

「かごしま黒豚」の遺伝資源の保存および胚の移植技術に関する研究

池谷幸恵^{*1}・前田昂亮・大小田 勉・鈴木木昭一

要 約

口蹄疫等の重大疾病や天災等による「かごしま黒豚」の絶滅を回避し、将来にわたり遺伝資源として活用できる体制を構築するため、系統豚「サツマ」、「ニューサツマ」および「サツマ 2001」の遺伝資源である精液と胚を凍結・保存した。遺伝資源の消失リスクを低減させるため、その一部を IBBP センター（大学共同利用機関法人自然科学研究機構基礎生物学研究所内）にて保存した。胚の保存はガラス化法を用い、保存胚の活力向上を図るため、ガラス化前後の洗浄液をそれぞれ Yoshioka ら⁹⁾による PXM-Hepes から PBM-Hepes へ、Hirayama ら²⁾による PZM-Hepes から PBM-Hepes に変更し、洗浄回数を 2 回から 10 回に増加させ、1 時間の培養を止めたところ、融解後の胚の生存率と孵化率はそれぞれ 63.3% から 89.7%、43.3% から 75.9% に有意に上昇した。更に、胚移植の受胎豚に関し、発情徴候中心だった母豚の選定に客観性を持たせるため、母豚の子宮頸管粘液中の好中球数を指標に加えたところ、平均 11.3×10^6 個/ml 未満の受胎豚の受胎率、分娩率、産子数、産子率（産子数/移植胚数）が高かったことから、貴重な遺伝資源を移植する際に、受胎豚の適否を判断する基準の一助となる可能性が示唆された。

キーワード：「かごしま黒豚」、系統豚、遺伝資源、精液、胚

緒 言

本県は国内で唯一「パークシャー種」（以下 B）の系統豚を造成・維持しており、これまで造成された系統豚は、「サツマ（以下 B1）」（1983 年完成）、「ニューサツマ」（以下 B2）（1991 年完成）、「サツマ 2001」（以下 B3）（2001 年完成）および「クロサツマ 2015」（以下 B4）（2015 年完成）の 4 系統があり、現在は一般社団法人鹿兒島県種豚改良協会（以下協会）で B2・B3・B4 の 3 系統が維持されている。これら系統豚はそれぞれ 10 年近い歳月と多額の費用をかけて育種改良され、全国的に知名度の高い「かごしま黒豚」ブランドの基盤となっている貴重な財産である。

一方で、近隣諸国では、口蹄疫等の越境性動物疾病の発生が継続しており、国内への侵入リスクは高い状況にある。また、2010 年に宮崎県で発生した口蹄疫では、「かごしま黒豚」への重大なリスクも想定され、系統豚は緊急の移送措置等が講じられた。このような状況の下、「かごしま黒豚」を絶滅の危険から守る一つの手段として、系統豚の精液や胚を保存し、遺伝資源として確保しておく必要がある。

他方で、豚の生殖細胞は低温感作に弱く⁷⁾、保存胚の移植は、新鮮胚の移植に比べて受胎率が低く、産子数が少ない状況にある。保存した系統豚の胚を有効に活用するには、受胎率等を向

上させる必要があり、融解後の胚の品質向上が求められる。回収した胚に使用する洗浄液について、Mito ら⁵⁾は、PZM-5 に 5 mM グルコースおよび 10 mM グリシンを添加した PBM を胚盤胞期以降の体外生産胚の培養に用いると、PZM-5 と比較して胚盤胞の孵化率や細胞数が増加することを報告している。このような胚の品質向上のほか、胚移植に適した母豚の選定も胚の効率的な活用に重要と考えられる。従来、受胎豚の選定には、母豚の発情徴候の観察に重きが置かれてきたが、母豚の発情状態を客観的に把握するため、本試験では発情周期との関連が報告されている子宮頸管粘液中の好中球数（以下好中球数）⁶⁾を指標に加えることにした。

