

(案)

新開発食品評価書

体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品

2009年3月

食品安全委員会新開発食品専門調査会

目 次

<審議の経緯>	3
<食品安全委員会委員名簿>	3
<食品安全委員会新開発食品専門調査会専門委員名簿>	3
<食品安全委員会新開発食品専門調査会ワーキンググループ名簿>	4
<食品安全委員会新開発食品専門調査会ワーキンググループ小グループ名簿>	4
要 約	5
I. はじめに	7
1. 背景	7
2. 評価対象食品の概要	7
3. 安全性に係る資料の概要	7
II. 食品健康影響評価の考え方	8
1. 基本的な考え方	8
2. 体細胞クローン牛及び豚の健全性の評価について（第Ⅲ～Ⅴ章）	8
3. 体細胞クローン牛及び豚に由来する食品の評価について（第Ⅵ章）	8
III. 家畜における繁殖技術の概要	9
1. 主な繁殖技術	9
2. クローン技術	10
3. 体細胞クローン動物の産出数と効率	11
IV. 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代につ いて	13
1. 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚について	13
(1) 体細胞クローン技術を用いて産出された牛	13
(2) 体細胞クローン技術を用いて産出された豚	22
(3) 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚のまとめ	25
2. 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚の後代について	26
(1) 体細胞クローン技術を用いて産出された牛の後代（F1）	27
(2) 体細胞クローン技術を用いて産出された豚の後代（F1）	28
(3) 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚の後代のまとめ	29
V. 体細胞クローン動物のエピジェネティクス等	30
1. 体細胞クローン動物の発生と分化	30
2. エピジェネティクスとは	30
3. 体細胞クローン動物のエピジェネティクス	31
(1) DNA のメチル化	31
(2) 遺伝子の発現解析	34
(3) エピジェネティックな変化に影響を及ぼす因子	36
(4) 後代	37
4. その他	37

(1) DNA 変異及び染色体異常	37
(2) ミトコンドリア DNA	38
(3) テロメア長	38
5. 体細胞クローン動物のエピジェネティクス等のまとめ	39
VI. 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品の安全性について	42
1. 肉及び乳の成分比較	42
2. 小核試験	45
3. ラット及びマウスにおける亜急性・慢性毒性試験	45
4. アレルギー誘発性	46
5. タンパク質の消化性	47
6. 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品のまとめ	48
VII. 食品健康影響評価結果	50
<参照>	52

<審議の経緯>

2008年 4月 1日	厚生労働大臣より「体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品」に係る食品健康影響評価について要請、関係書類の接受（厚生労働省発食安第0401006号）
2008年 4月 3日	第232回食品安全委員会（要請事項説明）
2008年 4月 11日	第52回新開発食品専門調査会
2008年 5月 2日	第1回新開発食品専門調査会ワーキンググループ
2008年 6月 2日	第2回新開発食品専門調査会ワーキンググループ
2008年 7月 25日	第3回新開発食品専門調査会ワーキンググループ
2008年 10月 6日	第1回新開発食品専門調査会ワーキンググループ小グループ
2008年 11月 21日	第2回新開発食品専門調査会ワーキンググループ小グループ
2008年 12月 8日	第4回新開発食品専門調査会ワーキンググループ
2009年 1月 19日	第5回新開発食品専門調査会ワーキンググループ
2009年 2月 24日	第55回新開発食品専門調査会
2009年 3月 12日	第277回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

見上 彪（委員長）
小泉直子（委員長代理）
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄
本間清一

<食品安全委員会新開発食品専門調査会専門委員名簿>

上野川修一（座長）
池上幸江（座長代理）
石見佳子
磯 博康
漆谷徹郎
及川眞一
尾崎 博
菅野 純
小堀真珠子
清水 誠
田嶋尚子
本間正充
松井輝明
山崎 壮
山添 康
山本精一郎
脇 昌子

<食品安全委員会新開発食品専門調査会ワーキンググループ名簿>

(専門委員)

早川堯夫 (座長)

池上幸江

宇理須厚雄

尾崎 博

上野川修一

熊谷 進

澤田純一

手島玲子

和久井信

(専門参考人)

小倉淳郎

小島敏之

塩田邦郎

<食品安全委員会新開発食品専門調査会ワーキンググループ小グループ名簿>

(専門委員)

早川堯夫 (座長)

熊谷 進

(専門参考人)

小倉淳郎

小島敏之

澤田純一

塩田邦郎

要 約

「体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚（以下、「体細胞クローン牛及び豚」という。）並びにそれらの後代に由来する食品」について、厚生労働省から提出のあった資料及び既発表の学術論文を用いて食品健康影響評価を実施した。

体細胞クローン技術は、除核した成熟卵に体細胞又は体細胞の核を移植し、電氣的刺激により融合させ、得られた（再構築）胚を受胎牛に受胎させ、産子を産出させるものである。体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品について、従来の繁殖技術（人工授精等）による牛及び豚に由来する食品と比較して、同等の安全性を有するかを評価することを基本的な考え方とし、現時点における科学的知見に基づき検討した。

体細胞クローン牛及び豚の出生前後において、従来の繁殖技術による牛及び豚と比較して、高い頻度で死産及び生後直死が認められる。また、体細胞クローン牛では、若齢期においても死亡率が高い傾向が認められている。しかし、この結果は、体細胞を利用して作製された再構築胚の全能性の完成度などによるものと考えられ、死亡原因そのものは従来の繁殖技術でも認められているものである。また、出生後及び若齢期に生理学的パラメータ値が従来の繁殖技術による牛及び豚と差異が認められることがあるものの、それらは成長とともに回復し、健全となる。

また、体細胞クローン牛及び豚の後代では、従来の繁殖技術による牛及び豚と健全性に差異は認められない。

これらのことから体細胞クローン技術を用いて産出され、食用に供される可能性のある牛及び豚並びにそれらの後代については、従来の繁殖技術による牛及び豚と比べて差異のない健全性を有すると認められた。

体細胞クローン牛及び豚の周産期や若齢期に認められた異常については、エピジェネティックな変化が適正に行われず、体細胞クローン牛及び豚における発生と分化が適正に行われないことが主な原因と考えられる。

体細胞クローン牛及び豚では、ドナー動物と核内の DNA の塩基配列が理論的に同一であるため、ドナー動物及び従来の繁殖技術による牛及び豚に存在しない新規の生体物質が産生されるものではない。

体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する肉及び乳について、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する肉及び乳と比較し、栄養成分、小核試験、ラット及びマウスにおける亜急性・慢性毒性試験、アレルギー誘発性等について、安全上、問題となる差異は認められなかった。

また、肉及び乳以外の食品についての詳細なデータは得られていないが、前述のとおり、体細胞クローン牛及び豚において、新規の生体物質が産生されるものではないこと、肉及び乳において安全上、問題となる差異は認められなかったこと等から、従

来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品と比較して、安全上の差異はないものと考えられた。

従って、現時点における科学的知見に基づいて評価を行った結果、体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品は、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品と比較して、同等の安全性を有すると考えられる。

なお、体細胞クローン技術は新しい技術であることから、リスク管理機関においては、体細胞クローン牛及び豚に由来する食品の安全性に関する知見について、引き続き収集することが必要である。

I. はじめに

1. 背景

1996年に英国で体細胞クローン羊の「ドリー」が誕生して以降、牛、山羊、豚等、さまざまな動物で研究が進められ、既に多くの体細胞クローン動物が誕生している。我が国においても、1998年に世界で初めて、成体由来の体細胞を用いた体細胞クローン牛の産出に成功しており、その後、多くの体細胞クローン牛及び豚の産出が行われている。

我が国においては、厚生労働科学研究等において、体細胞クローン牛の食品の安全性について調査・研究が行われ、また、農林水産研究高度化事業等において、体細胞クローン牛の生産物性状等に関する調査が行われてきた。また、米国食品医薬品局（FDA）及び欧州食品安全機関（EFSA）において、体細胞クローン技術を用いて産出された家畜及びそれらの後代に由来する食品に関する安全性について評価が行われている。

厚生労働省は、これら国内外における体細胞クローン技術を用いて産出された家畜等に由来する食品の安全性に関する知見が集積されてきたこと、関係文献等の収集が終了したことから、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第24条第3項の規定に基づき、体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚（以下、「体細胞クローン牛及び豚」という。）並びにそれらの後代に由来する食品の安全性について、食品安全委員会に食品健康影響評価を依頼した。

2. 評価対象食品の概要

厚生労働省から食品健康影響評価の依頼があった対象は、体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品についてである。

体細胞クローン技術については後述するが、体細胞クローン牛及び豚の後代とは、体細胞クローン牛及び豚から受精を介して産出された産子及びその産子から受精を介して産出された子孫のことである。

3. 安全性に係る資料の概要

本食品の食品健康影響評価に当たっては、厚生労働省が収集した体細胞クローン技術を用いて産出された家畜等に由来する食品の安全性に関する国内外における知見の他、既発表の学術論文も参考とした。

II. 食品健康影響評価の考え方

1. 基本的な考え方

体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品の食品健康影響評価においては、体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品が、従来の繁殖技術（人工授精等）による牛及び豚に由来する食品と比較して、同等の安全性を有するかを評価することを基本的な考え方とした。

すなわち、成育した体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代の健全性において、従来の繁殖技術による牛及び豚と比べて、ヒトの健康を損なうおそれのある要素・要因の付加が考え得るか、また、体細胞クローン牛及び豚に由来する食品において、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品と比べて、ヒトの健康を損なうおそれのある要素・要因の付加が考え得るかについて、現時点の科学的知見に基づき検討した。

なお、食品健康影響評価は、客観的かつ中立公正に行い、環境影響、倫理、道徳、社会経済等に係る審議は行わない。

2. 体細胞クローン牛及び豚の健全性の評価について（第Ⅲ～Ⅴ章）

体細胞クローン技術が動物個体に及ぼす影響について、発育段階毎に検討し、体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代と、従来の繁殖技術による牛及び豚とが同等の健全性を有するかについて評価した。なお、各発育段階の動物が食用として供される可能性について考慮して行った。

3. 体細胞クローン牛及び豚に由来する食品の評価について（第Ⅵ章）

2. における評価をもとに、体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品と、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品の安全性上の差異の有無について評価した。また、評価に当たっては、体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品と従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品との栄養成分等の比較データ等も参考にした。

Ⅲ. 家畜における繁殖技術の概要

1. 主な繁殖技術

我が国における家畜繁殖技術は開発当初から現在に至るまで、優良な遺伝形質を有する個体又は系統を効率的に増殖させ、動物性タンパク質を国内で安定的に供給することを目的として進められてきた。特に、限られた資源や土地を有効に活用する必要がある我が国にとっては、第二次世界大戦の終戦以降、活発に研究と技術開発が行われてきた。

また、家畜繁殖技術の開発に伴い関係法令（家畜改良増殖法 [昭和 25 年法律第 209 号]）の制定・改正等、法制度の整備が進められてきた。

現在、家畜、特に牛で応用されている主要な繁殖技術は次のとおりである。

①人工授精

人工授精とは、優良な遺伝形質を有する雄動物の精液を、発情を示す健全な雌動物の生殖道内に人為的に注入することによって産子を生産する技術である。現在、我が国で飼養されている雌牛の繁殖のほぼ 100%で、凍結保存された精液を用いた人工授精が行われている。しかし、産子の性別はもちろん産子の能力を制御することは不可能な技術である。

我が国では、乳用種であるホルスタイン種雌牛に肉用種である黒毛和種雄牛の凍結精液を人工授精する割合が牛の人工授精総計の 30%を占めている（社団法人日本家畜人工授精師協会の平成 20 年 1～3 月統計、全国平均）。この方法によって生産された牛（F1；1 代交雑種と呼ばれる。）は主に食肉用途に利用されている。

②体内受精卵移植

体内受精卵移植とは、卵胞刺激ホルモン等のホルモン製剤投与により過剰排卵処理を施した雌動物に人工授精した後、生殖道を洗浄した液を灌流することによって受精卵（胚）を採取し、別の雌動物（牛の場合、受胎牛又は受卵牛という。）の生殖道内に胚を注入して受胎させることによって産子を生産する技術である。人工授精と異なり、雌雄の両方から形質の改良が可能であるが、人工授精に比べて遺伝的改良速度は圧倒的に劣る（その効率は、1 回採卵当たりの回収移植可能胚数に影響される。）。また、体内受精卵移植単独では、産子の性別は制御不可能である。

我が国の 2005 年統計では、牛の産子のうち 16,155 頭（全体の約 0.6%）が、体内受精卵移植によって生産されている（参照 1）。なお、発育ステージが透明帯に囲まれている胚であれば、胚の洗浄を適切に行うことによって胚の表面の病原微生物の数を受胎牛及び産子が感染に至らない程度にまで減らすことができ、伝染性疾病伝播を遮断することが可能である。これは、精子を利用する人工授精では実現不可能な特徴である。

③体外受精卵移植

体外受精卵移植とは、卵巣から吸引採取した卵胞内卵子（未成熟卵）を体外で成熟させ、その後、体外受精及び体外培養に供し、正常に発育した胚を受胎牛の生殖道内に注入して受胎させることによって産子を生産する技術である。体外での受精卵の培養技術の進展と改善に貢献した技術で、その後開発されることになる体細胞クローン技術の基盤技術である。

2005年の統計によると、我が国の牛の産子のうち2,308頭(全体の約0.08%)が、この技術により生産されている(参照1)。

2. クローン技術

牛等の家畜のクローン技術は、細胞融合技術を含む核移植技術が基盤となっており、細胞(2nの核1個を含む。)を提供する胚又は動物と核内遺伝子構成が同一の複数の胚や個体を産出することが可能な技術であり、胚の割球細胞を用いる受精卵クローン技術と体細胞を用いる体細胞クローン技術の二つがある。

体細胞クローン動物を産出するには、予め卵巣から採取しておいた卵胞内卵子を培養し成熟させた後、その核を除去した成熟卵子の囲卵腔に核提供動物の皮膚、筋肉、卵管上皮細胞等の体細胞又は体細胞の核を移植し、両者を電氣的刺激により融合させる。このようにして作製した再構築胚を受胎牛の生殖道内に注入して受胎させることによって体細胞クローン動物が生産される。

体細胞クローン動物では、細胞を提供する動物の優良な遺伝形質が産子に表現され、性別も当然のことながら細胞提供動物と同一となる。また、培養系で維持されている体細胞を使用することから核内遺伝子構成が同一な個体を無数に産出することが理論上可能である。一方、体細胞クローン動物の産出では、体細胞(すでに分化している細胞)を使用することから、再構築胚に全能性を獲得させる(リプログラミング) 必要があり、この全能性の獲得が胚の正常な発生及び正常な産子の産出に重要な要件になると考えられている。また、体細胞クローン動物産出の成功率は、ドナー又はレシピエント細胞の由来、細胞の培養方法、核移植の方法等によっても影響を受ける可能性がある。

体細胞クローン技術は人工授精、体内受精卵移植及び体外受精卵移植等の従来の家畜繁殖技術を基盤として開発された技術であり、従来の家畜繁殖技術の延長線上に位置するものである。

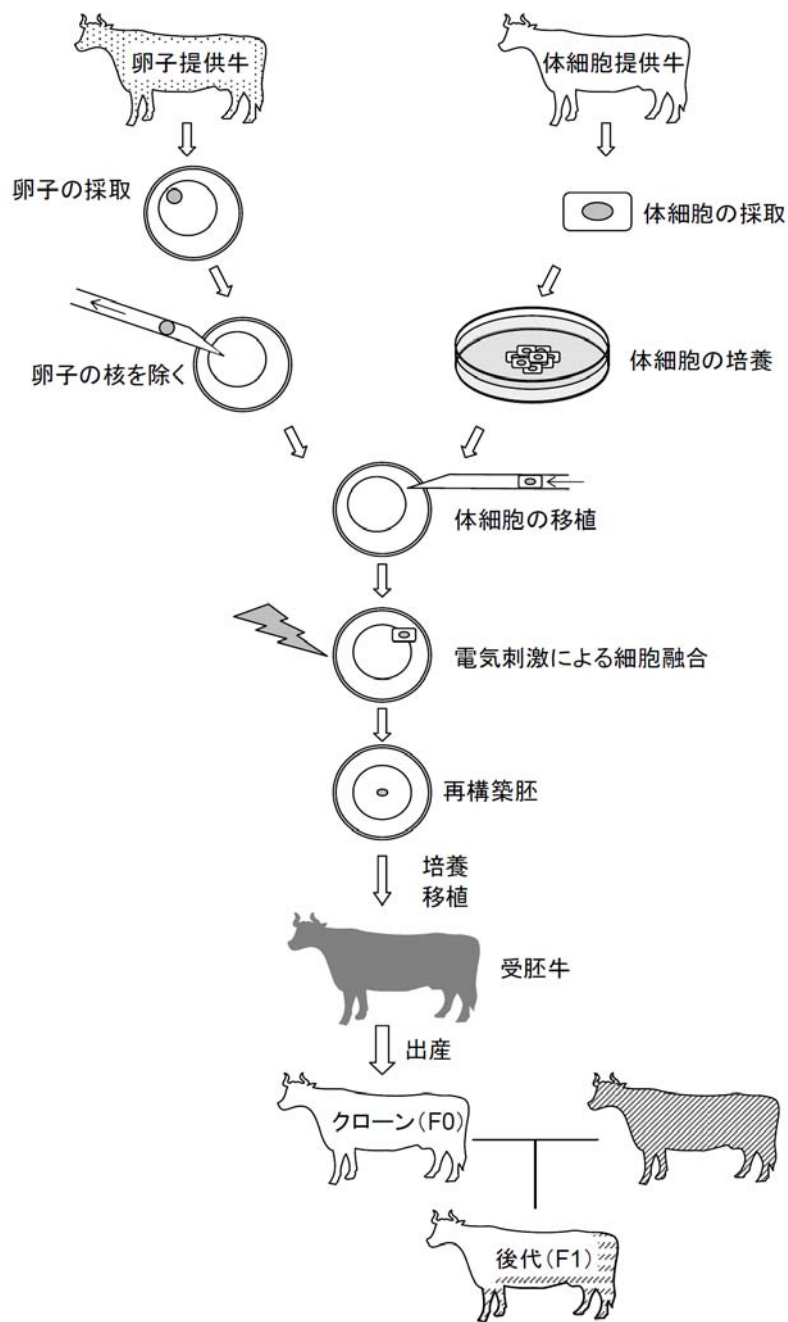


図1. 体細胞クローン牛の産出

3. 体細胞クローン動物の産出数と効率

体細胞クローン動物の産出は、1996年に英国で羊の「ドリー」が誕生して以降、牛、マウス、山羊、豚、ウサギ等、さまざまな動物で研究が進められ、体細胞クローン動物が誕生している。

我が国では、牛の受精卵移植、体外受精や初期胚を用いた核移植（受精卵クローン）研究等が世界的にみても高い技術水準で行われていたことを背景として、牛を中心に研究がなされ、1998年に世界で最初の成体由来の体細胞を用いた体細胞クローン牛の産出に成功した（参照2）。農林水産省の公表資料によると、平成

20年9月30日現在の累計で、我が国では体細胞クローン牛は557頭出生し、82頭が育成・試験中であり、体細胞クローン豚については335頭出生し、35頭が育成・試験中である。

一方、米国では体細胞クローン牛が約570頭、体細胞クローン豚が約10頭、EU加盟国では、体細胞クローン牛が約100頭、体細胞クローン豚が体細胞クローン牛より少ない数が生存していると推定されている。その他、アルゼンチン、オーストラリア、中国、ニュージーランド等でも体細胞クローン家畜が産生されている（参照3）。

体細胞クローン家畜産出の成功率は、従来の繁殖技術と比べると全体的に低いが、動物種によっても異なると考えられている。体細胞クローン牛の産出割合について調査した研究において、雌牛に移植された3,374個の体細胞クローン胚から317頭（9%）の産子が誕生し、出生後24時間ではその278頭（8%）が生存しており、出生後150日以上ではその225頭（7%）が生存し続けている（参照4）。

