Application of Ice Induction Method Using Silver Iodide to Cryopreservation of Bovine Embryos

Toshiyuki KOJIMA, Tadashi SOMA and Norihiko OGURI

*Department of Animal Reproduction, National Institute of Animal Industry
Tsukuba-Norindanchi, P.O. Box 5, Ibaraki, 305 JAPAN*

(Accepted for publication March 13, 1987)

Summary. In our previous study we have reported a new method for inducing ice crystal formation in extracellular solution using silver iodide. Rabbit morulae survived freezing with the silver iodide seeding method. The present study examined the viability of frozen bovine embryos using the silver iodide seeding procedure after transfer to appropriate heifers.

Seven-days excellent and good embryos recovered from superovulated heifers by FSH were used in the present study. Plastic straws were used for frozen storage of the embryos. Each straw was filled by successive aspiration of the following fractions: 70 mm high of 10% v/v glycerol containing one embryo, 3 mm of air and 10 mm of 1% suspension of silver iodide in distilled water (Fig. 1). The straws were cooled to -7°C at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and held at -7°C for 10 min without initiating seeding. They were then cooled to -35°C at $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and plunged into liquid nitrogen. After rapid thawing, the embryos recovered were immersed in 0.75 M or 1.0 M sucrose solution for 10 min and washed by modified phosphate buffered saline solution. The seven embryos were transferred to the total 7 recipients synchronized. This resulted in two pregnant cows which delivered male normal calf, respectively. **KEY WORDS:** SEEDING, SILVER IODIDE, ICE INDUCTION, CRYOPRESERVATION OF BOVINE EMBRYOS.

Jpn J Anim Reprod 33, 73-76, 1987

ヨウ化銀による氷晶形成誘起法の牛胚凍結保存への応用

小島 敏之・相馬 正・小栗 紀彦

農林水産省畜産試験場 305 茨城県稲敷郡茎崎町池の台2
筑波農林研究団地内局 私書箱5号

哺乳動物初期胚の標準的凍結保存技術 (Whittingham *et al.*, 1972; Wilmot and Rowson, 1973; Bank and Maurer, 1974; Whittingham, 1975; Bilton and Moore, 1976; Willadsen *et al.*, 1976; Yamamoto *et al.*, 1982) は、哺乳動物胚以外の細胞のそれを基本に発達してきている。しかし、胚が持つ特有の性質 (Leibo, 1980)、すなわち水の透過性が低く、活性化エネルギーが大きく、容積に対する表面積の比が小さいなどのために、いくつかの特別な処置が必要である。冷却中に凍結媒液が過度の過冷却状態となるのを避けるために、細胞外液に氷晶

形成を誘起する植氷 (seeding) 操作は、その重要な行程のひとつである。

植氷操作それ自体は、非常に簡単で、液体窒素中に予め冷却しておいたビンセットを、凍結媒液が入っている容器のメニスカス部分に外側より瞬間的に接触させることなどは、その一方法である。ただし、その操作は手動であるので、再現性に欠ける危険性があり、また多本数のサンプルを短時間で処理することは困難である。胚の凍結保存のために商品化されているプログラム・フリーザーには自動植氷装置が付いているものもあるが、それ

らでは、凍結容器の選択および凍結容器（とくに、プラスチック・ストローの場合）を植氷装置に装着する方法、凍結媒液の充填方法に制約がある。

このような植氷操作における欠点を改善するため、著者らはヨウ化銀を用いた植氷方法を考案した (Kojima *et al.*, 1986)。ヨウ化銀分子は、過冷却状態の水中で、また氷晶に関して過飽和状態の水蒸気中で氷晶核となり易い性質を持っており (Vonnegut, 1947)、そのため人工降雨の誘起実験に使われたことがある (Hatakeyama, 1956)。このヨウ化銀の氷晶形成促進効果を胚の凍結保存に応用することを試み、温度センサーを装着したダミー・ストローの冷却試験や凍結・融解家兎胚の体外培養試験によって、その有効性を確認し、従来行ってきた植氷操作を省略しても生存胚が高率に得られることを証明した (Kojima *et al.*, 1986)。本試験では、この方法を牛胚の凍結保存に応用し、その移植後の生存性を検討した。

