンでは不変であるという事実を考慮すると、健全なウシクローンおよびブタクローンとその子孫から得られた食品に関しては、健全な従来の育種法による動物から得られたものと比較した場合に差異を示すものはない。

この結論は、以下に示す現在の証拠にも基づいている。

- ・ 健全な従来の繁殖法による動物から測定される生理的パラメータで健全なクローン間には有意差はまずあり得ない（第 4 章参照）。
- ・ 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、健全なクローンまたはクローンの子孫とこれに対応する従来の繁殖法による健全な動物間に、正常な変動性の範囲外の差異がみられる可能性はほとんどない。
- ・ クローンおよびその子孫から得た食品の摂取に関連した毒物的作用およびアレルギー性の作用はまずない。

しかしながら、クローンの免疫能力に関する情報が限られているため、病原体が事実上人畜共通である症例において、このような感染症またはインフェステーション（および関連する公衆衛生リスク）の有病率が従来の育種法で生産された動物のそれと同様であるかどうかは不明である。

6. 遺伝的多様性、生物多様性、および環境への影響

6.1. 遺伝的多様性

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（FAO、2007 年）。

6.2. 生物多様性

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 (NZRBCS、2002 年)。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。

6.3. 環境への影響

クローンやその子孫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所有していることを示唆するものは一切ない。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。

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 で生産された動物への獣医薬品の利用に範囲を広げて 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。

6.4. 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

- SCNT の技術を適切に用いれば、国内の種の中にみられる遺伝的多様性に有害な影響を与えないものと思われる。
- クローニングによって、絶滅の危機にさらされた動物種を復元させる機会が得られる。
- クローンやその子孫が従来による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。

総体的結論と勧告

結論

体細胞核移植 (SCNT) は動物の繁殖のなかでも比較的新しい技術で、利用可能なデータが限られているが、クローンを生産するために数カ国でますます利用されている。これらのクローンは、後に従来の方法あるいはその他の方法を用いてさらに育種に利用できる。

クローニングを利用する動物種が数種であった間は、リスク評価を行う際に利用できるデータはウシとブタの例のみで十分であった。

リスク評価に不確かさが生じる原因には、利用できる試験の件数が限られていること、調査対象のサンプルサイズが小さいことのほか、概してこの意見書に関連するすべての問題に比較的十分に対処できる同様のアプローチがないことなどが挙げられる。

主にウシの場合は幼若期中に、ブタの場合は周産期中にある有意な頭数のクローンの健康と福祉では、有害な影響を受けていることが判明し、しばしば重度で致死的な転帰がみられた。エピジェネティック的調節不全は、クローンに影響を及ぼす可能性のある、結果として発育異常をまねくおそれのある有害作用の主な源であるとみなされている。しかしながら、ウシとブタでの SCNT の使用は、生理特性、挙動、臨床状態などのパラメータに基づく従来の繁殖法による動物と類似している健全なクローンと健全な子も産生した。臨床的に健全なクローンの生産は、エピジェネティック的な再プログラム化が成功した例の証拠を示す。

食品の安全性に関しては、従来の育種法による動物から得た食肉および乳に比べ、クローンおよびその子孫のそれらとの間に何らかの差を示す徴候はない。このような結論は、義務的な生体検査および剖検によって評価を行うため、ウシやブタから得た食肉は健全な動物に由来し、牛乳が健全なウシから作り出されており、いずれの場合もこれらの食品が微生物および化学物質の混入物に関する食品の安全性基準に従っているとの仮説に基づいたものである。

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。

勧告

一般的な勧告

- ・ クローンの健康と福祉については、クローンから生まれる動物の生存中の様子と寿命をモニタリングする必要がある。
- ・ ウシとブタ以外の食用動物も SCNT を経て得られているため、当該データが利用できるようになった場合は、これらの種においてもリスク評価を行うべきである。
- ・ 本意見書は、クローニングや新たな関連データの発展に照らして更新すべきで

ある。

付加された勧告

SCNT のエピジェネティック的側面および遺伝的側面に関し、以下について判定するか、または詳細な調査を行うことを推奨する。

- ・ 有害作用の原因としてのエピジェネティック的調節不全の役割。
- ・ クローンに発生するエピジェネティック的調節不全がどの程度まで子孫 (F1) に伝達されるか。
- ・ そしてその場合は、SCNT がどの程度までサイレント DNA 突然変異を誘発するか。
- ・ SCNT 内でのミトコンドリアの異質性により考えられる結果。
- ・ 異なる細胞由来のクローンのテロメア長の影響。

動物の健康に関して以下の事項を推奨する。

- ・ クローンウシとクローンブタの寿命に対する SCNT の潜在的影響について、さらに詳細に研究を実施すること。
- ・ 妊娠期間中と出生直後のクローンで観察される病変の原因と死亡率について、また成人期ではそれらが観察される頻度が低かった点について、詳細に調査すること。
- ・ 従来 of 農業条件下で養育して庇護する際、疾患や伝播性の因子に対するクローンとその子の免疫適格性と感受性について詳しく調査すること。

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全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。
- ・ 仮腹雌の福祉に有害作用をもたらし得る異常な胎子の発現の初期のマーカについて、仮腹雌のモニタリングを行う。

食品の安全性に関して以下の事項を推奨する。

- ・ 証拠は、クローンの低下した免疫担当性を利用できるようにならなければならない (上記の動物の健康に関する勧告を参照)、そしてその場合は、伝播性の

物質へのヒトの曝露の増大をまねく可能性のあるクローンまたはそれらの子に由来する食肉および乳の摂取にまで範囲を広げて調査すべきである。

- ・ クローンおよびその子孫に由来する食用の動物製品の組成上の特性や栄養的特性に関するデータベースを拡張しなければならない。

EFSA に利用できる情報

EFSA は、2007 年 4 月 27 日から 5 月 29 日にかけて、ウェブサイトに関するデータの要求を公表した。

情報は、以下の組織から受領した。

AAVS (American Anti-Vivisection Society : 動物実験反対団体)、アメリカ

- FDA リスク評価 (草案) についてのコメント。47 ページ。

BIO (Biotechnology Industry Organisation : バイオテクノロジー工業組織)、ベルギー

- 2007 年 5 月 29 日に「EFSA, Implications of animal cloning」へのコメント。5 ページ。

Center for Food Safety (食品安全性センター)、アメリカ

- 報告書 : Not Ready for Prime Time. (プライムタイムの準備ができていない) FDA の『Flawed Approach To Assessing The Safety Of Food From Animal Clones』。25 ページ。
- アメリカ食料医薬品局への市民嘆願書。
クローン動物の規制を求める嘆願。24 ページ。

CIWF (Compassion in World Farming : 畜産に思いやりを)、イギリス。

- 報告書 : 『Farm Animal Cloning from an Animal Welfare Perspective』。10 ページ。

Danish Centre for Bioethics and Risk Assessment Institute of Food and Resource Economics

(食物と資源経済学についてのバイオエシックスとリスク評価のためのデンマークセンター)、デンマーク。

- 現在の研究活動と精選参考文献に関する情報。

EFFAB (European Forum of Farm Animal Breeders : 家畜育種家の欧州フォーラム)、オランダ。

- The importance of cloning in bovine selection (ウシのクローニングの選択の重要性)。2 ページ。
- The European Perspective for Livestock Cloning (家畜クローニングのためのヨーロッパの展望)。19 ページ。
- 要約。2 ページ。
- Possibilities and Concerns (可能性と懸念事項) — Perspectives of Farm Animal Breeders (家畜育種家の展望)。24 ページ。

Faculty of Agricultural Sciences at Aarhus University (オーフス大学農業科学部)、デンマーク。

- 現在の研究活動と精選参考文献に関する情報。

IETS (International Embryo Transfer Society : 国際胚移植学会)、アメリカ。

- International Embryo Transfer Society (IETS) および Health and Safety Advisory Committee (健康と安全に関する諮問委員会 : HASAC) の委任事項「Terms of Reference for Food Safety Subcommittee」。2 ページ。
- International Embryo Transfer Society (IETS) および Health and Safety Advisory Committee (HASAC) の委任事項「Terms of Reference for Research Subcommittee」。2 ページ。

Institut national de la recherche agronomique INRA (Jouy-en-Josas : 国立農学研究所)、フランス。

- 現在の研究活動と精選参考文献に関する情報。

I-SiS (Institute of Science in Society)、イギリス。

- Is FDA Promoting or Regulating Cloned Meat and Milk? (FDA はクローン化した食肉や牛乳を促進しているのか規制しているか?) 7 ページ。
- Cloned BSE-Free Cows, Not Safe Nor Proper Science (クローン化された BSE の危険性がないウシ、安全性も適切性もない科学)。8 ページ。

ViaGen Inc (ViaGen 社)、アメリカ

- レター。3 ページ
- 米 FDA に提供されるデータ (29 ファイル、XL ファイルおよび Word ファイル)。このデータは、米国 FDA の 2008 年度の報告書内で一般公開されている。“Animal Cloning: A Risk Assessment”、Appendix F は以下で

ご覧いただけます。

http://www.fda.gov/cvm/CloneRiskAssessment_Final.htm

(最終アクセス日 2008 年 6 月 27 日)

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	本意見書で使用される場合の定義
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、後に胎子となる内細胞塊と、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じたDNAに対する生化学的修飾。
ドナー動物	クローニング法に使用するために細胞を採取される動物。
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。胎子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（再構築）	<i>in vitro</i> での顕微操作によりその構成部分から再構築された胚。
エピジェネティックのプロセス	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。
エピジェネティック的調節不全	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	エピジェネティック（後成）的に変更される対立遺伝子。
線維芽細胞	主に結合組織にみられ、細胞外基質の形成と合成に関与（例、膠原線維）。
胎子	胚期後の出生前の発育中の哺乳類。
配偶子	雄または雌から得た成熟した生殖細胞で、新しい有機体が卵母細胞を呈することができる接合子（二倍体）を形成する異性からの別の配偶子と正常に融合する染色体の n （一倍数）を含む。卵母細胞と精子は、配偶子である。
配偶子形成	一倍体の配偶子の形成過程。
遺伝的多様性	遺伝子で種を作る遺伝的特性の総数。
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。
ヘテロプラズミー	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。
健全性	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。
尿膜の水腫	胎盤の尿膜腔内に異常に液が蓄積すること。
水腫胎	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子の状態。水腫胎によって自然流産に至ることがある。
インプリンティング（刷り込み）	ある遺伝子が父母由来の対立遺伝子のうち一方で発現される遺伝現象。
幼若期	生後最長 6 カ月の若いウシについて呼ぶ期間。
LOS	過大子症候群。種または品種の平均+ 2SD を超える子の大きさ。症状には、臨床的水腫、胎盤浮腫のほか、心臓肥大と肝肥大をもたらす臓器の非同期的な成長などがある。
寿命（自然命数期間）	特定の種の個体が生きられると見込まれる典型的な長さ。
卵母細胞	未受精卵子、雌性配偶子。
供卵動物（卵母細胞ドナー）	クローニング法で使用される未受精卵子（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。
胎盤分葉数	胎子側胎盤分葉と、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。多能性細胞は胎子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。
出生直後	出生直後の期間
クローン後代	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。
サイレント変異	結果として蛋白質のアミノ酸変化を呈さない DNA 突然変異。
体細胞	生殖系列細胞以外の動物の何らかの細胞。
仮腹雌	クローン胚を妊娠している動物。
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を囲む厚い糖タンパク質層。
接合子	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

Uncertainties in the risk assessment arise from the limited number of studies available, the small sample sizes investigated and the absence of a uniform approach to allow all the issues relevant to this opinion to be addressed.

This opinion considers animal health aspects in relation to the surrogate dams, to clones and their progeny. For surrogate dams, an increase in pregnancy failure has been observed in cattle and pigs and increased frequencies of hydrops and dystocia have been observed especially in cattle. This together with the increased size of the offspring (large offspring syndrome) makes Caesarean sections more frequent in cattle carrying a clone than with conventional pregnancies. These effects have also been observed in surrogate dams carrying pregnancies induced by assisted reproductive technologies not involving SCNT, but at much lower frequencies.