豚では5%の成功率との報告もあるが、他の報告では最高17%の成功率と報告されている（移植した58個の胚から10頭の産子が得られている。）（参照5）。

また、人工授精や受精卵移植等、他の繁殖技術でもみられる流産、死産、過大子等が、体細胞クローン家畜では他の繁殖技術と比較して発生頻度が高くなっている。我が国において生産された体細胞クローン牛に関する関係機関による調査報告書によると、従来の繁殖技術による牛での死産及び生後直死の割合は産出された牛の6.5%であり、体細胞クローン牛では30.8%となっている（参照6）。

IV. 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代について

1. 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚について

体細胞クローン牛及び豚について、次の発育段階毎に、健全性について従来の繁殖技術による牛又は豚との比較を行った。

- ・細胞融合～妊娠（胎子発育）
- ・周産期（出生前後）
- ・若齢期
- ・春機発動後の成熟及び加齢期（繁殖性を含む）

一定の健康状態にある動物に由来する食品は、一般にヒトが消費するのに適しているとみなされており（参照 7）、体細胞クローン技術を用いて産出され、食用に供される可能性のある牛及び豚が、従来の繁殖技術による牛及び豚と比べて同等の健全性を有するかについて検討した。

各発育段階の期間については、畜産分野において明確な規定はされていないことから、本評価にあたっては、核移植から陣痛が始まるまでの期間を「細胞融合～妊娠（胎子発育）」、陣痛開始から出産後 1 週間程度を「周産期」、その後、春機発動がみられるまでの時期（一般に、牛では 6～13 ヶ月、豚では 7～8 ヶ月（参照 8））を「若齢期」、春機発動後の時期については繁殖性も含めて「春機発動後の成熟及び加齢期」とした。

(1) 体細胞クローン技術を用いて産出された牛

①細胞融合～妊娠（胎子発育）

体細胞クローン胚による産子の出産の割合は 10%以下との報告があり、また、ドナー細胞又はレシピエント細胞（卵母細胞）の種類によって移植に用いる胚盤胞（blastocyst）の形成率や胎子の生存率が異なると報告されている。

卵丘細胞や卵管上皮細胞をドナー細胞として用いた場合に、それぞれ、皮膚線維芽細胞と乳腺上皮細胞、卵胞の顆粒膜細胞を用いる場合より高い胚盤胞形成率が認められるとの報告がある（参照 9、10）。また、牛において、異なる品種の細胞をドナー細胞又はレシピエント細胞として用いた場合に、胎子の生存率が異なるとの報告がある（参照 11）。

用いたドナー細胞の細胞周期による胚盤胞の発生等への影響についても検討が行われている。胎子の線維芽細胞の G1 期又は M 期の細胞をドナー細胞として用いた場合には、G1 期の細胞が胚盤胞形成率が高かった（31%対 16%）

（参照 12）。また、G0 期又は G1 期の細胞をドナー細胞として使用したところ、ともに移植後早い時期に胚の死滅が認められるが、G0 期ドナー細胞を使用した場合には、移植後 120 日目以降は妊娠が維持され、水腫も認められなかった。G1 期細胞を使用した場合では、妊娠率の低下が分娩まで続き（移植後 120 日目以降 21/43）、水腫の発生率も高かった（18/43（42%））（参照 13）。

また、胚盤胞の発生について、体外受精胚と比較したところ、体外受精胚で

は培養に用いる合成卵管液へ牛血清又は脱脂牛血清アルブミンのいずれを添加しても胚盤胞形成率は同等であったが、体細胞クローン胚では血清を添加した方が、胚盤胞形成率が高かったとする報告がある（参照 14）。体細胞クローン胚の高頻度の不受胎、流産、胎盤異常の原因として、培地を含め多くの因子が複合的に関与する可能性が体外受精卵移植で得られた知見からも示唆されている（参照 15、16、17）。

他の繁殖技術と同様に、牛の体細胞クローン胚においても、移植後 60 日までの妊娠の中断が多いが、人工授精や体内受精卵移植と違い、体外受精胚とクローン胚では妊娠の全期間を通じて妊娠の中断がみられることが報告されている（参照 18、19）。

牛の体細胞クローン胚の移植後 50 日での妊娠率は、対照（人工授精、体外受精胚移植）と同様であるが、それ以降、体細胞クローン胚の妊娠率は低下した。対照では、この期間の低下は見られなかった。移植後 150 日目では、体細胞クローン胚を移植された受胎牛の妊娠率は、40%まで低下した。胎子の平均体重において、移植後 100 日目では 3 グループ間で違いは認められなかったが、体細胞クローン牛の胎子 6 頭のうち 5 頭、体外受精の胎子 4 頭のうち 1 頭では、人工授精による胎子の 2 標準偏差以上であった。同様の傾向は移植後 150 日目の胎子でも確認された。人工授精や体外受精による胎子と比較して、体細胞クローン牛の胎子の肝臓と腎臓は大きく、3 頭の体細胞クローン牛の胎子の一つの肝臓と腎臓は、脂肪浸潤を示していた（参照 20）。

移植後 60 日目の体細胞クローン胚受胎牛の胎盤では、人工授精と比較して、発達が不十分な胎盤葉（cotyledon）と宮阜（caruncle）が認められた。胎盤葉は平坦で、胎盤節（placentome）数は約半分であった（参照 21）。

一方、別の研究で、体細胞クローン胚の移植後 100 日目の宮阜の平均数及び胎盤節数は人工授精や体外受精群より少ないが、宮阜の全重量は体細胞クローン牛で有意に重く、より大きい胎盤節は、厚く、こぶし状の形をしていたと報告されている（参照 20）。

他にも、牛や羊の体細胞クローンの胎盤で異常な胎盤節が観察された報告が多数ある（参照 22、23、24、25）。また、妊娠の後期における流産は、水腫、腫大した臍帯、異常な胎盤を伴っており、主な原因は胎盤の発育異常であると報告されている（参照 22、23、26）。

正常な胎盤は、母体と胎子間の栄養の吸収、ガス交換、老廃物の排出等、胎子の発育に重要な役割を担っており、従来の繁殖技術でも認められる胎盤の異常な発育は、従前より妊娠が維持されない原因の一つと言及されている。

従来の繁殖技術でも観察される水腫が、体細胞クローン牛の胎膜で高頻度に確認されている。胎膜水腫の 85～90%を占める尿膜水腫（hydroallantois）は、胎盤の肥大等を伴い、尿膜絨毛膜や胎盤の機能不全によるとされている。

一般に牛の水腫は 7,500 回の妊娠で 1 回起こり、牛の体外受精胚移植による妊娠では 0.05~4%との報告がある (参照 27)。牛の体細胞クローンの妊娠では、妊娠 120 日までの間に高率に妊娠の中断が生じ、そのうち、58~86%は水腫を伴う (参照 13、28)。

尿膜水腫を伴った体細胞クローン受胎牛において、胎子の過成長に先行し胎盤の過成長が認められ、移植後 220 日目の胎盤節の重量は対照胎子の胎盤節より重かった。また、胎盤節の数は妊娠後期に増加傾向を示した。なお、胎盤節の重さと数が正常であるものも認められた (参照 29)。

体細胞クローン胚を受胎した受胎牛の 20 頭中 3 頭 (15%) に妊娠 6 ヶ月から分娩の間に重度の尿膜水腫と胎盤節の肥大化が確認された (参照 24)。

体細胞クローン胚の移植後 100 日以降では、胎子水腫 (13/37)、胎盤浮腫 (21/37)、尿膜水腫 (5/37) の発生率が高かった。胎子水腫の大部分 (12/13) は胎盤浮腫を発症していた (参照 4)。

移植後 150 日の体細胞クローン受胎牛の胎膜の総液量は、体外受精と比較し有意に高く、8 頭中 2 頭で高い尿膜液量 (20 と 12L) が認められた (参照 20)。

なお、7 頭の体細胞クローン牛の出生時の胎盤の病理学的検査の結果では、全ての胎盤で異常 (中~重度の浮腫、血管の拡張、その他の異常な胎盤形成) が認められ、胎盤節は、体内受精卵移植と比較して、数が少なく、重量及び表面積が大きくなっていた (参照 30)。

また、胎盤の過成長が、胎子に供給されるフルクトースの増加を招き、心筋を含む筋機能に影響する低血糖及び高フルクトース血症を引き起こす可能性も示唆されている (参照 30)。

生存して生まれた体細胞クローン牛と妊娠後期で死亡した体細胞クローン牛との間に、その受胎牛の妊娠関連糖タンパク (PAG) 血中濃度の違いはなかったが、早い段階 (妊娠 35~90 日目) で流産した体細胞クローン牛の胎子の受胎牛 PAG 濃度は明らかに低かった (参照 31)。

②周産期 (出生前後)

我が国において生産された体細胞クローン牛に関する関係機関による調査報告書によると、体細胞クローン牛 451 頭における死産は 74 頭 (16.4%)、生後直死は 65 頭 (14.4%) であり、従来の繁殖技術による牛 (n=566) の死亡率 (死産 4.6%、生後直死 1.9%) と比較し有意な差が認められた。また、死産の主な原因は、難産、窒息、羊水誤嚥等の呼吸障害であり、生後直死においても窒息、羊水誤嚥等の呼吸障害が主な死因であった。生後直死した体細胞クローン牛では過大子の傾向が認められている (参照 6)。

過大子の発生は、体細胞クローン牛の妊娠で頻度が高く、受精卵クローン牛や人工授精における妊娠でも頻度は低いが発生している。牛における過大子の発生率は、体細胞クローンでは 13.3%であり、受精卵クローンでは 8.6%、人

工授精では9.5%との報告がある（参照 24）。

我が国の多数の報告においても、体細胞クローン牛の生時体重が重くなる傾向が認められている（参照 32、33、34、35、36、37）。

黒毛和種雄牛の細胞から6頭の体細胞クローン牛が出生したが、2頭は生後直死であった。生存している4頭は健全で正常であり、平均生時体重は36kg（30.7～42.5kg）で、この品種の平均30kgより20%重かった。なお、生後直死した2頭のうち1頭はアカバネウイルスを持っていたことが診断され、他の1頭は難産による複合的な原因で死亡した（参照 38）。

一方、牛で出生時体重が50kg以上であったのは、人工授精で10%、体外受精で31.7%、受精卵クローンでは15%（n=126）との報告もある（参照 39）。

過大子の発生は難産とそれに伴う罹病及び死亡を招くことが多い（参照 40、41）。自然交配や人工授精で生まれた牛の2,191頭のうち6%が助産を必要としたとの報告がある（参照 41）。また、米国農務省では、一般的な牛の集団での難産発生リスクを4%と見積もっている（参照 42）。

難産は、産子の出生時体重と雌牛の産次（出産回数）が重要な要因となり、特に未経産牛では難産になる危険度が経産牛に比べて高い。異常分娩は、新生子死亡の増加の原因となり、高い罹病率、低体温症、呼吸及び消化の不全、免疫の受動的伝達の失敗等により、死亡のリスクが増加する。また、困難な娩出や帝王切開による損傷は、子牛の死亡を引き起こす（参照 41、43、44）。

帝王切開により分娩した体細胞クローン牛が、生後45時間で誤嚥性肺炎のため死亡した。解剖の結果、臓器等の異常は認められなかった（参照 45）。

生後直死、死産であった2頭の体細胞クローン牛（双子）は、解剖所見により分娩事故による羊水誤嚥が主原因で窒息死したものと考えられた（参照 46）。

出生体重71.0kgの体細胞クローン牛は、帝王切開で娩出されたが、生後3日で死亡した。この例では、解剖の結果、複数の臓器で異常が認められた（参照 30、47）。

黒毛和種とホルスタイン種のドナー細胞から24頭の体細胞クローン牛が出生し、13頭の生存産子が得られた。7頭の体細胞クローン牛は死産か生後直死であり、2頭の体細胞クローン牛は帝王切開中に死亡したが、異常は認められなかった。1頭の体細胞クローン牛は出生時においては正常に見えたが、生後19日目に敗血症で死亡した。死亡した6頭の体細胞クローン牛は腎臓又は後肢に重篤な形態的異常を示した。体細胞クローン牛の平均生時体重は従来の繁殖技術による牛より重く、9頭の体細胞クローン牛では40%以上重かった（参照 48）。

過大子の発生は妊娠後期の牛及び羊の体細胞クローンで観察され、周産期死亡の増加、胎盤発育異常（胎子水腫発症率の増加等）、内臓の腫大、疾病感受性の増加、突然死、吸乳の減少、呼吸及び起立の困難を引き起こすとされている（参照 2、26、49、50）。

体細胞クローン牛における過大子の発生率は、使用したドナー細胞の種類により異なるとの報告もある（参照 48）。

体外受精後に羊の卵管内で維持された胚に由来する牛は 8 頭中 1 頭が死亡したのに対し、卵管上皮細胞とともに培養された胚に由来する牛は 8 頭中 7 頭が死亡した（参照 40）。このことから、生体外での培養条件も過大子の発生に影響すると考えられている（参照 51、52）。ただし、体外受精胚と体細胞クローン胚を同一条件下で培養したところ、体外受精由来子牛と比較して体細胞クローン由来の子牛では過大子の発生率が高かった（参照 23、24、53）。

過大子の発生の他、生後直死した体細胞クローン牛の病理学的検査の結果、心臓の構造異常に加えて心筋組織、腎臓の結合組織、腱等の軟部組織に異常が観察されている（参照 54）。別の研究によると、生後 1 週間までに死亡した 9 頭の病理学的検査の結果では、体温上昇、臍ヘルニア、呼吸困難、腹水症、脂肪肝、四肢奇形、消化管異常等が示されている（参照 55）。

体細胞クローン牛の血液学検査において、生後直後から 24 時間までの赤血球数、白血球数が有意に低く、造血機能が低いことが示唆されたが、血液生化学検査ではグルコースを除く全ての項目で有意な差は認められなかった（参照 35、36、56）。また、出生直後の血清タンパク、マグネシウム及び無機リンについては人工授精による子牛に比べ有意に高い値であった（参照 33）。一方、出生直後から 2 ヶ月間までの血液生化学検査の結果は、正常範囲内であり、従来の繁殖技術による牛と比較しても大きな差は認められていない（参照 57）。

出生直後の体細胞クローン牛において、ヘモグロビン値はやや低いものの正常範囲内であった。この低レベル状態は生後 65 日間持続した後、人工授精牛と同じレベルに回復した（参照 55）。

13 頭の体細胞クローン牛において、5 頭は帝王切開による娩出を必要としたが、対照牛（人工授精、体外受精胚移植）の 7 頭は助産なしで分娩した。5 頭のうち 2 頭は尿膜水腫であった。これらの牛の生時体重、血中コルチゾール値、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、インスリン様成長因子（IGF）シグナル伝達経路の構成要素について検討された。生時体重は、帝王切開により生まれた体細胞クローン牛が最も重く、次いで、自然分娩した体細胞クローン牛、人工授精牛の順であった。帝王切開で生まれた体細胞クローン牛は対照牛よりコルチゾールと IGF-1 の値が低く、ACTH 値は同等で、IGF 結合タンパク 2 (IGFBP-2) は対照牛より高かったが、筆者らは帝王切開によるものと考察している（参照 53）。

8 頭の体細胞クローン牛は出生時及び 1 時間後の赤血球数とヘマトクリット値が低かったが、その後は対照牛（人工授精及び体内受精卵移植）と有意な違

いがみられなかった。平均体温は対照牛と同様に1時間後に低下した。血中グルコースと乳酸値は、対照牛と比較して生後24時間まで低かったが、48時間では差が認められなかった。また、出生直後の血中フルクトース値が高かったが、6時間後には、差は認められなかった。白血球数に違いは認められなかった。(参照30、58)。

生後1週間、体細胞クローン牛の体温は人工授精牛よりも高く、さらに数回の一時的な上昇が観察された。サイロキシシン(T4)の値を測定したところ、生後2週間は、体細胞クローン牛の値が低かった。IGF-2は出生時に高く、生後15日目では低かった。いずれの値も生後50日までには正常レベルに戻った。T4レベルの低下について、著者らは体温の上昇に伴うものとしており、体細胞クローン牛の出生時に認められる生理学的パラメータ値の差異については、出生後2ヶ月経つと、ほとんど正常になるとされている(参照23)。

③若齢期

従来の繁殖技術で生産された乳牛で、死亡率が最も高いのは生後1週目(死亡率 $1.8 \pm 0.3\%$ (死産を除く))である。これらの雌牛に最も一般的に報告された疾病は、呼吸器障害と下痢症で、これらの疾病の発生は生後2週間でピークとなる(参照59)。

離乳後4歳までの体細胞クローン牛の年間死亡率は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;3~4歳では12頭中1頭が死亡)で、その主な死亡原因は筋骨格異常により予後不良という判断に基づく安楽死であった(参照60)。

我が国において生産された体細胞クローン牛に関する関係機関による調査報告書によると、調査した体細胞クローン牛482頭で病死したのは94頭(19.5%)であった。

このうち、比較対照のデータが収集された黒毛和種及びホルスタイン種(体細胞クローン牛216頭、対照牛991頭)について、病死した日齢を調査した結果、約200日齢までは従来の繁殖技術による牛に比べ死亡率が高い傾向があるが、約200日齢以降は対照牛と同様に極めて低いレベルで推移することが判明したとしている。また、死因が判明しているもののうち、生後2~3日は呼吸障害や心臓奇形が認められたが、それ以降は肺炎によるものが最も多かった。3頭の死亡牛について、病理学的検査が行われ、特定された死因は従来の繁殖技術による牛でも知られている肺のうっ血、免疫不全、心臓の構造異常であったとされている。

生存した黒毛和種及びホルスタイン種の血液検査(赤血球、白血球、血清タンパク質、血清尿素態窒素、血清コレステロール、血糖等)の結果、従来の繁殖技術による牛の変動の範囲内の変化であった。

成育については、体細胞クローン牛は品種特性や個体差の範囲内で対照牛や標準発育曲線と大きく外れることのない成長を示した。なお、ドナー牛の発育

能力が標準より優れていた場合には、体細胞クローン牛もその傾向に準じることが認められた（参照 6、61）。

147 日齢で死亡した体細胞クローン牛の病理学的検査を実施したところ、内分泌系（成長ホルモン）の異常による小児症に加え、栄養消化・吸収が不十分なことによる栄養不足、さらに免疫不全による感染症への抵抗性の低下により死亡したと考えられた（参照 57）。

25 ヶ月齢での死亡例では、微量ミネラル（セレンウムと銅）の欠乏症が原因であった。同じ牧草で飼育している他の牛では、問題は認められなかった。この体細胞クローン牛は子牛の時期から鼓張症の徴候が軽度ながら頻繁に起きていた（参照 47）。

1 頭の体細胞クローン雄牛の例では、呼吸困難（未成熟な肺と肺高血圧症）、吸乳反射の不足、I 型糖尿病と思われる症状及び他の健康上の問題で出生直後にかなりの臨床獣医師のサポートが必要とされた。この子牛はまもなく回復し、2 ヶ月齢までに糖尿病も治まり（子牛は血糖とインシュリンが正常な値を維持できた）、健全な成牛となった（参照 62）。

超音波診断画像によって、出生直後の体細胞クローン牛で右心室拡張が明らかとなった例があったが、投薬による治療により治癒した。出生後 1 日おきに採血し検査したところ、血液中の網状赤血球数と未完成な血液細胞の増加が 3 週間にわたってみられた。リンパ球（白血球）数については 1 ヶ月齢まで正常な値であったが、その後急速に減少した。ヘモグロビン値も 40 日齢頃以降に減少し、51 日齢で貧血により死亡した。死亡牛の病理学的検査により、胸腺、脾臓、リンパ節の形成不全（発育不全）と全身性のリンパ類似組織の無形成を認めた。また、内因性の IgG 合成は認められなかった。胸腺萎縮を引き起こすウイルスの関与も認められなかった（参照 63）。

