

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

2008年12月

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

目 次

I. 家畜における繁殖技術の概要	2
1. 主な繁殖技術	2
2. クローン技術	3
3. 体細胞クローン動物の産出数と効率	4
II. 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	6
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	6
(1) 体細胞クローン技術を用いて産出された牛	6
(2) 体細胞クローン技術を用いて産出された豚	15
(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	18
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	20
(1) 体細胞クローン技術を用いて産出された牛の後代 (F1)	20
(2) 体細胞クローン技術を用いて産出された豚の後代 (F1)	21
(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	22
III. 体細胞クローン動物のエピジェネティクス等	24
1. 体細胞クローン動物の発生と分化	24
2. エピジェネティクスとは	24
3. クローン動物のエピジェネティクス	25
(1) DNA のメチル化	25
(2) 遺伝子の発現解析	28
(3) エピジェネティックな変化に影響を及ぼす因子	30
(4) 後代	31
4. その他	31
(1) DNA 変異及び染色体異常	31
(2) ミトコンドリア DNA	32
(3) テロメア長	32
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	33
<参照>	35

I. 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、発情を示す健康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、その後に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。

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。

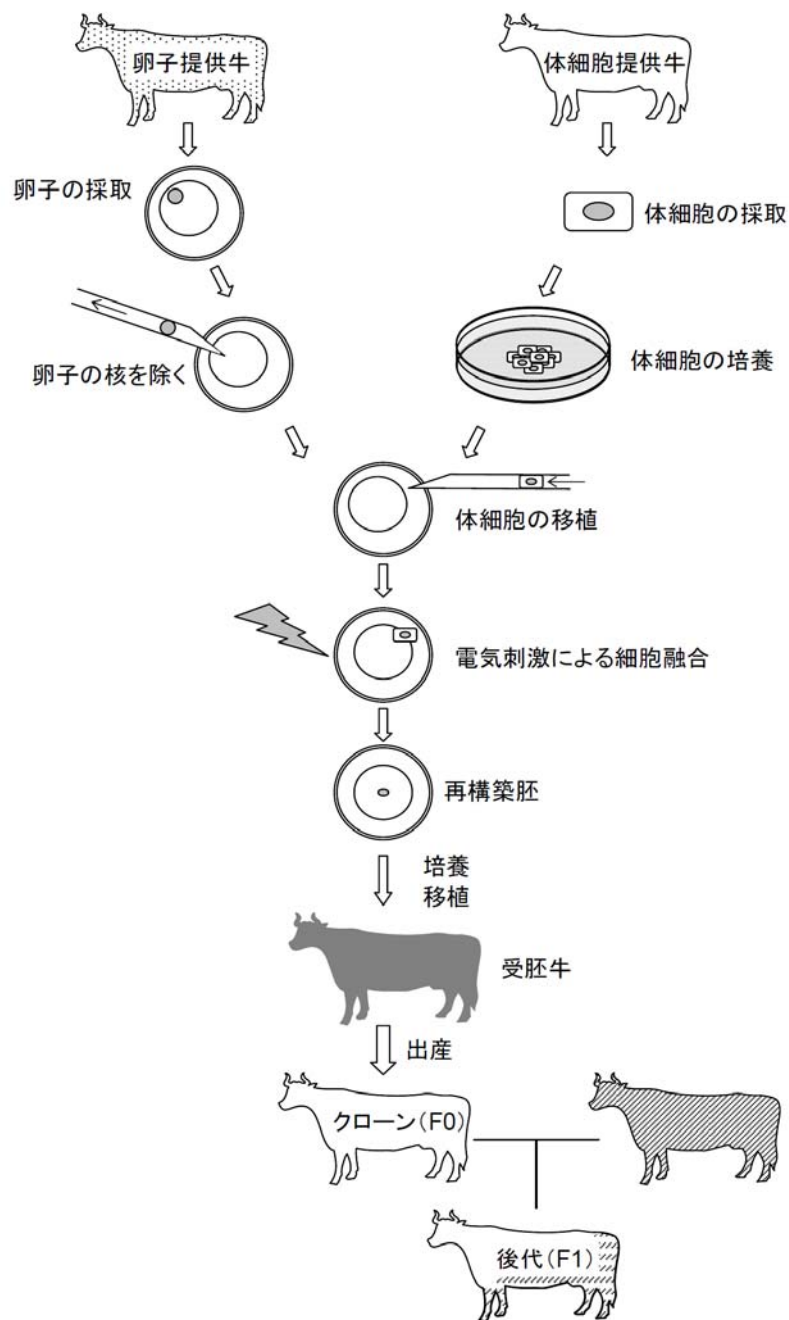


図 1. 体細胞クローン牛の産出

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 3 月 31 日現在の累計で、我が国では体細胞クローン牛は 551 頭出生し、86 頭が育成・試験中であり、体細胞クローン豚については 328 頭出生し、65 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。我が国の牛における繁殖技術毎の産子の死産や事故死等の死亡率は、人工授精 5.3%、体内受精卵移植 4.6%、体外受精卵移植 7.5%、受精卵クローン 15%、体細胞クローン 31%となっている。

II. 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

体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚について、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）