A significant proportion of clones, mainly within the juvenile period for bovines and perinatal period for pigs, has been found to be adversely affected, often severely and with fatal outcome. Most clones that survive the perinatal period are normal and healthy, as determined by physiological measurements, demeanour and clinical examinations. There is no indication of adverse effects for the sexually reproduced progeny of cattle or pig clones. However, clones and their progeny have not yet been studied throughout the whole of their natural life span.

The current welfare assessment is extrapolated from mainly animal health data. The welfare of both the surrogate dam and a significant proportion of clones has been found to be affected by the adverse health outcomes observed.

For the evaluation of the safety of bovine milk and meat from cattle and pigs derived from clones or their progeny, the following aspects were considered: compositional and nutritional data, probability of novel constituents to be present, health status of the animal, available data on toxicity and allergenicity. Based on current knowledge, and considering the fact that the primary DNA sequence is unchanged in clones, there is no indication that differences exist in terms of food safety between food products from healthy cattle and pig clones and their progeny, compared with those from healthy conventionally-bred animals.

At present there is no indication that clones or their progeny would pose any new or additional environmental risks compared with conventionally bred animals.

A number of recommendations is given at the end of the opinion.

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

TABLE OF CONTENTS

Scientific Committee Members.....	1
Summary	1
Table of Contents	3
Background as provided by the European Commission	5
Terms of reference as provided by the European Commission.....	5
Acknowledgements	5
Assessment	6
1. Introduction to the opinion	6
1.1. Matters not addressed in the opinion	6
1.2. Terms used in the opinion.....	7
2. Animal breeding and reproductive techniques	7
2.1. Introduction to Somatic Cell Nucleus Transfer (SCNT).....	8
2.2. Cloned species and cloning efficiency.....	9
2.3. Data on clones and their life span	9
2.4. Possible use of cloning	10
3. Epigenetic and genetic aspects of SCNT.....	10
3.1. Epigenetic aspects: Reprogramming in clones	11
3.1.1. Transgenerational epigenetic inheritance	13
3.1.2. Epigenetic telomere modifications	14
3.1.3. Epigenetic dysregulation in perspective	14
3.2. Genetic aspects.....	15
3.2.1. Mitochondrial DNA modifications.....	15
3.2.2. Silent mutations	15
3.3. Other aspects.....	16
3.4. Conclusions of epigenetic and genetic aspects of SCNT.....	16
4. Animal health and welfare implications of SCNT.....	16
4.1. Animal health.....	17
4.1.1. Health of source animals for somatic cells and oocytes	17
4.1.1.1. The somatic cell nucleus source	17
4.1.1.2. The oocyte source	17
4.1.2. Health of surrogate dams.....	18
4.1.3. Health of clones (F0).....	19
4.1.3.1. Immune function of clones	19
4.1.3.2. Health of clones during gestation and the perinatal period.....	19
4.1.3.3. Health of clones after birth up to sexual maturation.....	20
4.1.3.4. Health of clones after sexual maturation.....	21
4.1.3.5. Mortality of adult clones.....	22
4.1.4. Health of progeny (F1)	22
4.1.5. Conclusions on animal health.....	23
4.2. Animal welfare aspects	24
4.2.1. Welfare of the source animals	25
4.2.2. Welfare of the surrogate dam	25
4.2.3. Welfare of clones.....	25
4.2.3.1. Welfare of clones at the time of birth to weaning.....	25
4.2.3.2. Welfare of clones after weaning to puberty/slaughter/end of natural life.....	26
4.2.4. Welfare of progeny (F1).....	27
4.2.5. Conclusions on animal welfare.....	27
5. Safety of meat and milk derived from clones (F0) and their progeny (F1).....	27
5.1. Molecular, biological and chemical aspects considered for safety	27
5.1.1. Compositional comparison of meat and milk derived from clones and progeny of clones.....	28
5.1.2. Toxicity and allergenicity testing	29
5.1.2.1. Feeding studies	29
5.1.2.2. Genotoxicity	29

5.1.2.3. Allergenicity	29
5.1.3. Probability of novel constituents to be present.....	30
5.1.4. Animals and animal products for human consumption	30
5.1.5. Microbiological aspects.....	30
5.1.6. Residue levels.....	30
5.2. Conclusions on food safety.....	31
6. Impact on the genetic diversity, biodiversity and environment.....	31
6.1. Genetic diversity	31
6.2. Biodiversity.....	31
6.3. Environmental impacts	31
6.4. Conclusions on Impact on the Environment and Genetic diversity	32
Overall Conclusions and Recommendations.....	32
Conclusions.....	32
Recommendations	33
General recommendations.....	33
Additional recommendations	33
Information made available to EFSA	34
References	36
Glossary and abbreviations used in the opinion.....	47

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 become 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.⁴

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 OF 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. The opinion does not indicate any priority of the assessed areas.

ACKNOWLEDGEMENTS

The European Food Safety Authority wishes to thank the members of the Working Group for the preparation of this opinion: 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.

EFSA would also wish to thank the participants of the drafting group that prepared the final draft of the opinion before its adoption; Ada Knaap, Vittorio Silano, Pierre Le Neindre, John Collins and Jörg Hartung.

⁴ The final FDA risk assessment was published on 15 January 2008 and can be found at http://www.fda.gov/cvm/CloneRiskAssessment_Final.htm (last accessed 27 June 2008)

ASSESSMENT

1. Introduction to the opinion

This opinion is based upon published peer reviewed scientific papers, data and other information deemed reliable. EFSA launched through its Advisory Forum and on its website a request for scientific contributions on this subject from third parties; a list of all documents made available to EFSA can be found at the end of the opinion. A draft of the opinion was published on the EFSA web for public consultation between 11 January and 25 February 2008. During the public consultation, on February 7, a technical meeting with the EFSA's Stakeholder Consultative Platform was held. This meeting provided an opportunity to have an exchange of views and feedback from stakeholders, as part of the public consultation. All the public comments received that related to the remit of EFSA were assessed and the opinion has been revised taking relevant comments into consideration. The comments received and a report on the outcome of the public consultation has been published on the EFSA web.

While cloning has been applied to several animal species, only in the case of cattle and pigs has there been sufficient data available to perform a risk assessment. Where appropriate, reference is made also to data concerning other species.

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

Broadly speaking, cloning can be regarded as an assisted reproductive technology (ART) in the sense that it is a method used to achieve pregnancy by artificial means. However, in the context of this opinion, SCNT is not included in the current use of the term ART, as it is unique due to its asexual nature and permits the production of animals from a single animal with a given genotype of a known phenotype. The present opinion takes into account observations on clones in the context of animals produced by ART (such as artificial insemination, *in vitro* fertilization, embryo transfer and embryo splitting), and natural mating as appropriate. It is also acknowledged that ARTs are currently widely used in the zootechnical practice without any underlying formal risk assessment. In Europe artificial insemination (AI) is used in about 48 % of cattle breeding and 49 % of pig breeding; worldwide the figures are 42 % and 28 % respectively (FAO, 2007). The global conception rates following AI average 50-65 % in cattle and 70-80 % in pigs.

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

1.1. Matters not addressed in the opinion

Approaches to cloning other than SCNT, such as embryonic cell nucleus transfer (ECNT) using early embryonic cells (blastomeres) have been carried out, but in comparison with SCNT, relatively few animals have been described in the literature (Yang *et al.* 2007b). ECNT as well as genetically modified animals (rDNA animals) that have been propagated by the use of

SCNT are not assessed in the present opinion, nor are the effects of ARTs. Cloning, without involving SCNT is not addressed in this opinion. Moreover, the opinion does not address aspects of established procedures used in animal breeding or aspects related to breeding the progeny of clones.

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.⁵

1.2. Terms used in the opinion

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

- Clone

The word clone is derived from the Greek words *clonos*, “twig” and *clonizo* “to cut twigs”. 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.

- Cloning

Cloning, as assessed in this opinion, is defined as the technique of somatic cell nucleus transfer (SCNT). 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 DNA sequence.

- Progeny (offspring) of clone

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

2. Animal breeding and reproductive techniques

ARTs have contributed to 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. 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, is intended to reproduce a particular desired phenotype e.g., disease resistance ability, improved welfare, production or food product quality, with a higher likelihood than sexual reproduction. SCNT allows the replication of the genome of an animal with the intention of producing more animals with a desired trait over a period than might be possible through conventional or assisted breeding. However, as with any other reproductive technique, clones may also develop abnormally and/or possess undesirable traits.

⁵ http://ec.europa.eu/european_group_ethics/publications/

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).

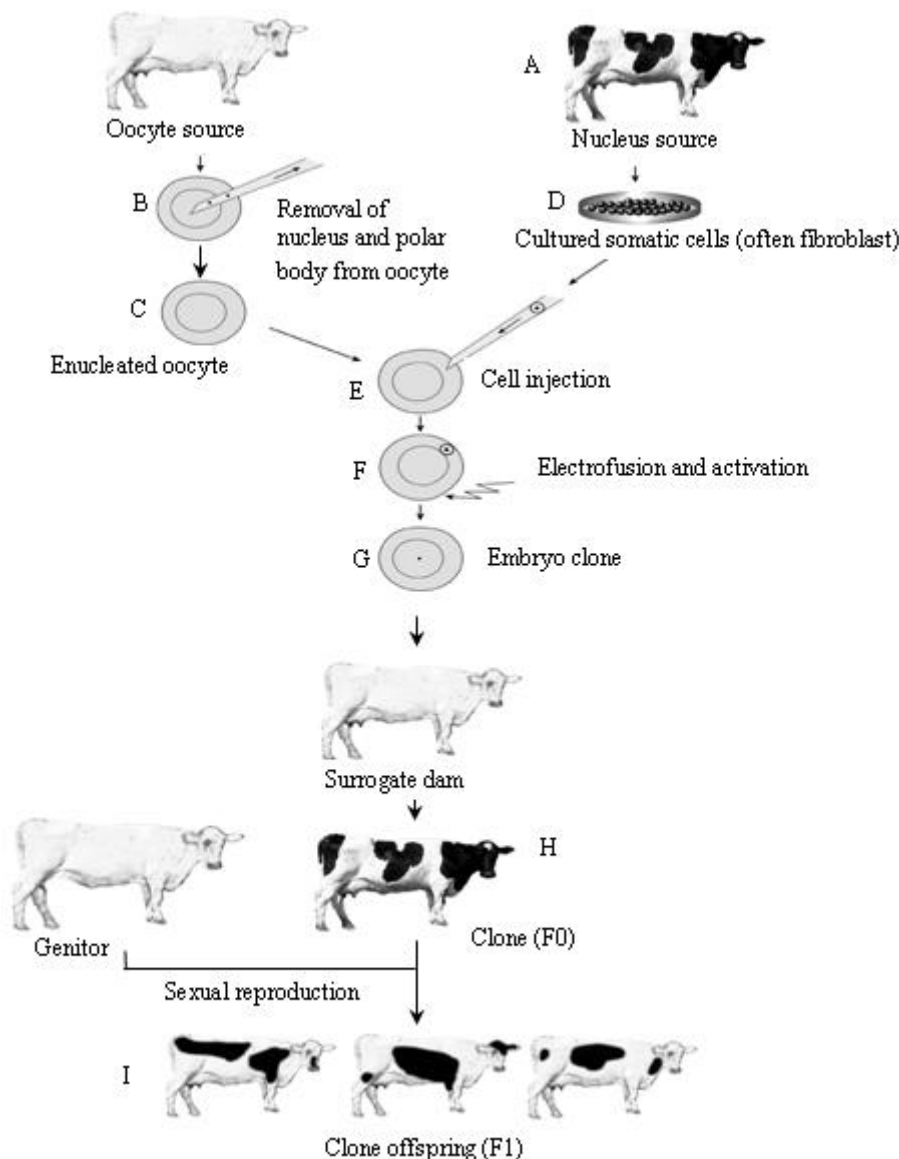


Figure 1. Main steps of somatic cell nucleus transfer (SCNT). (A) nucleus cell source; (B) the nucleus and the polar body are removed from oocyte by aspiration giving an enucleated oocyte (C); (D) culture of somatic cells from the nucleus donor; (E) injection of a somatic cell between the zona pellucida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

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. The opinion does not address the effect of these methodological challenges on the outcome of cloning.