体細胞クローン牛の平均 30%は月齢 6 ヶ月前に、さまざまな原因で死亡することが報告され、呼吸不全、腎臓の発育異常及び肝臓脂肪症（脂肪肝）等が含まれるが、出生から数ヵ月過ぎれば、ほとんどの体細胞クローン牛は正常に発育し、成熟期に達する（参照 55、60、64）。

周産期後の血液検査やホルモン等のパラメータに関し、体細胞クローンと対照牛（従来 of 繁殖技術による牛）との間で有意な差は認められていない。6 ヶ月齢の体細胞クローン牛は同齢の対照牛と比較した研究において、血液生化学的及び尿パラメータ、免疫状態、成長及び生殖パラメータに関して差異は認められていない。同様に、多数の生理学的パラメータ（血液プロファイル）に関し、体細胞クローンと同齢の対照牛との間で差異が認められないとする報告が多い（参照 4、61、65、66、67）。

④春機発動後の成熟及び加齢期

我が国において生産された体細胞クローン牛に関する関係機関による調査報告書では、臨床・病理、血液性状、成育、繁殖性、乳肉生産のデータを分析した結果、生後 200 日以上にわたって生存した体細胞クローン牛は従来の繁殖技術による牛と同程度に成育し、差異のない生理機能を有することが判明したとされている。

体細胞クローン牛 19 頭(黒毛和種)の肥育試験の結果、1 日当たりの増体量、枝肉の肉質について、肥育時の個体の状態により若干の差が生ずる場合があるものの従来の繁殖技術による牛と比較して相似性が高かった(参照 6)。

体細胞クローン牛の成育について、従来の繁殖技術による牛の値と同等であるか、ドナー品種における標準値の範囲内であったとする多数の報告がある(参照 60、68、69、70)。また、体細胞クローン牛は、ドナー牛の優良形質を維持することから、比較対照とする群の値よりも優れた値を示すことが考えられ、黒毛和種やホルスタイン種の体細胞クローン牛では、体重、体高等が標準発育値の上限を上回る良好な発育を示すこともある(参照 37、71)。

体細胞クローン牛のと畜検査及び病理学的所見は、肥育牛で日常的に確認されている所見であった。特に、採取可能であった臓器(肝、腎、心、肺、骨格筋、皮膚)の病理学的検査において、構造的な異常所見は認められなかった(参照 72)。

61 ヶ月齢の不受胎の体細胞クローン牛一頭について病理学的検査を実施した結果、子宮角の変色・低形成、卵巣静止が確認された。また、子宮の動脈中膜に石灰沈着が多く、内膜の動脈が異常に多いことが観察された(参照 73)。

体細胞クローン牛の寿命について、我が国において、現在 10 歳齢で健全な牛が飼育されており、また、6~7 歳齢の動物について言及した報告書もあるが(参照 55)、寿命に関して検討できるデータは十分に得られていない。

また、体細胞クローンマウスでは、寿命が短くなるという報告(参照 74)や寿命は変化しないという報告(参照 75)がある。

2 ヶ月齢~5 歳齢の体細胞クローン牛 17 頭に対し、ロタウイルスワクチンとオボアルブミンを投与し、免疫機能について調査したところ、抗体産生性については従来の繁殖技術による牛との間に差はみられなかった。また、抗原に特異的な細胞の増殖は、ロタウイルスでは差はみられなかったが、オボアルブミンでは体細胞クローン群で弱かった。改めて、同様の試験を同一の動物及び別の体細胞クローン牛で行ったが、免疫機能は正常であった(参照 64、67)。

2~4 歳齢の体細胞クローン牛の泌乳期の初期において、一時的に血中の $\gamma\delta T$ 細胞及び WC1⁺ $\gamma\delta T$ 細胞の割合が従来の繁殖技術による牛と比較して減少して

いることが観察されており、これにより体細胞クローン牛が泌乳期の初期に免疫機能が低下する可能性があることが指摘されている（参照 76）。

（繁殖性）

我が国において生産された体細胞クローン牛に関する関係機関による調査報告書では、52 頭（雄 18 頭、雌 34 頭）の体細胞クローン牛の繁殖性について報告されている。

雄牛の精液は、正常に生産され、性状も従来の繁殖技術による牛と同様であった。その精液を用いた体外受精、人工授精等の繁殖性調査を通じ、体細胞クローン雄牛が種雄牛として利用可能であることが確認された。また、その際の人工授精における生産率は、従来の繁殖技術による牛と同等であることが認められている。

雌牛は春機発動後、正常な発情周期が認められ、血中プロゲステロンの濃度に異常は認められていない。雌牛を用いた人工授精、胚を用いた他の雌牛への胚移植により、繁殖性が確認された（参照 6）。

体細胞クローン雄牛の精子について、正常精子率、体外受精後の卵割率、胚盤胞の発生率に差異は認められておらず、受胎試験でも異常は認められていない（参照 69、77、78、79、80、81、82）。また、精液の凍結融解後の精子性状、授精試験も異常は認められず凍結による影響はなかった（参照 78、83、84、85）。

不妊となった高齢の牛に由来する体細胞クローン雄牛は、出生時体重が重かったが生存し、その精液性状及び繁殖能力を調べたところ、正常であることが確認された（参照 86）。さらに、リクローン牛の凍結精液を用いた受胎試験においても、後代牛の出産が確認されている（参照 87）。

体細胞クローン雌牛の多くは、正常な初回発情時期、発情周期が認められているが、春機発動を迎えるのが遅く、初回発情時の体重は重いとする報告もある。発情周期の長さ、卵胞の発育、ホルモン変化について差異はみられなかった。黄体形成ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、エストラジオール、プロゲステロンについて、日内変動の様相は体細胞クローン牛と人工授精牛との間で類似していた（参照 79、88）。

体細胞クローン雌牛においては、同一条件下で飼育された従来の繁殖技術による牛より春機発動期に達するのが遅かった。しかし、妊娠期間及び出生子牛の生存に関して、両者の間に有意な差はみられなかった（参照 64）。

初回排卵が確認された体細胞クローン雌牛、人工授精雌牛ともに、初回排卵後の血中プロゲステロン濃度は低かった。また、発情周期が短い牛ほど血中プロゲステロン濃度は低い傾向を示した。2 回目以降の排卵後では、体細胞クローン牛、人工授精牛ともに、この濃度変化に大きな差はなかった（参照 89）。

2頭の26ヶ月齢体細胞クローン雌牛に人工授精を行った結果、1頭が受胎し、受胎後285日目に自然分娩により22.5kgの雌牛を分娩した。不受胎であったもう1頭に後日、再度人工授精を行った結果、受胎したが、受胎後252日目に流産した(参照57)。

妊娠期間についても、通常の繁殖牛と大きな差は認められていない(参照46、54、89、90、91、92)。

体細胞クローン牛の繁殖性は従来の繁殖技術によって生産された牛と有意な差はなく、その後の胎子の発育も正常であった(参照60、68、86、88)。

ドナー牛の305日乳量(実測値)は10,722kgで、体細胞クローン牛の305日乳量(期待値)は8,500kgであった。初産時での305日間の乳量に違いはみられるものの、これは飼養管理の影響によると考えられている(参照92)。

体細胞クローン牛の泌乳成績は、人工授精牛と比較すると初産時は低い傾向であったが、2産次では同等であった(参照36)。一方、2産次でも低い乳量であったとする報告もある(参照93)。

(2) 体細胞クローン技術を用いて産出された豚

①細胞融合～妊娠(胎子発育)

豚は多胎動物であり、妊娠初期に複数の生育可能な胚が子宮内に存在する必要がある、妊娠を開始して維持するために最小限度の発育可能な胚を必要とする。それはおよそ4個であると考えられている(参照94、95)。

豚においては、牛と異なり、体細胞クローン胚の高い死亡率のため、非常に多くの胚を受胎豚に移植する必要がある。1頭あたり約150個の体細胞クローン胚を移植した報告によると、2頭の受胎豚から4頭の生存産子が生まれている(参照96)。同様に、1頭あたり数十～100個程度の体細胞クローン胚を移植し、体細胞クローン豚を産出した報告がある(参照5、97、98)。

従来の繁殖技術における調査においても、胎盤発育の時期である妊娠35日以後に胎子の死亡率が高くなることが報告されており、死亡率は9.2%とされている(参照99)。

②周産期(出生前後)

我が国において生産された体細胞クローン豚に関する関係機関による調査報告書によると、体細胞クローン豚90頭における死産は22頭(24.4%)、生後直死は8頭(8.9%)であり、体細胞クローン牛と比較をすると死産の割合が多く、生後直死の割合は少ない傾向であった。また、死産、生後直死した体細胞クローン豚において、極端な過大子の発生は認められなかったとされている。また、病死は25頭(27.8%)発生しており、死因は記載されていないが、体細胞クローン牛より多い傾向であったとされている(参照6)。

デュロック種の胎子線維芽細胞をドナー細胞として、1頭あたり59～128個の体細胞クローン胚を5頭（合計511個）に移植した。移植後28～40日に5頭全ての受胎雌豚について超音波診断により妊娠が確認された。5頭のうち4頭は分娩まで継続し、それぞれ5～9頭の体細胞クローン豚（合計28頭）が娩出した。4頭のうち3頭は妊娠115日目に分娩誘起処理を行い娩出した。4頭目は自然分娩により妊娠117日目に娩出した。28頭の体細胞クローン豚のうち1頭は死産であったが、病理学的検査で異常は認められなかった。生存して生まれた体細胞クローン豚のうち1頭は、鎖肛で、最も小さい個体であった。鎖肛は従来の方法で生産された子豚において低い発生頻度で見られる異常である。生存した子豚は従来の方法で生産された同一品種の子豚より、やや低めの生時体重であった。産子数、胎盤重量、胎子重量には関係がほとんどみられなかった（参照5）。

体細胞クローン豚を妊娠した仮親の数は限られているが、妊娠期間は114～120日間と報告されている（従来の繁殖技術での豚の平均的な妊娠期間は110～120日の範囲）（参照5、100、101、102、103）。

また、体細胞クローン豚の生時体重及び胎盤の重量は、従来の繁殖技術により生産された産子の正常範囲内であるとする報告がある（参照97、104）。また、飼育環境を制御した研究では、出生時平均体重は、体細胞クローン豚が人工授精と比較して有意に低いことが示されている。また、体細胞クローン豚は死産や出産後死亡率が高い傾向にあったと報告されている（参照105）。

体細胞クローン牛に見られる過大子の発生とは対照的に、体細胞クローン技術で生産された豚では子宮内発育遅延（IUGR）が増加している。顆粒膜細胞をドナー細胞として用い、妊娠116日目に帝王切開により娩出し、5頭の生存した体細胞クローン豚が産出された。体細胞クローン豚の平均生時体重は2.72ポンドで、ドナー細胞と同じ集団での自然交配による産子より約25%軽かった（参照98）。また、体細胞クローン豚の23腹（143個体）を、人工授精での112腹（1,300個体）と比較し、1腹当たりの子宮内発育遅延数が増加していることが示された（参照105）。

生後直死した2頭と139日齢で死亡した体細胞クローン豚の病理学的検査の結果、生後直死した2頭のうち1頭は肢の異常とヘルニア、もう1頭は臓器に著変はなかったが、腹腔及び脳内の出血が認められた。139日齢で死亡した体細胞クローン豚は、胸膜肺炎とコリネバクテリウムの全身感染症と診断された。これらの所見は従来の繁殖技術による豚でも知られている所見であった（参照57）。

40頭の体細胞クローン豚のうち、下痢、脳髄膜炎、心臓の機能異常を含む種々の原因のため、5頭が死産、22頭が生後1週間以内、1頭が生後40日で死亡

した。12頭は成豚まで生存した（参照 101）。

生育不能の体細胞クローン豚の胎盤の形態異常は、胎盤細胞のアポトーシスに起因している可能性があるとしてされている（参照 106）。

2種類の胚由来繊維芽細胞をドナーとする体細胞クローン子豚9頭について、生後約 30 日目の時点でリポ多糖の負荷による急性期反応（コルチゾール、TNF- α 、IL-6）を調べたところ、従来の繁殖技術による豚に比べ、一部の体細胞クローン豚では低かったが、他の体細胞クローン豚では同程度であった（参照 100）。

③若齢期

体細胞クローン豚の体重は、標準値と同様に推移し、体細胞クローン豚の間でも大きな差は認められていない（参照 57）。

3～5 週齢の体細胞クローン豚の体重は、従来の繁殖技術による豚と比べ有意に高値で推移したが、6 週齢以降差はみられなくなり、8 週齢ではほぼ同様の値であった（参照 104）。

15 及び 27 週齢の体細胞クローン豚では、自然交配による豚と比較して発育、健康状態、生化学検査及び免疫機能に関して差が認められないことが示されている（参照 107、108）。皮膚角質肥厚がこの体細胞クローン群で 1 例観察されたが、これは従来の飼育法にも存在するので、原因が体細胞クローンのためであったか否かは判断できない（参照 107）。

約 18 ヶ月齢の 3 頭の体細胞クローン豚の血液検査では、赤血球等の 17 項目の血液学検査、LDH 等の 24 項目の血液生化学検査の結果、従来の繁殖技術による豚と著しい差異は認められていない（参照 6）。

体細胞クローン豚は自然交配による豚と比較し、行動様式において同様であるか、若しくは、個体間差が大きくなる（参照 109）。

④春機発動後の成熟及び加齢期

体細胞クローン雄豚からの精液の評価では、対照豚と同等の精液量、精液濃度、運動性を示した（参照 102、110）。

また、体細胞クローン豚 4 頭からの精液を従来の繁殖技術により生産された雌豚 49 頭に人工授精したところ、後代豚 293 頭が離乳期間まで生存した（参照 102）。

体細胞クローン雌豚の初回発情日齢は 1 頭を除き、97～125 日齢であった。また、平均産子数 11.7 頭、生存頭数 10.3 頭、離乳頭数 9 頭で、対照豚（従来の繁殖技術による豚）との差は認められなかったが、産子の平均体重は、生時及び 3 週齢時とも対照豚に比べ低値であった（参照 104）。

体細胞クローン雄豚精液による人工授精を受けた体細胞クローン雌豚は、通

常の妊娠期間で出産した。後肢の屈筋腱が拘縮した1頭の豚を除き、62頭の後代は出産時に正常であった。異常の割合(1.6%)はオーストラリアの養豚産業の推定頻度(1.2%)と同程度であった。対照豚(従来の繁殖技術による豚)の死産率は8%であったが、体細胞クローン豚産子の死産率は4.5%であった(参照110)。

体細胞クローン豚(n=5)は、1頭のみ出生後及び解体処理前のIGF-Iが対照豚(従来の繁殖技術による豚)よりも低かったが、他は対照豚の変動の範囲内であった。また、17 β -エストラジオールレベルも低かったが、対照豚の変動の範囲内であった(参照111)。

(3) 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚のまとめ

体細胞クローン牛及び豚について、発育段階毎に従来の繁殖技術による牛又は豚との健全性について比較を行った。

①体細胞クローン技術を用いて産出された牛

周産期における死産及び生後直死が多く認められ、その主な原因として、過大子の発生による難産、窒息、羊水誤嚥が認められている。過大子の発生は、従来の繁殖技術による牛でも認められているが、体細胞クローン牛において高い頻度で認められている。また、出生直後の血液検査等において、従来の繁殖技術による牛との間に差が認められたとの報告があるが、生後2ヶ月以内に回復したとされている。

若齢期において、従来の繁殖技術による牛と比較して死亡率が高いことが報告されている。死因は従来の繁殖技術による牛でも知られている肺炎等であったとされている。また、感染症への抵抗性の低下の報告もある。血液検査等では、従来の繁殖技術による牛と有意な差は認められていない。若齢期に認められる死亡率の高さは、周産期において多く認められる異常と共通の要因によるものと考えられる。この時期に認められる異常は、概ね6ヶ月以降まで成長した牛では、従来の繁殖技術による牛と死亡率の差は認められていない。

若齢期を過ぎて生存している体細胞クローン牛については、従来の繁殖技術による牛と比較して、臨床・病理、血液検査等のパラメータに関して差異は認められていない。成育、繁殖性、乳肉生産のデータにおいても、従来の繁殖技術による牛と差異は認められていない。また、採取可能であった体細胞クローン牛の病理学的検査においても、異常所見は認められていない。

一部の体細胞クローン牛において免疫機能が低下したとする報告があるが、一方で従来の繁殖技術による牛と差がないとする報告も多数ある。一般的に、体細胞クローン牛が従来の繁殖技術による牛と比較して、感染症等の疾病に特に感受性が高いということを示す知見は報告されていない。

体細胞クローン動物産出の成功率は、ドナー又はレシピエント細胞の由来、

細胞の培養方法、核移植の方法等により影響を受けると考えられた。今後、これらの要因についての研究を進めることにより、体細胞クローン動物産出の成功率は向上するものと考えられる。

②体細胞クローン技術を用いて産出された豚

周産期における死産及び生後直死が多く認められているが、その死亡原因は従来の繁殖技術による豚でも認められるものである。

また、いくつかの報告において、生時体重が低いとする報告があるが、離乳期には回復している。

若齢期以降において、体細胞クローン豚については、臨床・病理、血液検査、成育、繁殖性においても、従来の繁殖技術による豚と差異は認められていない。

③体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚のまとめ

体細胞クローン牛及び豚の出生前後において、主に発生異常と考えられる死産及び生後直死が認められる。また、体細胞クローン牛については、若齢期においても死亡率が高い傾向が認められているが、概ね6ヶ月齢を超えると従来の繁殖技術による牛と同様に健全に発育する。なお、これらの死亡原因は従来の繁殖技術でも認められているものである。

出生後及び若齢期に生理学的パラメータ値が従来の繁殖技術による牛及び豚と差異が認められることがあるものの、それらは成長とともに回復し、健全となる。

これらのことから体細胞クローン技術を用いて産出され、食用に供される可能性のある牛及び豚については、従来の繁殖技術による牛及び豚と比べて、健全性の点で差異は認められなかった。

なお、人獣共通感染症等の食品衛生法（昭和22年法律第233号）で規定された疾病にかかり又はその疑いがある場合及びと畜場法（昭和28年法律第114号）で規定されている異常を呈する場合には、食用に供することが禁止されており、体細胞クローン技術を用いて産出された動物であるか否かにかかわらず現行のと畜検査において、必要に応じて処理される。

2. 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚の後代について

体細胞クローン牛及び豚の後代（F1）について、従来の繁殖技術による牛又は豚と健全性について比較を行った。

体細胞クローン牛及び豚の後代とは、体細胞クローン牛及び豚から受精を介して産出された産子（F1）及びその産子から受精を介して産出された子孫のことである。いずれの世代においても、受精を介して産出されるものであることから、一代目の子孫であるF1について、従来の繁殖技術による牛及び豚と比べて同等の健全性を有するかについて検討した。

(1) 体細胞クローン技術を用いて産出された牛の後代 (F1)

我が国において生産された体細胞クローン牛に関する関係機関による調査報告書によると、体細胞クローン牛の後代 124 頭における死産は 11 頭 (8.9%)、生後直死は 1 頭 (0.8%) であり、従来の繁殖技術による牛 (n=566) の死亡率 (死産 4.6%、生後直死 1.9%) と比較し有意な差は認められなかった。また、病死は 202 頭のうち 14 頭 (6.9%) であり、比較対照のデータが収集された黒毛和種及びホルスタイン種 (体細胞クローン牛 216 頭、対照牛 991 頭) について、病死した日齢を調査した結果、生後 2 日目以降は対照とほぼ同等の死亡率で推移することが判明した。これらの結果から、体細胞クローン牛の後代において、死産、生後直死及び病死の発生率は、従来の繁殖技術による牛と有意な差は認められないとされている。

また、1 頭の死産した体細胞クローン牛の後代について、病理学的検査が行われ、従来の繁殖技術による牛でも知られている疾患 (免疫不全) によるものであった。その他、外観的に健全と思われた飼育中の体細胞クローン牛の後代 2 頭について、病理学的検査が行われ著変は認められていない。