すなわち、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6）、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7）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の種類によって胚盤胞の発生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、皮膚線維芽細胞、乳腺上皮細胞、顆粒膜細胞を用いる場合より高い胚盤胞の発生率が認められるとの報告がある（参照8、9）。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10、11）。

ドナー細胞の細胞周期による胚盤胞の発生等について検討が行われている。

胎子の線維芽細胞のG1期又はM期をドナー細胞として用いた場合には、G1期の細胞が胚盤胞への発生が高かった（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、G0期を使用した場合には、移植後早い時期に多くの受胎牛で妊娠が維持されなかったが、移植後120日目以降では、妊娠が維持され、水腫も認められなかった。G1期を使用した場合では、分娩までに多くの受胎牛で妊娠が維持されず（移植後120日目以降21/43）、水腫の発生率が高かった（妊娠の18/43（42%））（参照13）。水腫には、胎膜腔内に多量の胎水が貯留する胎膜水腫と胎子の水腫がある。

また、胚の培養条件による胚盤胞への発生について、体外受精胚と比較したところ、体外受精胚は使用した培地にかかわらず胚盤胞への発生率は同等であったが、体細胞クローン胚では 2% 去勢牛血清を含む合成卵管液で培養した方が、胚盤胞の発生率が高いとする報告があり（参照14）、他の報告でも、体細胞クローン胚の高頻度な不受胎、流産、胎盤異常の根本的な原因として、培地を含む要因の数と組み合わせとの関係があることを示唆する報告がある（参照15、16、17）。

牛の体細胞クローン胚において、他の繁殖技術と同様に移植後 60 日まで妊娠が維持されない場合も認められているが、人工授精や体内受精卵移植と違い、体外受精胚と体細胞クローン胚では妊娠のいずれの時期においても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 日での受胎率は、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受胎率は低下した。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 40% が妊娠していた。対照では、この期間の低下はみられなかった。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できた。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 1 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牛の胎子の胎盤は人工授精の胎盤と比較して、多胎盤の発現と同時に発達が不十分な小丘が認められた。体細胞クローン牛の胎盤の多胎盤領域は、人工授精の胎盤と比較し、弱々しく平坦で、数は約半分であった（参照21）。

一方、別の研究では、体細胞クローン牛の胎子では 100 日目の胎子の宮阜の平均数は人工授精や体外受精群より少なく、胎盤葉数は減少したが、宮阜の全重量は体細胞クローン牛の胎子で有意に高く、胎盤葉も大きく、厚く、こぶし状の形をしていた（参照20）。

生存して生まれた体細胞クローン牛では、妊娠後期で死亡した体細胞クローン牛との間に、妊娠関連糖タンパク（PAG）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 PAG 濃度は明らかに低かった（参照22）。