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 (Sullivan *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2007).

2.2. Cloned species and cloning efficiency

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

The overall success rate of the cloning procedure to date is low and differs greatly between species. The overall success rate is often measured as the percentage of embryos transferred and the number of live clones born. Information is often also given on the survival at certain times, such as 24 h, after the perinatal period, weaning or puberty.

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 attributed 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.

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).

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. Data on clones and their life span

There is no world-wide register of clones; similarly no register is available in individual countries and therefore the number of living clones is difficult to estimate. From information gathered by EFSA it is estimated that in 2007 in the EU there were about 100 cattle clones and fewer pig clones alive. 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. EFSA estimates that the total number of clones alive world-wide in 2007 was less than 4000 cattle and 500 pigs.

The relatively small number is considered to be a reflection of both the difficulties of the SCNT techniques and the various voluntary or mandatory moratoria around the world regarding clones and their progeny. The current number of clone progeny (i.e., F1 and subsequent generations) is also limited, largely for commercial reasons. Despite this, however, gametes (primarily semen) from clones have been traded for a number of years.

Although farmed animals may live for decades their production life is relatively short (e.g. beef cattle approximately 1-3 years, dairy cattle approximately 5-7 years, fattening pigs less than 6 months). Consequently, it will be difficult to generate data on the effect of cloning on the natural lifespan on farmed animals. 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 yet available.

Several studies indicate that mouse clones may have a lifespan as long as their conventionally bred counterparts, whereas other studies reported a shorter life span (Ogonuki *et al.*, 2002; Tamashiro *et al.*, 2003; Wakayama *et al.*, 2000).

2.4. Possible use of cloning

With SCNT there is the opportunity to clone those animals that have already shown good productivity, a low incidence of disease and ability to cope with the production environment. As a result there may be an even greater chance that clones will propagate 'good' phenotypes as animals can be selected according to their own individual performance criteria. Traditional breeding methods, based on phenotype and population, are more recently complemented with genetic markers that may result in improved, poorer or the same quality of life for the animal and, where often, individual performance testing has not been carried out. However, as with any breeding strategy it is important to carry out longer term risk assessments on critical aspects and at critical ages to address potential genetic risks associated with changes occurring due to the process of genetic reprogramming.

SCNT is starting to be used commercially for purposes of breeding food production animals in a few countries outside the EU. Within the EU, SCNT is used for research purposes as a reproductive technique. The application of SCNT in research allows for the generation of an understanding of fundamental biological mechanisms, with potential benefit in other areas such as medicine.

The Scientific Committee noted that the primary use of clones (F0) commercially is to produce elite animals to be used in breeding, and not to produce animals as a food source.

3. Epigenetic and genetic aspects of SCNT

Successful SCNT requires that the nuclear activities of the differentiated somatic cell used in cloning are reset to those of an undifferentiated embryonic cell and that the new embryo is able to complete foetal development. The somatic cell nucleus has to change its gene expression pattern in relation to changes in its microenvironment in order to be able to replicate all steps of normal development. This process, which is by essence epigenetic, leaves the primary DNA sequence unchanged and is reversible. Epigenetic modifications include biochemically-mediated conformational changes of the proteins surrounding the DNA (i.e. chromatin) and also biochemical modifications of the DNA, particularly methylation. Modification of

chromatin proteins is a reversible and dynamic process. In contrast DNA methylation can be much more stable. Somatic cell reprogramming consists to a large extent of DNA demethylation followed by a specific re-methylation of those DNA regions which must remain silent in a given cell type. Epigenetic mechanisms affect the expression of some genes and such modifications may be transmitted to daughter cells (Jablonka and Lamb, 2002).

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

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

3.1. Epigenetic aspects: Reprogramming in clones

Reprogramming of nuclear activities after SCNT is a time-dependent process which involves two main steps: the de-differentiation of the somatic cell nucleus to a totipotent embryonic 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 correspond 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 foetus is interrupted, usually with fatal consequences. It is this phenomenon that is consistent with the considerable loss of embryo clones during 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 the blastocyst stage are also found aberrantly expressed in the organs of clones that had died shortly after birth (Li *et al.*, 2005). Methylation errors evidenced early in the preimplantation period of embryonic development can persist in bovine clone foetuses (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 following 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 cattle 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 (Kremenskoy *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 mouse new born 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 differed among individual new born clones analysed with an average of two to five aberrantly methylated loci per 1,000 loci in

each tissue. However the few cloned mice that developed to full term seemed to have almost perfectly re-established the genomic DNA methylation patterns necessary for their development (Shiota and Yanagimachi, 2002) 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. The extent to which individuals from a set of adult clones remains epigenetically different is however not known. There are some suggestion that abnormalities could disappear with the advancement of animals' aging (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. 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 bull clone (Ortegon *et al.*, 2007). In cattle a single offspring from mating a cow clone and a bull clone has been produced (Kasai *et al.*, 2007). Various examinations of this offspring at eight months age including growth characteristics, and clinical, serological, haematological, biochemical and telomere length analyses, indicated no abnormalities.

Nine female pig clones mated with a conventional boar produced 14 F1 piglets in which the parameters that were statistically significant between the clones (F0) and the controls were within the normal range in the F1 with exception of two parameters (Mir 2005). The two parameters (Blood Urinary Nitrogen and Alkaline Phosphatase) were not consistently different over time (attributed to an outlier animal).

Similar results have also been seen in mice, where the obesity character of the F0 was not transmitted to offspring produced by natural mating between clones (Tamashiro *et al.*, 2000; Tamashiro *et al.*, 2002).

Overall, these results indicate that aberrant traits exhibited by clones are not necessarily transmitted to their offspring produced by natural mating.

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 in rats (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. Therefore epigenetic effects of adult onset disease and the transgenerational epigenetic inheritance are not specific to cloning and would follow the same mechanisms in conventional animals. Recent data suggest complex epigenetic transgenerational effects on the phenotype of mammals and raise new scientific questions on genotypes bearing epigenetic differences (Han *et al.*, 2008).

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; Tian *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2004; Betts *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2005; Schaetzlein and Rudolph, 2005; Kasai *et al.*, 2007). 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 offspring from the same bull clone were not different from age-matched controls (Ortegon *et al.*, 2007).

3.1.3. Epigenetic dysregulation in perspective

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

3.2. Genetic aspects

Chromosomal disorders after SCNT are routinely observed at a high frequency during the preimplantation stages but mainly in morphologically abnormal embryos (Booth *et al.*, 2003). In a study of 20 cattle clones two showed high incidences (about 21 %) of abnormal cells with non-diploid chromosomes number. These abnormalities were not transient and indicates that instability in chromosome number can occur in phenotypically normal clones (Hanada *et al.*, 2005). The telomere length and chromosome stability of 30 offspring from the same bull clone showed no abnormalities compared with controls (Ortegon *et al.*, 2007).

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

3.2.1. Mitochondrial DNA modifications

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

3.2.2. Silent mutations

The extent to which SCNT induces silent mutations in the nuclear DNA of clones that could be 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 cytoplasmic disturbances may result in the malfunctioning of the cytoplasm and its organelles which could have an impact on the development of the embryo clone. The implication of cytoplasmic modification has not yet been determined (Tamashiro *et al.*, 2007).

3.4. Conclusions of epigenetic and genetic aspects of SCNT

- Epigenetic dysregulation is the main source of adverse effects that may affect clones and result in developmental abnormalities.
- Epigenetic reprogramming takes place successfully in clinically healthy clones.
- The DNA sequence of a clone is a copy of that of the donor animal, but some 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).
- The extents to which epigenetic and genetic aspects of SCNT are affected are not fully elucidated.

4. Animal health and welfare implications of SCNT

Animal health includes physical and mental 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.

As the literature on cloning is based on reports of work often 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.

There are a number of published reports relating to health and welfare of clones where the results are based on observations on mixed populations of clones and transgenic clones. Such studies are of limited relevance to this opinion if there is no direct indication on the possible impact of the transgenic effect.

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. In rare circumstances it could be a highly valued and/or monitored animal whose oocytes are collected by ovum pick up *in vivo*. In such cases, the animal health and welfare issues have been extensively addressed. There are reports indicating that the recovery of oocytes from live donor animals using an echography-guided approach is not detrimental to animal welfare provided the operator is licensed (Chastant-Maillard *et al.*, 2003; Petyim *et al.*, 2007). 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). The genomes of all vertebrate species investigated contain endogenous retroviruses. Possible reactivation of bovine endogenous retroviruses (BERV) during SCNT 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.

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). However, not all protocols applied to embryos produced *in vivo* are applicable to *in vitro* derived embryos, or cloned or 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 susceptibility or resistance of the source animal and its source tissue is important as the clone may be affected by such disease traits.

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 used during *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). This risk is reduced by sanitary management of source animals (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 cattle 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 (Batchelder *et al.*, 2005). 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).

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 elective Caesarean sections were also often carried out.

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

4.1.3. Health of clones (F0)

Four different outcomes 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 are secondary to, placental dysfunctions (Constant *et al.*, 2006).

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 those ARTs in which an embryo is introduced into a surrogate dam.

4.1.3.1. Immune function of clones

A limited number of studies have investigated the immune function of clones. A study of 17 cattle clones, aged 2 to 5 years, reflecting the immune function have been reported (Heyman *et al.*, 2007a and b). Lymphocyte populations were represented as normal in apparently healthy clones of all age classes compared to controls. After immune challenge there was no difference between clones and controls in the antibody response but the antigen-specific induced cell proliferation was weaker in clones. This finding may indicate that the bovine clones had a reduced capacity to mount a cellular immune response against a newly encountered antigen. However, when a similar study was performed later on the same animals and also in another set of clones, the immune function appeared normal, suggesting that there was an effect of age.

A study on nine cloned piglets demonstrated that following lipopolysaccharide challenge at 30 days of age, the acute phase response (cortisol, TNF- α , IL-6) was lower in some clones, or the same in other clones compared to controls (Carroll *et al.*, 2005).

In the early lactation stage the proportions of gammadelta and WC1+gammadelta T cells temporarily declined in cow clones, suggesting that cloned cows may fall into an immunosuppressive state in the early lactation stage (Tanaka *et al.*, 2006; Heyman *et al.*, 2007b).

4.1.3.2. Health of clones during gestation and the perinatal period

Large offspring syndrome (LOS), often thought to be a cloning-related phenomenon, was first described in pregnancies derived from the transfer of *in vitro* fertilized embryos in cattle and sheep (Farin and Farin, 1995; Walker, 1996; Kruip and den Daas, 1997; Sinclair *et al.*, 1999). 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 another study the incidence of LOS at birth was 13.3 % for somatic cloning based on 15 clones, compared with 8.6 % for 23 embryonic clones, and 9.5 % for a group of 25 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 % (9 of 19) has been observed when calf clones were derived from skin, ear or liver cells (Kato *et al.*, 2000).

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

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.

A study of eight 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 the increases in the level of bilirubin and fibrinogen were not necessarily abnormal since these increases remained within the normal physiological range.

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 (piglets weighting less than 1.04 kg). A comparison of 23 SCNT litters (143 individuals of which 41 were transgenic) 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). In this study no differences were observed in the parameters studied between the clones and transgenic clones.

A study has reported low birth weights in SCNT piglets, where 27 out of 40 died within the perinatal period from a variety of health problems including diarrhoea, meningitis and heart functional abnormalities. Twelve of the clones survived to adulthood. However, in this study it was not possible to rule out the presence of coexisting infections (Park *et al.*, 2005). A follow-up study by the same group found morphological abnormalities in the placentas of the nonviable clones which may have been caused by apoptosis of placenta cells (Lee *et al.*, 2007). The perinatal mortality rate reported above was not observed by other groups (Du *et al.*, 2007; Estrada *et al.*, 2007).

Gestational lengths of between 114 to 120 days have been reported for a limited number of pregnancies giving birth to pig clones (Walker *et al.*, 2002; Carroll *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2007). Generally, the average gestational length in pigs is about 115 days with a range from 110-120 days.

