Survival after Transfer of Bovine Embryos Frozen using the Seeding Method by Immobilized Silver Iodide

Toshiyuki KOJIMA, Kunio ONODERA*, Tadashi SOMA
and Norihiko OGURI

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

*Aomori Animal Husbandry Experimental Station

(Accepted for publication June 13, 1988)

Summary. The present study was undertaken to assess *in vivo* survival of bovine embryos frozen using the ice-seeding method with the immobilized silver iodide. Silver iodide was added into 2% sodium alginate solution in distilled water to obtain a final concentration of 2% w/v. The sol resulting from the above mixture was let fall drop by drop into 100 mM calcium chloride (dihydrate) solution in distilled water. Day-7 excellent or good five embryos were loaded individually into 0.25 ml-plastic straw with 200 μ l of 10% (v/v) glycerol in PBI supplemented with 10% FBS and one droplet of the immobilized silver iodide. The loaded plastic straws were refrigerated until -36°C at the gradual cooling rate of $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ after 5 min-holding at -7°C , and were followed by plunging into liquid nitrogen. After rapid thawing and sucrose-dilution, one embryo was discarded due to detection of sign of degeneration. Four embryos were transferred to two synchronized recipient-cows by nonsurgical method. The both recipients became pregnant. The result of the present study suggested that the ice-seeding method by the immobilized silver iodide did not disturb *in vivo* survival of frozen-thawed bovine embryos. **KEY WORDS:** IMMOBILIZATION, SILVER IODIDE, ICE-SEEDING, CRYOPRESERVATION, BOVINE EMBRYO.

Jpn J Anim Reprod 34, 149-152, 1988

固定化ヨウ化銀による植氷方法を応用して凍結された牛胚の移植試験

小島 敏之・小野寺邦男*・相馬 正・小栗 紀彦

農水省畜試, 青森県畜試 〒305 茨城県筑波農林研究団地内局私書箱5号

氷晶誘起物質としてのヨウ化銀 (Vonnegut, 1947; Mason, 1962) が哺乳動物胚の凍結保存のための凍結媒液への氷晶形成誘起剤として利用でき, 従来の植氷方法を代替できることは既に報告した (Kojima *et al*, 1986; Kojima *et al*, 1987a; Kojima *et al*, 1987b)。さらに, 上記のヨウ化銀による植氷方法を実用化するために, アルギン酸で固定化したヨウ化銀が凍結媒液中で氷晶形成誘起剤として利用でき, 凍結融解された家兔胚と牛胚の体外培養系での生存性が優れていることも既に報告した

(Kojima *et al*, 1988b; Kojima *et al*, 1988c)。本研究では, この固定化ヨウ化銀による植氷法を用いて凍結した牛胚を受胎牛へ移植した後の生存性を確認するために移植試験を実施した。

材料及び方法

供試した牛胚の由来

本試験に供した牛胚は, 性周期の7日目 (発情日を0日とする) に非外科的に採取し4段階評価でA及びBラ

シクの桑実期～胚盤胞期のもので、FSH-P 製剤(アントリン、デンカ製薬)により多排卵処理されたホルスタイン種経産牛由来のもの3個、及び自然発情による黒毛和種未経産牛由来のもの2個の計5個である。

固定化ヨウ化銀の作製

ヨウ化銀を2%の濃度になるように、2%アルギン酸ナトリウム水溶液(ゾル状)に加え、超音波破砕機により細粒化したのちマグネチックスターラーを用いてよく攪拌した。そのヨウ化銀アルギン酸ナトリウム混合液を5ml容量の注射器に吸引し、先端を切断した23ゲージ注射針を用い100mM塩化カルシウム水溶液中に一滴ずつ滴下してヨウ化銀を固定化した。ヨウ化銀—アルギン酸ナトリウム混合液は、塩化カルシウム溶液に入るとすぐに球状のドロプレットとなる。その後、固定化ヨウ化銀を塩化カルシウム液中から取り出し蒸留水で2～3回洗浄し、121℃・20分の条件でオートクレーブ滅菌を行った。そして、使用時まで4℃の蒸留水中に保存した。

凍結方法

胚を10%(v/v)グリセロール・PB1(10%FBS添加)溶液(以下、凍結媒液と称する)中へ移し、冷却開始まで室温(約25℃)で30分間平衡させた。この間に0.25ml容量のプラスチックストロー(I.M.V., フランス)内へ1個の胚を含む凍結媒液200μlと共に1個の固定化ヨウ化銀ドロプレットを納めた後、ストロー端を加熱して閉封した(Fig. 1)。プログラムフリーザー(ダイサン

Fig. 1. Diagram of the 0.25 ml-capacity plastic straw containing one droplet of immobilized silver iodide and one bovine embryo which were immersed in 10% (v/v) glycerol in PB1 supplemented with 10% FBS. The straw was collocated at horizontal position in the cooling chamber of the programmable freezer.