「かごしま黒豚」の遺伝資源の維持・保存のため、まずは系統豚である B1, B2, B3 の凍結精液とガラス化胚を保存するとともに、一局集中的な保管によるリスクを避けるため、精液と胚の一部を分散して保管する必要がある。また、好中球数と受胎率等との関連を明らかにすることによって、母豚の選定による受胎率向上と、胚の保存・融解条件の改良による品質向上により、遺伝資源の活用を向上させるとともに、「かごしま黒豚」ブランドの維持・保存に寄与する。

試験材料および方法

1 系統豚の遺伝資源の保存

(1) 精子の保存

（連絡先）中小家畜部

* 1 鹿兒島中央家畜保健衛生所徳之島支所

供試豚は、鹿児島県農業開発総合センター畜産試験場（以下畜試）と協会で飼養しているB種雄のB1を4頭、B2を3頭、B3を1頭用いた。保存精液数の目標は1系統につき2,000本とした。

精液の採取は、擬牝台を用い、手圧法にて精液濃厚部を分画採取した。採取した精液は遠沈管に移し、顕微鏡下で精子活力80+++以上と判定したものを凍結した。

凍結には、前処理液としてモデナ液（表1）を使用し、精液に前処理液を加え上澄みを除去し、10億精子/mlとなるように前処理液で希釈した。これを26℃の室温下で1.5~2時間放冷し、15℃の低温インキュベーター内で20時間静置した。次に、再び精液の上澄みを除去し、20億精子/mlとなるように一次希釈液を混合した後、5時間で5℃まで冷却した。その後二次希釈液を徐々に加え10億精子/mlとなるよう調整し、0.5mlの精液ストローに充填して凍結した。なお、この凍結精液作製技術は、特許技術（広島大学・大分県出願2007-325313）を含む。

凍結精液の品質を確認するため、作製した凍結精液のうち2本の精液ストローを液体窒素から取り出し、10秒間空气中に保持した後、38℃のウォーターバスに投入し、50秒間浸漬して融解した。希釈液（モデナ液）で10倍希釈後、38℃で加温し30分後に精子活力を調査した。精子活力が50+++以上であった場合に、残りの凍結精液を保存した。

表1 モデナ液の組成	単位：g/L
グルコース	27.50
クエン酸ナトリウム	6.90
炭酸水素ナトリウム	1.00
EDTA	2.35
クエン酸	2.90
トリスアミノメタン	5.65
硫酸アミカシン	0.40

(2) 胚の作出と保存

供試豚は、畜試と協会のB種雌のB1を14頭、B2を6頭、B3を9頭用いた。保存胚数の目標は1系統につき100個とした。

供試豚は、21日前後で発情周期を繰り返している個体を選定した。自然交配後22~40日目にPGF_{2α}（クロプロステノールとして175μg）を投与し、更に24時間後にPGF_{2α}を同量投与した。2回目のPGF_{2α}投与時に血清性性腺刺激ホルモン（以下eCG）を1,500IU投与し、更に72時間後に胎盤性性腺刺激ホルモン（以下hCG）を500IU投与して、発情および排卵を誘起した。これらのホルモン製剤はすべて頸部筋肉内に注射し、hCG投与後24時間後から同じ系統豚の雄と2回交配を行った。交配を開始した日（day0）から6日後（day6、hCG投与後160時間後）で採胚に供した。また、離乳母豚においては、離乳当日にeCGを投与し、その後上記と同様のホルモン処置と交配および採胚を実施した（図1 供胚豚）。

