

## 育種改良を目的としたクローン家畜生産技術の応用に関する研究

戸田尚美・赤上正貴<sup>1)</sup>・足立憲隆・山口大輔<sup>2)</sup>・赤木悟史<sup>3)</sup>・高橋清也<sup>3)</sup>・渡辺伸也<sup>3)</sup>・久保正法<sup>4)</sup>

A study of cloned animal production aimed for breeding

Naomi TODA, Masataka AKAGAMI<sup>1)</sup>, Noritaka ADACHI, Daisuke YAMAGUCHI<sup>2)</sup>, Satoshi AKAGI<sup>3)</sup>,  
Seiya TAKAHASHI<sup>3)</sup>, Shinya WATANABE<sup>3)</sup> and Masanori KUBO<sup>4)</sup>

### 要 約

体細胞クローン技術は高能力な家畜の複製，育種改良の効率化や遺伝資源の保存に利用できる技術として期待されている。そこで，種雄牛候補の体細胞を用いて生産したクローン牛について肥育試験を実施し，発育の正常性と産肉能力について調査し，種雄牛候補の後代検定牛の成績と比較した。またクローン牛を作出する際，クローン胚3個を接着させて1個にする集合法による作出を試みた。その結果，8細胞期の核移植胚3個を集合させることで，細胞数の増加，発生能および受胎能が改善し，クローン産子の作出効率が向上することが示唆された。作出された体細胞クローン牛の発育は正常範囲内であり，発育過程において特異な点は見当たらず，肥育してと畜した際，主要な臓器について病理組織学的検査を実施したが異常所見は認められなかった。またクローン牛は後代検定牛と同等の産肉能力を有しており，枝肉の一般成分およびアミノ酸比率も通常の牛肉とほぼ変わらなかった。

クローン検定とステーション式後代検定のコスト計算を行ったところ，費用のみを比較するとクローン検定は低コストであるが，後代検定牛を市場出荷して得られる利益を計算に入れるとクローン検定はコスト高になり，現状の作出効率では後代検定より低コストとはならない。体細胞クローン牛は種雄牛の産肉能力検定に活用できる可能性が示されたが，実用化にはクローン牛の生産効率の改善と市場出荷が認められる社会的条件整備が必要である。

キーワード：体細胞クローン牛，クローン検定，集合法，肥育試験

### 緒 言

体細胞クローン技術は同一遺伝形質を持つ動物を生産できる技術として期待されている。畜産分野においては，ドナー牛との遺伝的相同性や発現形質におけるクローン牛同士の相似性および斉一性を利用した優良雌牛の増産や種雄牛造成の効率化などへの応用が考えられており，その中でも黒毛和種種雄牛候補の産肉検定利用への検討が多く行われている<sup>1)</sup>。

体細胞クローン牛の検定では，種雄牛候補の細胞を早い時期に採取し，これを用いてクローン牛を誕生させ，肥育することで候補牛自身の産肉能力を推定することができる。1頭のクローン牛を解体して検定するクローン検定は，7頭で行う後代検定に相当することが示されており<sup>2)</sup>，体細胞クローン牛を活用した種雄牛造成を行うことにより，間接検定の頭数を減らせ，検定牛の買い上げや飼養管理等に係るコスト削減にもつながる<sup>3)</sup>とされている。そこで，当センターでは平成12年度から体細胞クローン牛及び豚の生産に係わる技術的課題を検討し，その生産および正常性の調査を試みてきた<sup>4)</sup>。本研究では，クローン技術が肉牛の育種改良における検定に利用可能か検証するために，和牛種雄牛候補の体細胞クローン牛1頭を生産した<sup>5)</sup>。クローン胚の作出では，生産効率を改善するために「集合法」を検討した。生産され

- 1) 茨城県鹿行家畜保健衛生所
- 2) 茨城県北家畜保健衛生所
- 3) 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所
- 4) 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 疫学研究チーム

たクローン牛について、成長の正常性およびと畜した際の枝肉についてアミノ酸および脂肪成分の分析を行い、クローン検定と通常の後代検定にかかる費用の比較も含め、クローン検定の有効性について検討したので報告する。