材料と方法

採卵と供試卵の選別 当場で飼養している黒毛和種未經産牛の黄体期に、FSH 製剤（アントリン、デンカ製薬）総量 28mg を漸減的に4日間（1日あたり朝夕の2回）頸部皮下に投与して多排卵を誘起し、さらにFSH製剤投与開始後48時間目と72時間目にPGF₂α製剤（パナセラン、第一製薬）を15mgずつ頸部筋肉内に投与して発情を誘起し、発情を発見した当日の午前中と翌日の午前中に当场飼養の黒毛和種雄牛の新鮮精液を計2回人工授精した。性周期の7日目（発情日を0日とする）に採取した胚のうち、4段階評価でA、Bランクの桑実期～胚盤胞期の胚を供試した。

凍結保存法 これらの胚を10% v/v グリセロール・修正PBS溶液（modified phosphate buffered saline solution, Whittingham, 1976）（凍結媒液）中へ移し、冷却開始まで室温（約25℃）に30分間（平衡時間）放置した。この間にFig. 1の模式図に示したように、0.25

Fig. 1. Diagram of 0.25 ml straw used in this study. 70 mm of 10% v/v glycerol containing one bovine embryo (FS), 3 mm of air bubble, 10 mm of 1% suspension of silver iodide in distilled water (1% AgI). The straw was sealed by heat.

ml容量の人工授精用プラスチック・ストロー（I.M.V., フランス）内へ、胚を含む凍結媒液（層の長さ、70 mm）、気泡（3 mm）、1% ヨウ化銀蒸留水懸濁液（1% AgI, 10 mm）の順に吸引し、ストロー端を加熱して閉封した。ストロー1本あたり1個の胚を納め、液体窒素蒸気による気相温度制御方式のプログラム・フリーザー（ダイサン FFP-190, 大阪酸素工業株式会社）を用いて、冷却槽内の温度を室温から-7℃まで1℃/minで冷却した後、そのまま10分間保持した。-7℃から-35℃まで0.3℃/minで冷却し続けた後、液体窒素中へ浸漬し、融解時まで保存した。冷却途中外部からの植氷操作は行わず、またプログラム・フリーザーの自動植氷装置も作動させなかった。

融触および移植 移植当日に、37℃の温水中へストローを浸漬して融解させた。融解後、ストロー内に気泡が残っている場合には、気泡部分を切断して1% AgI層を切り離し、他方気泡が消失しているストローでは、そのままそれぞれ時計皿へ内容物を移した。つづいて、0.75Mあるいは1.0M ショ糖・修正PBS溶液中へ回収融解胚を移し、10分間そのまま放置した。その後、胚を修正PBS溶液で洗浄し、形態観察を行い、人工授精用プラスチック・ストロー内に吸引収容して移植場所へ運搬した。自然発情の性周期7日目のホルスタイン種未經産牛に1頭あたり1個の胚を、黄体側子宮角に頸管經由法により移植した。妊娠の成否は、移植後50～60日目に直腸検査を実施して確認し、受胎牛は分娩を待って産子の状態をも観察した。

結果と考察

Table 1に各凍結・融解胚の移植成績を示してある。合計7個の胚を融解し、延べ7頭の受卵牛に移植した結果、2頭受胎し、それぞれ正常な雄子牛を分娩した。H17とH127の妊娠期間は、283日と280日、産子の生時体重は28kgと24.5kgであった。著者らの家兎胚を用いた実験 (Kojima *et al.*, 1986) では、ヨウ化銀による氷晶形成誘起法が胚の凍結保存に有効であることを *in vitro* の発育成績から確認できたが、本試験では *in vivo* で牛胚の生存を指標として、この方法の有効性を再確認した。

著者らがこの方法を応用するにあたって最も懸念したのは、ヨウ化銀の胚および子宮粘膜に対する有害作用であったが、著者らの家兎胚を用いた実験 (Kojima *et al.*, 1986) および本試験の受卵牛 H17 の成績から判断しても、現在のところ供試濃度におけるその有害作用は認め

Table 1. Informations of donors, embryos and diluents used in the present study and the result of transfer through cervix to appropriately synchronized recipients

	Donor	Stage of development*	Ranking	Diluent	Ranking of frozen-thawed embryo	Recipient	Pregnancy	Parturition	Offspring
1	B 8	B	A	1.0 M-suc§	A#	H17	+	+	male (28 kg)
2	B 8	E B	B	0.75M-suc	B	H159	—	—	—
3	B 8	M	A	1.0 M-suc	A	H159	—	—	—
4	B 134	E B	A	1.0 M-suc	B##	H21	—	—	—
5	B 134	E B	B	1.0 M-suc	B	H21	—	—	—
6	B 12	M	A	1.0 M-suc	B	H125	—	—	—
7	B 12	M	B	1.0 M-suc	B	H127	+	+	male (24.5 kg)

* "B" means blastocyst, "EB", early blastocyst and "M", morula.