18 頭の体細胞クローン牛の後代を対象とした血液検査の結果、バラツキは見られたものの対照牛における変動範囲を大きく逸脱する項目は認められなかった。

成育については、調査した 16 頭について、体細胞クローン牛の後代は品種特性や個体差の範囲内で対照牛や標準発育曲線と大きく外れることのない成長を示した。

5 頭の雌の体細胞クローン牛の後代について、繁殖性の調査が行われており、人工授精による妊娠期間、産子の生時体重等において、対照牛との差は認められていない。

搾乳量について、5 頭の体細胞クローン牛の後代を調査したところ、305 日平均補正乳量は対照牛より低い値を示した。肥育試験では、増体、枝肉成績に加えアミノ酸組成、脂肪酸組成等の分析が行われた結果、肥育時の個体の状態により若干の差が生ずる場合があるものの標準値内の発育成績を示したとされている (参照 6)。

自然分娩された体細胞クローン牛の 52 頭の後代のうち、85%が 24 時間後まで生存しており、その生存率は人工授精牛とほとんど変わることはなかった (参照 60)。

21 頭の体細胞クローン牛の後代が自然分娩で生まれており、21 頭中 20 頭が出生後生存していた (参照 67)。

移植後 252 日目に死産した体細胞クローン牛の後代胎子について、病理学的検査の結果、脾臓と胸腺からは免疫不全が、甲状腺からはホルモン関係の異常が示唆された (参照 90)。

3 頭の体細胞クローン牛の後代の生時体重は、体細胞クローン牛にみられる過大子の発生はなく、人工授精による産子と差は認められておらず、全て自然分娩

であった。体細胞クローン牛の後代の血液性状については、一部で人工授精による牛との間に差が認められる時期もあったが、ほぼ正常範囲であり、多くの項目で差は認められなかった（参照 112）。

分娩した体細胞クローン牛の後代は、外見的に異常はなく、自力で起立後、乳を吸引した。通常の人工授精、受精卵移植による産子と異なることはなかった（参照 113）。

体細胞クローン牛の後代（雄）の精液性状は正常であり、その精液を用いた人工授精及び受精卵移植を実施した 2 頭の雌はともに 1 回で受胎し、それぞれ正常な産子を得ることができた（参照 80）。

体細胞クローン雌牛の体外受精により得られた後代（雌）に人工授精を実施したところ、産子（孫にあたる）を出産し、正常に発育した（参照 73、93）。

体細胞クローン牛の後代（雌 19 頭、雄 11 頭）の生理機能及び遺伝的状況を調査したところ、出生当初においては心拍数、呼吸数及び体温が低めであるが、染色体安定性、発育、肉体的、血液学的及び生殖的パラメータは 1 歳の正常動物と比較しても標準的であった。さらに、ストレス反応も適度であった（参照 114）。

体細胞クローン牛の後代の体重及び体高等の推移は、対照とした従来の繁殖技術による牛や標準値の範囲内であったとする多くの報告があり、また、各臓器や胃及び腸等の消化管重量の調査においても正常値の範囲内であった。さらに、枝肉における筋肉、脂肪及び骨の構成割合や枝肉における各筋肉の割合も正常値の範囲内にあった（参照 115）。

（2）体細胞クローン技術を用いて産出された豚の後代（F1）

我が国において生産された体細胞クローン豚に関する関係機関による調査報告書によると、体細胞クローン豚の後代 143 頭における死産は 8 頭（5.6%）、生後直死は 2 頭（1.4%）であり、全てが、自然分娩であり、過大子の発生は見られなかった。また、体細胞クローン豚の後代を対象とした血液検査の結果、測定値の分布範囲は対照豚（従来の繁殖技術による豚）のものと同様であり、体重増加も対照豚や標準的な成長曲線と同様であった（参照 6）。

体細胞クローン豚（雌）6 頭に人工授精を行い、44 頭の後代を産出した。後代の出生時体重は従来の繁殖技術による豚に比べて有意に低かったが、出生胎子数、平均同腹子数及び離乳期までの生存数は同様であった（参照 116）。

体細胞クローン豚（雌）9 頭に、従来の繁殖技術により交配し、後代を産出した。平均同腹子数は対照豚（自然繁殖による豚）と比較して差異はなく、生後 15 週目（n=14）と 27 週目（n=8）での血液検査（10 項目）において、15 週目の血中尿素態窒素と 27 週目のアルカリホスファターゼの平均値で軽度な相違が認められたが、対照豚と比較して正常変動の範囲内であった（参照 108）。

体細胞クローン豚の後代 242 頭が商業的な条件下で飼育された結果、従来の繁

殖技術による豚と比べ、健康状態又は死亡率に差異は認められなかった(参照 111、117)。

体細胞クローン豚の後代の生育状況について、分娩 10 腹のうち、衰弱等による離乳前の死亡以外に 3 腹の一部で疾病による死亡例がみられた。死亡の原因は、下痢や多発性漿膜炎であり、通常の豚でもみられるものであった。また、疾病による死亡例がみられなかった腹の産子は、従来の繁殖技術による豚と同様の発育を示した(参照 118)。

体細胞クローン豚の後代の血液生化学検査では、ヘモグロビン量、白血球数等の項目で従来の繁殖技術による豚と比較し有意差が見られたが、ほとんどが一時的なものであり、数値の範囲もほぼ同様であった(参照 118)。

体細胞クローン豚の後代は、従来の繁殖技術による豚と比較して生時体重が低値であり、30kg までの 1 日あたり増体量では差がみられなかったが、30~70kg の増体量では後代豚が上回っていた(参照 119)。

(3) 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚の後代のまとめ

体細胞クローン牛及び豚の後代(F1)において、体細胞クローン牛及び豚の周産期や若齢期に認められた異常は認められておらず、F1 の健全性は、従来の繁殖技術による牛及び豚と差異は認められない。

体細胞クローン牛及び豚の後代は、人工授精等の従来の繁殖技術を用いて、受精を介して産出される。従って、一代目の子孫である F1 において、従来の繁殖技術による牛及び豚と比べて同等の健全性を有することから、受精を介して産出される二代目以降についても、従来の繁殖技術による牛及び豚との差異は想定されない。

V. 体細胞クローン動物のエピジェネティクス等

1. 体細胞クローン動物の発生と分化

通常の交配により得られる受精後の接合子は、「全能性 (totipotency)」を有する胚となり、数回の分裂を経て、筋肉細胞、脂肪細胞、脳細胞等の多数の異なる細胞へ分化することができる。そのうちある細胞は実際に胚性幹細胞として利用されている。つまり、同じ遺伝子構成を持つ細胞が、必要とされる遺伝子の適切な発現調節を行うことにより、異なる役割や性質をもつ体細胞へと分化しうる。この概念は、近年のエピジェネティクスを含めた発生学研究の進展に伴い、確立されたもので、自然交配、人工授精及びクローン技術の如何を問わず、発生学の基本的な概念となっている。

体細胞クローン技術では、ドナー動物の体細胞（卵子や精子等の生殖細胞以外の細胞、例えば、皮膚や筋肉等の細胞）又は体細胞の核を、核を除いた未受精卵（レシピエント）に移植し、又は電氣的刺激により体細胞を細胞融合させ、活性化して発育を促す。培養により数回の細胞分裂を経た後、得られる胚盤胞（体細胞クローン胚、再構成胚等と呼ばれる。）を別の雌（受胎動物、仮親）の子宮へ移植し、受胎させ、成長した胎子をクローン動物新生子として出産させる。

体細胞クローン動物の産出においては、通常の受精の過程を経ずに、分化した体細胞の核を使用することから、体細胞クローン胚を、一度「全能性」を有する状態にリプログラミングする必要があるといわれている。

体細胞クローン産出過程において、体細胞クローン胚の「全能性」の獲得が適切に行われない場合には、その後の細胞分化及び組織や器官の形成が適切になされないことが予想され、近年、体細胞クローン動物の発生、分化、発育における異常の原因解明のため、関連分野のエピジェネティクス研究が精力的に行われてきた。本章においては、体細胞クローン動物の産出過程で認められる発生や発育の異常とエピジェネティックな変化との相関に関する現在の知見をまとめた。

2. エピジェネティクスとは

エピジェネティクスとは、「DNA の塩基配列の変化を伴わず、細胞分裂後も継承される遺伝子機能を研究する学問」（参照 120）として定義されている。

エピジェネティックな制御としては、DNA のメチル化（参照 121、122、123、124、125）、ヒストンの修飾（メチル化、アセチル化、リン酸化及びユビキチン化）等（参照 126、127、128、129、130）が知られている。特に DNA のメチル化は、遺伝子発現解析と並んで、エピジェネティクス研究の大部分を占めており、遺伝子のエピジェネティックな発現調節において重要な役割を果たしていると考えられている。

DNA のメチル化とは、メチル転移酵素により、DNA のシトシン塩基の 5 位にメチル基が転移し、5-メチルシトシンとなることである。遺伝子の制御領域にあるシトシン-グアニン配列（CG 配列）のシトシン塩基がメチル化され、多くの場合、遺伝子の発現が抑制される。

DNA のメチル化のパターン（遺伝子毎のシトシンのメチル化の程度の相違）は、筋肉、脂肪、脳等の器官や組織を構成する細胞の種類により異なる。また、通常、DNA のメチル化のパターンは細胞分裂によって失われずに維持され得る。少なくとも哺乳類においては、その生命維持において、遺伝子毎にメチル化と脱メチル化が適切に行われることが重要であると考えられている。

例えば、着床前のマウス胚（胚盤胞, blastocyst）において、発生において重要と考えられている *Oct-4* 遺伝子（他の遺伝子の転写を調節する因子をコードする遺伝子）のメチル化の状態及び遺伝子発現を調べると、内細胞塊 (inner cell mass) ではほとんどメチル化されておらず、遺伝子の発現が認められるが、栄養膜細胞 (trophoblast) では高度にメチル化されており、遺伝子の発現は認められない（参照 131）。

哺乳類の胚の発生及び分化の過程でゲノム全域のエピジェネティックな変化が起きる。受精直後に起こるエピジェネティックな変化は、「着床前 (preimplantation) のリプログラミング」と呼ばれ、配偶子の形成 (gametogenesis) 時に起こるエピジェネティックな変化は、「配偶子形成のリプログラミング」と呼ばれることがある。即ち、「リプログラミング」とは「グローバルなエピジェネティックな変化」と考えられている（参照 122、132）。

体細胞クローン技術により得られた胚のリプログラミングと正常胚におけるリプログラミングとの相違が注目され、数多くの報告がなされているが、その殆どは、着床前のリプログラミングに関するものである（参照 133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143）。このようなエピジェネティックな調節の不全は、必ずしも体細胞クローン動物に限られるものではなく、他の生殖補助技術 (ART) によって得られた胚においても認められる（参照 144、145、146）。

3. 体細胞クローン動物のエピジェネティクス

以下に、体細胞クローン動物のエピジェネティクスに関する知見について概説する。

(1) DNA のメチル化

（細胞融合～着床前・胚盤胞）

マウス、ラット、豚、牛で、受精直後の接合子（受精卵）において、精子由来の核の脱メチル化が起きることが報告されている。牛では、2 細胞期から 8 細胞期にかけて細胞分裂に伴いメチル化の程度が低下するが、8 細胞期から 16 細胞期に、新たなメチル化が起きる。一方、マウスでは、新たなメチル化は、4 回の分裂以後に胚盤胞の内細胞塊で顕著であることが報告されている（参照 147）。このように、動物種により、再メチル化の時期に相違が認められる。

牛の体細胞クローン胚で、細胞融合の段階で脱メチル化が起こるものの不完

全で、再メチル化が正常胚よりも早期に起きることが報告されている。そのため、体細胞クローン牛の桑実胚 (morula) では、より高度のメチル化が認められた (参照 147)。

一方、体細胞クローン牛の胚で、4 細胞期まではドナー細胞のメチル化パターンが維持されており、脱メチル化が認められないという報告もある (参照 148)。

また、体細胞クローン牛の着床前の胚で、ゲノムのサテライト領域の脱メチル化が適正に行われず、ドナー細胞によく似たメチル化レベルが維持されるとの報告がある (参照 149)。

豚の生殖細胞及び体細胞では、セントロメア (染色体の長腕と短腕が交差する部位) のサテライト DNA 配列やユークロマチンに存在する PRE-1 配列の脱メチル化を比較すると、卵子はごくわずかに、精子は高度にメチル化されており、体細胞 (線維芽細胞) は高度にメチル化されていた。体細胞クローン胚においては、4~8 細胞期までは、高いメチル化状態が維持されていた。それ以降は、体外受精胚や体内受精胚と同様に、脱メチル化が始まり、胚盤胞ではメチル化部位の数が明らかに減少していた (参照 150)。この報告から、豚体細胞クローン胚では、通常の受精胚と同じように着床前に脱メチル化が起こると考えられた。

(胎盤及び胎子)

牛やマウスにおける体細胞クローンの胎盤の肥大については、栄養膜細胞 (trophoblast) におけるリプログラミングの相違に起因するものと考えられている。

体細胞クローンマウスでは、胎盤の肥大と胎子体重の減少が認められるが、胎盤の過成長は、主に海綿栄養芽細胞 (spongiotrophoblast) 層の肥厚によることが示されている (参照 151)。

体細胞クローンマウスの胎盤と胎子皮膚の細胞を用いてゲノムの CpG アイランドのメチル化状態について調べた。その結果、大部分の領域 (胎盤の 99.5% と皮膚の 99.8%) は、有性生殖による対照と同一であったが、異なるメチル化パターンも認められた。メチル化のパターンが異なる領域は、組織特異的な遺伝子の発現に対応する領域と一致していた (参照 152)。

さらに、体細胞クローンマウスの胎盤の過成長と、特定の遺伝子の DNA のメチル化及び遺伝子発現の関連が調べられ、体細胞クローンマウスの胎盤で、高度にメチル化される領域として、*Sall3* 遺伝子座が同定された。*Sall3* 遺伝子座のメチル化の割合は胎盤肥大の程度に相関していることから、*Sall3* 遺伝子座は、核移植に起因するエピジェネティックな変化が起きやすい遺伝子座であると結論づけられた (参照 153)。

体細胞クローン牛と受精由来の胎子のメチル化の相違も認められており、発達異常との関係が推定されている。

体細胞クローン牛の胎子、流産胎子及び成牛について、DNA 中の 5-メチルシトシンの量を測定した結果から、体細胞クローン牛胎子の低メチル化と流産胎子の著しい低メチル化が示されている。しかし、体細胞クローンの成牛では、対照牛と同程度のメチル化が示された。このことから、グローバルな DNA メチル化の欠失が胎子の発達阻害に関係している可能性がある」と結論づけられている（参照 154）。

移植後 40 日目の体細胞クローン胎子の胎盤では、胎盤葉の発達がなく、絨毛膜で *Xist* 遺伝子座の刷り込み（インプリンティング）の異常、サテライト DNA 配列及び表皮サイトケラチン（epidermal cytokeatin）遺伝子プロモーター領域の高メチル化が見いだされ、リプログラミングの違いが栄養外胚葉由来組織の遺伝子発現パターンに影響を与えるものと報告された（参照 155）。

体細胞クローン牛と人工授精の流産胎子（妊娠 60～90 日）、成牛（生後 18～24 ヶ月）について、サテライト I 反復配列、IL-3 及びサイトケラチン遺伝子のプロモーター領域のメチル化を解析した。その結果、成牛では、いずれの遺伝子座においても、体細胞クローンと人工授精でメチル化レベルに相違がないが、流産胎子では非常に低いメチル化を示す群と人工授精の流産胎子と類似のメチル化パターンを呈する群が確認された。これらのことから、少なくともゲノムのある領域での適切なメチル化が正常な発達と相関しているとされた（参照 156）。

移植後 48 又は 59 日目の体細胞クローン牛と人工授精牛の胎子の胎盤組織（intercotyledonal fetal membranes, ICFM）及び脳について、比較した結果、複数の特定の遺伝子領域で DNA メチル化の違いが見いだされている（参照 157）。

体細胞クローン牛の胎子の肝臓、脳、心臓、肺の組織について、インプリント遺伝子 *Igf-2r* のメチル化を解析した結果でも、正常胎子との相違が見いだされ、胎子組織の異常との関係が示されている（参照 158）。

（出生後）

体細胞クローン牛の組織（心臓、肝臓、脾臓）で *Xist* 遺伝子のメチル化を調べたところ、生後直後に死亡した体細胞クローン牛ではメチル化の程度が低いものがみられたとの報告がある（参照 9）。

マウスの新生子、成体（8～11 ヶ月）、加齢体（23～27 ヶ月）の腎臓細胞のゲノムのメチル化について 2,000 箇所調べた。その結果、マウスの体細胞クローン胚と体外受精胚では、2,000 箇所中わずか 3 箇所しかメチル化パターンの差は認められなかった。このことから、体細胞クローンマウスのメチル化については、体外受精由来のマウスとほとんど同等と考えられる。また、体細胞クローンマウスと有性生殖マウスの間で認められたメチル化の差異は、生後 11 ヶ月では 1 箇所のみで認められ、生後 23～27 ヶ月までには消失した。このこ

とから、DNA メチル化のエラーは、加齢に伴い消失する可能性があると考えられた (参照 159)。

健全な体細胞クローン豚 (15 又は 27 週齢) で、体重と血液学的パラメータに対照豚との有意な相違はないが、中には、変動が大きいパラメータもあること、また皮膚 DNA の非転写領域 (PRE-1 SINE 及び動原体サテライト配列) のメチル化に局所的な相違が認められることが示されている (参照 107)。

(2) 遺伝子の発現解析

(着床前・胚盤胞まで)

牛の体細胞クローンの桑実胚及び胚盤胞における X 染色体連鎖遺伝子 (*G6PD*、*Xist*) の発現量が体内受精胚と異なることが報告されている (参照 160)。

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析により、体細胞クローン牛の胚盤胞の発現パターンは、ドナー細胞とは著しく異なり、受精により得られた胚盤胞の発現パターンによく似ていることが示された。このことから、リプログラミングがある程度なされているものと考えられた。従って、胚におけるそれ以降の分化を妨げる小さなリプログラミングのエラーがあるものと推定されている (参照 161)。

体細胞クローン、受精卵クローン、体外受精及び体内受精により作製した牛の胚盤胞において、IGF 受容体と IGF 結合タンパクの mRNA 発現を調べた結果、体細胞クローン胚で IGF-2 受容体及び IGFBP-3 の発現低下が示された (参照 162)。一方、牛の体細胞クローン胚で、IGF-2 受容体遺伝子の発現の有意差は認められないとする報告もある (参照 163)。

体細胞クローン牛の 8 細胞期胚で 11 個の遺伝子 (*Oct-4* 遺伝子を含む) の発現解析を行った。その結果、11 個の遺伝子の発現パターンは、体外受精と体細胞クローン由来の胚の間に大きな相違は認められなかった。体外受精由来及び体細胞クローン由来の胚での発現レベルは、体内受精由来胚と比べて、乳酸脱水素酵素を除く全ての遺伝子で高かった (参照 164)。

体細胞クローン牛の胚では、ドナー細胞の相違と時期 (桑実胚、胚盤胞等) に依存するヒストン脱アセチル化酵素、DNA メチル化酵素 (*Dnmt3*) 及び転写因子 (*Oct-4*) 発現量の変化が認められている (参照 165)

雌マウス体細胞クローンにおいては、正常胚と同様、卵割期 (8 細胞期まで) に 2 つの染色体はともに活性化されており、胚盤胞期以降、内細胞塊でランダムな X 染色体の不活性化が起きていることが示されている。しかし、栄養外胚葉 (trophectoderm) では、ドナー体細胞のアレル特異的な不活性化状態が維持されることが示されている (参照 166)。

体細胞クローンマウスの胚盤胞における *Oct-4* 遺伝子の発現レベルを mRNA と *Oct-4*-GFP 発現により調べた結果、体外受精由来の胚盤胞と比較し

て、*Oct-4* 遺伝子の異常な発現が認められた。このことから、*Oct-4* 遺伝子の異常発現が体細胞クローニングにおける不成功の原因となっている可能性が示唆された（参照 167）。