採胚は、吸入麻酔下で行った。最初に、麻酔による心拍数の低下を防ぐため、供試豚にアトロピン硫酸塩（0.025mg/kg）を頸部筋肉内に投与し、導入麻酔としてチアミラールナトリウム（1.8~2.5mg/kg）を静脈内投与し、豚手術台に横臥させた。その後、維持麻酔として3~5%濃度のイソフルランを吸入させ仰臥位に保定し、腹部を洗浄・消毒・剃毛後、正中線に沿って開腹し、子宮体部の分岐部から卵巣までの部分を片側ずつ体外へ引き出した。卵巣の排卵状態を確認後、子宮体部の分岐部から卵巣側に約15cmの部位を5mm程度切開し、泌尿器用フォーリーカテーテル（ニプロ製オールシリコーンバルーンカテーテルS、外径:18Fr）を挿入し、バルーンを固定した。このカテーテルを通して50mlの還流液（M2液）³⁾を子宮内に注入し、子宮を揉み卵管まで灌流した後、液を回収した。回収したM2液をシャーレに移し、顕微鏡下で胚のステージを確認し、胚盤胞期と拡張胚盤胞期の胚を保存した。初期胚盤胞期の胚はPBM（ブタ後期胚培養用培地）に移し、マルチガスインキュベーター（38.5℃、0.5%CO₂、0.5%O₂）内で培養し、採取から5時間以内で胚盤胞期に成長した胚のみ保存した。

胚の保存は超低温保存法の一つであるガラス化保存法を用い、液体窒素に直接触れずに微量のガラス化液とともに胚を空冷するマイクロボリュウムエアークーリング（MVAC）法⁴⁾にて行った。採取した胚を20mMHepesで緩衝したPBM（PBM-Hepes）⁵⁾で10回洗浄し、一次平衡液に5分間、二次平衡液に5分間浸

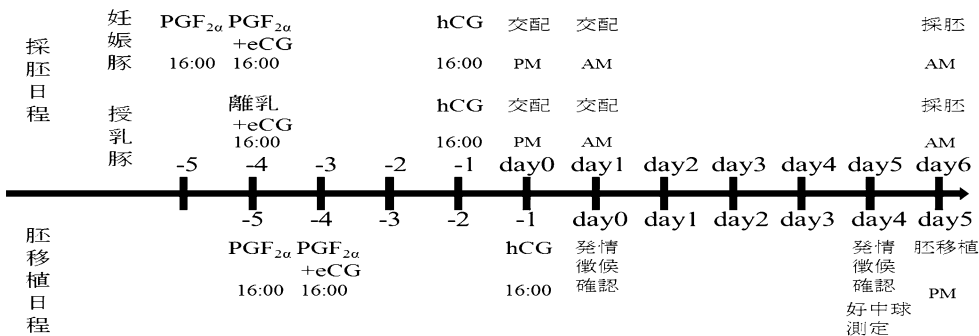


図1 母豚のホルモン処置、採胚及び胚移植スケジュール

した後、ガラス化液に浸し、1本のブタ胚用ガラス化保存器具のデバイス上に10個程度乗せ、液体窒素中のストローに速やかに差し込み、空冷して液体窒素中で保存した。胚へのダメージを最小限に抑えるため、ガラス化液に浸してから液体窒素中のストローで空冷するまでを1分以内で実施した。

(3) 遺伝資源の消失リスクの低減

上記方法により作出した凍結精液およびガラス化胚の一部について、遺伝資源の消失リスクを低減させるため、愛知県にあるIBBPセンター（大学共同利用機関法人自然科学研究機構の基礎生物学研究所内）に依頼し保管することとした。なお、IBBPセンターは、東日本大震災によって多くの生物遺伝資源が毀損・消失したことを受けて設立され、現在全国の研究機関等から遺伝資源を受け入れバックアップ保管を行っている施設である。

2 保存胚における保存・融解方法の検討

供試豚は畜試のB種雌3頭を用いた。発情誘起方法と採卵方法は前述のとおりとした。1頭から採取した胚盤胞期と拡張胚盤胞期の胚を、畜試の慣行方法で胚の保存・融解を行う慣行区と、改良を加えた改良区に分けた。慣行区は胚を20mMHepesで緩衝したPXMとPBMで1回ずつ洗浄し、10%FBS加PBMで1時間培養した後、ガラス化し、1本のガラス化保存器具に6~16個乗せ、液体窒素中で保存した。胚の融解は、保存胚を加温・希釈液にて3分間加温・希釈した後、20mMHepesで緩衝したPZM（PZM-Hepes：ブタ培養胚培養用培地）で1回洗浄し、10%FBS加PBMに移し、マルチガスインキュベーター内で72時間培養し、胚の生存率と、胚が拡張胚盤胞期から脱出胚盤胞期へ成長した割合（孵化率）を調査した。改良区は、慣行区に対して、胚をPBM-Hepesで10回洗浄し、培養せずにガラス化を行い、1本のガラス化保存器具に5~15個乗せ、液体窒素中に保存した。保存胚を加温・希釈した後、PBM-Hepesで1回洗浄し、その後慣行区と同様に調査し、慣行区と改良区を比較した。