これらのように、牛や羊の体細胞クローンの胎盤で異常な胎盤葉が観察された報告が多数ある（参照23、24、25、20、26）。また、妊娠の後期における流産は、水腫、腫大した臍帯、異常な胎盤の報告が伴っており、主な原因は胎盤の発生異常であるとされている（参照27、23、24）。

正常な胎盤は、母体と胎子間の栄養の吸収、ガス交換、老廃物の排出等の胎

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子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28、29）。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が維持されない場合があり、そのうち、58～86%は水腫が原因と考えられている（参照30、13）。

尿膜水腫を伴った体細胞クローン牛を受胎した受胎牛において、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 日目の胎盤葉の重量は人工授精や体外受精に由来する胎子より軽かった。また、胎盤葉の数は妊娠期間により増加傾向を示した。なお、胎盤葉の重さと数が正常であるものも確認された（参照31）。

体細胞クローン牛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葉の肥大化が確認された（参照25）。

体細胞クローン牛を受胎した受胎牛では胎子水腫（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牛を受胎している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）であった。これらの 2 例は水腫を発症していた（参照20、32）。

7 頭の体細胞クローン牛の出生時の胎盤の組織学的検査の結果、全ての胎盤で異常（中～重度の浮腫、拡張した血管、偶発的な胎盤形成、胎盤葉の大規模な欠損）が確認された。また、胎盤葉は対照と比較して、数が少なく、重く、表面積が広がった（参照32）。

胎盤の機能不全が水腫等の疾病の原因のひとつと考えられる他、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誘発し、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と考えられている（参照33）。

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34）。

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25）。

我が国の複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35、36、37、38、39、40）。

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 頭は健康で正常であり、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41、42）。

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42）。

過大子の発生は難産とそれに関係する罹病及び死亡を招くことが多い（参照43、23）。

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報告がある（参照44）。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45）。

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、子牛の新生子死亡の増加の原因となり、高い罹病率、低体温症、呼吸及び消化の問題、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44、46、47）。

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48）。

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26、49）。

出生体重 71.0kgの体細胞クローン牛が出生時に、特に頭部と頸部で浮腫を表し、軽度の胎子水腫を患った。この子牛は帝王切開で娩出に成功したが、生後 3 日で死亡した（参照26）。

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対照より重く、9頭の体細胞クローン牛では対照より40%以上重かった（参照49）。

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、51、27、52）。

体細胞クローン牛における過大子の発生率は、使用した細胞の種類により異なるとの報告もある（参照49）。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43）。このことから、生体外での培養条件が過大子の発生原因とも考えられている（参照53、54）。

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25、24、55）。

過大子の発生の他、生後直死した体細胞クローン牛の組織検査の結果、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56）。別の研究では、生後1週間までに死亡した9頭の臨床的徴候と剖検の結果には、過温症、臍ヘルニア、呼吸困難、腹水症、脂肪肝、四肢奇形、消化管異常等が含まれていた（参照57）。

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58、38、39）。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子牛に比べ有意に高い値であった（参照36）。一方、出生直後から2ヶ月間までの血液生化学的検査の結果は、正常範囲内であり、対照牛と比較しても大きな差は認められていない（参照59）。

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57）。

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（人工授精牛、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調査した。

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55)。

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 (人工授精及び体内受精卵移植) と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、対照と比較して生後 24 時間まで低かったが、48 時間までに同じになった。白血球数に違いは認められなかった。体細胞クローン牛に過大子の発生に関連する臨床的症狀が認められたが、人工授精由来の対照牛でも多くの同じ症狀が認められた (参照26、33、32)。

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、体細胞クローン牛は生後 2 週間低かった。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 日目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不安定な生理状態については、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24)。

③若齢期

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、解剖・病理検査が行われ、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。

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34)。

147 日齢で死亡した体細胞クローン牛の病性鑑定を実施したところ、内分泌系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61)。