マウスの *Oct-4* 遺伝子と類似の発現パターンを呈する候補遺伝子（10 個）を同定し、着床前の体細胞クローン胚における発現を調べた。胚性幹細胞由来体細胞クローンの全ての胚で、11 個の遺伝子全ての発現が認められたが、卵丘細胞由来の体細胞クローン胚では、62%の胚が全ての遺伝子を発現するに留まった（参照 168）。

体細胞核移植及び体外受精によって作製したマウス胚において、*Hprt*、*Tsx*、*Bex1*、*Bax*、*Cpt2*、*Oct4* 遺伝子の転写は、作製法によらず、ほぼ同時に開始したが、分裂が進むにつれて遺伝子の発現レベルに相違が認められ、特に胚盤胞では、発現レベル比にクローン間で変動が認められた。このことから、着床前の段階ではリプログラミングが完全でないものと考えられた（参照 169）。

豚の体細胞クローン胚及び細胞質内精子注入（ICSI）胚の 2~4 細胞期及び胚盤胞について、*FGFr2IIIc*、*FGFr72IIIb*、*Xist*、*IL6*、*IL6r*、*c-kit* リガンド遺伝子の発現を比較した。体細胞クローン胚のドナー細胞は、2 種類の細胞系列に由来し、活性化の手順も 2 種類の方法を用いた。その結果、遺伝子の発現の程度は体細胞クローン胚と ICSI 胚で類似していたが、体細胞クローン胚盤胞で、*FGFr72IIIb* の低下及び *IL6r* の上昇が認められた。2~4 細胞期で、*FGFr72IIIb* と *Xist* では、活性化の手順により異なる発現を示した。また、体細胞クローンの 2 種類のドナー細胞間では、2~4 細胞期では遺伝子発現の有意差はみられなかった（参照 170）。

（胎盤及び胎子）

マウス胚性幹細胞をドナーとした体細胞クローンマウスの胎盤では、重量の増加が著しく、インプリント遺伝子（*H19*、*Igf2*、*Peg1/Mest*、*Meg1/Grb10*）のクローン間の発現量の変動も非常に大きい（参照 171）。

体細胞クローンマウスの妊娠末期の胎盤について、組織学的変化及び胎盤特異的な遺伝子及びインプリント遺伝子の発現が調べられた。その結果、体細胞クローンマウスの胎盤は、対照よりサイズが大きく、組織レベルでは胎盤を構成する全部の層、栄養膜巨大細胞層、海綿栄養芽層、迷路層で変化が認められ、特に海綿栄養芽層の肥厚が著しかった。胎盤の遺伝子発現では、重大な変化はみられなかった。牛や羊では、体細胞クローン胎子は大きくなる傾向があるが、マウスの体細胞クローン胎子の平均体重はコントロールよりも低かった。このことから、体細胞クローニングによる胎盤の異常が胎子の成長にマイナスの影響を与えたと考えられた（参照 151）。

体細胞クローンマウス（胚性幹細胞又は卵丘細胞由来）の胎盤について、マイクロアレイ解析により 10,000 個を超える遺伝子の発現を評価した。その結果、体細胞クローンマウスの胎盤で発現している遺伝子について、約 4%は対

照群と比較して発現レベルが異なっていた。卵丘細胞由来の体細胞クローンと胚性幹細胞由来の体細胞クローンでは、286 個の遺伝子の発現量が同じように変化した。このことから体細胞クローンマウスの胎盤における遺伝子の発現の異常には、体細胞クローンマウスの胎盤に共通して生ずるものがあると考えられた。また、胎盤の大きさと遺伝子発現の異常とは関連がなかった(参照 172)。

体細胞クローンマウスの妊娠末期の胎盤は、ドナー細胞の種類によらず、対照のマウスの胎盤と比べて 2~3 倍大きかった。また、インプリント遺伝子を含む複数の遺伝子の発現の異常な低下が認められた。このことから胎盤細胞の遺伝子発現は、ゲノムインプリンティング機構とは独立に調節されていると結論づけられた(参照 173)。

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析により、体細胞クローン牛の胎子と正常胎子の肝臓における発現パターンには、対象遺伝子の約 5%で相違がみられたが、個体差が大きいとされている(参照 174)。

(出生後)

X染色体上の 10 種の遺伝子の発現を体細胞クローン牛で調べたところ、生後直後に死亡した体細胞クローン牛では、複数の器官で 9 種の遺伝子の発現異常が認められている(参照 9)。

同じドナー細胞に由来する体細胞クローン牛の生後直死した新生子と健全な成牛について、3つの遺伝子(*Igf2*, *Igf2r*, *H19*)の発現レベルを検討した結果、生後直死した新生子の遺伝子発現には異常が認められ、クローン間の変動が大きかった(参照 175)。

生後直死した体細胞クローン牛と対照牛の 6 つの器官(心臓、肝臓、腎臓、脾臓、肺及び脳)について、発生学的に重要な 8 つの遺伝子(*PCAF*, *Xist*, *FGFR2*, *PDGFRa*, *FGF10*, *BMP4*, *Hsp70.1*, *VEGF*)の発現レベルを比較した。死亡した体細胞クローン牛では、遺伝子に応じて、組織特異的な異常発現が認められた。そのような異常は、心臓に最も多く(遺伝子 8 個中 5 個)、腎臓には最も少なかった(遺伝子 8 個中 2 個)(参照 176)。

雌の体細胞クローンマウスで、X染色体不活性化に偏りが見いだされることがあったとされている(参照 177)。

マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析により、外見上正常なクローンマウス新生子の脳、肝臓、腎臓において、受精由来の産子には見られない顕著な遺伝子発現の変化が認められ、複数の遺伝子の発現異常が連動しておきる染色体領域があることが示された(参照 178)。

(3) エピジェネティックな変化に影響を及ぼす因子

エピジェネティックな状況は、培養条件の相違やドナー細胞の種類の影響を受けることが報告されている。体細胞クローン技術によるクローン動物産出の成功率を上げるため、多くの検討がなされているが(IV、(1)、①も参照)、重

要な点として、ドナー細胞のタイプや性質（参照 165、179）、細胞周期（参照 163）、培養条件（参照 163、180）、染色体安定性（参照 181、182）、レシピエントである卵母細胞の採取月齢（参照 183）や採取時期（参照 184）、細胞周期（参照 185）、細胞融合時の活性化のタイミング（参照 163）、クローン胚の培養条件（参照 163）等が挙げられている。

（4）後代

哺乳類の胎子のエピジェネティックな変化の一部が、後代に伝達しうることが報告されている（参照 186、187）。しかし、体細胞クローンマウスで認められた異常な表現型（胎盤過成長、胎子の過体重、出生子の眼瞼の開口（open eyelids）、加齢に伴う肥満等）はその子孫（F1）には伝達されない（参照 75、188、189）。また、同一の体細胞クローン雄牛から生まれた後代牛（雌 11 頭、雄 19 頭）では、父牛の出生時や出生後に見られた異常が全ての後代牛で認められなかった（参照 114）。これらのことから体細胞クローンで示された異常は、次世代以降は、配偶子形成のリプログラミングにより、除去されうると考えられる（参照 189、190）。従って、体細胞クローン動物の後代は、従来の繁殖技術による動物と同様な健全性を有すると考えられている（参照 191）。

4. その他

（1）DNA 変異及び染色体異常

体細胞クローン技術は、除核した成熟卵に体細胞又は体細胞の核を移植し、電氣的刺激により融合させるものであり、遺伝子を組換えたものではない。

一方、自然発生的に生じる DNA の突然変異が、体細胞クローン動物においても核移植後に生じる可能性があるが、これは従来の繁殖技術においても生じる可能性がある。

マイクロサテライト多型マーカーを用いたドナー牛、ドナー培養細胞、体細胞クローン牛の遺伝子型の調査によると、遺伝子型は全て一致しており（参照 45、84、192、193、194、195）、体細胞クローン牛から産出された再クローン牛についても完全に一致していた（参照 192）。

牛の体細胞クローンの着床前の胚盤胞では、核型異常（2 倍体以外のもの）が高率に認められる（参照 196）。体細胞クローン牛の末梢リンパ球を用いた検査でも、20 頭のうち 2 頭に、2 倍体以外の染色体数を示す細胞が約 20%認められた（対照では、5%前後）（参照 197）。

一方、同一の体細胞クローン牛から得た 30 頭の後代牛の末梢リンパ球の核型分布を調べたが、対照牛との相違は認められなかった（参照 114）。

マウスの体細胞クローン胚（卵丘細胞由来）では、90%以上が正常な染色体構成を呈したことが言及されている（参照 198）。

マウスの体細胞クローン胚及び体外受精胚（細胞質内精子注入）の 8 細胞期

までの染色体分離を調べると、体細胞クローン胚の中に異常が見いだされるものがあつたが、胚盤胞では体細胞クローン胚の方が染色体数の異常が少なかった。このことから、体細胞クローン胚における欠陥は主にエピジェネティックな原因に起因すると推定された。しかし、稀に遺伝しうる染色体異常が体細胞クローンマウスで見いだされることもある（参照 199）。

（2）ミトコンドリア DNA

体細胞クローン動物産出の成功率が低い原因として、不完全又は不適切なりプログラミングに加え、移植後の体細胞由来ミトコンドリア DNA (mtDNA) の伝達パターンの変化が挙げられている。精子はほとんどミトコンドリアを持ち込まないため、通常の受精卵のミトコンドリアは卵子由来の単一のタイプとなる（ホモプラスミー）が、体細胞クローン胚では、ドナー細胞とレシピエント卵子に由来する mtDNA が混在しうる（ヘテロプラスミー）。体細胞核移植に由来する胚、胎子及び産子の異常の一部が、このミトコンドリアのヘテロプラスミーに起因する可能性も指摘されている（参照 200、201、202）。

核移植に関与する因子（胚の培養条件、ドナー細胞のタイプ、卵母細胞レシピエントの質等）がヘテロプラスミーのレベルに影響を及ぼす可能性があるが、体細胞クローン動物（牛、豚、羊）は、ほとんどホモプラスミー（ドナー細胞由来の mtDNA が消失）であるか、軽度のヘテロプラスミー（ドナー細胞由来の mtDNA が混在）である。また、ヘテロプラスミーの程度は組織に依存する（参照 203）。

体細胞クローン動物にヘテロプラスミーが認められた場合でも、体細胞クローン動物の健康や摂食リスクへの影響の程度を決めることは困難である。体細胞クローン動物のヘテロプラスミーの程度によらず、表現型としては正常な場合もある。現在のところ、核移植に起因するヘテロプラスミーが、個体発生に有害であることを示す明確な証拠はない（参照 204）。

（3）テロメア長

テロメアは、染色体の末端部に位置し、グアニン塩基に富む短い反復配列の繰り返しよりなる 5-20 kb にも及ぶ DNA であり、染色体の安定性に貢献している。テロメアは、末端に一本鎖 DNA 部分を有するため、DNA 複製時に、細胞分裂当たり 50~200 塩基ほど短くなる。そのため、テロメアは「分裂時計 (mitotic clock)」とも呼ばれる。また、DNA 複製や染色体の分離等に関与すると云われている。

体細胞クローン羊（ドリー）では、同年齢の羊に比べて、テロメア長が有意に短く、体細胞クローン羊（ドリー）のテロメアの長さは、ドナー細胞を提供した動物の年齢と核移植の前に細胞を培養した期間を合わせた年齢のテロメア長となっていたと報告された（参照 205）。また、他の報告においても、体細胞クローン羊は同年齢の羊と比べてテロメア長が短いと報告されている（参照

206)。

しかし、牛、豚、山羊の体細胞クローンのテロメア長は、老化した細胞をドナー細胞に使用した場合でも、同年齢の対照動物と比較して、同等又は長かったとされる（参照 206、207、208、209、210、211、212）。

また、同一の体細胞クローン牛（ドナーは線維芽細胞）から生まれた 30 頭の後代のテロメア長は、同年代の牛と同じ長さであった（参照 114）。

体細胞クローン動物のテロメア長は、動物種、用いた体細胞の種類、培養条件により大きな相違が認められるが、体細胞クローン動物の寿命との関係は明らかにされてはいない（参照 205、210、213、214）。

一方、テロメラーゼは、生殖細胞や胚細胞、不死化した培養細胞等に存在し、テロメアを伸長させ、複数回の細胞分裂を経たテロメアの長さを維持する能力がある。テロメアを再建、伸長させる酵素であるテロメラーゼは、胚の形成期に活性化している。テロメラーゼの活性は出生後ほとんどの体細胞で抑制されているが、生殖細胞、腫瘍細胞及び幹細胞においては活性が維持されている（参照 212、215、216）。

牛胎子線維芽細胞のテロメラーゼ活性は、成体由来線維芽細胞よりもはるかに高いが、ES 様細胞と比較すると著しく低い。牛胎子線維芽細胞のテロメラーゼ活性は、継代や血清除去により低下した。核移植により得られた体細胞クローン牛の胚ではテロメラーゼ活性が対照胚と同様に上昇する。得られた体細胞クローン動物のテロメア長は同年齢の対照牛より長いかほぼ同程度であった。（参照 206）。

牛とマウスでは、桑実胚から胚盤胞への時期に、テロメラーゼ依存性のテロメア伸長が認められている（参照 217）。

体細胞クローン羊の胎子から得た初代培養線維芽細胞は、ドナー細胞に用いた胎子の初代培養線維芽細胞と同じ増殖能力、同じテロメアの短縮率を示した（参照 218）。この現象から、細胞分裂能の老化は遺伝的に決められたもので、テロメア長に依存するものではないと推測されている（参照 124）。

5. 体細胞クローン動物のエピジェネティクス等のまとめ

同一の遺伝子構成をもつ細胞は、エピジェネティックな変化に基づき、必要とされる遺伝子及び不必要な遺伝子の適切な発現調節を行い、種々の機能や性質を有する体細胞へと分化することができる。

1. ～4. で述べたように、体細胞クローン動物の産出に至る種々の過程に関するエピジェネティクス研究によって、通常受精を介した動物の産出との間に、エピジェネティックな変化や遺伝子発現プロファイルの違いがあることが数多く報告されている。

通常、分化の進んだ体細胞は、既定外の細胞に分化しないように制御されている。体細胞を利用する体細胞クローン動物の産出においては、再構築された胚に

においてリプログラミングがうまく進むことが、その後の体細胞クローン胚の発生と胎子の正常な発育に重要であると考えられている。しかし、多くの場合、体細胞クローン動物においてはエピジェネティック制御が完全に受精卵型に行われないう場合が多く（即ち、体細胞側の正常なエピジェネティクス制御が持ち越されるため）、発生がうまくいかず、正常な出産に至らないことが多い。即ち、体細胞クローン動物産出の成功率が低いことの原因の一つとして、ドナー細胞の核のリプログラミングが、受精卵における精子由来の核のリプログラミングの場合のようになく進まないことが挙げられている。

しかし、健全に発育した体細胞クローン動物ではエピジェネティックな変化の違いは少ない。また、そのような体細胞クローン動物に、エピジェネティックな変化の違いが一部残っている場合があるが、その相違は個体間で異なり、殆どの表現型は正常である。この場合、エピジェネティックな変化の違いが残っているにせよ、遺伝子発現に影響を与えないゲノム領域であるか、あるいは遺伝子が生存や形質に影響を与えないゲノム領域であると考えられる。

このように、エピジェネティックな変化の制御が適正に行われないうことが、体細胞クローン動物における発生と分化が適正に行われないうことの主な原因と考えられる。

エピジェネティックな変化の制御の異常は体細胞クローン動物に限ったことではなく、自然交配や人工受精も含めて、全ての生殖過程で認められるものであるが、特に *in vitro* での操作が多い生殖補助技術における人工的な生殖では、その頻度も高い。

体細胞クローン動物はドナー動物と核内の DNA の塩基配列が同一である。体細胞クローン動物においても、DNA の突然変異の可能性が考えられるが、体細胞クローン動物の産出過程では、組換え DNA 技術は使われていないことから、自然発生的に生じる DNA の突然変異は、従来の繁殖技術において生じるものと同様であると考えられる。いくつかの報告においても、DNA の突然変異及び染色体異常については、検出されていないか、受精を介した従来の繁殖の場合と差はなかったとされている。

体細胞クローン動物では、理論上、核ドナーと卵細胞質のミトコンドリア DNA が混在する（ヘテロプラスミー）。現在のところ、核移植に起因するヘテロプラスミーが、個体発生に有害であることを示す明確な証拠はない。

テロメア長については、多くの研究の結果、テロメアの長さは、個体により様々であり、細胞によってはテロメアの長さが回復することが示されている。従って、体細胞クローン技術の開発当初に懸念された「体細胞クローン動物のテロメア長が特に短い」ということはないと考えられる。

体細胞クローン動物の後代では、両親（クローン動物）に残存しうるすべてのエピジェネティックな変化の違いは、受精を介した従来の繁殖の場合と同様に、

細胞の核が生殖細胞系列を経る時にリプログラミングされると考えられる。そのため、体細胞クローン動物の後代におけるエピジェネティックな制御は、受精を介した従来の繁殖技術によって得られる産子と同様であると考えられる。

VI. 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品の安全性について

一般に、ほ乳類家畜に由来する食品においては、その構成成分の一つであるタンパク質の一部がヒトにアレルギーを誘発することはあっても、食品として摂取した場合に、その構成成分がヒトに毒性や病原性を有することは知られていない。

体細胞クローン牛及び豚は、遺伝子を組換えたものではないことから、従来の繁殖技術による牛及び豚と比較して、新規の生体物質が産生されるものではない。

また、体細胞クローン技術を用いて産出された動物とドナー動物の核内の DNA の塩基配列は理論的に同一であり、従って、健全に成長した体細胞クローン牛及び豚において産生しうるタンパク質の種類は、ドナー動物と同一と考えられる。

従って、健全な体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品について、従来の食品との安全上の差異はないものと想定される。

現在得られているデータを用いて、体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する肉及び乳について、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する肉及び乳と比較し、栄養成分、小核試験、ラット及びマウスにおける亜急性・慢性毒性試験、アレルギー誘発性等についての相違を確認した。

1. 肉及び乳の成分比較

牛の乳と肉の成分は、飼料や環境により影響を受け、食品成分の変動をもたらすとされている（参照 108、219）。

(1) 牛肉

1 頭の黒毛和種の体細胞クローン牛（28 ヶ月齢）の肉（9 部位：かた、かたロース、リブロース、サーロイン、ばら、もも、そともも、ランプ及びヒレ）について、一般成分（水分、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分、カルシウム、コレステロール）、アミノ酸（18 種類）、脂肪酸（17 種類）を分析したところ、従来の繁殖技術による牛の肉と実質的な差異は認められなかった（参照 220）。

2 頭の黒毛和種の体細胞クローン牛（26 ヶ月齢）について、筋肉（棘下筋、胸最長筋、広背筋、内転筋、大腿二頭筋、半腱様筋）の水分、タンパク質、脂質、アミノ酸（18 種類）、脂肪組織（皮下、筋間、体腔、腎臓）の脂肪酸（8 種類）の分析、臓器（肝臓、腎臓、脾臓等）の病理学的検査を実施したところ、従来の繁殖技術による牛と半腱用筋の水分、タンパク質、脂肪酸（オレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、リノール酸、リノレン酸）、胸最長筋及び腎臓脂肪のリノレン酸に有意差が認められたが、脂肪酸の違いは、ドナー牛（高い脂肪交雑）に由来すると考えられ、他の変数は全て、一般に認められる値の範囲内であった。また、病理学的検査にも異常は認められなかった（参照 221）。

11 頭（雌 6 頭、雄 5 頭（アンガス種、ブランガス種、ホルスタイン種、交雑種））の体細胞クローン牛（12～43 ヶ月齢）の肉について、水分、脂質、タンパク質、炭水化物、コレステロール、アミノ酸（19 種類）、脂肪酸（7 種類）、ビタミン（6 種類）、ミネラル（4 種類）を分析したところ、従来の繁殖技術による牛の肉と差異は認められなかった（参照 222）。