4.1.3.3. Health of clones after birth up to sexual maturation

One study in cattle reported that a mean of 30 % (21 of 59) of the calf clones died before reaching 6 months of age due to a wide range of pathological causes, including respiratory

failure, abnormal kidney development, and liver steatosis (fatty liver) (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 surviving 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. 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 %).

Cattle clones at about 6 months of age showed no relevant 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 profiles) 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).

EFSA was provided with a raw data set on porcine clones and their progeny by ViaGen Inc. USA, and publications based thereon (FDA, 2008; Williams *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2007). In this dataset, seven pig clones were delivered by Caesarean section whilst comparator controls (produced by AI) were delivered vaginally. The birth weights of the clones were smaller than the comparators (1.12 kg vs 1.73 kg).

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 (Estrada *et al.*, 2007). Additionally, there was a trend towards higher stillbirths and higher postnatal mortality in the SCNT population (Estrada *et al.*, 2007).

Studies on swine clones at 15 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; Williams *et al.*, 2006).

4.1.3.4. 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, after sexual maturation there was no significant variation regarding gestation length and survival of the offspring (Heyman *et al.*, 2007b). Subsequent 305-day lactation curves of clones, as a health parameter, were also comparable for yield, fat and mean cell counts. The mean protein content in milk from the clones 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 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).

Five gilt clones (of which four were transgenic) were mated to a clone boar and gestation length, litter size proportion of pigs born live and birth weights were comparable with those achieved from controls (Martin *et al.*, 2004). In this study no significant differences were observed in the parameters studied between the clones and the transgenic clones.

Data provided by ViaGen Inc. showed that porcine clones had lower IGF-I (Insulin like Growth Factor 1) than the comparator group after birth and before slaughter, although the levels, with the exception of one pig clone, were within the comparator range (ViaGen Inc. USA). Similarly, estradiol-17 β levels were lower in the clones than in the controls, but within the comparator range. As these clones reached market weight within the normal time frame and were able to reproduce successfully, the relevance of the differences in these parameters for alterations in growth rate or reproductive function remains to be seen (Walker *et al.*, 2007).

4.1.3.5. Mortality of adult clones

As SCNT is a developing technology, the number 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 refers 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 the likelihood of a reduction of lifespan or other aging-related effects are difficult to assess at present.

A study 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 on 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 a warm period of 2003.

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 (F1) 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 supports these findings (Watanabe and Nagai, 2008). 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 temperatures ($P=0.03$) in their early period of life. Furthermore, they showed moderate stress responses to routine handling (Ortegon *et al.*, 2007). In a study, an aged infertile bull was used as cell donor to produce two bull clones (F0) that exhibited normal fertility both *in vitro* and *in vivo*. Conventional cows were artificially inseminated with the semen from the clones and after normal gestation lengths produced ten F1 with normal birth weights and growth (Shiga *et al.*, 2005).

Semen from four boar clones were used to breed 49 conventional gilts and 293 offspring (F1) survived to weaning (Williams *et al.*, 2006). In a follow-up study, 242 of the pig offspring, raised under commercial conditions, were reported and showed no difference in health status or mortality rates compared to offspring ($n=162$) of control boars ($n=3$) (ViaGen Inc. USA; Walker *et al.*, 2007).

Six gilt clones were artificially inseminated with semen from a conventional boar and produced 44 (23 male and 21 female) offspring (Shibata *et al.*, 2006). The birth weight of the F1 were significantly lower compared to the controls and after day 30 the growth rates of the F1 were significantly higher compared to controls. However this difference disappeared at weaning. The mean litter size, the numbers of piglets born alive and surviving to weaning were all similar in the F1 compared to controls.

Nine gilt clones were bred to a conventional boar (Mir *et al.*, 2005). There were no differences in the means of body weight and average litter size between clones and controls, 7.8 ± 2.6 and 7.4 ± 3.0 respectively. At 15 and 27 weeks of age ten blood parameters of 14 and 8 offspring (F1) respectively were reported. Two out of the ten parameters (Blood Urinary Nitrogen and Alkaline Phosphatase) were significantly different between the F1 and controls but they were not consistently different at the two time points (attributed to an outlier animal).

4.1.5. Conclusions on animal health

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

The infection status of the somatic cells and oocytes source animals (specifically concerning the tissues from which 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.

In relation to surrogate dams it is concluded that:

- Increased pregnancy failure is observed following the implantation of cloned embryos. Based on information from 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.
- 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:

- Although the data are limited and variable, the mortality rate of clones is considerably higher than in sexually produced animals.

- Increased embryonic and foetal losses occur during pregnancy, mostly observed in cattle rather than in pigs.
 - Increased mortality is observed in the perinatal period for pigs and bovine clones and during the juvenile period for bovine clones.
 - A small number of studies report an increased mortality in adult clones.
- There is evidence of increased morbidity of clones compared with sexually produced animals.
 - A proportion of bovine clones show several altered physiological effects.
 - During gestation, mainly physiological adverse outcomes, including Large Offspring Syndrome (LOS), are observed in cattle clones at a higher frequency than with other ARTs.
 - In the data available, there is often no clear indication of the causes of morbidity and mortality.
 - The low number of animals and the few assays carried out do not allow precise measurement of the impact of cloning on the immune functions of the cloned animals. Such an impact, if present, could modify the carrier state of the cloned animals with respect to infectious agents of animal and human health concern.
 - The close similarity of adverse effects observed in animals reproduced either by cloning or by ARTs suggests a common genesis although conclusive evidence is still lacking.
 - High levels of husbandry care can enhance the survival and health of clones during early life.
 - Bovine clones that survive the juvenile period, and pig clones that survive the perinatal period appear to be normal and healthy as determined by physiological measurements, demeanour and clinical examination.
 - 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 natural life span.

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

- From the data available there is no indication of any abnormal effects in those species examined.

4.2. Animal welfare aspects

Qualitative and preferably quantitative data are required to assess welfare indicators directly on the animals concerned. Since animal cloning is a relatively recent technology the availability of such data is very limited. It is therefore difficult to draw any direct conclusions on the welfare aspect of cloning. The current welfare assessment is largely based on the interpretation of data related to the physical health of the animals as presented in the previous section. The interpretation of affected physical health of animals as an indicator of their mental well-being is hampered by anthropomorphic extrapolations and is of a qualitative and more general nature only. However, the Scientific Committee considered that, in the absence of quantitative direct animal welfare indicators, this somewhat conservative interpretation of animal welfare indicators is the most appropriate approach.

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

4.2.1. Welfare of the source animals

The cloning procedure itself does not normally affect the welfare of the animals which are the source of the somatic cell nucleus or oocyte. Ovum pick-up is not detrimental to animal welfare providing the operator is licensed (Chastant-Maillard *et al.* 2003; Petyim *et al.* 2007).

4.2.2. Welfare of the surrogate dam

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

From a welfare viewpoint, dystocia carries the risk of unrelieved “extra” pain during birth due to the large offspring. If the dam has to have a Caesarean section then that itself carries the risk of pain and anxiety due to the procedures involved, including a failure to provide adequate post-operative pain relief. If the Caesarean section is not planned then there is the added burden of the pain of both the dystocia and the Caesarean section. For the neonates Caesarean section may be less stressful.

It has been reported that the occurrence of late gestation losses in surrogate dams carrying embryonic or somatic calf clones was linked to a high level of a specific maternal serum protein (PSP60) (Heyman *et al.*, 2002). Elevated PSP60 levels could be detected as early as day 50 in surrogate dams that later lost their foetus and could be used as a marker for foetal death. Therefore assessing the placental development by day 50 or even day 34 of pregnancy by measuring PSP60, especially when carried out in combination with ultrasonography, could lead to more specific care for the bovine surrogate dam (Heyman *et al.*, 2002; Chavatte-Palmer *et al.*, 2006).

4.2.3. Welfare of clones

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

4.2.3.1. Welfare of clones at the time of birth to weaning

The period immediately after birth is critical for all newborns as the cardiovascular, respiratory and other organ systems adapt to life outside the womb. Offspring delivered naturally show a number of compensatory and regulatory mechanisms to minimize the stress of birth. Hence, even though a neonatal animal can certainly show severe signs of abnormal function e.g. so-called respiratory distress, it does not necessarily mean it is experiencing adverse effects, as adults might do under such conditions. In fact, mild postnatal stressors might instigate beneficial consequences relating to stress coping, fearfulness and learning ability (Casolini *et al.*, 1997).

After birth, the newborn gains a raised awareness due to the increased flow of oxygenated blood in the brain, and may then experience distress. Distress and pain reception have been

shown in neonates in premature human infants and lambs (Slater *et al.*, 2006; Mellor and Gregory, 2003). Distress in newborns could be due to various perinatal resuscitation and survival techniques, e.g. slaps, clearing out the mouth, vigorous rubbing of the skin, forced feeding including gavaging with colostrum.

Clones exhibiting LOS may require additional supportive care at birth. Planned Caesarean sections combined with special postnatal resuscitation measures for the clone neonates may reduce this problem. Calf clones are slower to reach normal levels of various physiological measures than their conventional counterparts (Chavatte-Palmer and Guillomot, 2007; Batchelder *et al.*, 2007b). Endocrine studies of cloned calves have shown lower cortisol concentrations at birth, although according to Batchelder *et al.* these results are difficult to interpret because controls were not born by the same method (Chavatte-Palmer *et al.*, 2002; Matsuzaki and Shiga, 2002; Batchelder *et al.*, 2007b).

In cloning the frequency of placenta dysfunction is increased and, therefore, foetal stress could arise due to altered oxygen exchange or altered placental blood barrier (Kato *et al.*, 1998; Galli *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999; Young and Fairburn, 2000; Batchelder *et al.*, 2007b). Painful stimuli in late gestation have been shown in other species to cause irreversible effects on later development (Smythe *et al.*, 1994; Grunau *et al.*, 1994a; Grunau *et al.*, 1994b; Lloyd-Thomas and Fitzgerald, 1996; Braastad *et al.*, 1998).

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

In LOS calves and lambs various 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.

4.2.3.2. Welfare of clones after weaning to puberty/slaughter/end of natural life

No data on welfare effects have been reported in clones approaching reproductive maturity compared with conventional animals.

There is no evidence 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”. The significance of these observations are, as yet, obscure.

An observation of five clones (from three different origins) and five 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.

Daily activity, reactions to new events, and food preferences have been observed in two genetically identical Duroc clone litters consisting of four and five pigs, respectively, and two non-clone Duroc litters each of four pigs (Archer *et al.*, 2003b; Archer *et al.*, 2003c). The clones were similar to, but more variable than, the non-clone controls. However, according to another paper this study design was not amenable to inferential statistics, in addition to the considerable statistical noise (Shutler, 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 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 transmission 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 specific studies on the welfare of the progeny of clones have been reported in livestock species.

4.2.5. Conclusions on animal welfare

- Only limited data are available on welfare implications of SCNT on surrogate dams, clones and progeny.
- The cloning procedure itself does not usually affect the welfare of the animals from which the somatic cell nucleus and oocyte are obtained.
- Reduced welfare of clones can be 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 these adverse health outcomes is higher in SCNT than in conventional reproduction or by using other ART.
- Due to the low efficiency of the cloning process, a high number of surrogate dams suffer pregnancy failure.

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

5.1. Molecular, biological and chemical aspects considered for safety

In line with the recommended safety assessment strategy, i.e. 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 aspects for the evaluation of the safety of milk and meat from cattle

and of meat and meat products from pigs derived from clones and their progeny in comparison with milk and meat from sexually reproduced animals.

5.1.1. Compositional comparison of meat and milk derived from clones and progeny of clones

Compositional data of products derived from animal clones (F0) and their progeny (F1) are compared with the corresponding products obtained from sexually generated animals of the same breed which have a long term history of safe use. Comparisons include details of the nutritional composition. The composition of milk and meat from cows is influenced *inter alia* by the nature of the animals' feed and the environment they live in, leading to large inter-individual variability in foods derived from conventional animals (Palmquist *et al.*, 1993). 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 examined. Compositional data of meat and milk vary widely in the literature depending on breed, feeding regime, age, stage of lactation. Reference databases, indicating the range variability in the biochemical composition observed in sexually reproduced animals, can be utilized for comparison with the composition of clones and their progeny (Jensen *et al.*, 1995; Caballero, 2003; Belitz, 2004). Therefore it is important to make comparisons only with appropriate comparators, of similar genetic background, managed under similar conditions (Smith, 2005).