3 受胎豚の選定基準の検討

(1) 発情徴候および好中球数の調査

供試豚は畜試のB種雌6頭を用いた。1頭につき2回の自然発情において、許容日（day0）と許容日から4日後（day4）での発情徴候を観察し、許容、外陰部の発赤、腫脹について調査した。

許容は豚の腰背部を手で押さえ、豚が「止まる（+）・動く（-）」で判定し、外陰部の発赤は、外陰部を指で開き内側の粘膜面の赤みを「赤い（+）・少し赤い（±）・白い（-）」で判定し、外陰部の腫脹を「腫れている（+）・少し腫れている（±）・腫れていない（-）」で判定した。それぞれの項目について、許容はday0で「+」かつday4で「-」を良好とし、外陰部の発赤はday0で「+」かつday4で「±・-」を良好とし、外陰部の腫脹はday0で「+」かつday4で「-」を良好とし、それ以外を不良と判定した（図2）。これらの発情徴候の項目全てにおいて良好な豚を移植適格豚とし、それ以外は移植不適格豚とした。

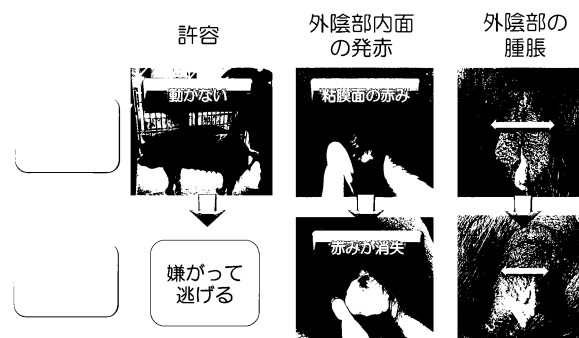


図2 発情徴候の項目と良好と判断する例

好中球数はday5での移植を想定し、day4で測定した。外陰部から腔鏡を挿入して子宮頸管外口を確認した後、綿棒を3cm程度挿入し5回転させて子宮頸管粘液を採取した。粘液の付着した綿棒を15mlのコニカルチューブに入れ、PBS1mlを上から注入した後10分間静置し、5秒間の振とうを2回行った後、綿棒をコニカルチューブの内面に押しつけ、絞った後のPBSを材料とした。PBS中の好中球数をギムザ染色後、顕微鏡下で測定した。発情徴候を指標とした移植豚の選定と好中球数の間に関連があるか調査するため、移植適格豚と不適格豚における好中球数について比較した。

(2) ガラス化胚移植における好中球数と受胎率等の調査

畜試のB種の雌を自然交配後、eCGの投与量を1,000IUとして供胚豚と同様のスケジュールでホルモン処置を行った（図1受胚豚）。hCG投与翌日をday0として発情徴候を観察し、day4で発情徴候の観察と好中球数を測定した。発情徴候を指標として選定した10頭の移植適格豚を供試豚として、day5で非外科的にガラス化胚を移植した。

表 2 系統豚の精液の採取回数, 平均凍結本数および保存本数

系統	個体	採取回数 (回)	平均凍結本数 (本/回)	保存本数		目標数 (本/系統)	達成率 (%)
				(本/頭)	(本/系統)		
サツマ	A	10	71.0	733		2000	104
	B	13	101.0	670	2073		
	C	13	56.0	670			
	D	9	0.0	0			
	E	14	49.1	540			
ニューサツマ	F	9	93.4	747	2005	2000	100
	G	9	102.6	718			
サツマ 2001	H	19	107.9	2051	2051	2000	103