9頭の体細胞クローン雌牛（8、12、18、24ヶ月齢）の半腱様筋について報告がある。具体的な数字は示されていないが、非クローン牛と比較して、8、12ヶ月齢の体細胞クローン牛で、ミオシン重鎖Ⅰとミオシン重鎖Ⅱaの割合が増え、ミオシン重鎖Ⅱbの割合が減ったとされている。8ヶ月齢では、多価不飽和脂肪酸が増え、一価不飽和脂肪酸の割合が低下していた。また、24ヶ月齢で、トランスバクセン酸（C18:1-t11）及びシスバクセン酸（C18:1-c11）の割合が低く、18、24ヶ月齢でC16脂肪酸に対する $\Delta 9$ 不飽和化酵素活性が高かったとされている（参照64）。

3頭の黒毛和種の体細胞クローン牛の後代（28ヶ月齢）の肉（3部位：かた、サーロイン、もも）について、一般成分（水分、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分、コレステロール）、アミノ酸（18種類）、脂肪酸（17種類）を分析したところ、従来の繁殖技術による牛の肉と差異は認められなかった（参照223）。

（2）豚肉

4頭のハムライン種の体細胞クローン豚（6～8ヶ月齢）の肉について、枝肉格付、色、固さ、脂肪交雑等の質的形質は従来の繁殖技術による豚の肉と同等であった。また、5頭（ハムライン種4頭、デュロック種1頭）の体細胞クローン豚（6～8ヶ月齢）の肉について、コレステロール、アミノ酸（17種類）、脂肪酸（32種類）、ビタミン（3種類）、ミネラル（4種類）を分析したところ、従来の繁殖技術による豚の肉との差異は非常に小さく、USDAの標準値と同程度であった（参照47、111）。

242頭の体細胞クローン豚の後代の肉（背最長筋）について、コレステロール、アミノ酸（17種類）、脂肪酸（33種類）、ビタミン（3種類）、ミネラル（4種類）の58項目を分析したところ、従来の繁殖技術による豚の肉と違いが認められたのはエイコサジエン酸（C20:2）（対照豚0.01～0.03%に対し、0.04%）のみであり、その他は全てUSDAの標準値と同程度であった（参照117）。

44頭（雄23頭、雌21頭）の体細胞クローンの金華豚の後代の肉について、pH、水分、脂質等を分析したところ、従来の繁殖技術による豚と類似していた（参照116）。

11頭（雄5頭、雌6頭）の体細胞クローンの金華豚の後代の胸最長筋、大腿二頭筋、肝臓、心臓について、水分、タンパク質、脂質及び灰分、胸最長筋及び大腿二頭筋についてアミノ酸（18種類）及び核酸（6種類）、脂肪組織の脂肪酸（6種類）を分析したところ、一部の項目の平均値では従来の繁殖技術による豚と差異が認められたが、その値は対照豚の振れ幅の範囲内であった（参照118）。

（3）牛乳

15頭（ホルスタイン種、交雑種）の体細胞クローン牛の乳について、脂質、

タンパク質、乳糖、pH、窒素、固形分、体細胞数、酸度、脂肪酸（14種類）、ミネラル（8種類）、タンパク質組成（6種類）を分析したところ、従来の繁殖技術による牛の乳と2種類の脂肪酸（パルミチン酸（C16:0）及びリノレン酸（C18:3））、カリウム、亜鉛、ストロンチウム及びリンにおいて小さな差異が認められたが、飼料成分の違いによるものとしている。その他の項目に有意差は認められていない（参照 224）。

6頭のホルスタイン種の体細胞クローン牛の乳について、脂質、タンパク質、乳糖、固形分、脂肪酸（14種類）、ミネラル（4種類）、タンパク質組成（7種類）をドナー牛の乳と比較した結果、血清アルブミン、2種類の脂肪酸（リノール酸（C18:2）及びリノレン酸（C18:3））に差異が認められたが、一般にホルスタイン種に認められる範囲内であった（参照 60）。

9頭の体細胞クローン牛の乳について、アミノ酸（18種類）、ビタミン（3種類）、ミネラル（8種類）を従来の繁殖技術による牛の乳と比較した結果、差異は認められなかった（参照 77）。

10頭のホルスタイン種の体細胞クローン牛の乳について、脂質、タンパク質、乳糖、固形分、尿素窒素、体細胞数、タンパク質組成（7種類）を分析したところ、従来の繁殖技術による牛の乳と差異は認められなかった（参照 221）。

6頭のホルスタイン種、4頭のジャージー種の体細胞クローン牛の乳について、脂質、タンパク質、無脂乳固形分を分析したところ、ドナー牛と環境や飼料に由来するとみられる差はあるものの、従来の繁殖技術による牛に認められる範囲内であった（参照 68）。

5頭のホルスタイン種の体細胞クローン牛の乳について、脂質、脂肪酸（6種類）分析したところ、従来の繁殖技術による牛の乳に比べて、ステアリン酸（C18:0）（対照乳 10.5%に対し、7.3%）、トランスバクセン酸（C18:1-t11）（1.30%に対し、0.94%）、リノレン酸（C18:3）（0.34%に対し、0.21%）の値は低かった（参照 64）。

6頭のホルスタイン種、3頭のジャージー種の体細胞クローン牛の乳について、脂質、タンパク質、乳糖、カゼイン、pH、アミノ酸（18種類）、脂肪酸（23種類）、ビタミン（3種類）、ミネラル（7種類）を分析したところ、従来の繁殖技術による牛の乳と差異は認められなかった（参照 65）。

3頭のホルスタイン種の体細胞クローン牛の乳について、一般成分（水分、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分、カルシウム、コレステロール）、アミノ酸（18種類）、脂肪酸（21種類）を分析したところ、従来の繁殖技術による牛の乳と実質的な差異は認められなかった（参照 220）。

体細胞クローン牛の乳についての脂質、タンパク質、乳糖、カゼイン、pH、脂肪酸、ミネラル、タンパク質組成（8種類）を分析したところ、従来の繁殖技術による牛の乳の値の範囲の中にあることが示されている（参照 225、226、227）。

3頭のホルスタイン種の体細胞クローン牛の後代の乳について、一般成分（水

分、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分、カルシウム、コレステロール)、アミノ酸 (18 種類)、脂肪酸 (21 種類) を分析したところ、従来の繁殖技術による牛の乳と差異は認められなかった (参照 223)。

2. 小核試験

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の肉 (28 ヶ月齢) (0、1、2.5、5%) 及び乳 (0、2.5、5、10%) を混餌投与した ICR マウス (8 週齢) の骨髓細胞を用いた小核試験において、結果は陰性であった (参照 220)。

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の後代の肉 (28 ヶ月齢) (0、1、5%) 及び乳 (0、2、10%) を混餌投与した ICR マウス (8 週齢) の骨髓細胞を用いた小核試験において、結果は陰性であった (参照 223)。

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン豚 (金華豚) の後代の肉 (0、250、500、1,000、2,000mg/kg 体重) を強制経口投与した ddY マウス (8 週齢) の骨髓細胞を用いた小核試験において、結果は陰性であった (参照 118)。

3. ラット及びマウスにおける亜急性・慢性毒性試験

(1) 牛肉及び豚肉

SD ラット (5 週齢、一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛 (28 ヶ月齢) の肉 : 0、1、2.5、5%) 投与による 14 週間反復混餌投与試験が実施された。一般状態、体重、摂餌量、機能観察総合検査、感覚反射機能検査、着地開脚幅、握力、性周期、尿検査、血液検査、器官重量、病理学的検査の結果、投与による異常は認められなかった (参照 66、220)。

Wistar ラット (一群 8 匹 : 雌雄不明) を用いた体細胞クローン牛の肉が基礎となる飼料の投与による 21 日間反復投与試験が実施された。摂餌量、体重増加、器官重量、空腹時血糖値、IgG、IgA、IgM、IgE において、投与による異常は認められなかった (参照 228)。

SD ラット (5 週齢、一群雌雄各 12 匹) を用いた混餌 (凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の後代 (28 ヶ月齢) の肉 : 1、5%) 投与による 12 ヶ月間反復投与・生殖併合試験が実施された。一般状態、体重、摂餌量、機能観察総合検査、感覚反射機能検査、着地開脚幅、握力測定、眼科検査、尿検査、血液検査、器官重量、病理学的検査、また、生殖試験として、親動物の繁殖能及び子動物の発生に及ぼす影響を観察した結果、投与による異常は認められなかった (参照 223、229)。

ddY マウス (5 週齢、一群雌雄各 6 匹) を用いた混餌 (凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン豚 (金華豚) の後代の肉 : 0、1、2.5、5%) 投与による 28 日間反復混餌投与試験が実施された。一般状態、体重、器官重量、病理学的検

査において、投与による異常は認められなかった（参照 118）。

（2）牛乳

SD ラット（5 週齢、一群雌雄各 10 匹）を用いた混餌（凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の乳：0、2.5、5、10%）投与による 14 週間反復混餌投与試験が実施された。一般状態、体重、摂餌量、機能観察総合検査、感覚反射機能検査、着地開脚幅、握力、性周期、尿検査、血液検査、器官重量、病理学的検査の結果、投与による異常は認められなかった（参照 66、220）。

Wistar ラット（一群 8 匹：雌雄不明）を用いた体細胞クローン牛の乳が基礎となる飼料の投与による 21 日間反復投与試験が実施された。摂餌量、体重増加、器官重量、空腹時血糖値、IgG、IgA、IgM、IgE において、投与による異常は認められなかった（参照 228）。

SD ラット（5 週齢、一群雌雄各 12 匹）を用いた混餌（凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の後代の乳：2、10%）投与による 12 ヶ月間反復投与・生殖併合試験が実施された。一般状態、体重、摂餌量、機能観察総合検査、感覚反射機能検査、着地開脚幅、握力測定、眼科検査、尿検査、血液検査、器官重量、病理学的検査、また、生殖試験として、親動物の繁殖能及び子動物の発生に及ぼす影響を観察した結果、投与による異常は認められなかった（参照 223、229）。

4. アレルギー誘発性

（1）21 日間反復投与試験

Wistar ラット（一群 8 匹：雌雄不明）を用いた体細胞クローン牛の肉が基礎となる飼料の投与による 21 日間反復投与試験が実施された（再掲）。摂餌量、体重増加、器官重量等の他、血中 IgG、IgA、IgM、IgE 量の測定を行ったが、投与による異常な抗体量の増加は認められなかった（参照 228）。

Wistar ラット（一群 8 匹：雌雄不明）を用いた体細胞クローン牛の乳が基礎となる飼料の投与による 21 日間反復投与試験が実施された（再掲）。摂餌量、体重増加、器官重量等の他、血中 IgG、IgA、IgM、IgE 量の測定を行ったが、投与による異常な抗体量の増加は認められなかった（参照 228）。

（2）マウスの腹腔内投与試験

①牛肉及び豚肉

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛（28 ヶ月齢）の肉の生理食塩水抽出液を用いて、ddY 系雄性マウス（5 週齢）に腹腔内注射による感作を行ってから 14 日目に、エバンスブルー溶液を静注後、腹壁に惹起用肉抽出液を投与し、注射部位における色素漏出斑の直径を測定したところ、従来の繁殖技術による牛肉と比較して有意な差は認められなかった（参照 220）。

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の後代（28ヶ月齢）の肉の生理食塩水抽出液を用いて、ddY系雄性マウス（5週齢）腹腔内注射による感作を行ってから14日目に、エバンスブルー溶液を静注後、腹壁に惹起用肉抽出液を投与し、注射部位における色素漏出斑の直径を測定したところ、従来の繁殖技術による牛肉と比較して有意な差は認められなかった（参照223）。

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン豚（金華豚）の後代の肉の生理食塩水抽出液を用いて、ddY系雄性マウス（5週齢）腹腔内注射による感作を行ってから14日目に、エバンスブルー溶液を静注後、腹壁に惹起用肉抽出液を投与し、注射部位における色素漏出斑の直径を測定したところ、従来の繁殖技術による同種の豚の肉と比較して有意な差は認められなかった（参照118）。

②牛乳

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の乳（3頭分）の抽出物を用いて、ddY系雄性マウス（5週齢）腹腔内注射による感作を行ってから14日目に、エバンスブルー溶液を静注後、腹壁に惹起用乳抽出液を投与し、注射部位における色素漏出斑の直径を測定したところ、従来の繁殖技術による牛の乳と比較して有意な差は認められなかった（参照220）。

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の後代の乳（3頭分）の抽出物を用いて、ddY系雄性マウス（5週齢）腹腔内注射による感作を行ってから14日目に、エバンスブルー溶液を静注後、腹壁に惹起用乳抽出液を投与し、注射部位における色素漏出斑の直径を測定したところ、従来の繁殖技術による牛の乳と比較して有意な差は認められなかった（参照223）。

なお、上記で用いたKataokaらの方法（参照230）は、経口感作によるIgE介在性アレルギー誘発性を評価するものではなく、異種タンパク質としての抗原性の強さが評価される。

体細胞クローン牛及び豚は、ドナー動物と核内のDNAの塩基配列が理論的に同一であり、新たなアレルゲンとなるタンパク質が産生されることはないと考えられる。また、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品と比較して、アレルギー誘発性に有意な差があることを示す知見は報告されていない。

5. タンパク質の消化性

(1) 牛肉

体細胞クローン牛（生後4日）の肉を用いて、*in vitro*での人工胃液（0、0.75、1.5、6、12時間）及び人工腸液（0、1.5、3、6時間）による消化試験が実施

された。体細胞クローン牛の肉の消化率は、従来の繁殖技術による牛の肉の消化率と比較して、人工胃液を用いた場合、45分でやや低く、人口腸液では90分でやや高かった。その他の時間において差は認められなかった（参照 220）。

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛（28ヶ月齢）の肉を添加した飼料（タンパク質含量を13.09%に調製）を、26週齢SDラット雄に混餌投与し、3日間の糞中の全窒素量を測定し消化率を比較したところ、従来の繁殖技術による牛の肉と比較して有意な差は認められなかった（参照 220）。

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の後代（28ヶ月齢）の肉を添加した飼料（タンパク質含量を13.09%に調製）を、39週齢SDラット雄に混餌投与し、3日間の糞中の全窒素量を測定し消化率を比較したところ、従来の繁殖技術による牛の肉と比較して有意な差は認められなかった（参照 223）。

（2）牛乳

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の乳を添加した飼料（タンパク質含量を13.09%に調製）を、26週齢SDラット雄に混餌投与し、3日間の糞中の全窒素量を測定し消化率を比較したところ、従来の繁殖技術による牛の乳と比較して有意な差は認められなかった（参照 220）。

凍結乾燥し、粉末にした体細胞クローン牛の後代の乳を添加した飼料（タンパク質含量を13.09%に調製）を、39週齢SDラット雄に混餌投与し、3日間の糞中の全窒素量を測定し消化率を比較したところ、従来の繁殖技術による牛の乳と比較して有意な差は認められなかった（参照 223）。

6. 体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品のまとめ

一般に、ほ乳類家畜に由来する食品においては、その構成成分の一つであるタンパク質の一部がヒトにアレルギーを誘発することはあっても、食品として摂取した場合に、その構成成分がヒトに毒性や病原性を有することは知られていない。

体細胞クローン牛及び豚は、遺伝子を組換えたものではないことから、従来の繁殖技術による牛及び豚に存在しない新規の生体物質が産生されるものではない。

また、体細胞クローン技術を用いて産出された動物とドナー動物の核内のDNAの塩基配列は理論的に同一であり、従って、健全に成長した体細胞クローン牛及び豚において産生しうるタンパク質の種類は、ドナー動物と同一と考えられる。

現在得られている体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する肉及び乳のデータを用いて、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する肉及び乳と比較し、栄養成分、小核試験、ラット及びマウスにおける亜急性・慢性毒性試験、アレルギー誘発性等についての相違を確認したところ、安全上、問題となる差異は認められなかった。

また、肉及び乳以外の食品の詳細なデータは得られていないが、前述のとおり、

体細胞クローン牛及び豚において、新規の生体物質が産生されるものではなく、ほ乳類家畜に由来する食品を摂取した場合に、その構成成分がヒトに毒性や病原性を有することは知られていないこと、乳及び肉において、安全上、問題となる差異は認められなかったことから、健全な体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する肉及び乳以外の食品についても、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品と比較して、安全上の差異はないものと考えられる。

VII. 食品健康影響評価結果

厚生労働省から提出のあった資料及び既発表の学術論文を用いて、体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品の安全性について食品健康影響評価を実施した。

食品健康影響評価に当たっては、従来の繁殖技術（人工授精等）による牛及び豚に由来する食品と比較して、同等の安全性を有するかを評価することを基本的な考え方とし、現時点における科学的知見に基づき検討した。

体細胞クローン牛及び豚の出生前後において、従来の繁殖技術による牛及び豚と比較して、高い頻度で死産及び生後直死が認められる。また、体細胞クローン牛では、若齢期においても死亡率が高い傾向が認められているが、概ね6ヶ月齢を超えると従来の繁殖技術による牛と同様に健全に発育する。なお、これらの結果は、体細胞を利用して作製された再構築胚の全能性の完成度などによるものと考えられ、死亡原因そのものは従来の繁殖技術でも認められているものである。また、出生後及び若齢期に生理学的パラメータ値が従来の繁殖技術による牛及び豚と差異が認められることがあるものの、それらは成長とともに回復し、健全となる。

また、体細胞クローン牛及び豚の後代は、人工授精等の従来の繁殖技術を用いて、受精を介して産出される。一代目の子孫であるF1において、体細胞クローン牛及び豚の周産期や若齢期に認められた異常は認められておらず、F1の健全性は、従来の繁殖技術による牛及び豚と差異は認められない。従って、受精を介して産出される二代目以降についても、従来の繁殖技術による牛及び豚との差異は想定されない。

これらのことから体細胞クローン技術を用いて産出され、食用に供される可能性のある牛及び豚並びにそれらの後代については、従来の繁殖技術による牛及び豚と比べて差異のない健全性を有すると認められた。

近年のエピジェネティクスを含めた発生学研究の進展に伴い、同じ遺伝子構成を持つ細胞が、必要とされる遺伝子の適切な発現調節を行うことにより、異なる役割や性質をもつ体細胞へと分化しうるということが明らかとなっている。

体細胞クローン動物の産出に至る種々の過程に関する研究によって、通常受精を介して産出された動物との間に、エピジェネティックな変化や遺伝子発現プロファイルの違いがあることが数多く報告されており、エピジェネティックな変化が適正に行われないことが、体細胞クローン動物における発生と分化が適正に行われないことの主な原因と考えられる。

一方、体細胞クローン動物の後代では、受精を介した従来の繁殖の場合と同様に、細胞の核が生殖細胞系列を経る時にリプログラミングされると考えられるため、エピジェネティックな変化の制御は、受精を介した従来の繁殖技術によって得られる産子と同様であると考えられる。

体細胞クローン牛及び豚では、ドナー動物と核内のDNAの塩基配列が理論的に同一であるため、ドナー動物及び従来の繁殖技術による牛及び豚に存在しない新規の生

体物質が産生されるものではない。一般に、ほ乳類家畜に由来する食品においては、その構成成分の一つであるタンパク質が一部のヒトにアレルギーを誘発することはあっても、食品として摂取した場合に、その構成成分がヒトに毒性や病原性を有することは知られていない。

体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する肉及び乳について、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する肉及び乳と比較し、栄養成分、小核試験、ラット及びマウスにおける亜急性・慢性毒性試験、アレルギー誘発性等について安全上、問題となる差異は認められなかった。

また、肉及び乳以外の食品についての詳細なデータは得られていないが、前述のとおり、体細胞クローン牛及び豚において、新規の生体物質が産生されるものではないこと、肉及び乳において安全上、問題となる差異は認められなかったこと等から、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品と比較して、安全上の差異はないものと考えられた。

従って、現時点における科学的知見に基づいて評価を行った結果、体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品は、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品と比較して、同等の安全性を有すると考えられる。

なお、体細胞クローン技術は新しい技術であることから、リスク管理機関においては、体細胞クローン牛及び豚に由来する食品の安全性に関する知見について、引き続き収集することが必要である。