25 ヶ月齢で死亡した体細胞クローン牛を剖検したところ、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従来の繁殖技術による牛の中でミネラル欠乏症の徴候を示しているものはいなかった。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26、62)。

1 頭の体細胞クローン雄牛は呼吸困難 (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であった。この子牛はまもなく回復し、2 ヶ月齢までに糖尿病も回復した (子牛は血糖とインシュリンが正常な値を維持できた)。この体細胞クローン牛は完全に回復し、健康な成牛となった (参照62)。

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 週間でピークとなった (参照63)。

生後 1、2 ヶ月の体細胞クローン牛の心臓と肝臓の重量は、人工授精の牛と区別がつかなくなっていた。また、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57、61、64)。

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り、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。死亡牛の組織学的検査により、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65)。

周産期後、牛及び豚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との間で差異が認められないとする報告がある（参照66、4、67、68、69、70）。

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対照牛と比較して相似性が高かった（参照34）。

体細胞クローン牛の成育について、対照牛の値と同等か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61、11、71、72）。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40、73）。

体細胞クローン牛のと畜検査及び病理組織学的所見は、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）の組織像において、構造的な異常所見は認められなかった（参照74）。

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解剖した結果、解剖所見では子宮角の変色・低形成、卵巣静止が確認された。また、同牛の病性鑑定では子宮の動脈中膜に石灰沈着が多く、内膜に異常に多いことが観察された（参照75）。

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 歳齢で健常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57、76、4）、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77）や寿命は変化しないという報告（参照78）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対照群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、69）。

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細胞の割合が対照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抑制状態に陥る可能性があることが指摘されている（参照79、69）。

（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34）。

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80、81、76、82、71、83、84）。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85、86、87、81）。

出生時体重が重い高齢の体細胞クローン雄牛においても、その精液性状及び繁殖能力は正常であることが確認され（参照88）、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89）。

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）、卵細胞刺激ホルモン（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対照牛との間で類似していた（参照90、76）。

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対照牛より春機発

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牛、人工授精牛ともに、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91）。

2頭の26ヶ月齢体細胞クローン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59）。

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92、56、49、93、91、94）。

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90、95、61、88、11、96）。

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94）。

体細胞クローン牛の泌乳成績は、対照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39）。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97）。

（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と考えられている（参照98）。

体細胞クローン豚の胎子死亡率に関する報告は少ないものの、1頭あたり100～300個の体細胞クローン胚に加え、100個の体外受精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99）。同様に、1頭あたり100個以上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100、101）。

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り、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98、102）。

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

以後に胎子の死亡が報告されており、死亡率は 9.2%とされている（参照103）。

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34）。

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、剖検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みられる異常である。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、104、105、106、107）。

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100、108）。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109）。

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数頭の豚では子宮内発育遅延が増加している。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）と比較すると、1 腹当たりの子宮内発育遅延が増加していることが分かった（参照109）。

また、顆粒膜細胞をドナー細胞として用い、5 頭の生存体細胞クローン豚が生産された。妊娠 116 日目に帝王切開により娩出した。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101）。

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解剖・病理検査の結果、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59）。

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健康問題のため、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。しかし、この試験では感染症による影響を除外できなかったとされている（参照105）。

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されている（参照110）。

2 種類の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後に、急性反応（コルチゾル、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 ）を調査したところ、対照群に比べ、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104）。

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59）。

3～5 週齢の体細胞クローン豚の体重は、対照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108）。

15 及び 27 週齢の体細胞クローン豚の研究では、対照と比較して発育、健康、臨床化学及び免疫機能に関して差が認められないことを示している（参照111、112）。

体細胞クローン豚は対照と比較し、行動、健康において著しい違いはない。年齢に応じた生理反応（例えば、アルカリホスファターゼ、血清タンパク）の測定で、体細胞クローン豚は正常であった。角化不全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、発生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113、114）。