## 材料および方法

### 1 クローン牛の作出

#### 1) 成熟培養

食肉処理場由来牛卵巣の直径 5mm 以下の小卵胞から、18G 注射針をつけたシリンジで卵丘細胞 - 卵子複合体を吸引した。卵子の周囲に卵丘細胞が密に付着した A ランク卵子のみを選別し、成熟培養を行った。成熟培養は、10%ウシ胎児血清(以下、FBS)を加えた TCM-199 で 38.5°C、5% CO<sub>2</sub> で 20 時間行った。

#### 2) 卵子裸化および除核

成熟培養した卵丘細胞 - 卵子複合体の卵丘細胞を、0.1% hyaluronidase 液中でピペッティング操作により除去し、卵子を裸化した。これらの裸化卵子のうち、第一極体を放出し、細胞質の均一なもののみを除核した。除核は、20% FBS を加えた TCM-199 を操作培地とし、透明帯切開後、極体とその周辺の細胞を押し出す方法で行った。押し出した部分をヘキスト染色液 (10 μg/ml Hoechst33342 を加えた PBS) で染色し、紫外線励起下で極体および核が発光しているものを除核されたと判定し、レシピエント卵子として用いた。

#### 3) ドナー細胞の準備

茨城県肉用牛研究所に繋養されている種雄牛候補「明安の 2」の耳由来線維線維芽細胞を、5~7 日間血清飢餓培養を行ったものを使用した。

#### 4) 細胞融合

レシピエント卵子の成熟培養開始から 24 時間後を目安に、融合用 2 本の電極でレシピエント卵子とドナー細胞を軽く挟み、電氣的融合を行った。融合液は Zimmerman Mammalian Cell Fusion Medium を用いた。融合条件は直流パルスで 25V/150 μm · 10 μsec × 1 回とした。

#### 5) 活性化処理および発生培養

融合処理後、融合した卵子を 10% FBS、10 μg/ml cycloheximide および 2.5 μg/ml cytochalasin D を加えた TCM-199 に 1 時間、その後 10% FBS、10 μg/ml cycloheximide を加えた Tissue Culture Medium-199 (GIBCO 社: 以下 TCM-199) で 4 時間活

性化処理を行った。その後裸化受精卵培養液 IVD-101 (機能ペプチド研: 以下 IVD-101) において気相条件 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> で 2~3 日間培養した。

#### 6) 集合胚の作出

集合胚の作出は、赤木らの報告<sup>6)</sup>に準じて行った。すなわち、核移植後 2 日目の 8 細胞期胚を、0.5% pronase で 10~15 分間処理して透明帯を除去した。50 μg/ml phytohemagglutinin を加えた TCM-199 のドロップ内において、透明帯を除去した胚 3 個を、培養シャーレの底面に針で作った“くぼみ”の中に入れて 20 分間接着させた(図 1)。その後、IVD-101 のドロップ内において、上記と同様に作ったくぼみに接着した胚を移動し、気相条件 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> でさらに 5~6 日間培養した。また、集合処理を行わなかった核移植胚を、上記と同じ条件で培養して対照区とした。

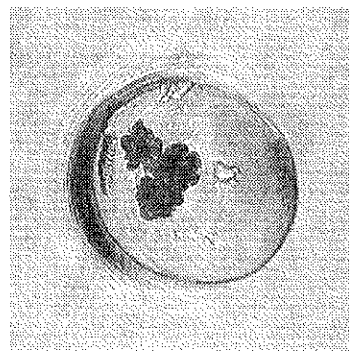


写真 1 胚 3 個による集合胚作出

#### 7) 細胞数の測定

核移植後 7~8 日目における内部細胞塊 (Inner Cell Mass: 以下 ICM) の細胞数および総細胞数の測定は、赤木らの報告<sup>7)</sup>に準じて二重免疫染色法により行った。

#### 8) ガラス化保存

作出した集合胚の保存および融解は、渡辺らの報告<sup>8)</sup>に準じてアルミプレートガラス化法により行った。なお移植する際には、融解後に生存を確認するため、IVD-101 で 6~18 時間培養し、形態的に正常と判定された胚を移植した。