<参照>

- 1 (社) 家畜改良事業団, ニュースレター 2008; 32
- 2 Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998; 282: 2095-2098
- 3 Scientific Opinion of the Scientific Committee. Food Safety, Animal Health and Welfare and Environmental Impact of Animals¹ derived from Cloning by Somatic Cell Nucleus Transfer (SCNT) and their Offspring and Products Obtained from those Animals, *The EFSA Journal* 2008; 767: 1-49
- 4 Panarace M, Agüero JI, Garrote M, Jauregui G, Segovia A, Cane L, Gutierrez J, Marfil M, Rigali F, Pugliese M, Young S, Lagioia J, Garnil C, Forte Pontes JE, Ereno Junio JC, Mower S, Medina M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology* 2007; 67: 142-151
- 5 Walker SC, Shin T, Zaunbrecher GM, Romano JE, Johnson GA, Bazer FW, Piedrahita JA. A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using in vitro-matured oocytes. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 105-112
- 6 (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 体細胞クローン牛・後代牛の健全性ならびに生産物性状に関する国内調査報告書 2008
- 7 Codex Alimentarius, Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Animals, 2008; CAC/GL 68
- 8 (社) 日本家畜人工授精師協会 家畜人工授精講習会テキスト (家畜人工授精編) 1980
- 9 Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, Dinnyes A, Dai Y, Levine H, Pereira LV, Yang X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet* 2002; 31: 216-220
- 10 Gong G, Dai Y, Zhu H, Wang H, Wang L, Li R, Wan R, Liu Y, Li N. Generation of cloned calves from different types of somatic cells. *Sci China C Life Sci* 2004; 47: 470-476
- 11 Hiendleder S, Prelle K, Bruggerhoff K, Reichenbach HD, Wenigerkind H, Bebbere D, Stojkovic M, Muller S, Brem G, Zakhartchenko V, Wolf E. Nuclear-cytoplasmic interactions affect in utero developmental capacity, phenotype, and cellular metabolism of bovine nuclear transfer fetuses. *Biol Reprod* 2004; 70: 1196-1205
- 12 Ideta A, Urakawa M, Aoyagi Y, Saeki K. Early morphological nuclear events and developmental capacity of embryos reconstructed with fetal fibroblasts at the M or G1 phase after intracytoplasmic nuclear injection in cattle. *J Reprod Dev* 2005; 51: 187-194
- 13 Wells DN, Laible G, Tucker FC, Miller AL, Oliver JE, Xiang T, Forsyth JT,

- Berg MC, Cockrem K, L'Huillier PJ, Tervit HR, Oback B. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology* 2003; 59: 45-59
- 14 Mastromonaco GF, Semple E, Robert C, Rho GJ, Betts DH, King WA. Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. *Reprod Domest Anim* 2004; 39: 462-467
- 15 Thompson JG. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 341-354
- 16 van Wagendonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos AP, Merton JS, den Daas JH, Kemp B, de Ruigh L. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 2000; 53: 575-597
- 17 Gardner DK, Lane M. Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 361-370
- 18 Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2006; 65: 178-191
- 19 Le Bourhis D, Chesne P, Nibart M, Marchal J, Humblot P, Renard JP, Heyman Y. Nuclear transfer from sexed parent embryos in cattle: efficiency and birth of offspring. *J Reprod Fertil* 1998; 113: 343-348
- 20 Lee RS, Peterson AJ, Donnison MJ, Ravelich S, Ledgard AM, Li N, Oliver JE, Miller AL, Tucker FC, Breier B, Wells DN. 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* 2004; 70: 1-11
- 21 Hashizume K, Ishiwata H, Kizaki K, Yamada O, Takahashi T, Imai K, Patel OV, Akagi S, Shimizu M, Takahashi S, Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Tsujimoto G, Todoroki J, Izaike Y. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 197-209
- 22 Farin PW, Crosier AE, Farin CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 2001; 55: 151-170
- 23 Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, LeBourhis D, Kann G, Chillard Y, Vignon X, Renard JP. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 1596-1603
- 24 Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 2002; 66: 6-13

- 25 Batchelder CA, Hoffert KA, Bertolini M, Moyer AL, Mason JB, Petkov SG, Famula TR, Anderson GB. Effect of the nuclear-donor cell lineage, type, and cell donor on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Cloning Stem Cells* 2005; 7: 238-254
- 26 Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 1999; 60: 996-1005
- 27 Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production, Freezing and Transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995; 43: 141-152
- 28 Forsyth JT, Wells DN. Health and neonatal care of bovine clones. *Methods Mol Biol* 2006; 348: 91-108
- 29 Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavatte-Palmer P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod* 2006; 75: 122-130
- 30 Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. *Cloning Stem Cells* 2007; 9: 63-82
- 31 Chavatte-Palmer P, de SN, Laigre P, Camous S, Ponter AA, Beckers JF, Heyman Y. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology* 2006; 66: 829-840
- 32 比嘉 直志、山城 在、千葉 好夫 クローン牛生産技術の確立 体細胞クローン牛の生産 沖縄県畜産試験場研究報告 2002 ; 40: 5-10
- 33 谷山 敦、中里 敏、廣川 順太、小笠原 俊介、松尾 信明 体細胞クローン子牛の生時体重および血液性状 長崎県畜産試験場研究報告 2006 ; 12: 4-5
- 34 森 浩一郎、窪田 力、児島 浩貴、寺脇 志朗、轟木 淳一、太田 均、佐藤 真澄、上宮田 正己、山下 光則 体細胞クローン牛の作出状況 鹿児島県畜産試験場研究報 2002; 35: 52-57
- 35 長野 京子、森 浩一郎、窪田 力、岡本 光司、寺脇 志朗、児島 浩貴、上宮田 正己、山下 光則 体細胞クローン牛（ホルスタイン種）の発育性 鹿児島県畜産試験場研究報告 2002; 35: 83-88
- 36 長谷川 清寿、佐々木 恵美、安部 亜津子、村尾 克之、高仁 敏光 ホルスタイン雌牛由来卵丘細胞から作出したクローン個体とその後代産子に関する生理学および病理組織学的観察 島根県畜産試験場研究報告 2005; 38: 1-8
- 37 長谷川 清寿、佐々木 恵美、安部 亜津子、高仁 敏光 黒毛和種種雄牛候補に

- 一次選抜された子牛からの体細胞クローン牛生産手法の検討 島根県畜産試験場研究報告 2004; 37: 1-5
- 38 Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 990-995
- 39 Kruip T, den Daas JHG. In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 1997; 47: 43-52
- 40 Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Kreuscher BR, Medrano JF, Murray JD. Birth of large calves that developed from in-vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 1995; 44: 227-232
- 41 Nix JM, Spitzer JC, Grimes LW, Burns GL, Plyler BB. A retrospective analysis of factors contributing to calf mortality and dystocia in beef cattle. *Theriogenology* 1998; 49: 1515-1523
- 42 USDA/NAHMS 1997
- 43 Lombard JE, Garry FB, Tomlinson SM, Garber LP. Impacts of dystocia on health and survival of dairy calves. *J Dairy Sci* 2007; 90: 1751-1760
- 44 Sanderson MW, Dargatz DA. Risk factors for high herd level calf morbidity risk from birth to weaning in beef herds in the USA. *Prev Vet Med* 2000; 44: 97-106
- 45 上田 淳一、小林 章二、武井 真理、加藤 泰之 経膈採取した卵丘細胞を用いたウシ体細胞クローン産子生産 愛知県農業総合試験場研究報告 2000; 32: 197-202
- 46 神藤 学、大町 雅則、菊島 一人、高橋 照美、清水 景子、小尾 一夫、小柴 哲也、高木 優二 受精卵および体細胞由来クローン牛の生産と発育・繁殖状況 山梨県酪農試験場研究報告 2005; 16: 1-8
- 47 Center for Veterinary Medicine U. S. Food and Drug Administration Department of Health and Human Services 7500 Standish Place Rockville, MD 20855, Animal Cloning: A Risk Assessment, 2008
- 48 Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* 2000; 120: 231-237
- 49 Galli C, Duchi R, Moor R. M, Lazzari G. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning* 1999; 1 (3): 161-70
- 50 Young LE, Fairburn HR. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology* 2000; 53: 627-648
- 51 Bertolini M, Anderson GB. The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology* 2002; 57: 181-187
- 52 Bertolini M, Mason JB, Beam SW, Carneiro GF, Sween ML, Kominek DJ, Moyer AL, Famula TR, Sainz RD, Anderson GB. Morphology and

- morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology* 2002; 58: 973-994
- 53 Matsuzaki M, Shiga K. Endocrine characteristics of cloned calves. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 261-267
- 54 (社) 家畜改良事業団、(株) ミック クローン牛生産技術の効率化・安定化のための技術開発に関する研究 受精卵及び体細胞を用いたクローン牛生産のための核移植に関する研究—その1— 農林水産業・食品産業等先端産業技術開発事業 (体細胞等を利用したクローン家畜生産技術の開発) 平成 13 年度研究開発報告書 2002; 83-93
- 55 Chavatte-Palmer P, Remy D, Cordonnier N, Richard C, Issenman H, Laigre P, Heyman Y, Mialot JP. Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells* 2004; 6: 94-100
- 56 窪田 力、岡本 光司、轟木 淳一、溝下 和則、山口 浩、田原 則雄 体細胞クローン雄牛の血液成分 (生後 1 ヶ月令までの生化学成分) 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告 2001; 6: 32-41
- 57 山口 大輔、戸塚 豊、渡辺 晃行、足立 憲隆、赤木 悟史、高橋 清也、久保 正法 クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験 茨城県畜産センター研究報告 2005; 38: 5-12
- 58 Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematologic and biochemical profiles. *Cloning Stem Cells* 2007; 9: 83-96
- 59 USDA/NAHMS 1994
- 60 Wells DN, Forsyth JT, McMillan V, Oback B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells* 2004; 6: 101-110
- 61 Watanabe S, Nagai T. Health status and productive performance of somatic cell cloned cattle and their offspring produced in Japan. *J Reprod Dev* 2008; 54: 6-17
- 62 Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA, Westhusin ME. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod* 2000; 62: 1135-1140
- 63 Renard JP, Chastant S, Chesne P, Richard C, Marchal J, Cordonnier N, Chavatte P, Vignon X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 1999; 353: 1489-1491
- 64 Heyman Y, Chavatte-Palmer P, Berthelot V, Fromentin G, Hocquette JF, Martignat L, Renard JP. Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative approach. *Theriogenology* 2007; 67: 134-141
- 65 Laible G, Brophy B, Knighton D, Wells DN. Compositional analysis of dairy products derived from clones and cloned transgenic cattle. *Theriogenology*

- 2007; 67: 166-177
- 66 Yamaguchi M, Ito Y, Takahashi S. Fourteen-week feeding test of meat and milk derived from cloned cattle in the rat. *Theriogenology* 2007; 67: 152-165
- 67 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, Renard J. P, Quality and safety of bovine clones and their products. *Animal* 2007; (1): 963-972
- 68 Yonai M, Kaneyama K, Miyashita N, Kobayashi S, Goto Y, Bettpu T, Nagai T. Growth, reproduction, and lactation in somatic cell cloned cows with short telomeres. *J Dairy Sci* 2005; 88: 4097-4110
- 69 谷山 敦、中里 敏、廣川 順太、小笠原 俊介、松尾 信明 体細胞クローン雄牛の発育性および精液性状 長崎県畜産試験場研究報告 2006; 12: 6-7
- 70 中里 敏、井上 哲郎、谷山 敦、清松 邦章 ウシ体細胞クローン胚の体外発生と移植成績 長崎県畜産試験場研究報告 2001; 10: 4-6
- 71 井上 一之、斉藤 武志、安部 好文、吉田 周司、高木 喜代文、渋谷 清忠、平井 康夫 体細胞クローン牛生産技術の確立に関する研究 乳用牛における体細胞クローン利用技術の確立 平成 13 年度大分県畜産試験場試験成績報告書 2002; 31: 69-71
- 72 長谷川 清寿、佐々木 恵美、安部 亜津子、中村 亮一、高仁 敏光 黒毛和種種雄牛候補に一次選抜された子牛からの体細胞クローン牛生産手法の検討 (第 2 報) 島根県立畜産技術センター研究報告 2006; 39: 1-6
- 73 小岩井農牧 (株) クローン家畜の発育性・繁殖性の検証事業 クローン牛の泌乳試験及び繁殖試験 先端技術を活用した畜産技術研究開発推進事業 (体細胞クローン技術安定化・体系化事業) 平成 16 年度研究開発報告書 2005; 105-118
- 74 Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Tanemura K, Suzuki O, Nakayama H, Doi K, Ohtomo Y, Satoh M, Nishida A, Ogura A. Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat Genet* 2002; 30: 253-254
- 75 Tamashiro KL, Wakayama T, Yamazaki Y, Akutsu H, Woods SC, Kondo S, Yanagimachi R, Sakai RR. Phenotype of cloned mice: development, behavior, and physiology. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 1193-1200
- 76 Tanaka S, Miyazawa K, Watanabe K, Ohwada S, Aso H, Yonai M, Saito N, Yamaguchi T. Comparison of T cell subsets between somatic cloned and normal cow. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 28-35
- 77 Wells DN. Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech* 2005; 24: 251-264
- 78 窪田 力、野崎 聡、西 浩二、新福 由香、川久保 耕三、轟木 淳一、溝下 和則、山口 浩、田原 則雄 体細胞クローン雄牛の繁殖性 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告 2001; 6: 42-45
- 79 Heyman Y, Richard C, Rodriguez-Martinez H, Lazzari G, Chavatte-Palmer P, Vignon X, Galli C. Zootechnical performance of cloned cattle and

- offspring: preliminary results. *Cloning Stem Cells* 2004; 6: 111-120
- 80 谷口 雅律、住尾 善彦 牛の体細胞クローン技術の確立 平成 16 年度試験成績書（熊本県農業研究センター畜産研究所） 2005; : 84-89
- 81 本多 巖、坂本 秀樹、丹治 敏夫、原 恵、石川 雄治、志賀 美子、管野 美樹夫 体細胞クローン雄牛の繁殖性調査 福島県畜産試験場研究報告 2003; 10: 17-19
- 82 早坂 駿哉、高田 直和 牛体外受精に関する研究 体細胞クローン牛生産技術の確立 平成 14 年度宮城県畜産試験場成績書 2002; : 56-58
- 83 佐藤 亘、梅木 英伸、志賀 一穂、山口 弘之 体細胞クローン牛生産技術の確立に関する研究 体細胞クローン牛の性能調査 平成 11 年度大分県畜産試験場試験成績報告書 2000; 29: 108-109
- 84 志賀 一穂、梅木 英伸、志村 英明、藤田 達男、赤峰 正雄 体細胞クローン牛生産技術の確立に関する研究 体細胞クローン牛の遺伝的相同性調査（第 2 報）平成 12 年度大分県畜産試験場試験成績報告 2001; 30: 55-61
- 85 佐藤 亘、吉田 秀幸、梅木 英伸、志賀 一穂 体細胞クローン牛生産技術の確立に関する研究 体細胞クローン牛の性能調査 平成 12 年度大分県畜産試験場試験成績報告書 2001; 30: 62-64
- 86 Shiga K, Umeki H, Shimura H, Fujita T, Watanabe S, Nagai T. Growth and fertility of bulls cloned from the somatic cells of an aged and infertile bull. *Theriogenology* 64 2005; : 334-343
- 87 轟田 洋一、野崎 聡、窪田 力、上村 利久、西 浩二、新福 由香、内山 正二、横山 喜世志 クローン検定の実証試験（第 7 報 体細胞クローン牛の発育および精液性状） 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告 2003; 8: 1-5
- 88 Enright BP, Taneja M, Schreiber D, Riesen J, Tian XC, Fortune JE, Yang X. Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 291-296
- 89 森 浩一郎、長野 京子、窪田 力、岡本 光司、寺脇 志朗、児島 浩貴、上宮田 正己、上原 修一、高橋 清也、徳永 智之 体細胞クローン牛の初産分娩時までの繁殖状況 鹿児島県畜産試験場研究報告 2002; 36: 34-40
- 90 山口 大輔、根本 聡美、渡辺 晃行、葦澤 圭二郎、足立 憲隆、赤木 悟史、高橋 清也、久保 正法 クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験（第 4 報）－体細胞クローン牛の繁殖能力およびその後代産子に関する調査－ 茨城県畜産センター研究報告 2004; 37: 79-83
- 91 笠井 裕明、福見 善之、渡辺 裕恭、立川 進 ホルスタイン種体細胞クローン育成雌牛の過排卵処理成績及び後代牛の生産 徳島県立農林水産総合技術センター畜産研究所報告 2003; 3: 14-19
- 92 全国農業協同組合連合会 クローン家畜の発育性・繁殖性の検証事業 クローン牛産子等の繁殖性等試験 先端技術を活用した畜産技術研究開発事業（体細胞クローン技術安定化・体系化事業）平成 17 年度研究開発報告書 2006; 163-173
- 93 小岩井農牧（株） クローン家畜の発育性・繁殖性の検証事業 クローン牛の泌

- 乳試験及び繁殖試験 先端技術を活用した畜産技術研究開発推進事業（体細胞クローン技術安定化・体系化事業）平成 15 年度研究開発報告書 2004; 111-118
- 94 Polge C, Rowson LE, CHANG MC. The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. *J Reprod Fertil* 1966; 12: 395-397
- 95 Dziuk P. Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. *J Reprod Fertil Suppl* 1985; 33: 57-63
- 96 Betthauser J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 1055-1059
- 97 Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000; 289: 1188-1190
- 98 Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407: 86-90
- 99 van der Lende T, van Rens BTTM. Critical periods for foetal mortality in gilts identified by analysing the length distribution of mummified foetuses and frequency of non-fresh stillborn piglets. *Anim Reprod Sci* 2003; 75: 141-150
- 100 Carroll JA, Carter DB, Korte SW, Prather RS. Evaluation of the acute phase response in cloned pigs following a lipopolysaccharide challenge. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29: 564-572
- 101 Park MR, Cho SK, Lee SY, Choi YJ, Park JY, Kwon DN, Son WJ, Paik SS, Kim T, Han YM, Kim JH. A rare and often unrecognized cerebromeningitis and hemodynamic disorder: a major cause of sudden death in somatic cell cloned piglets. *Proteomics* 2005; 5: 1928-1939
- 102 Williams NE, Walker SC, Reeves DE, Sherrer E, Galvin JM, Polejaeva I, Rampacek G, Benyshek L, Christenson RK, Graves WM, Pratt SL. A comparison of reproductive characteristics of boars generated by somatic cell nuclear transfer to highly related conventionally produced boars. *Cloning Stem Cells* 2006; 8: 130-139
- 103 Du Y, Kragh PM, Zhang Y, Li J, Schmidt M, Bogh IB, Zhang X, Purup S, Jorgensen AL, Pedersen AM, Villemoes K, Yang H, Bolund L, Vajta G. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation. *Theriogenology* 2007; 68 (8): 1104-1110
- 104 柴田 昌利、土屋 聖子、大竹 正剛、河原崎 達男. 体細胞クローン金華豚の発