表 3 系統豚別の頭数, 胚回収率, ガラス化率および保存個数

系統	頭数	胚回収率	ガラス化率	保存個数	目標数	達成率
		(%)	(%)	(個)	(個)	(%)
サツマ	14	87.4	69.5	160	100	160
ニューサツマ	6	84.5	48.2	40	100	40
サツマ 2001	9	78.1	65.4	94	100	94

移植方法は, 受胎豚に対してメシル酸マホブラジン (0.3~0.5mg/kg) を頸部筋肉内に注射し, 鎮静させた後, 深部注入カテーテルの外筒を外陰部から挿入し子宮頸管に固定後, カテーテル内筒を外筒に通し, 子宮角まで挿入した. 加温・希釈した 11~18 個の胚を封入した 0.5ml ストローを内筒に結合し, 2ml の PBM-Hepes を入れたシリンジをストローに結合し, 押し流して胚を子宮内に注入し移植した. 妊娠鑑定は移植日から 22~25 日後に超音波診断装置を用いて行った. 分娩については, 予定日の前日に PGF_{2α} (クロプロステノールとして 175μg) を臀部筋肉中に注射して分娩を誘起した. 好中球数により, 少数区と多数区を設定し, 受胎率, 分娩率, 区毎の総産子数, 一腹産子数および産子率 (産子数移植胚数×100) を比較した.

4 統計処理

一元配置分散分析と χ^2 検定を用いて有意差検定を行った. 全ての項目について, 有意差水準 5% 未満を有意差がある (p<0.05) とした.

結果および考察

1 系統豚の遺伝資源の保存と分散保管

B1 の凍結精液を 2,073 本, ガラス化胚を 160 個, B2 の精液を 2,005 本, 胚を 40 個, B3 の精液を 2,051 本, 胚を 94 個保存した (表 2, 3). なお, 一般的に, 凍結精液の約 10 本 (精子数約 50 億) が人工授精 1 回分に, ガラス化胚の約 15 個が移植 1 回分に相当する.

精液において, B1 の個体 D は, 9 回採取を行ったが採取時の精液の活性が弱く, 保存には適さなかった. 胚において, B2 の回収胚の半数程度は胚盤胞期まで成長しておらず, 保存には適さなかった.

保存した遺伝資源のうち, B1 の精液 290 本と胚 24 個を IBPP センターへ保管した. なお, B2 と B3 についても同数程度の保管を予定している.

2 胚の保存・融解方法の改良

慣行区の融解後の胚の生存率は 63.3%, 孵化率は 43.3%, 改良区の生存率は 89.7%, 孵化率は 75.9% であり, 改良区は慣行区と比べ生存率と孵化率が有意に高かった (p<0.05) (表 4).

表 4 ガラス化保存・融解方法の違いによる供試胚数, 生存胚数および孵化胚数

区分	洗浄液	供試胚数 (個)	生存胚数		孵化胚数	
			(個)	(%)	(個)	(%)
慣行区	PXM-Hepes	30	19	63.3	13	43.3
	PZM-Hepes					
改良区	PBM-Hepes	29	26	89.7	22	75.9

慣行区から改良した点は洗浄液の種類, 洗浄回数の増加, ガラス化前の培養を行わない点である. 洗浄液について, PBM-Hepes を用いたことで胚の細胞数の減少が抑えられ, 保存後の胚

の生存率と孵化率が上昇した可能性がある。洗浄回数について、改良区は、胚の付着物や灌流液等の混入を防ぐため、「胚の衛生的取り扱いマニュアル¹⁾」に従って10回以上実施した。ガラス化前の培養について、「胚の衛生的取り扱いマニュアル」では、ウシ胚において凍結前に4～6時間室温に保持した胚は融解後の移植において胚の生存率は高くはないとなっており、そのため胚回収後はできるだけ速やかに凍結することを推奨している。今回ブタ胚においても、回収からガラス化保存までの時間を1時間短くしたことで、生存率等が上昇した可能性がある。しかし、今回の実験では、どの要因が融解後の胚の生存率や孵化率に最も影響を及ぼしたか不明のため、それぞれ個別に検討する必要があると思われる。