Several relevant studies with respect to human nutrition have been conducted on the composition of bovine milk and meat from cattle and meat from pigs derived from clones (F0) and their progeny (F1).

In an extensive study, more than 150 parameters in 37 cow clones (F0) from three 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 changes were observed in all 3 groups of clones, compared with their controls, e.g. in fatty acid composition of milk and muscle of bovine clones (F0) and a slight increase of stearoyl-CoA desaturase in milk and muscle. However, these variations were still within the normal ranges.

A study on meat composition for five pig clones (F0) and 15 comparator animals showed no biologically relevant differences in fatty acid, amino acid, cholesterol, mineral and vitamin values (ViaGen Inc. USA). In a study of the composition of pig clone offspring, 242 offspring (F1) from four boar clones and 162 control pigs from the same breed were compared (Walker *et al.*, 2007). In this study 58 parameters consisting of more than 24 000 individual measurements (clones and controls) were examined. Only three individual values of the offspring were outside the control range.

Several other studies have analysed a number of parameters including carcass characteristics and meat and milk composition, including water, fat, proteins and carbohydrate content, amounts and distribution of amino acids, fatty acids, vitamins and minerals, and in the case of milk, also volume per lactation. These studies did not identify any differences outside the normal variability (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; Laible *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2007; Heyman *et al.*, 2007a; Yang *et al.*, 2007b).

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

products from clones or their progeny. However, it should be acknowledged that the data base is limited.

5.1.2. Toxicity and allergenicity testing

Conventional toxicity tests are designed for individual 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, that are not related directly to the material itself (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.

5.1.2.1. Feeding studies

A subchronic oral feeding study (14 weeks) was conducted in rats to investigate the possible effects of a diet containing meat and milk derived from embryonic and somatic clones. For each product three different concentrations were tested; based on the protein content in raw milk and beef the highest amount administered exceeds the usual daily intake in a human diet. The rats were not affected in any of the groups studied (Yamaguchi *et al.*, 2007). Similar results were obtained in a 21-day feeding test with a diet containing milk and meat from cattle clones (F0) (Tome *et al.*, 2004; Heyman *et al.*, 2007a; Heyman *et al.*, 2007b). A 12-month oral toxicity study in the rat (which included reproduction performance) fed meat and milk from progeny (F1) of cattle clones has recently been published (Yamaguchi *et al.* 2008). The meat was derived from three progeny (F1) of conventional cows inseminated with semen from an SCNT bull. The milk was derived from three progeny (F1) of cow clones (F0) inseminated with semen from a conventionally bred bull. There were no biologically significant differences in the parameters examined (haematology, blood biochemistry, necroscopy, organ weight and histology) between the rats fed meat/milk from F1 compared to those fed conventional meat/milk products.

5.1.2.2. Genotoxicity

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

5.1.2.3. Allergenicity

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

The allergenic potential of several *in-vitro* digested samples of meat and milk from cattle clones (F0) and controls was further assessed by intraperitoneal injection into mice following a classical immunization protocol. No statistically significant difference in the allergenic potential was observed between samples from clones and comparator control cattle (Takahashi and Ito, 2004). Also, Heyman *et al.* did not detect differences in the allergenicity of milk and meat obtained from clones in the rat compared with the same food products derived from non-

cloned animals, age and sex-matched, maintained under the same conditions (Heyman *et al.*, 2007a).

These results are only indicative as the rat and mouse models are not specific for human allergenicity predictive testing (WHO/FAO, 2001). However, changes in the primary protein structure or the presence of novel proteins in the edible products of clones and their progeny are not expected because the nuclear DNA sequence is unchanged.

5.1.3. 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. Furthermore, as no new DNA sequences have been introduced into the clones, the generation or the occurrence of new substances, such as toxicants or allergens, are not expected.

5.1.4. Animals and animal products for human consumption

In accordance with EU legislation, animals belonging to species used for meat production are individually inspected *ante-* and *post-mortem* to determine if they meet existing regulatory animal health and food safety requirements. Animals, including clones, which are found to show clinical evidence of ill health at *ante-mortem* inspection, along with their carcasses and offal, would be removed from the food chain either prior to or following slaughter and would, therefore, be excluded from the human food supply. These requirements relate to actions to be taken following the detection of overt signs of disease or injury, either at *ante-* or *post-mortem* inspection. They are also complemented by criteria concerning maximum permissible levels of microbial and chemical contaminants.

Likewise, the production of milk from cattle (and other animals), both conventionally produced and cloned, would be subject to comparable EU legislative controls.

5.1.5. Microbiological aspects

Pathogenic microorganisms are likely to be found in both conventionally produced animals and clones even in the absence of clinical disease. These agents may later be present at slaughter on the carcasses of these animals and in their tissues. Any diminution of immunological competence may lead to clinical disease when the agent is pathogenic for that animal species.

5.1.6. 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 use of veterinary medicinal products for treatment may be greater than that in their natural comparators; however, no reliable data are available on comparative levels of veterinary drug residue levels. In all cases, veterinary medicinal products residues in meat and milk have to comply with existing EU regulations.

5.2. Conclusions on food safety

Based on current knowledge, and considering the fact that the primary DNA sequence is unchanged in clones, there is no indication that differences exist in terms of food safety between food products from healthy cattle and pig clones and their progeny, compared with those from healthy conventionally-bred animals.

This conclusion is also based on current evidence that indicates that:

- There are unlikely to be significant differences between healthy clones in the physiological parameters measured from their healthy conventional counterparts (see Chapter 4).
- Differences outside the normal variability are unlikely as regards the composition and nutritional value of meat (cattle and swine) and milk (cattle) between healthy clones or clone progeny and their healthy conventional counterparts.
- Toxicological and allergenic effects related to the consumption of food products from clones and their progeny are unlikely.

However, as information is limited on the immunological competence of clones, it is unclear, in cases where the pathogen is zoonotic in nature, whether or not the prevalence of such infection or infestation (and related public health risk) is the same as that of the conventionally produced animal.

6. Impact on the genetic diversity, biodiversity and environment

6.1. Genetic diversity

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 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 in the farm animal populations 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 (FAO, 2007).

6.2. Biodiversity

Cloning offers opportunities to save endangered species or livestock breeds and can be used to restore populations from infertile or castrated animals (NZRBCS, 2002). 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.

6.3. Environmental impacts

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

In the event of an overall increased need for the use of veterinary medicinal products in clones there might be an impact on the environment, but no reliable data are available that compare

the extent of veterinary medicinal product use in animals produced by SCNT with those produced by ARTs or with conventional reproduction.

6.4. Conclusions on Impact on the Environment and Genetic diversity

Based on current knowledge:

- If used appropriately SCNT technology is not expected to adversely affect the genetic diversity within domestic species.
- Cloning can offer opportunities to restore endangered animal species.
- 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 available to suggest that such risks may exist.

OVERALL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

CONCLUSIONS

Somatic cell nucleus transfer (SCNT) is a relatively new technology in animal reproduction with limited data available and is increasingly being used in some countries to produce clones. These clones can then be used for further breeding using conventional or other methods.

While cloning has been applied to several animal species, only in the case of cattle and pigs has there been sufficient data available to perform a risk assessment.

Uncertainties in the risk assessment arise due to the limited number of studies available, the small sample sizes investigated and, in general, the absence of a uniform approach that would allow all the issues relevant to this opinion to be more satisfactorily addressed.

The health and welfare of a significant proportion of clones, mainly within the juvenile period for bovines and perinatal period for pigs, have been found to be adversely affected, often severely and with a fatal outcome. Epigenetic dysregulation is considered to be the main source of adverse effects that may affect clones and result in developmental abnormalities. The use of SCNT in cattle and pigs, however, has also produced healthy clones and healthy offspring that are similar to their conventional counterparts based on parameters such as physiological characteristics, demeanour and clinical status. The production of clinically healthy clones provides evidence in those cases that the epigenetic reprogramming has taken place successfully.

In relation to food safety, there is no indication that differences exist for meat and milk of clones and their progeny compared with those from conventionally bred animals. Such a conclusion is based on the assumption that meat from cattle and pigs is derived from healthy animals as assessed by mandatory *ante-mortem* and *post-mortem* examinations, that milk is produced from healthy cows and that in both cases these food products are in compliance with food safety criteria regarding microbiological and chemical contaminants.

No environmental impact is foreseen but there are only limited data available.

RECOMMENDATIONS

General recommendations

- The health and welfare of clones should be monitored during their production life and natural life span.
- As food animals other than cattle and pig have also been produced *via* SCNT, risk assessments should be performed on these species when relevant data become available.
- This opinion should be updated in the light of developments in cloning and/or with new relevant data.

Additional recommendations

In relation to epigenetic and genetic aspects of SCNT it is recommended to determine or further investigate:

- The role of the epigenetic dysregulation as a cause of adverse effects.
- Whether, and if so, to what extent epigenetic dysregulation occurring in clones is transmitted to the progeny (F1).
- Whether, and if so, to what extent SCNT may induce silent DNA mutations.
- The possible consequences of mitochondrial heterogeneity in SCNT.
- The effects of telomere length in clones derived from different cell sources.

In relation to animal health it is recommended to:

- Conduct further research on the possible effects of SCNT on the natural life span of cattle and swine clones.
- Investigate further the causes of pathologies and mortality observed in clones during the gestational and postnatal periods and those observed at a lower frequency in adulthood.
- Further investigate the immunocompetence and the susceptibility of clones and their offspring to diseases and transmissible agents when reared and kept under conventional husbandry conditions.

In relation to animal welfare it is recommended to:

- Perform studies on animal welfare, including behavioural studies, in healthy clones under normal husbandry conditions.
- Monitor the surrogate dams for early markers of abnormal foetal development which could lead to adverse effects on their welfare.

In relation to food safety it is recommended that:

- Should evidence become available of reduced immunocompetence of clones (see animal health recommendations above), it should be investigated whether, and if so, to what extent, consumption of meat and milk derived from clones or their offspring may lead to an increased human exposure to transmissible agents.
- The database on compositional and nutritional characteristics of edible animal products derived from clones and their progeny should be extended.

INFORMATION MADE AVAILABLE TO EFSA

EFSA published a call for data on its website between 27 April and 29 May 2007. Information was received from the following organisations:

AAVS (American Anti-Vivisection Society), USA

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

BIO (Biotechnology Industry Organisation), Belgium

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

Center for Food Safety, USA

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

CIWF (Compassion in World Farming), United Kingdom

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

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

- Information on current research activities and selected references.

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

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

Faculty of Agricultural Sciences at Aarhus University, Denmark

- Information on current research activities and selected references.

IETS (International Embryo Transfer Society), USA

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

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

- Information on current research activities and selected references.

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

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

ViaGen Inc, USA

- Letter. 3 pages
- Data (29 files, XL and Word) provided also to US FDA. This data is publicly available in the US FDA 2008 Report. “Animal Cloning: A Risk Assessment”, Appendix F, which can be found at:
http://www.fda.gov/cvm/CloneRiskAssessment_Final.htm
(Last accessed 27 June 2008)

REFERENCES

- ACNFP (Advisory Committee on Novel Foods and Processes) 1998. Toxicological assessment of novel (including GM) foods. HMSO, London, <<http://www.acnfp.gov.uk/acnfpapers/inforelatass/toxrev>> last accessed 2008-01-23.
- 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.
- Braastad, B. O., Osadchuk, L. V., Lund, G. and Bakken, M. 1998. Effects of prenatal handling stress on adrenal weight and function and behaviour in novel situations in blue fox cubs (*Alopex lagopus*). *Applied Animal Behaviour Science* 57 (1-2): 157-169.
- Brambrink, T., Hochedlinger, K., Bell, G. and Jaenisch, R. 2006. ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (4): 933-8.
- Caballero, B. 2003. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Editor. Elsevier Science Ltd, Pages.
- Camargo, L. S., Viana, J. H., Sa, W. F., Ferreira, A. M. and Vale Filho, V. R. 2005. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. *Anim Reprod Sci* 85 (1-2): 53-9.