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、対照と著しい差異は認められていない（参照34）。

④春機発動後の成熟及び加齢期

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106）。

体細胞クローン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週齢時とも対照に比べ低値であった（参照108）。

体細胞クローン雌豚で得られた受胎率は対照と同等であった（参照115、106）。

人工授精により体細胞クローン雄豚を交配し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（1.6%）の割合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。対照群の死産率は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。雄豚からの精液の評価では、対照と同等の精液量、精液濃度、運動性を示した（参照115）。

Viagen社のデータから体細胞クローン豚は、1頭のみ出生後及び解体処理前のIGF-Iが対照群よりも低かったが、他は対照群の変動の範囲内であった。また、エストラジオール-17 β レベルも低かったが、対照群の変動の範囲内であった。正常期間内に出荷体重に達したことから、成長率や生殖能に対する内分泌の違いの変動の影響は不明である（参照67）。

（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

体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚について、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、体細胞クローン技術を用いて産出された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組織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、一方で対照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、体細胞クローン技術を用いて産出された豚については、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

体細胞クローン技術を用いて産出された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、体細胞クローン技術を用いて産出された牛については、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ヶ月齢を越えると従来の繁殖技術による牛と同様に健常に発育する。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に不安定な牛及び豚が認められるものの、それらは成長とともに回復し、健常となる。

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差異のない健全性を有すると認められた。

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

体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚の後代（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。

体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚の後代とは、体細胞クローン技術を用いて産出された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、対象牛 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、解剖・病理検査が行われ、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、外観的に健康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、解剖・病理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学検査及び血液生化学検査の結果、バラツキは見られたものの対照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34）。

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、その生存率は対照とほとんど変わることはなかった（参照61）。

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69）。

移植後 252 日目に死産した体細胞クローン牛の後代について、解剖・病理検査の結果、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92）。

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（参照116、92）。

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116）。

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117）。

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82）。

体細胞クローン牛の後代（雌）に人工授精を実施した。また、採卵し、体外受精卵を他の雌に移植したところ、どちらも産子を出産し、現時点では通常の産子と変わらず、どちらも順調な発育をしている。また、特に肺炎や下痢等の疾病に対する抵抗性にも異常は認められなかった（参照97）。

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118）。

ホルスタイン種の体細胞クローン牛の後代（雌）について、黒毛和種精液を用いた人工授精により産子を出している（参照75）。

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119）。

（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学検査及び血液生化学検査の結果、測定値の分布範囲は対象群のものとはほぼ同様であり、体重増加も対照群や標準的な成長曲線とはほぼ同等であった(参照34)。

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対照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120)。

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を除き、対照群と比較して正常変動の範囲内であった(参照112)。

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、対照群に比べ、健康状態又は死亡率に差異は認められなかった(参照121、67)。

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、対照豚と同様の発育を示した(参照122)。

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対照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122)。

体細胞クローン豚の後代は、対照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123)。

(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

体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚の後代(F1)において、体細胞クローン技術を用いて産出された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。

体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚の後代は、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。

Ⅲ. 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）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、通常の有性生殖における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124）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125、126、127、128、129）、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130、131、132、133、134）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-メチルシトシン塩基が生成される反応である。遺伝子の5'上流域にあるシトシン-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135）。

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、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126、136）。

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137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147）。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148、149、149）。

3. 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150）。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（参照150）。そのため、牛クローン桑実胚（morula）では、より高度のメチル化が認められた。

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152）。

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153）。

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154）。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れと考えられた。

（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155）。

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156）。

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157）。

牛体細胞クローン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考えられている（参照158）。

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 cytokeratin）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159）。

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160）。

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161）。

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162）。

（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8）。

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 ヶ所中わずか 3 ヶ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163）。

健康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象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111）。

（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164）。

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析により、牛体細胞クローン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165）。

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166）。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167）。

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168）。

牛体細胞クローン胚では、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169）

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170）。

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171)。

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172)。

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173)。

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174)。

(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175)。

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155)。

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176)。

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177)。

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析により、牛体細胞クローン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178)。