#### 8) 移植

受胎牛は、(独)畜産草地研究所あるいは当センターで繋養している黒毛和種および交雑種の経産牛を用いた。発情終了後 7~8 日目に、形態的に正常と判定したクローン胚を新鮮胚あるいはガラス化胚で 1 頭につき 1 胚移植した。妊娠診断は移

植後 30～40 日目に超音波診断装置を用いて行った。

### 9) 分娩

クローン牛の分娩は、分娩時の事故を防ぐため、分娩予定日翌日もしくは2日前に金山らの方法<sup>9)</sup>に準じて受胎牛に分娩誘起を行った。

### 2 肥育試験およびと畜時の状況

肥育試験は(社)全国和牛登録協会産肉能力検定法に準じて、8ヶ月齢から27ヶ月齢まで茨城県肉用牛研究所の慣行法により行った。調査項目は体重、体高で、体重は肥育開始から終了まで4週間に1回、その他については8週間に1回測定した。また、「明安の2」の後代検定牛6頭(去勢3頭、雌3頭)を最長28ヶ月齢までクローン牛と同様に肥育し、調査を行った。クローン牛についてはと畜時に通常の食肉衛生検査を実施した後、主要臓器の剖検及び組織の採材を行いホルマリン材料を作製し、(独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所疾病診断室に病理組織学的検査を依頼した。

### 3 産肉成績および肉質成分の分析

クローン牛についてはと畜時に通常の食肉衛生検査を実施した後、主要臓器の剖検及び組織の採材を行いホルマリン材料を作製し、(独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所疾病診断室に病理組織学的検査を依頼した。枝肉成績についてはクローン牛および「明安の2」の後代検定牛15頭(去勢8頭、雌7頭)について(社)日本食肉格付協会が実施した枝肉格付結果を用いて評価した。クローン牛の枝肉の一般成分分析、総アミノ酸組成の分析、脂肪酸組成の分析は(株)つくば食品センターに依頼した。格付および成分分析の採材はと畜後1週間に実施し、採材は第6～7肋間の胸最長筋部分で行った。

### 4 クローン検定と後代検定のコスト比較

今回クローン牛で行った1頭によるクローン検定と、茨城県肉用研究所で行っている後代牛8頭による慣行法の後代検定(ステーション式)の費用を比較した。クローン牛については受胎牛の性周期の同期化、クローン胚の作製の時点から、後代牛については子牛市場で購入時点から計算した。クローン牛は検定中、後代検定の検定牛と同様の使用方法・条件であり、検定終了後も後代検定

牛同様と殺したため、検定期間中の飼料・資材費およびと畜費用などは同じとした。

## 結果および考察

### 1 クローン牛の作出

集合胚の体外発生成績を表1に示した。非集合処理区では、61個の8細胞期胚から34個の胚盤胞が得られたのに対し(55.7%)、集合処理区では60個の8細胞期胚から20個の集合胚を作出したところ、うち19個の胚盤胞が得られ(95.0%)、有意に高い発生率を示した( $p < 0.01$ )。

表1 集合処理が体外発生に及ぼす影響

区	8細胞期胚数 (個)	集合胚数 (個)	胚盤胞数 (個)	発生率 (%)
非集合処理区	61	—	34	55.7 <sup>A</sup>
集合処理区	60	20	19	95.0 <sup>B</sup>

異符号間に有意差有り(<sup>A,B</sup> $< 0.01$ )

集合処理区の1個あたりの平均総細胞数、ICM細胞数およびICM構成率を調査した結果を表2に示した。総細胞数では、非集合処理区が95個であったのに対し、集合処理区では172個と有意に増加した( $p < 0.01$ )。ICM細胞数では、非集合処理区が36個であったのに対し、集合処理区では65個と有意に増加した( $p < 0.05$ )。ICM構成率はいずれの区も38%と差は認められなかった。

表2 集合処理が細胞数に及ぼす影響

区	胚盤胞数 (個)	総細胞数 (個)	ICM細胞数 (個)	ICM構成率 (%)
非集合処理区	17	95 ± 39 <sup>A</sup>	36 ± 15 <sup>a</sup>	38.3 ± 11.5
集合処理区	11	172 ± 77 <sup>B</sup>	65 ± 39 <sup>b</sup>	38.0 ± 21.0