- Carroll, J. A., Carter, D. B., Korte, S. W. and Prather, R. S. 2005. Evaluation of the acute phase response in cloned pigs following a lipopolysaccharide challenge. *Domest Anim Endocrinol* 29 (3): 564-72.
- Casolini, P., Cigliana, G., Alema, G. S., Ruggieri, V., Angelucci, L. and Catalani, A. 1997. Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid receptors, stress response and learning in offspring in the early stages of life. *Neuroscience* 79 (4): 1005-12.
- Charlier, C., Segers, K., Karim, L., Shay, T., Gyapay, G., Cockett, N. and Georges, M. 2001. The callipyge mutation enhances the expression of coregulated imprinted genes in cis without affecting their imprinting status. *Nat Genet* 27 (4): 367-9.
- Chastant-Maillard, S., Quinton, H., Lauffenburger, J., Cordonnier-Lefort, N., Richard, C., Marchal, J., Mormede, P. and Renard, J. P. 2003. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reproduction* 125 (4): 555-63.
- Chavatte-Palmer, P., de Sousa, N., Laigre, P., Camous, S., Ponter, A. A., Beckers, J. F. and Heyman, Y. 2006. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology* 66 (4): 829-840.
- Chavatte-Palmer, P. and Guillomot, M. 2007. Comparative implantation and placentation. *Gynecol Obstet Invest* 64 (3): 166-74.
- Chavatte-Palmer, P., Heyman, Y., Richard, C., Monget, P., LeBourhis, D., Kann, G., Chilliard, Y., Vignon, X. and Renard, J. P. 2002. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* 66 (6): 1596-603.
- Chavatte-Palmer, P., Remy, D., Cordonnier, N., Richard, C., Issenman, H., Laigre, P., Heyman, Y. and Mialot, J. P. 2004. Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 94-100.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280 (5367): 1256-8.
- Coan, P. M., Burton, G. J. and Ferguson-Smith, A. C. 2005. Imprinted genes in the placenta--a review. *Placenta* 26 Suppl A: S10-20.
- Constant, F., Guillomot, M., Heyman, Y., Vignon, X., Laigre, P., Servely, J. L., Renard, J. P. and Chavatte-Palmer, P. 2006. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod* 75 (1): 122-30.
- Cooney, C. A., Dave, A. A. and Wolff, G. L. 2002. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 132 (8 Suppl): 2393S-2400S.
- Coulon, M., Baudoin, C., Depaulis-Carre, M., Heyman, Y., Renard, J. P., Richard, C. and Deputte, B. L. 2007. Dairy cattle exploratory and social behaviors: is there an effect of cloning? *Theriogenology* 68 (8): 1097-103.
- De Sousa, P. A., Dobrinsky, J. R., Zhu, J., Archibald, A. L., Ainslie, A., Bosma, W., Bowering, J., Bracken, J., Ferrier, P. M., Fletcher, J., Gasparrini, B., Harkness, L., Johnston, P., Ritchie, M., Ritchie, W. A., Travers, A., Albertini, D., Dinnyes, A., King, T. J. and Wilmut, I. 2002. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod* 66 (3): 642-50.
- Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E. and Reik, W. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (24): 13734-8.
- Du, Y., Kragh, P. M., Zhang, Y., Li, J., Schmidt, M., Bogh, I. B., Zhang, X., Purup, S., Jorgensen, A. L., Pedersen, A. M., Villemoes, K., Yang, H., Bolund, L. and Vajta, G. 2007. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation. *Theriogenology* 68 (8): 1104-10.

- Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W., 3rd, Yanagimachi, R. and Jaenisch, R. 2000. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* 290 (5496): 1578-81.
- Enright, B. P., Taneja, M., Schreiber, D., Riesen, J., Tian, X. C., Fortune, J. E. and Yang, X. 2002. Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biol Reprod* 66 (2): 291-6.
- Estrada, J., Sommer, J., Collins, B., Mir, B., Martin, A., York, A., Petters, R. M. and Piedrahita, J. A. 2007. Swine generated by somatic cell nuclear transfer have increased incidence of intrauterine growth restriction (IUGR). *Cloning Stem Cells* 9 (2): 229-36.
- FAO (Food and Agricultural Organization), 2007. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO. Food and Agriculture Organization, <<http://www.fao.org/docrep/010/a1250e/a1250e00.htm>>, last accessed 2008-01-23. 1-523.
- Farin, P. W. and Farin, C. E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 52 (3): 676-82.
- Farin, P. W., Piedrahita, J. A. and Farin, C. E. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65 (1): 178-91.
- FDA (Food and Drug Administration), 2008. Animal Cloning: A Risk Assessment. Center for Veterinary Medicine, U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Pages 1-968, http://www.fda.gov/cvm/CloneRiskAssessment_Final.htm, last accessed 2008-06-271.
- Forsberg, E. J., Strelchenko, N. S., Augenstein, M. L., Betthausen, J. M., Childs, L. A., Eilertsen, K. J., Enos, J. M., Forsythe, T. M., Golueke, P. J., Koppang, R. W., Lange, G., Lesmeister, T. L., Mallon, K. S., Mell, G. D., Misica, P. M., Pace, M. M., Pfister-Genskow, M., Voelker, G. R., Watt, S. R. and Bishop, M. D. 2002. Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biol Reprod* 67 (1): 327-33.
- Galli, C., Duchi, R., Moor, R. M. and Lazzari, G. 1999. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning* 1 (3): 161-70.
- Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R. and Lazzari, G. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424 (6949): 635.
- Gardner, D. K. and Lane, M. 2005. Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reprod Fertil Dev* 17 (3): 361-70.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Beedle, A. S. 2007a. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol* 19 (1): 1-19.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Beedle, A. S. 2007b. Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. *Bioessays* 29 (2): 145-54.
- Grimshaw, G. M., Sitarenios, G. and Finegan, J. A. 1995. Mental rotation at 7 years: relations with prenatal testosterone levels and spatial play experiences. *Brain Cogn* 29 (1): 85-100.
- Grunau, R. V. E., Whitfield, M. F. and Petrie, J. H. 1994a. Pain sensitivity and temperament in extremely low-birth-weight premature toddlers and preterm and full-term controls. *Pain* 58 (3): 341-346.
- Grunau, R. V. E., Whitfield, M. F., Petrie, J. H. and Fryer, E. L. 1994b. Early pain experience, child and family factors, as precursors of somatization: a prospective study of extremely premature and fullterm children. *Pain* 56 (3): 353-359.
- Gschwind, D., Hassig, M. and Bleul, U. 2003. [Retrospective study of the fertility outlook in cows after caesarean section]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 145 (4): 161-7.
- Han, Z., Mtango, N. R., Patel, B. G., Sapienza, C. and Latham, K. E. 2008. Hybrid Vigor and Transgenerational Epigenetic Effects on Early Mouse Embryo Phenotype. *Biol Reprod*:
- Hanada, H., Takeda, K., Tagami, T., Nirasawa, K., Akagi, S., Adachi, N., Takahashi, S., Izaïke, Y., Iwamoto, M., Fuchimoto, D., Miyashita, N., Kubo, M., Onishi, A. and King, W. A. 2005.

- Chromosomal instability in the cattle clones derived by somatic cell nuclear-transfer. *Mol Reprod Dev* 71 (1): 36-44.
- Hashizume, K., Ishiwata, H., Kizaki, K., Yamada, O., Takahashi, T., Imai, K., Patel, O. V., Akagi, S., Shimizu, M., Takahashi, S., Katsuma, S., Shiojima, S., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., Todoroki, J. and Izaike, Y. 2002. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. *Cloning Stem Cells* 4 (3): 197-209.
- Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., Berthelot, V., Fromentin, G., Hocquette, J. F., Martignat, L. and Renard, J. P. 2007a. Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative approach. *Theriogenology* 67 (1): 134-41.
- Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., Fromentin, G., Berthelot, V., Jurie, C., Bas, P., Dubarry, M., Mialot, J. P., Remy, D., Richard, C., Martignat, L., Vignon, X. and Renard, J. P. 2007b. Quality and safety of bovine clones and their products. *Animal* (1): 963-972.
- Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., LeBourhis, D., Camous, S., Vignon, X. and Renard, J. P. 2002. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 66 (1): 6-13.
- Heyman, Y., Richard, C., Rodriguez-Martinez, H., Lazzari, G., Chavatte-Palmer, P., Vignon, X. and Galli, C. 2004. Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 111-20.
- Hiendleder, S., Mund, C., Reichenbach, H. D., Wenigerkind, H., Brem, G., Zakhartchenko, V., Lyko, F. and Wolf, E. 2004. Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod* 71 (1): 217-23.
- Hiendleder, S., Wirtz, M., Mund, C., Klempt, M., Reichenbach, H. D., Stojkovic, M., Weppert, M., Wenigerkind, H., Elmlinger, M., Lyko, F., Schmitz, O. J. and Wolf, E. 2006. Tissue-specific effects of in vitro fertilization procedures on genomic cytosine methylation levels in overgrown and normal sized bovine fetuses. *Biol Reprod* 75 (1): 17-23.
- Hiendleder, S., Zakhartchenko, V. and Wolf, E. 2005. Mitochondria and the success of somatic cell nuclear transfer cloning: from nuclear-mitochondrial interactions to mitochondrial complementation and mitochondrial DNA recombination. *Reprod Fertil Dev* 17 (1-2): 69-83.
- Hill, J. and Chavatte-Palmer, P. 2002. Pregnancy and neonatal care of cloned animals. In: Principles of cloning. J. B. Cibelli, R. P. Lanza, K. Campbell and M. D. West. Academic Press, New York, 247-266.
- Hill, J. R., Burghardt, R. C., Jones, K., Long, C. R., Looney, C. R., Shin, T., Spencer, T. E., Thompson, J. A., Winger, Q. A. and Westhusin, M. E. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 63 (6): 1787-94.
- Hill, J. R., Winger, Q. A., Burghardt, R. C. and Westhusin, M. E. 2001. Bovine nuclear transfer embryo development using cells derived from a cloned fetus. *Anim Reprod Sci* 67 (1-2): 17-26.
- Hoffert, K. A., Batchelder, C. A., Bertolini, M., Moyer, A. L., Famula, T. R., Anderson, D. L. and Anderson, G. B. 2005. Measures of maternal-fetal interaction in day-30 bovine pregnancies derived from nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 7 (4): 289-305.
- Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Friedman, A., Hochedlinger, K., Yanagimachi, R., Lander, E. S., Golub, T. R. and Jaenisch, R. 2002. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (20): 12889-94.
- Inoue, K., Kohda, T., Lee, J., Ogonuki, N., Mochida, K., Noguchi, Y., Tanemura, K., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F. and Ogura, A. 2002. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science* 295 (5553): 297.
- Jablonka, E. and Lamb, M. J. 2002. The changing concept of epigenetics. *Ann N Y Acad Sci* 981: 82-96.