3 好中球数を用いた受胚豚の選定

発情徴候の観察から、移植に適格と判定したのは調査12回中半数の6回で、移植適格豚の平均好中球数は 11.3×10^6 個/mlであり、移植不適格豚の平均好中球数は 45.4×10^6 個/mlであった(表5)。

表5 自然発情豚の発情兆候、従来の選定基準での判定および平均好中球数

調査回	許容	外陰部		選定基準 での判定	平均好中球数 ($\times 10^6$ 個/ml)
		発赤	腫脹		
1					
2					
3					
4		全て良好		適格	11.3 ± 8.2
5					
6					
7		発赤が不良			
8					
9		許容・発赤が不良		不適格	45.4 ± 90.2
10		許容が不良			
11					
12		許容・腫脹が不良			

また、移植適格豚へのガラス化胚の移植において、好中球数が多数区の受胎率は40%、分娩率は20%、区毎の総産子数は4頭、子豚生産効率率は5.5%であり、少数区の受胎率と分娩率は60%、区毎の総産子数は8頭、産子率は10.1%であった(表6)。豚の胚移植では、胚日齢6日目の胚を発情後5日目の受胚豚に移植すると受胎率が高まると報告されており⁸⁾、発情周期を的確に把握することが重要である。そのため、受胚豚には、発情が明瞭に発現し(day0時点)、その後発情が長続きせず消失すること(day4～5時点)が求められる。発情調査は、許容や外陰部の変化を観察して行うが、特に発情の消失は、外陰部の変化を詳細に捉える必要があり、判定には熟練を要する。

そこで今回は、ホルモン動態と関連があり、発情期に増加し、その後減少することが報告されている好中球数⁹⁾について、客観的指標としての有用性を検討した。紫野⁵⁾は、黄体ホルモンは好中球数を抑制し、卵胞ホルモンは好中球数を増加させると報告していることから、胚移植の前日で発情がしっかり消失している個体、つまり移植適格豚は好中球数が少ないと予想した。結果、有意な差は認められなかったが、予想と同様に、移植に適格と判定される母豚の好中球数は不適格豚と比べて少なかった(表5)。

次に、実際の胚移植において、好中球数を指標とした場合の有用性を検討するため、発情徴候から移植に適格と判定された母豚にガラス化胚を移植した。好中球数によって少数区と多数区に分けて比較したところ、有意な差はないものの、少数区は多数区に比べ、分娩率、区毎の総産子数、一腹産子数および子豚生産効率率は上回った(表6)。

以上のことから、発情徴候を指標とした母豚の選定に加え、好中球数が 10^7 個/ml程度を一つの基準として、それ以下の個体を選定することが、移植豚選定の一助となる可能性がある。一方で、好中球数が多数区の母豚でも分娩が確認されたことから、好中球数が多い個体が必ずしも受胎しないとは言えず、ホルモン量と好中球数の関連は個体によって異なる可能性があり、体内ホルモン動態と好中球数の関連をさらに検討する必要があると思われる。

表 6 ガラス化胚移植母豚の好中球数, 移植胚数, 受胎, 分娩, 産子数および産子率

区分 (注1/母豚)	好中球数 ($\times 10^6$ 個/ml)	移植胚数 (個)	受胎	分娩	産子数 (頭)	産子率 (注2)
(少数区)						
1	4	15	—	—	—	0%
2	4	16	+	+	4	25.0%
3	6	15	+	+	2	13.3%
4	6	18	+	+	2	11.1%
5	8	15	—	—	—	0%
合計		79			8	
(平均±標準偏差)	(5.6±1.7)	(15.8±1.3)	60%	60%	(2.7±1.2)	10.1%
(多数区)						
1	14	14	+	— (流産)	—	0%
2	14	17	—	—	—	0%
3	27	16	—	—	—	0%
4	33	11	+	+	4	36.4%
5	56	15	—	—	—	0%
合計		73			4	
(平均±標準偏差)	(28.8±17.3)	(14.6±2.3)	40%	20%	—	5.5%