FFP-190, 大阪酸素工業)の冷却槽内にストローを水平に保持し、室温から-7℃まで1℃/minで冷却後5分間冷却槽内の温度を-7℃に保った。-7℃から-36℃まで0.3℃/minで冷却し続けた後、ストローを液体窒素中に浸漬し、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。

融解及び受胚牛への移植

移植当日に37℃の温水中にストローを浸漬して融解した。0.5Mショ糖・PB1溶液150μlに次いで、回収した胚を含む凍結媒液20μlを0.25mlストローに気泡を隔てて再吸引し、両液を混合後綿栓部を下にしてストローを鉛直方向に保持して5分間静置した。次いで、ストローから胚を回収し、別に用意した0.5Mショ糖・PB1溶液5mlを入れたディッシュ内に胚を移し、0.5Mショ糖・PB1溶液と5分間作用させた。PB1で2回洗浄し形態観察を行った後、移植のためにプラスチックストロー内に吸引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経産牛に1頭あたり2個の胚を黄体側子宮角に頸管経路法により移植した。妊娠の成否は、超音波診断装置を用いて妊娠45及び75日目に確認した。

結果及び考察

凍結融解技術を評価するには、体外培養系による凍結融解胚の生存性を指標とするのが現在のところ最も確実な方法であると考えられる。受胎動物へ胚を移植する方法は、凍結融解技術以外のさまざまな要因が受胎の成立に関与するゆえに、凍結融解技術に対して正確な評価を下しにくい。ただし、体外培養系での胚の発育が生殖道内での胚の発育及び胎児への成長を完全に保証することは証明されていないので、移植による受胎を確認しておくことは必要である。本研究の場合、特にヨウ化銀の胚に対する有害性の問題が未解決であるので、移植後の生存性を確認しておく必要があった。

Table 1に各凍結融解胚の移植成績を示した。合計5個の胚を融解し2頭の受胚牛にそれぞれ2個を移植した結果、いずれの受胚牛も受胎した。残りの1個は変性部分が多かったために移植には供しなかった。なお、受胎した2頭の子宮を超音波診断装置により検査した結果、双胎を確認することはできなかった。しかし、移植した4個の胚のうち、少なくとも2個が胎児に発育したことが認められた。著者らの家兎胚と牛胚を用いた実験(Kojima *et al.*, 1988b)では、固定化ヨウ化銀による植氷方法が胚の凍結保存に有効であることを体外培養系における発育成績から確認したが、本研究では受胚牛の子宮内における牛胚の生存を指標としてこの方法の有効性を再確認できた。

本法は、氷晶形成機構の内いわゆる heterogeneous

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

Donor No.	Embryo			Recipient No.	Pregnant
	Stage ^a	Quality ^b	Quality ^c		
1106 (JB)*	EB	A	A	5 (H)	+
2035 (JB)*	M	A	A	5 (H)	
282 (H)**	B	A	B	276 (H)	+
282 (H)**	EB	A	B	276 (H)	
282 (H)**	EB	B	D		

* indicates donor non-superovulated.

** indicates donor superovulated.

a 'M' means morula, 'EB' early blastocyst and 'B' blastocyst.

b before freezing.

c after thawing.