(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8)。

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康な成牛について、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179)。

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180)。

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181)。

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182)。

(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、重要な点として、ドナー細胞のタイプや性質(参照169、183)、細胞周期(参照167)、培養条件(参照167、184)、染色体安定性(参照185、186)、レシピエントである卵母細胞の

採取時期（参照187）や採取後の時間（参照188）、細胞周期（参照189）、細胞融合時の活性化のタイミング（参照167）、クローン胚の培養条件（参照167）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190、191）。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192、193、78）。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118）。これらのことから体細胞クローンの次世代以降は、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193、194）。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195）。

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196、86、197、198、199、48）、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196）。

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200）。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201）。

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118）。

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202）。

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つ

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203）。

（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リ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たないため、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204、205、206）。

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（ドナー核とレシピエント細胞のmtDNAが同じ）であるか、軽度のヘテロプラスミー（ドナー由来の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207）。

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208）。

（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、ドナー核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209）。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210）。

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、同等又は長かつ

たとえられる（参照210、211、212、213、214、215、216）。

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118）。

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209、217、218、214）。

一方、テロメラゼは、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ゼは、胚の形成期に活性化している。テロメラ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219、216、220）。

牛胎子線維芽細胞のテロメラゼ活性は、成体由来線維芽細胞よりもはるかに高いが、ES様細胞に比較すると著しく低い。牛胎子線維芽細胞のテロメラゼ活性は、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210）。

牛とマウスでは、桑実胚から胚盤胞への時期に、テロメラゼ依存性のテロメア伸長が認められている（参照221）。

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222）。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128）。

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、通常の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強いため）、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うま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。

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ゲノム 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。

<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 Codex Alimentarius, Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Animals, 2008; CAC/GL 68
- 7 (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
- 8 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
- 9 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
- 10 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
- 11 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
- 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 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
- 23 Farin PW, Crosier AE, Farin CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 2001; 55: 151-170
- 24 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
- 25 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
- 26 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
- 27 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
- 28 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
- 29 Block J, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Ocon OM, Krininger CE, III, Liu J, Hansen PJ. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *J Anim Sci* 2003; 81: 1590-1602
- 30 Forsyth JT, Wells DN. Health and neonatal care of bovine clones. *Methods Mol Biol* 2006; 348: 91-108
- 31 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
- 32 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
- 33 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
- 34 (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

- 35 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
- 36 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
- 37 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
- 38 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
- 39 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
- 40 長谷川 清寿、佐々木 恵美、安部 亜津子、高仁 敏光. 黒毛和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
- 41 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
- 42 Kruip T, den Daas JHG. In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. Theriogenology 1997; 47: 43-52
- 43 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
- 44 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
- 45 USDA/NAHMS 1997 (<http://nahms.aphis.usda.gov/>)
- 46 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
- 47 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
- 48 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
- 49 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
- 50 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
- 51 Galli, C., Duchi, R., Moor, R. M. and Lazzari, G.. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning* 1999; 1 (3): 161-70
- 52 Young LE, Fairburn HR. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology* 2000; 53: 627-648
- 53 Bertolini M, Anderson GB. The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology* 2002; 57: 181-187
- 54 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
- 55 Matsuzaki M, Shiga K. Endocrine characteristics of cloned calves. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 261-267
- 56 (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
- 57 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
- 58 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
- 59 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
- 60 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 E, The Cyagra Dataset, 2008
- 61 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
- 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 USDA/NAHMS 1994 (<http://nahms.aphis.usda.gov/>)