- Jaenisch, R. and Wilmut, I. 2001. Developmental biology. Don't clone humans! *Science* 291 (5513): 2552.
- Jensen, R. G., Couch, S. C., Bitman, J., Carlson, S. E., Hamosh, M., Newburg, D. S. and Robert, G. J. 1995. Handbook of Milk Composition. Editor. Academic Press, San Diego, Pages.
- Jeon, H. Y., Hyun, S. H., Lee, G. S., Kim, H. S., Kim, S., Jeong, Y. W., Kang, S. K., Lee, B. C., Han, J. Y., Ahn, C. and Hwang, W. S. 2005. The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows. *Mol Reprod Dev* 71 (3): 315-20.
- Jiang, L., Carter, D. B., Xu, J., Yang, X., Prather, R. S. and Tian, X. C. 2004. Telomere lengths in cloned transgenic pigs. *Biol Reprod* 70 (6): 1589-93.
- Kang, Y.-K., Koo, D.-B., Park, J. S., Choi, Y.-H., Lee, K.-K. and Han, Y.-M. 2001b. Differential inheritance modes of DNA methylation between euchromatic and heterochromatic DNA sequences in ageing fetal bovine fibroblasts. *FEBS Letters* 498 (1): 1-5.
- Kang, Y. K., Koo, D. B., Park, J. S., Choi, Y. H., Lee, K. K. and Han, Y. M. 2001a. Influence of oocyte nuclei on demethylation of donor genome in cloned bovine embryos. *FEBS Lett* 499 (1-2): 55-8.
- Kasai, K., Sano, F., Miyashita, N., Watanabe, S. and Nagai, T. 2007. Comparison of the growth performances of offspring produced by a pair of cloned cattle and their nuclear donor animals. *J Reprod Dev* 53 (1): 135-42.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282 (5396): 2095-8.
- Kato, Y., Tani, T. and Tsunoda, Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* 120 (2): 231-7.
- Keefer, C. L., Keyston, R., Lazaris, A., Bhatia, B., Begin, I., Bilodeau, A. S., Zhou, F. J., Kafidi, N., Wang, B., Baldassarre, H. and Karatzas, C. N. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod* 66 (1): 199-203.
- Kishigami, S., Hikichi, T., Van Thuan, N., Ohta, H., Wakayama, S., Bui, H. T., Mizutani, E. and Wakayama, T. 2006. Normal specification of the extraembryonic lineage after somatic nuclear transfer. *FEBS Lett* 580 (7): 1801-6.
- Kremensky, M., Kremenska, Y., Suzuki, M., Imai, K., Takahashi, S., Hashizume, K., Yagi, S. and Shiota, K. 2006. DNA methylation profiles of donor nuclei cells and tissues of cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev* 52 (2): 259-66.
- Kruip, T. A. M. and den Daas, J. H. G. 1997. In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47 (1): 43-52.
- Laible, G., Brophy, B., Knighton, D. and Wells, D. N. 2007. Compositional analysis of dairy products derived from clones and cloned transgenic cattle. *Theriogenology* 67 (1): 166-77.
- Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Blackwell, C., Cristofalo, V. J., Francis, M. K., Baerlocher, G. M., Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E. A., Sawyer, N., Lansdorp, P. M. and West, M. D. 2000. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288 (5466): 665-9.
- Lay, D. C., Randel, R. D., Friend, T. H., Carroll, J. A., Welsh, T. H., Jenkins, O. C., Neuendorff, D. A., Bushong, D. M. and Kapp, G. M. 1997. Effects of prenatal stress on the fetal calf. 14 (2): 73.
- Le Neindre, P. 1989. Influence of cattle rearing conditions and breed on social behaviour and activity of cattle in novel environments. *Applied Animal Behaviour Sciences* 23: 129-140.
- Lee, R. S., Peterson, A. J., Donnison, M. J., Ravelich, S., Ledgard, A. M., Li, N., Oliver, J. E., Miller, A. L., Tucker, F. C., Breier, B. and Wells, D. N. 2004. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. *Biol Reprod* 70 (1): 1-11.

- Lee, S. Y., Park, J. Y., Choi, Y. J., Cho, S. K., Ahn, J. D., Kwon, D. N., Hwang, K. C., Kang, S. J., Paik, S. S., Seo, H. G., Lee, H. T. and Kim, J. H. 2007. Comparative proteomic analysis associated with term placental insufficiency in cloned pig. *Proteomics* 7 (8): 1303-1315.
- Li, N., Wells, D. N., Peterson, A. J. and Lee, R. S. 2005. Perturbations in the biochemical composition of fetal fluids are apparent in surviving bovine somatic cell nuclear transfer pregnancies in the first half of gestation. *Biol Reprod* 73 (1): 139-48.
- Liu, G., Kato, Y. and Tsunoda, Y. 2007. Aging of Recipient Oocytes Reduces the Development of Cloned Embryos Receiving Cumulus Cells. *J Reprod Dev* 53 (4): 785-90.
- Lloyd-Thomas, A. R. and Fitzgerald, M. 1996. Do fetuses feel pain? Reflex responses do not necessarily signify pain. *Bmj* 313 (7060): 797-8.
- Loi, P., Clinton, M., Vackova, I., Fulka, J., Jr., Feil, R., Palmieri, C., Della Salda, L. and Ptak, G. 2006. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. *Theriogenology* 65 (6): 1110-21.
- Long, J. and Cai, X. 2007. Igf-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. *GENE* 388 (1-2): 125-134.
- Lucifero, D., La Salle, S., Bourc'his, D., Martel, J., Bestor, T. H. and Trasler, J. M. 2007. Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. *BMC Dev Biol* 7: 36.
- Martin, M., Adams, C. and Wiseman, B. 2004. Pre-weaning performance and health of pigs born to cloned (fetal cell derived) swine versus non-cloned swine. *Theriogenology* 62 (1-2): 113-22.
- Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S. C. and Kriegstein, A. R. 2006. Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. *Eur J Neurosci* 24 (12): 3475-88.
- Matsuzaki, M. and Shiga, K. 2002. Endocrine characteristics of cloned calves. *Cloning Stem Cells* 4 (3): 261-7.
- McConnell, J. M. L. 2006. A mitochondrial component of developmental programming. In: *Developmental origins of health and disease*. P. D. Gluckman and M. A. Hanson. Cambridge University Press, Cambridge, 75-81.
- Mellor, D. J. and Gregory, N. G. 2003. Responsiveness, behavioural arousal and awareness in fetal and newborn lambs: experimental, practical and therapeutic implications. *N Z Vet J* 51 (1): 2-13.
- Mir, B., Zaunbrecher, G., Archer, G. S., Friend, T. H. and Piedrahita, J. A. 2005. Progeny of somatic cell nuclear transfer (SCNT) pig clones are phenotypically similar to non-cloned pigs. *Cloning Stem Cells* 7 (2): 119-25.
- Norman, H. D., Lawlor, T. J., Wright, J. R. and Powell, R. L. 2004b. Performance of Holstein clones in the United States. *J Dairy Sci* 87 (3): 729-38.
- Norman, H. D. and Walsh, M. K. 2004a. Performance of dairy cattle clones and evaluation of their milk composition. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 157-64.
- NZRBCS 2002. Enderby Island Cattle: A New Zealand Rare Breed Society Rescue Project. <<http://www.rarebreeds.co.nz/endcattlepro.html>>
- Ogonuki, N., Inoue, K., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Tanemura, K., Suzuki, O., Nakayama, H., Doi, K., Ohtomo, Y., Satoh, M., Nishida, A. and Ogura, A. 2002. Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat Genet* 30 (3): 253-4.
- Ohgane, J., Wakayama, T., Kogo, Y., Senda, S., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R. and Shiota, K. 2001. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30 (2): 45-50.
- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A. C. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289 (5482): 1188-90.

- Ortegon, H., Betts, D., Lin, L., Coppola, G., Perrault, S., Blondin, P. and King, W. 2007. Genomic stability and physiological assessments of live offspring sired by a bull clone, Starbuck II. *Theriogenology* 67 (1): 116-126.
- Palmquist, D. L., Beaulieu, A. D. and Barbano, D. M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J Dairy Sci* 76 (6): 1753-71.
- Panarace, M., Agüero, J. I., Garrote, M., Jauregui, G., Segovia, A., Cane, L., Gutierrez, J., Marfil, M., Rigali, F., Pugliese, M., Young, S., Lagioia, J., Garnil, C., Forte Pontes, J. E., Ereno Junio, J. C., Mower, S. and Medina, M. 2007. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology* 67 (1): 142-51.
- Park, M. R., Cho, S. K., Lee, S. Y., Choi, Y. J., Park, J. Y., Kwon, D. N., Son, W. J., Paik, S. S., Kim, T., Han, Y. M. and Kim, J. H. 2005. A rare and often unrecognized cerebromeningitis and hemodynamic disorder: a major cause of sudden death in somatic cell cloned piglets. *Proteomics* 5 (7): 1928-39.
- Peaston, A. E. and Whitelaw, E. 2006. Epigenetics and phenotypic variation in mammals. *Mamm Genome* 17 (5): 365-74.
- Petersen, B., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Hornen, N., Hassel, P., Kues, W. A. and Niemann, H. 2007. Preovulatory embryo transfer increases success of porcine somatic cloning. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 155-156.
- Petyim, S., Bage, R., Madej, A. and Larsson, B. 2007. Ovum pick-up in dairy heifers: does it affect animal well-being? *Reprod Domest Anim* 42 (6): 623-32.
- Philpott, M. 1993. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br Vet J* 149 (4): 339-69.
- Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P. and Cuzin, F. 2007. Inheritance of an epigenetic change in the mouse: a new role for RNA. *Biochem Soc Trans* 35 (Pt 3): 623-5.
- Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I. and Cuzin, F. 2006. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441 (7092): 469-74.
- Renard, J. P., Maruotti, J., Jouneau, A. and Vignon, X. 2007. Nuclear reprogramming and pluripotency of embryonic cells: Application to the isolation of embryonic stem cells in farm animals. *Theriogenology* 68 Suppl 1: S196-205.
- Roemer, I., Reik, W., Dean, W. and Klose, J. 1997. Epigenetic inheritance in the mouse. *Curr Biol* 7 (4): 277-80.
- Roselli, C. E., Stadelman, H., Reeve, R., Bishop, C. V. and Stormshak, F. 2007. The ovine sexually dimorphic nucleus of the medial preoptic area is organized prenatally by testosterone. *Endocrinology* 148 (9): 4450-7.
- Roussel, S., Boissy, A., Montigny, D., Hemsworth, P. H. and Duvaux-Ponter, C. 2005. Gender-specific effects of prenatal stress on emotional reactivity and stress physiology of goat kids. *Hormones and Behaviour* 47 (3): 256-266.
- Savage, A. F., Maull, J., Tian, X. C., Taneja, M., Katz, L., Darre, M. and Yang, X. 2003. Behavioral observations of adolescent Holstein heifers cloned from adult somatic cells. *Theriogenology* 60 (6): 1097-110.
- Schaetzlein, S. and Rudolph, K. L. 2005. Telomere length regulation during cloning, embryogenesis and ageing. *Reprod Fertil Dev* 17 (1-2): 85-96.
- Senda, S., Wakayama, T., Arai, Y., Yamazaki, Y., Ohgane, J., Tanaka, S., Hattori, N., Yanagimachi, R. and Shiota, K. 2007. DNA methylation errors in cloned mice disappear with advancement of aging. *Cloning Stem Cells* 9 (3): 293-302.