異符号間に有意差有り(<sup>A,B</sup> $< 0.01$ , <sup>a,b</sup> $< 0.05$ )

集合処理が受胎成績に及ぼす影響としては、非集合処理区では、10頭の受胎牛に移植したところ3頭が受胎したが(30.0%)、いずれも90日以内に流産した。集合処理区では6頭の受胎牛に移植したところ4頭が受胎し(66.7%)、有意な差は認められないものの、受胎率が高い傾向を示した。うち3頭は90日以内に流産したが、1頭が妊娠期

間 287 日目に 36.7kg のクローン産子を分娩した。

本研究では、クローン牛を効率的に作出することを目的に、集合胚の発生能、細胞数および受胎能について調査し、その有効性について検討した。牛におけるクローン技術に集合法を応用した報告は少ないが、赤木らは、3 個の 8 細胞期胚を集合させたところ、総細胞数<sup>6)</sup>、<sup>10)</sup>および ICM 構成率<sup>6)</sup>が有意に増加したと報告している。橋本ら<sup>10)</sup>は、有意な差は認められないものの、集合胚の総細胞数は通常の核移植胚と比較して多い傾向にあり、受胎率についても 80.0%と高い傾向を示したと報告している。

Boiani ら<sup>12)</sup>は、マウスにおいて核移植胚を 2 個集合させたところ、胚の細胞数が増加し、受胎率数が向上したと報告している。その要因として、核移植胚は細胞数が少なく、細胞間の情報伝達が不足していることが考えられることから、核移植胚を複数個集合させて細胞数を増加させることで、情報伝達不足を補うことができ、その結果として発生能および受胎能の向上につながる可能性があるとして示唆している。

今回の我々の試験では、通常の核移植胚では 55.7%の発生率であったのに対し、集合胚では 95.0%と有意に高い発生率を示した。ICM 構成率は差が認められなかったものの、集合胚の総細胞数および ICM 細胞数は有意に増加した。受胎率については、通常の核移植胚では 30.0%であったのに対し、集合胚では 66.7%と高い傾向を示した。上述の報告を加味すると、これらの結果は、核移植胚を集合させることで細胞数が増加し、それにともない細胞間の情報伝達が補われ、核移植胚の発生能および受胎能が向上したことを示すと考えられた。

以上のことから、8 細胞期の核移植胚 3 個を集合法により集合させ、1 個の集合胚として発生させることで、細胞数の増加、発生能および受胎能が改善し、クローン産子の作出効率が向上することが示唆された。

## 2 肥育試験およびと畜時の状況

クローン牛、後代検定牛および日本飼養標準黒毛和種去勢牛の体重の推移を図 1 に示した。試験開始 40 週まではクローン牛は後代検定牛の平均値より低く推移したが、それ以降は上回った。しかし後代検定牛の上限および下限の範囲内から逸脱することはなかった。日本飼養標準の発育値と

比較するとクローン牛は試験開始後 8、12 週のみ下限を下回ったが、その他の期間は上限および下限の範囲内を推移した。

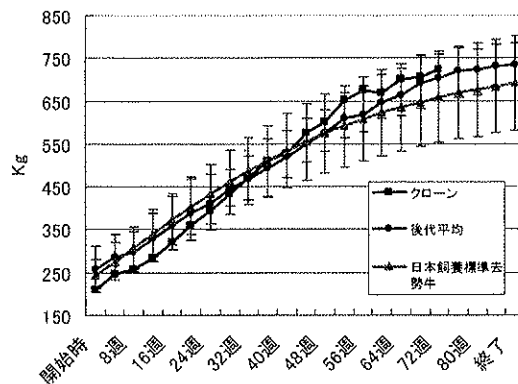


図 1 クローン、後代検定、日本飼養標準去勢牛の体重の推移

クローン牛、後代検定牛および日本飼養標準の黒毛和種去勢牛の体高の推移を図 2 に示した。クローン牛は試験開始 40 週までは後代検定牛 6 頭の上限・下限の範囲内から逸脱することはなかったが、それ以降は上限を上回った。日本飼養標準の発育曲線と比較するとクローン牛は発育試験のすべての期間において上限・下限の範囲内を推移した。