§ "suc" means sucrose.

An air bubble intervened between the freezing solution (10% v/v glycerol) and suspension of silver iodide has disappeared during thawing.

A small crack was observed in the zona pellucida.

られていない。受卵牛 H17 に移植された胚が納められていたストローでは、気泡が融解後に消失しており、胚を含む凍結媒液と 1% AgI が混合していたにもかかわらず、受卵牛は正常な子牛を分娩した。ただし、この場合、胚や子宮粘膜に高濃度のヨウ化銀を作用させていないので、この問題は今後の重要な検討課題であろう。

ストロー中の 1% AgI 層は、 $-2\sim-3^{\circ}\text{C}$ 付近で自然に氷結するので (Kojima *et al.*, 1986)、凍結媒液の温度がその凍結点温度に達すると、自動的に 1% AgI 層の氷晶が気泡を越えて凍結媒液の氷晶形成を誘起するものでないかと考えられる。したがって、外部からの植氷操作は全く不要で、温度変動の非常に少ない状況で細胞外液に氷晶を作ることができる。また、1% AgI と凍結媒液を冷却するに先だって予め混合しておいても、氷晶形成誘起効果が発揮されることが知られているので (Kojima *et al.*, 1986)、ストロー以外の凍結容器にもこの方法は応用できるのではないかと考えられる。その場合、胚周囲のヨウ化銀の微小な氷晶核から氷晶形成が起きると推測されるので、冷却中の胚の微細環境が、従来の植氷方法を用いた場合と異なるものと推察される。冷却中の胚の微細環境を制御あるいは調節することによって透明帯の損傷を防ぐことができる可能性が考えられ (Seidel, 1984)、ヨウ化銀による氷晶形成誘起法は、この方面の研究にも応用できるものであろう。

謝 辞

本論文を御校閲くださいました当場繁殖部長花田章博

士に、また有益な御助言をいただきました岡山県酪農試験場技師野上与志郎氏にそれぞれ深甚の謝意を表します。文献の収集に際しまして御協力いただきました運輸省気象研究所資料課の皆様にも厚く御礼を申し上げます。

References

- Bank H, Maurer RR (1974) Survival of frozen rabbit embryos. *Exp Cell Res* 89: 188-196.
- Bilton RJ, Moore NW (1976) *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust J Biol Sci* 29: 125-129.
- Hatakeyama H (1956) Report of rain-making in Japan, 1954-1956. In: *Papers in Meteorology and Geophysics*, VII: 327-349.
- Kojima T, Soma T, Oguri N (1986) Effect of silver iodide as an ice inducer on viability of frozen-thawed rabbit morulae. *Theriogenology* 26: 341-352.
- Leibo SP (1981) Preservation of ova and embryos by freezing. In: *New Technologies in Animal Breeding* (Brackett BG, Seidel GE, Jr, Seidel SM eds.), Academic Press, New York. pp 127-139.
- Seidel GE, Jr (1984) Future research in cryopreservation of embryos. In: *Techniques for Freezing Mammalian Embryos*, Short Course Proceedings, Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University. pp 95-97.
- Vonnegut B (1947) The nucleation of ice formation by silver iodide. *J Appl Physiol* 18: 593-595.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* 178: 411-414.

- Whittingham DG (1975) Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J Reprod Fert* 43: 575-578.
- Whittingham DG (1976) General aspects of egg culture and preservation. In: Egg Transfer in Cattle (Rowson LEA ed.), Comm Eur Commun Publ, Luxembourg. pp 101-116.
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moor RM (1976) Deep freezing of sheep embryos. *J Reprod Fert* 46: 151-154.
- Wilmut I, Rowson LEA (1973) Experiment on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 92: 686-690.
- Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, Hachinohe Y (1982) Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J Reprod Fert (Suppl)* 32: 399-403.

要 約

本試験では、ヨウ化銀を用いた氷晶形成誘起法を牛胚の凍結保存に応用し、受精卵への移植後の生存性を検討した。凍結に用いたストロー内の各層の構成は、7日目胚を含む 10% v/v グリセロール溶液 (70 mm), 気泡 (3 mm), ヨウ化銀層 (10 mm) で、常法に従い冷却したが、外部からの植氷は行なわなかった。急速融解後、0.75M あるいは 1.0M ショ糖溶液に胚を10分間浸漬してグリセロールを除去した後、それらを移植に供した。7個の胚を延べ7頭の受精卵牛に移植し、うち2頭がそれぞれ正常な雄子牛を分娩した。