- 育と繁殖能力 静岡県中小家畜試験場研究報告 2003; 14: 13-16
- 105 Estrada J, Sommer J, Collins B, Mir B, Martin A, York A, Petters RM, Piedrahita JA. Swine generated by somatic cell nuclear transfer have increased incidence of intrauterine growth restriction (IUGR). *Cloning Stem Cells* 2007; 9: 229-236
- 106 Lee SY, Park JY, Choi YJ, Cho SK, Ahn JD, Kwon DN, Hwang KC, Kang SJ, Paik SS, Seo HG, Lee HT, Kim JH. Comparative proteomic analysis associated with term placental insufficiency in cloned pig. *Proteomics* 2007; 7(8): 1303-1315
- 107 Archer GS, Dindot S, Friend TH, Walker S, Zaunbrecher G, Lawhorn B, Piedrahita JA. Hierarchical phenotypic and epigenetic variation in cloned swine. *Biol Reprod* 2003; 069: 430-436
- 108 Mir B, Zaunbrecher G, Archer GS, Friend TH, Piedrahita JA. Progeny of somatic cell nuclear transfer (SCNT) pig clones are phenotypically similar to non-cloned pigs. *Cloning Stem Cells* 2005; 7: 119-125
- 109 Archer GS, Friend TH, Piedrahita J, Nevill CH, Walker S. Behavioral variation among cloned pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 2003; 82: 151-161
- 110 Martin M, Adams C, Wiseman B. Pre-weaning performance and health of pigs born to cloned (fetal cell derived) swine versus non-cloned swine. *Theriogenology* 2004; 62: 113-122
- 111 Center for Veterinary Medicine U. S. Food and Drug Administration Department of Health and Human Services 7500 Standish Place Rockville, MD 20855, Animal Cloning: A Risk Assessment, Appendix F The ViaGen Dataset, 2008
- 112 長野 京子、森 浩一郎、窪田 力、今村 正昭、寺脇 志朗、上原 修一 体細胞クローン牛（ホルスタイン種）後代産子の発育性 鹿児島県畜産試験場研究報告 2005; 39: 53-58
- 113 (株) ミック クローン家畜の発育性・繁殖性の検証事業 クローン牛の発育及び繁殖試験 先端技術を活用した畜産技術研究開発推進事業（体細胞クローン技術安定化・体系化事業）平成 16 年度研究開発報告書 2005; 119-125
- 114 Ortegon H, Betts DH, Lin L, Coppola G, Perrault SD, Blondin P, King WA. Genomic stability and physiological assessments of live offspring sired by a bull clone, Starbuck II. *Theriogenology* 2007; 67: 116-126
- 115 坂下 邦仁、窪田 力、西 博巳、田原 則雄、別府 成、岡野 良一 体細胞クローン牛後代産子の肥育成績 鹿児島県畜産試験場研究報告 2003; 37: 34-40
- 116 Shibata M, Otake M, Tsuchiya S, Chikyu M, Horiuchi A, Kawarasaki T. Reproductive and growth performance in Jin Hua pigs cloned from somatic cell nuclei and the meat quality of their offspring. *J Reprod Dev* 2006; 52: 583-590

- 117 Walker SC, Christenson RK, Ruiz RP, Reeves DE, Pratt SL, Arenivas F, Williams NE, Bruner BL, Polejaeva IA. Comparison of meat composition from offspring of cloned and conventionally produced boars. *Theriogenology* 2007; 67: 178-184
- 118 柴田 昌利、大竹 正剛、土屋 聖子、河原崎 達男 体細胞クローン金華豚後代産子の食品としての安全性 静岡県中小家畜試験場研究報告 2007; 17: 13-23
- 119 柴田 昌利、土屋 聖子、大竹 正剛、河原崎 達男 体細胞クローン金華豚産子の産肉性と肉質 I クローン産子の発育と枝肉成績 静岡県中小家畜試験場研究報告 2004; 15: 35-38
- 120 Riggs AD, Martienssen RA, Russo VEA, In introduction, Riggs AD, Martienssen RA, Russo VEA, (eds), *Epigenetic mechanisms of gene regulation*, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY, 1996; 1-4
- 121 Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21
- 122 Shiota K, Yanagimachi R. Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals. *Differentiation* 2002; 69 (4-5): 162-166
- 123 Jaenisch R. Human cloning - the science and ethics of nuclear transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351: 2787-2791
- 124 Holliday R. DNA methylation and epigenotypes. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70: 500-504
- 125 Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol* 2005; 204: 21-35
- 126 Kanka J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology* 2003; 59: 3-19
- 127 Quivy V, Calomme C, Dekoninck A, Demonte D, Bex F, Lamsoul I, Vanhulle C, Burny A, Van Lint C. Gene activation and gene silencing: a subtle equilibrium. *Cloning Stem Cells* 2004; 6: 140-149
- 128 Cheung P, Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 563-573
- 129 Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15: 490-495
- 130 Verschure PJ, van der KI, de Leeuw W, van der VJ, Carpenter AE, Belmont AS, van Driel R. In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 4552-4564
- 131 Hattori N, Nishino K, Ko YG, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem.* 2004; 279 (17): 17063-17069

- 132 Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; 14 Spec No 1: R47-R58
- 133 Rideout WM III, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; 293: 1093-1098
- 134 Jaenisch R, Eggan K, Humpherys D, Rideout W, Hochedlinger K. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 389-396
- 135 Mann MR, Bartolomei MS. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol* 2002; 3: REVIEWS1003
- 136 Cezar GG. Epigenetic reprogramming of cloned animals. *Cloning Stem Cells* 2003; 5: 165-180
- 137 Han YM, Kang YK, Koo DB, Lee KK. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology* 2003; 59: 33-44
- 138 Jouneau A, Renard JP. Reprogramming in nuclear transfer. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 486-491
- 139 Smith LC, Murphy BD. Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals. *Cloning Stem Cells* 2004; 6: 126-132
- 140 Young LE, Beaujean N. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 61-78
- 141 Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 23-35
- 142 Armstrong L, Lako M, Dean W, Stojkovic M. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells* 2006; 24: 805-814
- 143 Eilertsen KJ, Power RA, Harkins LL, Misica P. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 2007; 98: 129-146
- 144 De Rycke M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum Reprod.* 2002 17 (10): 2 487-494
- 145 Niemann H, Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Brambrink T, Kues WA, Carnwath JW. Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning Stem Cells.* 2002; 4 (1): 29-38
- 146 Powell K. Fertility treatments: Seeds of doubt. *Nature.* 2003; 422 (6933): 656-658

- 147 Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13734-13738
- 148 Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Comizzoli P, Renard JP, Viegas-Pequignot E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol* 2001; 11: 1542-1546
- 149 Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet* 2001; 28: 173-177
- 150 Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Kim HN, Chang WK, Lee KK, Han YM. Typical demethylation events in cloned pig embryos. Clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. *J Biol Chem* 2001; 276: 39980-39984
- 151 Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Wakayama T, Tanaka M, Yoshida N, Hattori N, Ohgane J, Yanagimachi R, Shiota K. Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol Reprod* 2001; 65: 1813-1821
- 152 Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y, Senda S, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 2001; 30: 45-50
- 153 Ohgane J, Wakayama T, Senda S, Yamazaki Y, Inoue K, Ogura A, Marh J, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. The Sall3 locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genes Cells* 2004; 9: 253-260
- 154 Cezar GG, Bartolomei MS, Forsberg EJ, First NL, Bishop MD, Eilertsen KJ. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 2003; 68: 1009-1014
- 155 Dindot SV, Farin PW, Farin CE, Romano J, Walker S, Long C, Piedrahita JA. Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos gaurus/Bos taurus* hybrid fetuses. *Biol Reprod* 2004; 71: 470-478
- 156 Chen T, Jiang Y, Zhang YL, Liu JH, Hou Y, Schatten H, Chen DY, Sun QY. DNA hypomethylation of individual sequences in aborted cloned bovine fetuses. *Frontiers in Bioscience* 2005; 10: 3002-3008
- 157 Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, Yagi S, Shiota K. DNA methylation profiles of donor nuclei cells and tissues of cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev* 2006; 52: 259-266
- 158 Long JE, Cai X. Igf-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. *Gene* 2007; 388:

- 125-134
- 159 Senda S, Wakayama T, Arai Y, Yamazaki Y, Ohgane J, Tanaka S, Hattori N, Yanagimachi R, Shiota K. DNA methylation errors in cloned mice disappear with advancement of aging. *Cloning Stem Cells* 2007; 9: 293-302
- 160 Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. 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* 2002; 66 (1): 127-134
- 161 Smith SL, Everts RE, Tian XC, Du F, Sung LY, Rodriguez-Zas SL, Jeong BS, Renard JP, Lewin HA, Yang X. Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17582-17587
- 162 Sawai K, Kageyama S, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Onoe S. Analysis of mRNA transcripts for insulin-like growth factor receptors and binding proteins in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 2005; 7: 189-198
- 163 Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod* 2001; 65: 309-317
- 164 Camargo LS, Powell AM, Filho VR, Wall RJ. Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by in vitro fertilisation or somatic cell nuclear transfer. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 487-496
- 165 Beyhan Z, Forsberg EJ, Eilertsen KJ, Kent-First M, First NL. Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 18-27
- 166 Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout W 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* 2000; 290 (5496): 1578-1581
- 167 Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin KJ. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev* 2002; 16: 1209-1219
- 168 Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC, Jaenisch R. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 2003; 130: 1673-1680
- 169 Sebastiano V, Gentile L, Garagna S, Redi CA, Zuccotti M. Cloned pre-implantation mouse embryos show correct timing but altered levels of gene expression. *Mol Reprod Dev* 2005; 70: 146-154
- 170 Miyazaki K, Tomii R, Kurome M, Ueda H, Hirakawa K, Ueno S, Hiruma K,

- Nagashima H. Evaluation of the quality of porcine somatic cell nuclear transfer embryo by gene transcription profiles. *J Reprod Dev* 2005; 51: 123-131
- 171 Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM, III, Biniszkiewicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 2001; 293: 95-97
- 172 Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12889-12894
- 173 Inoue K, Kohda T, Lee J, Ogonuki N, Mochida K, Noguchi Y, Tanemura K, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Ogura A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science* 2002; 295: 297
- 174 Herath CB, Ishiwata H, Shiojima S, Kadowaki T, Katsuma S, Ushizawa K, Imai K, Takahashi T, Hirasawa A, Takahashi S, Izaike Y, Tsujimoto G, Hashizume K. Developmental aberrations of liver gene expression in bovine fetuses derived from somatic cell nuclear transplantation. *Cloning Stem Cells* 2006; 8: 79-95
- 175 Yang L, Chavatte-Palmer P, Kubota C, O'Neill M, Hoagland T, Renard JP, Taneja M, Yang X, Tian XC. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 431-438
- 176 Li S, Li Y, Du W, Zhang L, Yu S, Dai Y, Zhao C, Li N. Aberrant gene expression in organs of bovine clones that die within two days after birth. *Biol Reprod* 2005; 72: 258-265
- 177 Senda S, Wakayama T, Yamazaki Y, Ohgane J, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. Skewed X-inactivation in cloned mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321 (1): 38-44
- 178 Kohda T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Naruse M, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F. Variation in gene expression and aberrantly regulated chromosome regions in cloned mice. *Biol Reprod.* 2005; 73 (6): 1302-1311
- 179 Inoue F, Matsuda J, Ohkoshi K, Furusawa T, Takahashi S, Sasada H, Sato E, Tokunaga T. Differences in gene expression patterns between somatic cell nuclear transfer embryos constructed with either rabbit granulosa cells or their derivatives. *Anim Reprod Sci* 2006; 93: 76-87
- 180 Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod* 2006; 74: 46-57
- 181 Giraldo AM, Lynn JW, Godke RA, Bondioli KR. Proliferative characteristics and chromosomal stability of bovine donor cells for nuclear transfer. *Mol*

- Reprod Dev 2006; 73: 1230-1238
- 182 Mastromonaco GF, Perrault SD, Betts DH, King WA. Role of chromosome stability and telomere length in the production of viable cell lines for somatic cell nuclear transfer. BMC Dev Biol 2006; 10: 13-16
- 183 Camargo LS, Viana JH, Sa WF, Ferreira AM, Vale Filho VR. Developmental competence of oocytes from prepubertal Bos indicus crossbred cattle. Anim Reprod Sci 2005; 85 (1-2): 53-59
- 184 Liu G, Kato Y, Tsunoda Y. Aging of Recipient Oocytes Reduces the Development of Cloned Embryos Receiving Cumulus Cells. J Reprod Dev 2007
- 185 Bordignon V, Smith LC. Telophase-stage host ooplasts support complete reprogramming of roscovitine-treated somatic cell nuclei in cattle. Cloning Stem Cells 2006; 8: 305-317
- 186 Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. Am J Hum Biol 2007; 19 (1): 1-19
- 187 Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. Bioessays 2007; 29 (2): 145-154
- 188 Shimosawa N, Ono Y, Kimoto S, Hioki K, Araki Y, Shinkai Y, Kono T, Ito M. Abnormalities in cloned mice are not transmitted to the progeny. Genesis. 2002; 34 (3): 203-207
- 189 Tamashiro KL, Wakayama T, Akutsu H, Yamazaki Y, Lachey JL, Wortman MD, Seeley RJ, D'Alessio DA, Woods SC, Yanagimachi R, Sakai RR. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. Nat Med 2002; 8: 262-267
- 190 Fulka J Jr., Miyashita N, Nagai T, Ogura A. Do cloned mammals skip a reprogramming step? Nat Biotechnol 2004; 22: 25-26
- 191 Committee on Defining Science-Based Concerns Associated with Products of Animal Biotechnology, Committee on Agricultural Biotechnology, Health, and the Environment, National Research Council, Animal Biotechnology: Science-Based Concerns (NAS), 2002
- 192 山口 浩、窪田 力、溝下 和則、轟木 淳一、田原 則雄 牛核移植技術の開発（個体識別） 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告 2000; 5: 27-30
- 193 本多 巖、篠木 忠、原 恵、石川 雄治、志賀 美子、管野 美樹夫 体細胞クローン牛の遺伝的相同性および発育性について 福島県畜産試験場研究報告 2003; 10: 13-16
- 194 谷口 俊仁、柏木 敏孝、野口 浩和、山本 喜彦 体細胞クローン牛の作出および相似性の検討 和歌山県農林水産総合技術センター研究報告 2002; 4: 57-61
- 195 加藤 誠二、林 登、林 尚徳、平尾 一平、傍島 英雄、小林 直彦、大谷 健 体細胞クローン牛の正常性について（第1報）～体細胞クローン雌牛の発育性・

- 繁殖性とその産子の発育性について～ 岐阜県畜産研究所研究報告 2003; 3: 27-36
- 196 Booth PJ, Viuff D, Tan S, Holm P, Greve T, Callesen H. Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. *Biol Reprod* 2003; 68 (3): 922-928
- 197 Hanada H, Takeda K, Tagami T, Nirasawa K, Akagi S, Adachi N, Takahashi S, Izaike Y, Iwamoto M, Fuchimoto D, Miyashita N, Kubo M, Onishi A, King WA. Chromosomal instability in the cattle clones derived by somatic cell nuclear-transfer. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 36-44
- 198 Yanagimachi R. Cloning: experience from the mouse and other animals. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 241-248
- 199 Balbach ST, Jauch A, Bohm-Steuer B, Cavaleri FM, Han YM, Boiani M. Chromosome stability differs in cloned mouse embryos and derivative ES cells. *Dev Biol* 2007; 308 (2): 309-321
- 200 Hiendleder S, Mund C, Reichenbach HD, Wenigerkind H, Brem G, Zakhartchenko V, Lyko F, Wolf E. Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod* 2004; 71: 217-223
- 201 St John JC, Moffatt O, D'Souza N. Aberrant heteroplasmic transmission of mtDNA in cloned pigs arising from double nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 2005; 72: 450-460
- 202 Bowles EJ, Campbell KH, St John JC. Nuclear transfer: preservation of a nuclear genome at the expense of its associated mtDNA genome(s). *Curr Top Dev Biol* 2007; 77: 251-290
- 203 Hiendleder S. Mitochondrial DNA inheritance after SCNT. *Adv Exp Med Biol* 2007; 591: 103-116
- 204 Smith LC, Thundathil J, Filion F. Role of the mitochondrial genome in preimplantation development and assisted reproductive technologies. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 15-22
- 205 Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH, Waddington D, Wilmut I, Colman A, Schnieke AE. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 1999; 399: 316-317
- 206 Betts D, Bordignon V, Hill J, Winger Q, Westhusin M, Smith L, King W. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1077-1082
- 207 Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, Mak J, Schertzer M, Chavez EA, Sawyer N, Lansdorp PM, West MD. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 2000; 288: 665-669
- 208 Tian XC, Xu J, Yang X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat*

- Genet 2000; 26: 272-273
- 209 Jiang L, Carter DB, Xu J, Yang X, Prather RS, Tian XC. Telomere lengths in cloned transgenic pigs. *Biol Reprod* 2004; 70: 1589-1593
- 210 Betts DH, Perrault SD, Petrik J, Lin L, Favetta LA, Keefer CL, King WA. Telomere length analysis in goat clones and their offspring. *Mol Reprod Dev* 2005; 72: 461-470
- 211 Jeon HY, Hyun SH, Lee GS, Kim HS, Kim S, Jeong YW, Kang SK, Lee BC, Han JY, Ahn C, Hwang WS. The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 315-320
- 212 Schaetzlein S, Rudolph KL. Telomere length regulation during cloning, embryogenesis and ageing. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 85-96
- 213 Kuhholzer-Cabot B, Brem G. Aging of animals produced by somatic cell nuclear transfer. *Exp Gerontol* 2002; 37: 1317-1323
- 214 Miyashita N, Shiga K, Yonai M, Kaneyama K, Kobayashi S, Kojima T, Goto Y, Kishi M, Aso H, Suzuki T, Sakaguchi M, Nagai T. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol Reprod* 2002; 66: 1649-1655
- 215 Xu J, Yang X. Will cloned animals suffer premature aging--the story at the end of clones' chromosomes. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 105
- 216 Betts DH, King WA. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 2001; 55: 171-191
- 217 Schaetzlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M, Manns MP, Niemann H, Rudolph KL. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 8034-8038
- 218 Clark AJ, Ferrier P, Aslam S, Burl S, Denning C, Wylie D, Ross A, de SP, Wilmut I, Cui W. Proliferative lifespan is conserved after nuclear transfer. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 535-538
- 219 Palmquist DL, Beaulieu AD, Barbano DM. Feed and animal factors influencing milk fat composition, *J Dairy Sci* 1993; 76 (6): 1753-1771
- 220 (財) 畜産生物科学安全研究所 クローン牛生産物性状調査結果の概要, クローン牛の生産物性状調査事業報告書 (クローン牛利用緊急調査事業) (平成 11~13 年度) 2002
- 221 Tian XC, 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, Yang X. Meat and milk compositions of bovine clones, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 6261-6266
- 222 Yang X, Tian XC, Kubota C, Page R, Xu J, Cibelli J, Seidel G, Jr. Risk assessment of meat and milk from cloned animals, *Nat Biotechnol* 2007; 25: 77-83
- 223 (財) 畜産生物科学安全研究所 体細胞クローン後代牛の生産物性状に関する

試験結果の概要, 体細胞クローン後代牛の生産物性状に関する調査報告書
2008

- 224 Walsh MK, Lucey JA, Govindasamy-Lucey S, Pace MM, Bishop MD. Comparison of milk produced by cows cloned by nuclear transfer with milk from non-cloned cows, *Cloning Stem Cells* 2003; 5: 213-219
- 225 Mackle TR, Petch SF, Bryant AM, Auldist MJ. Variation in the characteristics of milkfat from pasture-fed dairy cows during spring and the effects of grain supplementation, *NZ J Agric Res* 1997; 40: 349-359
- 226 Mackle TR, Bryant AM, Petch SF, Hooper RJ, Auldist MJ. Variation in the composition of milk protein from pasture-fed dairy cows in late lactation and the effect of grain and silage supplementation, *NZ J Agric Res* 1999; 42: 154
- 227 Auldist MJ, Johnston KA, White NJ, Fitzsimons WP, Boland MJ. A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows, *J Dairy Res* 2004; 71: 51-57
- 228 Tome D, Dubarry M, Fromentin G. Nutritional value of milk and meat products derived from cloning, *Cloning Stem Cells* 2004; 6: 172-177
- 229 Yamaguchi M, Itoh M, Ito Y, Watanabe S. A 12-month feeding 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.* 2008; 54(5): 321-334
- 230 Kataoka H, Tsuda A, Tsuda Y, Baba A, Yoshida H, Hirasawa R, Tobimatsu Y, Nishiguchi M, Semma M, Ito Y. A novel method for induction and detection of anaphylactic reaction using the mouse abdominal wall (AW method), *Biol. Pharm. Bull.* 1997; 20(6): 714-716