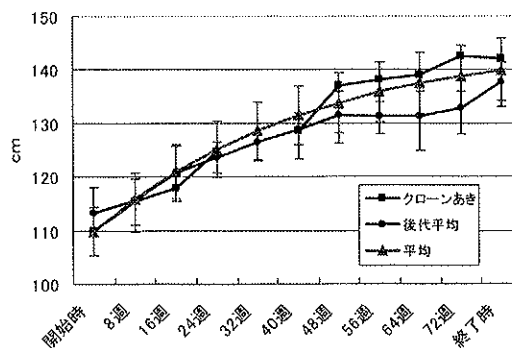


図 2 クローン、後代検定、日本飼養標準去勢牛の体高の推移

クローン牛 (写真 2) は外観上健康でと畜検査で特に異常は認められず、病理組織学的検査においても問題となるような病変は見つからなかった。

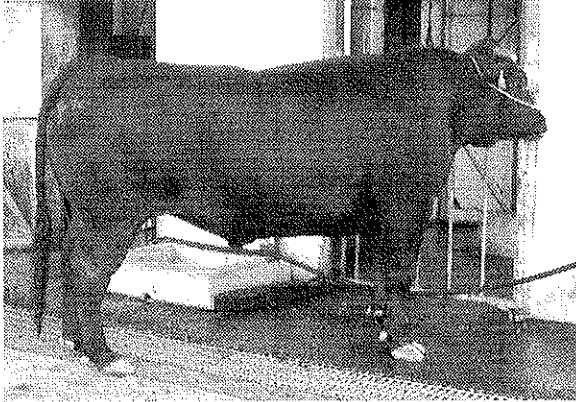


写真2 と畜時のクローン牛

発育能力については、黒毛和種去勢の標準と比較した場合、肥育開始直後は体重・体高とも小さい傾向が認められたが、その後は順調に成長し、発育能力は正常と考えられた。

後代検定牛と比較すると、試験開始40週まで体重はその平均値未満、体高はその最大値未満であったが、それ以降急に成長し、体高については後代検定牛の最大値より大きくなった。

クローン牛の発育調査に関してはいくつかの報告がなされており、その多くはクローン牛の発育は正常範囲内であり、発育過程において特異な点は見当たらないと報告している<sup>13)</sup>。今回の肥育試験においてもクローン牛の発育は標準的であることが示唆された。また、後代検定牛の発育と比較してもクローン牛は若干発育が遅い傾向はあるものの、ほぼ等しいといえることがわかった。

長谷川らは体細胞クローン去勢肥育牛をと畜した際、主要な臓器について病理組織学的検査を実施し、異常所見は認められなかったことを報告している<sup>14)</sup>が、今回の調査においても異常は見られなかった。

### 3 産肉成績および肉質成分の分析

クローン牛、後代検定牛の枝肉成績を表3に示した。後代検定牛の平均値と比較するとクローン牛のロース芯面積は約4割程大きく、皮下脂肪厚は3分の2程であった。推定歩留は後代検定牛15頭の最大値よりも高い値であった。枝肉重量、脂肪交雑(BMS No.)については後代検定牛より若干大きめ、バラの厚さについては少なめであったが、最大と最小の範囲内であった。また、クローン牛の格付はA-4であり、後代検定牛の平均とほぼ同

等であった。

表3 クローン牛と後代検定牛の枝肉成績

調査項目	後代検定牛(n=15)			クローン牛
	平均	最小値	最大値	
枝肉重量 kg	470.7	415.5	594.0	508.5
ロース芯面積 m <sup>2</sup>	54.7	45.0	68.0	77.0
バラの厚さ cm	8.0	6.0	10.4	7.7
皮下脂肪厚 cm	2.3	1.3	3.8	1.5
推定歩留 %	74.0	72.9	75.8	76.8
脂肪交雑 BMS No.	5.7	2.0	9.0	7
格付 A-1~5	3.6	2.0	5.0	4

クローン牛の枝肉一般成分率を表4、総アミノ酸に対するアミノ酸比率を表5、総脂肪酸に対する脂肪酸組成を表6に示した。

表4 枝肉の一般成分値

項目	①クローン牛 (100g中)	②日本食品 標準成分表 (100g中)	①/②
エネルギー(kcal)	467	452	103.3%
水分(g)	41.7	44	94.8%
たんぱく質(g)	10.5	13.2	79.5%
脂質(g)	47.1	42	112.1%
炭水化物(g)	0.2	0.2	100.0%
灰分(g)	0.5	-	-