nucleationあるいはcatalytic nucleationの機構(Franks, 1987)を応用したもので、その氷晶核に氷晶誘起物質として現在のところ最も効果が高いといわれているヨウ化銀を用いることによって、凍結媒液への氷晶形成誘起の確実性を高めることができた。現今の植氷方法の殆どが容器の外側から容器壁を通して冷体を接触させる機構を応用したものであるが、冷体による刺激の必要十分条件が未解明であるので、その確実性は種々の実験条件に微妙に影響されることは否定できないと考えられる。また、密閉されたプログラムフリーザーを用いて胚を凍結する場合は、植氷後の氷晶形成を直視下で確認することは試料の温度上昇の原因となることから、より確実性の高い植氷方法を採用する必要がある。その意味で、ヨウ化銀を用いる氷晶形成誘起に関する一連の研究が、胚の凍結保存技術のために現在汎用されている緩速冷却法の行程における植氷の重要性を再認識する契機となるかも知れない。固定化ヨウ化銀は、確実に -7°C 付近でそれ自体がまず氷晶化するので(Kojima *et al.* 1988a)、全く自然な条件下で凍結媒液に氷晶形成を誘起することができる。

ヨウ化銀による植氷方法を応用する場合、ヨウ化銀の胚に及ぼす有害性が最も懸念されるが、現在まで種々の角度から検討したが確認されていない(Kojima *et al.* 1986; Kojima *et al.* 1987a)。また、家兔桑実胚を1個の固定化ヨウ化銀ドロップレットと共に培養液中に入れ48時間培養を続けた結果、家兔胚の発育に対する有害作用は認められず、培養した全ての胚が拡張しきった後に脱殻した(Kojima, unpublished data)。

謝 辞

本論文を御校閲して戴いた当場繁殖部長花田章博士及び同部胎生発育研究室長塩谷康生氏に感謝する。また、繁殖部生殖機能制御研究室主任研究官富塚常夫氏、同部繁殖第2研究室研究生竹之内直樹氏及び育種部動物第1管理室の五味 浄氏の技術的御支援に対し心から御礼申し上げます。

References

- Franks F (1987) Nucleation: A maligned and misunderstood concept. *Cryo-Lett* 8: 53-55.
- Kojima T, Oguri N, Shimada K, Souzu H (1988a) Cryomicroscopic observation of ice crystal germination initiated by silver iodide-alginate gel droplets in various aqueous solutions. *Cryo-Lett* (in press).
- 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.
- Kojima T, Soma T, Oguri N (1987a) Application of ice induction method using silver iodide to cryopreservation of bovine embryos. *Jpn J Anim Reprod* 33: 73-76 (in Japanese).
- Kojima T, Soma T, Oguri N (1987b) Application of silver iodide as an inducer of ice formation in cryopreservation of mammalian embryos. *Cryobiology* 24: 547 (abstract).
- Kojima T, Soma T, Oguri N (1988b) Effect of induction of ice nucleation by silver iodide immobilized in freezing of rabbit and bovine embryos. *Theriogenology* (submitted).
- Kojima T, Soma T, Oguri N (1988c) Ice induction

method by silver iodide for cryopreservation of mammalian embryos. *J Freezing Drying* (in press) (in Japanese).
Mason BJ (1962) The germination and growth of

snow crystals. *In: Clouds, Rain & Rainmaking*, the University Press, Cambridge, pp 46-73.
Vonnegut B (1947) The nucleation of ice formation by silver iodide. *J Appl Phys* 18: 593-595.

要 約

本研究では、固定化ヨウ化銀による植氷方法を用いて緩速冷却後に凍結された胚の移植後の生存を確かめるために、牛胚の移植試験を実施した。2%のヨウ化銀を含むゾル状の2%アルギン酸ナトリウム水溶液を100mMの塩化カルシウム水溶液中へ滴下することにより、固定化ヨウ化銀を作製した。品質が優ないし良に格付けされた牛の7日目胚5個を供試し、まず10%グリセロール・PBI(10%FBSを添加)溶液中で30分間平衡させた後、胚を1個ずつ1個の固定化ヨウ化銀ドロップレットとともに0.25ml容量のプラスチックストロー中に吸引した。-7°Cで5分間の保持時間を設けた後、-36°Cまで0.3°C/minで冷却を続け、最終的に液体窒素中へ浸漬して保存した。移植当日に急速に融解し、回収した胚を0.5Mショ糖・PBI溶液に浸漬した後、変性の徴候を見せていた1個を除き残りの4個を2頭の同期化した受胚牛に各2個ずつその黄体側子宮角に頸管経由法により移植した。その結果、どちらの受胚牛も受胎した。超音波診断では、双胎を確認することはできなかったが、移植胚4個のうち少なくとも2個が胎児に発育したことが認められた。本研究の結果から、固定化ヨウ化銀による植氷方法は凍結融解牛胚の移植後の生存性を阻害しないことが推察された。