- Senda, S., Wakayama, T., Yamazaki, Y., Ohgane, J., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R. and Shiota, K. 2004. Skewed X-inactivation in cloned mice. *Biochem Biophys Res Commun* 321 (1): 38-44.
- Shibata, M., Otake, M., Tsuchiya, S., Chikyu, M., Horiuchi, A. and Kawarasaki, T. 2006. Reproductive and growth performance in Jin Hua pigs cloned from somatic cell nuclei and the meat quality of their offspring. *J Reprod Dev* 52 (5): 583-90.
- Shiels, P. G., Kind, A. J., Campbell, K. H., Wilmut, I., Waddington, D., Colman, A. and Schnieke, A. E. 1999. Analysis of telomere length in Dolly, a sheep derived by nuclear transfer. *Cloning* 1 (2): 119-25.
- Shiga, K., Umeki, H., Shimura, H., Fujita, T., Watanabe, S. and Nagai, T. 2005. Growth and fertility of bulls cloned from the somatic cells of an aged and infertile bull. *Theriogenology* 64 (2): 334-43.
- Shiota, K. and Yanagimachi, R. 2002. Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals. *Differentiation* 69 (4-5): 162-6.
- Shoubridge, E. A. and Wai, T. 2007. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Curr Top Dev Biol* 77: 87-111.
- Shutler, D., Weary, D., McLellan, N. 2005. The clones need to return: A comment on Archer et al. (2003). *Applied Animal Behaviour Science* 91 (3-4): 363-365.
- Sikich, L. and Todd, R. D. 1988. Are the neurodevelopmental effects of gonadal hormones related to sex differences in psychiatric illnesses? *Psychiatr Dev* 6 (4): 277-309.
- Sinclair, K. D., McEvoy, T. G., Maxfield, E. K., Maltin, C. A., Young, L. E., Wilmut, I., Broadbent, P. J. and Robinson, J. J. 1999. Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes. *J Reprod Fertil* 116 (1): 177-86.
- Slater, R., Cantarella, A., Gallella, S., Worley, A., Boyd, S., Meek, J. and Fitzgerald, M. 2006. Cortical pain responses in human infants. *J Neurosci* 26 (14): 3662-6.
- Smith, R. D. 2005. Veterinary Clinical Epidemiology. Editor. CRC Press, Boca Raton, FL, Pages.
- Smythe, J. W., McCormick, C. M., Rochford, J. and Meaney, M. J. 1994. The interaction between prenatal stress and neonatal handling on nociceptive response latencies in male and female rats. *Physiology & Behavior* 55 (5): 971-974.
- Steinborn, R., Schinogl, P., Zakhartchenko, V., Achmann, R., Schernthaner, W., Stojkovic, M., Wolf, E., Muller, M. and Brem, G. 2000. Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nat Genet* 25 (3): 255-7.
- Stringfellow, D. A., Givens, M. D. and Waldrop, J. G. 2004. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reprod Fertil Dev* 16 (2): 93-102.
- Suemizu, H., Aiba, K., Yoshikawa, T., Sharov, A. A., Shimosawa, N., Tamaoki, N. and Ko, M. S. 2003. Expression profiling of placentomegaly associated with nuclear transplantation of mouse ES cells. *Dev Biol* 253 (1): 36-53.
- Sullivan, E. J., Kasinathan, S., Kasinathan, P., Robl, J. M. and Collas, P. 2004. Cloned calves from chromatin remodeled in vitro. *Biol Reprod* 70 (1): 146-53.
- Takahashi, S. and Ito, Y. 2004. Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 165-71.
- Tamashiro, K. L., Sakai, R. R., Yamazaki, Y., Wakayama, T. and Yanagimachi, R. 2007. Developmental, behavioral, and physiological phenotype of cloned mice. *Adv Exp Med Biol* 591: 72-83.
- Tamashiro, K. L., Wakayama, T., Akutsu, H., Yamazaki, Y., Lachey, J. L., Wortman, M. D., Seeley, R. J., D'Alessio, D. A., Woods, S. C., Yanagimachi, R. and Sakai, R. R. 2002. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat Med* 8 (3): 262-7.

- Tamashiro, K. L., Wakayama, T., Blanchard, R. J., Blanchard, D. C. and Yanagimachi, R. 2000. Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biol Reprod* 63 (1): 328-34.
- Tamashiro, K. L., Wakayama, T., Yamazaki, Y., Akutsu, H., Woods, S. C., Kondo, S., Yanagimachi, R. and Sakai, R. R. 2003. Phenotype of cloned mice: development, behavior, and physiology. *Exp Biol Med (Maywood)* 228 (10): 1193-200.
- Tanaka, S., Miyazawa, K., Watanabe, K., Ohwada, S., Aso, H., Yonai, M., Saito, N. and Yamaguchi, T. 2006. Comparison of T cell subsets between somatic cloned and normal cow. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY* 55 (1): 28-35.
- Tanaka, S., Oda, M., Toyoshima, Y., Wakayama, T., Tanaka, M., Yoshida, N., Hattori, N., Ohgane, J., Yanagimachi, R. and Shiota, K. 2001. Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol Reprod* 65 (6): 1813-21.
- Tecirlioglu, R. T. and Trounson, A. O. 2007. Embryonic stem cells in companion animals (horses, dogs and cats): present status and future prospects. *Reprod Fertil Dev* 19 (6): 740-7.
- Tenhagen, B. A., Helmbold, A. and Heuwieser, W. 2007. Effect of various degrees of dystocia in dairy cattle on calf viability, milk production, fertility and culling. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54 (2): 98-102.
- Tian, X. C., Kubota, C., Sakashita, K., Izaike, Y., Okano, R., Tabara, N., Curchoe, C., Jacob, L., Zhang, Y., Smith, S., Bormann, C., Xu, J., Sato, M., Andrew, S. and Yang, X. 2005. Meat and milk compositions of bovine clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (18): 6261-6.
- Tian, X. C., Xu, J. and Yang, X. 2000. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat Genet* 26 (3): 272-3.
- Tome, D., Dubarry, M. and Fromentin, G. 2004. Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 172-7.
- Van Laere, A. S., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L., Archibald, A. L., Haley, C. S., Buys, N., Tally, M., Andersson, G., Georges, M. and Andersson, L. 2003. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* 425 (6960): 832-6.
- Veissier, I., Gesmier, V., Le Neindre, P., Gautier, J. Y. and Bertrand, G. 1994. The effects of rearing in individual crates on subsequent social behaviour of veal calves. *Applied Animal Behaviour Science* 41 (3-4): 199-210.
- Wakayama, T., Shinkai, Y., Tamashiro, K. L., Niida, H., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., Ogura, A., Tanemura, K., Tachibana, M., Perry, A. C., Colgan, D. F., Mombaerts, P. and Yanagimachi, R. 2000. Cloning of mice to six generations. *Nature* 407 (6802): 318-9.
- Wakayama, T. and Yanagimachi, R. 1999. Cloning the laboratory mouse. *Semin Cell Dev Biol* 10 (3): 253-8.
- Walker, S., Christenson, R., Ruiz, R., Reeves, D., Pratt, S., Arenivas, F., Williams, N., Bruner, B. and Polejaeva, I. 2007. Comparison of meat composition from offspring of cloned and conventionally produced boars. *Theriogenology* 67 (1): 178-184.
- Walker, S. C., Shin, T., Zaunbrecher, G. M., Romano, J. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W. and Piedrahita, J. A. 2002. A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using in vitro-matured oocytes. *Cloning Stem Cells* 4 (2): 105-12.
- Walker, S. K., Hartwich, K.M., Seamark, R.F. 1996. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. *Theriogenology*, 45 (1): 111-120.
- Walsh, M. K., Lucey, J. A., Govindasamy-Lucey, S., Pace, M. M. and Bishop, M. D. 2003. Comparison of milk produced by cows cloned by nuclear transfer with milk from non-cloned cows. *Cloning Stem Cells* 5 (3): 213-9.
- Ward, I. L. and Weisz, J. 1980. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science* 207 (4428): 328-9.

- Watanabe, S. and Nagai, T. 2008. Health status and productive performance of somatic cell cloned cattle and their offspring produced in Japan. Accepted for publication. *The Journal of reproduction and development* 54 (2):
- Wells, D. N. 2005. Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech* 24 (1): 251-64.
- Wells, D. N., Forsyth, J. T., McMillan, V. and Oback, B. 2004. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 101-10.
- Wells, D. N., Laible, G., Tucker, F. C., Miller, A. L., Oliver, J. E., Xiang, T., Forsyth, J. T., Berg, M. C., Cockrem, K., L'Huillier, P. J., Tervit, H. R. and Oback, B. 2003. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology* 59 (1): 45-59.
- Wells, D. N., Misica, P. M. and Tervit, H. R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60 (4): 996-1005.
- WHO (World Health Organization) 1990. Principles for the toxicological assessment of pesticide residues in food / published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization. World Health Organisation, International Programme on Chemical Safety, Geneva. 1-117.
- WHO/FAO (World Health Organisation/Food and Agricultural Organization) 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. <http://www.fao.org/docrep/007/y0820e/y0820e00.htm>, last accessed 2008-01-23.
- Williams, N. E., Walker, S. C., Reeves, D. E., Sherrer, E., Galvin, J. M., Polejaeva, I., Rampacek, G., Benyshek, L., Christenson, R. K., Graves, W. M. and Pratt, S. L. 2006. A comparison of reproductive characteristics of boars generated by somatic cell nuclear transfer to highly related conventionally produced boars. *Cloning Stem Cells* 8 (3): 130-9.
- Wilmot, I., Beaujean, N., de Sousa, P. A., Dinnyes, A., King, T. J., Paterson, L. A., Wells, D. N. and Young, L. E. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419 (6907): 583-6.
- Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 (6619): 810-3.
- Wolff, G. L., Kodell, R. L., Moore, S. R. and Cooney, C. A. 1998. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *Faseb J* 12 (11): 949-57.
- World Organisation for Animal Health (OIE) 2007. Terrestrial Animal Health Code. Appendix 3.3.2. *In vitro* fertilised bovine embryos/*in vitro* maturing oocytes.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Korsawe, K., Lemme, E. and Niemann, H. 2005. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* 17 (1-2): 23-35.
- Wrenzycki, C., Lucas-Hahn, A., Herrmann, D., Lemme, E., Korsawe, K. and Niemann, H. 2002. *In vitro* production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod* 66 (1): 127-34.
- Yamaguchi, M., Ito, Y. and Takahashi, S. 2007. Fourteen-week feeding test of meat and milk derived from cloned cattle in the rat. *Theriogenology* 67 (1): 152-165.
- Yamaguchi, M., Itoh M., Ito, Y. and Watatabe, S. 2008. A 12-month feedign study of reproduction/development in rats fed meat/milk powder supplemented diets derived from the progeny of cloned cattle produced by somatic cell nuclear transfer. *J Reprod Dev, Advance Publication* 1-44.
- Yang, L., Chavatte-Palmer, P., Kubota, C., O'Neill, M., Hoagland, T., Renard, J. P., Taneja, M., Yang, X. and Tian, X. C. 2005. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol Reprod Dev* 71 (4): 431-8.

- Yang, X., Smith, S. L., Tian, X. C., Lewin, H. A., Renard, J. P. and Wakayama, T. 2007a. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* 39 (3): 295-302.
- Yang, X., Tian, X. C., Kubota, C., Page, R., Xu, J., Cibelli, J. and Seidel, G., Jr. 2007b. Risk assessment of meat and milk from cloned animals. *Nat Biotechnol* 25 (1): 77-83.
- Yonai, M., Kaneyama, K., Miyashita, N., Kobayashi, S., Goto, Y., Bettpu, T. and Nagai, T. 2005. Growth, reproduction, and lactation in somatic cell cloned cows with short telomeres. *J Dairy Sci* 88 (11): 4097-110.
- Young, L. E. and Fairburn, H. R. 2000. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology* 53 (2): 627-48.

GLOSSARY AND ABBREVIATIONS USED IN THE OPINION

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

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.
Caesarean 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 from which the cell is obtained to be used in the cloning procedure
Dystocia	Abnormal or difficult birth giving or labour
Embryo	A multicellular structure of diploid cells formed after fertilization of the oocyte and until all organs have been formed, when 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 in the DNA sequence
Epigenetic dysregulation	Abnormal or impaired control of gene expression
Epi-alleles	Alleles that are epigenetically modified
Fibroblast	A cell found mainly in connective tissue, involved in the formation and synthesis of extracellular matrix (e.g. collagen fibres)
Foetus	A developing mammal after the embryo stage and before birth
Gamete	A mature reproductive cell from a male or female containing a haploid number of chromosomes that normally fuses with a another gamete from the opposite sex to form a zygote (diploid) from which a new organism can develop. The oocyte and spermatozoon are gametes.
Gametogenesis	The process of the formation of haploid gametes
Genetic diversity	The total number of genetic characteristics in the genetic make up of a species
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 and animal health
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.
Juvenile period	A period referring to young bovine of up to six months of age
LOS	Large Offspring Syndrome. The size of the offspring is greater than mean + 2SD for the species or breed. Symptoms includes clinical hydrops, placental oedema and asynchronous growth of organs resulting in increased heart and liver size
Natural life span	The typical length of time an individual of a particular species can be expected to live
Oocyte	Unfertilized egg, the female gamete
Oocyte donor	Animal providing 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 dam's uterus 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 has not the potential of as a totipotent cell.
Postnatal period	Time period (a few days) after birth
Progeny of clone	F1 and subsequent generations of animals born by sexual reproduction where at least one of the ancestors was a clone animals
Sexual reproduction	Normal way of reproduction between male and female, involving fusion between spermatozoon and oocyte
Silent mutation	DNA mutations that do not result in amino acid changes in a protein.
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 pluripotent
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
Zona pellucida	The thick glycoprotein layer surrounding the plasma membrane of an oocyte.
Zygote	The cell that results after fertilization of two haploid cells (usually a spermatozoon and an oocyte)

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