注 1) 少数区：好中球数が 10^7 個/ml未満

多数区：好中球数が 10^7 個/ml以上

注 2) 産子率：産子数/移植胚数

まとめ

今回保存した遺伝資源は、「かごしま黒豚」が絶滅の危機に瀕した際の担保となるだけでなく、新たな系統豚を造成する際や、現在供用している系統豚の血縁・近交係数の上昇抑制にも活用出来ると考えられることから、今後も、系統豚を含め様々な「かごしま黒豚」の遺伝資源を確保することが重要と思われる。

また、保存した胚を有効に利用するには、受胎豚の状態を詳細に把握し評価する必要があると考えられ、評価方法の確立が今後の課題であると思われた。

参考文献

1) 胚の衛生的取り扱いマニュアル, 第 3 版, 畜産技術協会, 1998

2) Hirayama Y., M. Ohkubo, K. Misumi and K. Imai 2006. Successful production of piglets derived from vitrified oocytes without direct exposure to liquid nitrogen, RFD 19(1) : 177-178

3) 柏崎直巴 1996. 豚の胚移植マニュアル, 農林水産省家畜

改良センター豚新技術開発研究会編, 54

4) マイクロボリュームエアクーリング (MVAC) 法によるブタ胚 (体内生産胚) のガラス化保存方法, 家畜改良センター

5) Mito, T., K. Yoshioka, S. Yamashita, C. Suzuki, M. Noguchi and H. Hoshi 2012. Glucose and Glycine synergistically enhance the in vitro development of porcine blastocysts in a chemically defined medium, Reprod. Fertil. Dev., 24, 443-450

6) 紫野正雄 2000. 発情豚の子宮頸管部粘液への好中球遊走現象に関する研究, 麻布大学, 学位論文

7) Polge C., I Wilmot and L.E.A. Rowson 1974. The low temperature preservation of cow, sheep, and pig embryos, Cryobiology 11:560

8) 山本禎, 西田浩司, 坂上信忠. 2008. 胚日齢 6 日目の豚胚を発情後 5 日目の受胎豚に非外科的移植すると高い受胎率が得られる, 神奈川県畜産技術センター成果情報

9) Yoshioka, K., C. Suzuki and A. Onishi 2008, Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium, J. Reprod. Dev., 54, 208-213

Research on Preservation of Genetic Resources of 'Kagoshima black pig' and transplantation technique of embryos

Yukie Iketani, Kousuke Maeda, Tsutomu Ohkoda and Syoichi Suzuki

Summary

Strained pig 'Satsuma', 'New satuma' and 'Satsuma 2001' genetic in order to avoid the extinction of 'Kagoshima black pig' due to serious diseases such as foot-and-mouth disease and natural disasters and to utilize it as a genetic resource for the future semen and embryos as resources were frozen and preserved. In order to reduce the risk of loss of genetic resources, a part of it was preserved at the IBBP Center (within the Institute for Basic Research on Biological Sciences, University Research Organization). To preserve embryos, we changed vitrification before and after vitrification from PXM - Hepes 7) to PBM - Hepes and PZM - Hepes to PBM - Hepes, respectively, in order to improve the vitality of preserved embryos, increasing from 2 times to 10 times and stopping culturing for 1 hour, the survival rate and hatching rate of the melted embryo significantly increased from 63.3% to 89.7% and from 43.3% to 75.9%, respectively. Furthermore, in order to give objectivity to the selection of the sows that were at the center of oestrus for embryo transfer recipient pigs, the number of neutrophils in cervical mucus of sows was added as an index. As a result, the conception rate, parturition rate, number of litters and birth rate (number of litters / number of transplanted embryos) of the recipient pig on average less than 11.3×10^6 / ml were high. This suggests that it might be helpful for the criteria to judge the propriety of the recipient pig when transplanting valuable genetic resources.

Keywords: Embryo, Genetic resources, 'Kagoshima black pig', Semen, Strained pig