①は赤肉部分、②は和牛・リブローズ皮下脂肪なし・生

日本食品標準成分表の値と比べると若干脂質が多くたんぱく質が少ないが、ほぼ等しい成分結果となった。

表 5 総アミノ酸に対するアミノ酸比率

項目	①クローン牛(%)	②日本食品標準成分表(%)	①/②
イソロイシン	4.55	4.79	94.9%
ロイシン	8.34	8.63	96.6%
リジン	9.19	9.44	97.4%
メチオニン	3.13	2.88	108.7%
シスチン	1.23	1.20	103.0%
フェニルアラニン	4.45	4.16	107.2%
チロシン	3.32	3.35	98.9%
スレオニン	4.55	4.79	94.9%
トリプトファン	1.04	1.13	92.4%
バリン	5.12	4.95	103.3%
ヒスチジン	3.60	4.16	86.6%
アルギニン	6.54	6.39	102.3%
アラニン	6.16	6.07	101.4%
アスパラギン酸	9.10	9.75	93.3%
グルタミン酸	15.26	15.83	96.4%
グリシン	5.69	4.32	131.8%
プロリン	4.64	4.00	116.2%
セリン	4.08	4.16	98.0%

①は赤肉部分、②は和牛・リブローズ皮下脂肪なし・生

アミノ比率はグルタミン酸が最も多く次いで、リジン、アスパラギン酸の順で比率も日本食品標準成分表の数値とほぼ変わらなかった。

表 6 総脂肪酸に対する脂肪酸比率

項目	①クローン牛(%)	②日本食品標準成分表(%)	①/②	
C12:0	C12:0ラウリン酸	0.1	0.1	100%
C14:0	ミリスチン酸	2.9	2.9	100%
C14:1	ミリストレイン酸	1.4	0.9	156%
C15:0	ペンタデカン酸	0.4	0.3	133%
C16:0	パルミチン酸	24.7	28.7	86%
C16:1	パルミトレイン酸	5.5	4.8	115%
C17:0	ヘプタデカン酸	1.4	0.7	200%
C17:1	ヘプタデセン酸	1.0	0.7	143%
C18:0	ステアリン酸	8.3	12.4	67%
C18:1	オレイン酸	49.7	46.2	108%
C18:2	n-6リノール酸	3.6	1.6	225%
C18:3	n-3 $\alpha$ -リノレン酸	0.2	0.0	-
C20:0	アラキジン酸	0.1	0.1	100%
C20:1	イコセン酸	0.5	0.4	125%
C20:3	n-6イコサトリエン酸	0.1	0.1	100%
C20:4	n-6アラキドン酸	0.1	0.0	-

①は赤肉部分、②は和牛・リブローズ皮下脂肪なし・生

脂肪酸組成についてはオレイン酸が最も多く、次にパルミチン酸、ステアリン酸の順で、日本食品標準成分表の数値とほぼ変わらなかった。

産肉成績については、クローン牛はロース芯面

積、および推定歩留については後代検定牛の最大値を上回り、好成績を得た。この2つ以外の項目については後代検定牛の最大・最小値の範囲内に収まり、クローンと後代の相似性が高いと考えられた。以上の結果から体細胞クローン牛は正常な発育能力を有し、かつ後代検定牛と同等の産肉能力を有していることから、種雄牛の産肉能力検定に利用できる可能性が示された。

#### 4 クローン検定と後代検定のコスト比較

コスト比較の結果を表7に示した。遺伝率が0.4の形質では1頭のクローン検定の正確度は6頭の後代検定に匹敵するとの報告<sup>1)</sup>があることから、6頭の後代検定と1頭のクローン検定のコストを施設経費や人件費を考慮せずに試算し比較した。受卵牛1頭への移植で検定牛が生産された場合、1頭のクローン検定にかかる費用は約70万円となった。一方、検定牛6頭の後代検定にかかる費用は約570万円で費用のみ比較するとクローン検定は極めて低コストである。しかし後代検定牛が市場出荷できるのに対し、体細胞クローン牛は現状では市場出荷できないため、肉を販売して得られる利益を計算に入れて収益を出すと、クローン検定は後代検定と比較して約100万コストがかかることになり、現状では6頭の後代検定より低コストといえない。クローン牛肉が市場販売できると想定すると6頭の後代検定と比較して同等の収益となる。しかし、後代検定数を6頭以上に設定すると、費用は増加するが収益も増加するため、クローン検定との収益差はさらに広がる。