- 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 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
- 66 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
- 67 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
- 68 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
- 69 Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., Fromentin, G., Berthelot, V., Jurie, C., Bas, P., Dubarry, M., Mialot, J. P., Remy, D., Richard, C., Martignat, L., Vignon, X. and Renard, J. P. Quality and safety of bovine clones and their products. *Animal* 2007; (1): 963-972
- 70 Watanabe, S. and Nagai, T. Health status and productive performance of somatic cell cloned cattle and their offspring produced in Japan. *The Journal of reproduction and development* 54 (2): 2008 (1):6-17
- 71 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
- 72 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
- 73 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
- 74 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
- 75 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
- 76 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
- 77 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
- 78 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
- 79 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
- 80 Wells DN. Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech* 2005; 24: 251-264
- 81 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
- 82 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
- 83 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
- 84 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
- 85 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
- 86 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
- 87 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
- 88 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
- 89 鶴田 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
- 90 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
- 91 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
- 92 山口 大輔、根本 聡美、渡辺 晃行、菰澤 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
 - 93 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
 - 94 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
 - 95 Forsberg EJ, Strelchenko NS, Augenstein ML, Betthauser JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsythe TM, Golueke PJ, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pace MM, Pfister-Genskow M, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD. Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biol Reprod* 2002; 67: 327-333
 - 96 Tecirlioglu, R. T. and Trounson, A. O.. Embryonic stem cells in companion animals (horses, dogs and cats): present status and future prospects. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19 (6): 740-7
 - 97 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
 - 98 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
 - 99 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
 - 100 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
 - 101 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
 - 102 Dziuk P. Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. *J Reprod Fertil Suppl* 1985; 33: 57-63
 - 103 van der LT, van Rens BT. Critical periods for foetal mortality in gilts

- ified fetuses and frequency of non-fresh stillborn piglets. *Anim Reprod Sci* 2003; 75: 141-150
- 104 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
- 105 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
- 106 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
- 107 Du, Y., Kragh, P. M., Zhang, Y., Li, J., Schmidt, M., Bogh, I. B., Zhang, X., Purup, S., Jorgensen, A. L., Pedersen, A. M., Villemoes, K., Yang, H., Bolund, L. and Vajta, G.. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation. *Theriogenology* 2007; 68 (8): 1104-1110
- 108 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
- 109 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
- 110 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
- 111 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; 69: 430-436
- 112 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
- 113 Archer GS, Friend TH, Piedrahita J, Nevill CH, Walker S. Behavioral variation among cloned pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 2003; 82: 151-161
- 114 Archer, G. S., Friend, T. H., Piedrahita, J., Nevill, C. H. and Walker, S.. Behavioral variation among cloned pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 2003; 81 (4): 321

- 115 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
- 116 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
- 117 (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
- 118 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
- 119 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
- 120 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
- 121 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
- 122 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
- 123 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
- 124 Riggs A.D, Martienssen R.A, and Russo, V.E.A. In introduction, Riggs, A. D. Martienssen, R. A. Russo V. E. A. (eds), *Epigenetic mechanisms of gene regulation*, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY, 1996; 1-4
- 125 Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21
- 126 Shiota, K. and Yanagimachi, R.. Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals. *Differentiation* 2002; 69 (4-5): 162-166
- 127 Jaenisch R. Human cloning - the science and ethics of nuclear transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351: 2787-2791
- 128 Holliday R. DNA methylation and epigenotypes. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70: 500-504

- 129 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
- 130 Kanka J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology* 2003; 59: 3-19
- 131 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
- 132 Cheung P, Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 563-573
- 133 Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15: 490-495
- 134 Verschure PJ, van dK, I, de Leeuw W, van d, V, 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
- 135 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
- 136 Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; 14 Spec No 1: R47-R58
- 137 Rideout WM, III, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; 293: 1093-1098
- 138 Jaenisch R, Eggan K, Humpherys D, Rideout W, Hochedlinger K. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 389-396
- 139 Mann MR, Bartolomei MS. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol* 2002; 3: REVIEWS1003
- 140 Cezar GG. Epigenetic reprogramming of cloned animals. *Cloning Stem Cells* 2003; 5: 165-180
- 141 Han YM, Kang YK, Koo DB, Lee KK. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology* 2003; 59: 33-44
- 142 Jouneau A, Renard JP. Reprogramming in nuclear transfer. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 486-491
- 143 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
- 144 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

- 145 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
- 146 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
- 147 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
- 148 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
- 149 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
- 150 Powell K. Fertility treatments: Seeds of doubt. *Nature.* 2003; 422 (6933): 656-658
- 151 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
- 152 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
- 153 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
- 154 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
- 155 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
- 156 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
- 157 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
 - 158 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
 - 159 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
 - 160 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
 - 161 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
 - 162 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
 - 163 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
 - 164 Wrenzycki, C., Lucas-Hahn, A., Herrmann, D., Lemme, E., Korsawe, K. and 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
 - 165 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
 - 166 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
 - 167 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
 - 168 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
- 169 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
 - 170 Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W., 3rd, Yanagimachi, R. and Jaenisch, R.. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* 2000; 290 (5496): 1578-1581
 - 171 Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin KJ. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev* 2002; 16: 1209-1219
 - 172 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
 - 173 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
 - 174 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
 - 175 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
 - 176 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
 - 177 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
 - 178 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
 - 179 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
- 180 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
- 181 Senda, S., Wakayama, T., Yamazaki, Y., Ohgane, J., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R. and Shiota, K.. Skewed X-inactivation in cloned mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321 (1): 38-44
- 182 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
- 183 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
- 184 Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod* 2006; 74: 46-57
- 185 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
- 186 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
- 187 Camargo, L. S., Viana, J. H., Sa, W. F., Ferreira, A. M. and Vale Filho, V. R.. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. *Anim Reprod Sci* 2005; 85 (1-2): 53-59
- 188 Liu G, Kato Y, Tsunoda Y. Aging of Recipient Oocytes Reduces the Development of Cloned Embryos Receiving Cumulus Cells. *J Reprod Dev* 2007
- 189 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
- 190 Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Beedle, A. S.. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol* 2007; 19 (1): 1-19
- 191 Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Beedle, A. S.. Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. *Bioessays* 2007; 29 (2): 145-54
- 192 Shimozawa 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

- amazaki 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
- 194 Fulka J, Jr., Miyashita N, Nagai T, Ogura A. Do cloned mammals skip a reprogramming step? *Nat Biotechnol* 2004; 22: 25-26
- 195 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
- 196 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
- 197 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
- 198 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
- 199 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
- 200 Booth, P. J., Viuff, D., Tan, S., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H.. Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. *Biol Reprod* 2003; 68 (3): 922-928
- 201 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
- 202 Yanagimachi R. Cloning: experience from the mouse and other animals. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 241-248
- 203 Balbach, S. T., Jauch, A., Bohm-Steuer, B., Cavaleri, F. M., Han, Y. M. and Boiani, M.. Chromosome stability differs in cloned mouse embryos and derivative ES cells. *Dev Biol* 2007; 308 (2): 309-321
- 204 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
- 205 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

- 206 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
- 207 Hiendleder S. Mitochondrial DNA inheritance after SCNT. *Adv Exp Med Biol* 2007; 591: 103-116
- 208 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
- 209 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
- 210 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
- 211 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
- 212 Tian XC, Xu J, Yang X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat Genet* 2000; 26: 272-273
- 213 Jiang L, Carter DB, Xu J, Yang X, Prather RS, Tian XC. Telomere lengths in cloned transgenic pigs. *Biol Reprod* 2004; 70: 1589-1593
- 214 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
- 215 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
- 216 Schaetzlein S, Rudolph KL. Telomere length regulation during cloning, embryogenesis and ageing. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 85-96
- 217 Kuhholzer-Cabot B, Brem G. Aging of animals produced by somatic cell nuclear transfer. *Exp Gerontol* 2002; 37: 1317-1323
- 218 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
- 219 Xu J, Yang X. Will cloned animals suffer premature aging--the story at the end of clones' chromosomes. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 105
- 220 Betts DH, King WA. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 2001; 55: 171-191

- 221 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
- 222 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
- 223 Beaujean N, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 2004; 71: 185-193