また、受卵牛にクローン胚を移植し、クローン牛が誕生し、生後150日以上まで生存する確率は現在の技術では7%位といわれている<sup>15)</sup>。そこで受卵牛14頭にクローン胚を移植して検定に用いるクローン牛1頭が生産できた場合のクローン検定にかかるコストを試算すると、費用が約120万円かかり、クローン牛1頭の枝肉を市場で販売することができても20万円以上の赤字になることが想定された。

クローン検定は、検定に要する期間を1~2年短縮できることや検定牛を飼育する場所や手間を少なくできる大きな利点を有するが、コスト面でメリットを活かすためにはクローンの作出効率を向上させることが重要である。今後クローン検定を実用化するには、クローン牛肉が市場で販売・流通できるようになることも必要と考えられる。

表7 後代検定とクローン検定のコスト比較の試算

後代検定6頭	クローン検定1頭			
		受卵牛1頭使用した場合	受卵牛14頭使用した場合	
検定牛の購入費用	¥2,867,400	検定前(受卵牛飼養・クローン胚作製・胚移植・分娩・育成)にかかる費用	¥227,434	¥777,049
検定期間の飼料・資材費	¥2,550,189	検定期間の飼料・資材費	¥425,032	¥425,032
検定牛のと畜費用	¥297,642	検定牛のと畜費用	¥49,607	¥49,607
費用合計	¥5,715,231		¥702,073	¥1,251,688
検定牛の枝肉を販売して得られる金額	¥5,914,752	検定牛の枝肉を販売して得られる想定金額	¥1,017,509	¥1,017,509
収益	¥199,521		¥315,436	¥-234,179

※受卵牛にクローン胚を移植し分娩されたクローン牛が150日以上生存する確率を7%と想定した場合

### 参考文献

- 古川ら, 2001, クローン技術を応用した肉牛の育種システム, 日本胚移植学雑誌, vol.23 No.3, 88-94
- 広岡, 2005, クローン牛の相似性とクローン検定, 畜産の研究, 第59巻, 第12号, 1291-1300
- 野口ら, 2002, 体細胞を利用した黒毛和種雄牛造成と経済性-期間短縮と経済性の検討-, 第7回核移植技術全国検討会
- 山口ら, 2005, 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 38号, 5-12
- 山口ら, 2007, 育種改良を目的としたクローン家畜生産技術の応用に関する研究(第1報), 茨城県畜産センター研究報告 40号, 37-40
- Akagi S. et al, 2005, In vitro development of aggregated nuclear transferred embryo derived from bovine cumulus cells, Reprod. Fertil. Dev. 17, 162
- Akagi S. et al, 2003, Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation, Mol. Reprod. Dev., 66, 264-272
- 渡辺ら, 2005, バイオプシー家畜胚の保存技術の確立(第1報), 茨城県畜産センター研究報告 40号, 59-62
- 金山ら, 2000, 分娩期の管理, 第15回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 16号, 13-15
- 赤木ら, 2006, ウシ核移植集合胚の発生能と Oct4 mRNA 発現解析, J. Reprod. Dev., 52, 117
- 橋本ら, 2002, クローン牛の新たな作出技術の開発, 第100回日本畜産学会講演要旨, 101
- Boiani M. et al, 2003, Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation?, EMBO J., 22, 5304-5312
- 坂下ら, 2002, 体細胞クローン去勢牛の肥育成績, 鹿児島県畜産試験場研究報告, 第35号, 351-363
- 長谷川ら, 2006, 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生産手法の検討(第2報), 鳥根県立畜産技術センター研究報告, 第39号, 1-6
- 食品安全委員会, 2009, 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」, p12