

核磁気共鳴法による受精周辺期の  
卵代謝に関する研究

(研究課題番号：61570778)

昭和62年度科学研究費補助金(一般研究C)  
研究成果報告書

昭和63年3月

研究代表者 石川睦男  
(旭川医科大学医学部助教授)

体外受精、胚移植という技術が不妊症の治療に計りしれない恩恵を与えつつある。しかし、その一方で先天異常の発生原因を受精周辺期にもとめる研究は依然として不十分である。特に配偶子の成熟期、受精期、卵割期の代謝のメカニズムに関しては不明といってよい。現在まで、卵の呼吸代謝の検討は少なく、ウニの受精卵の報告のみである。

本研究は哺乳類の受精卵の呼吸代謝を無侵襲で計測する目的で核磁気共鳴法（NMR）を用いて、受精周辺期の卵の呼吸代謝計測の基礎的検討を試みたので報告する。

## 研究組織

研究代表者：石川 睦 男（旭川医科大学医学部産婦人科助教授）  
研究分担者：田 中 邦 雄（旭川医科大学実験実習機器センター助教授）  
                  笠 茂 光 範（旭川医科大学医学部助手）  
                  柴 田 繁 男（旭川医科大学医学部助手）

## 研究経費

昭和61年度：1,400千円  
昭和62年度： 800千円  
計          : 2,200千円

## 研究発表

### イ. 学会誌等

- (1) 千石一雄、石川睦男、柴田繁男、清水哲也：初期胚の細胞内呼吸代謝に関する研究—微小電極法による初期胚組織酸素濃度測定、日本産科婦人科学会雑誌、38、1721—1732、1986.
- (2) Ishikawa, M., Sengoku, K., Kasamo, M., Yamashita, K. & Shimizu, T.: Penetration of estrogen and cephalosporine into the preimplantation blastocyst. *Biological Research in Pregnancy*, 7, 176 — 178, 1986.
- (3) 清水哲也、高田久士、石川睦男：未受精卵の凍結保存、産婦人科の実際、36、607 — 613、1987.
- (4) 清水哲也、浅川竹仁、石川睦男：成熟卵胞の診断、54、572 — 575、1987.
- (5) 高田久士：マウス未受精卵および受精卵の凍結融解法に関する研究：日本産婦人科学会雑誌、40、1988. 掲載予定.
- (6) Sasaki, K., Ishikawa, M., Shimizu, T. & Akino, T.: Fetal lung phospholipids in chinese hamster with spontaneous diabetes. *International J. Feto-Maternal Medicine*, in press.

### ロ. 口頭発表

- (1) 高田久士、浅川竹仁、水上明保、石川睦男、清水哲也：マウス未受精卵および受精卵の凍結融解後の生存性に関する検討、第31回日本不妊学会、仙台、1986、10. 16.
- (2) 高田久士、浅川竹仁、石川睦男、清水哲也：各種凍結法を用いてのマウス未受精卵および受精卵の生存性に関する比較検討、第39回日本産婦人科学会、東京、1987、4. 2.
- (3) 笠茂光範、石川睦男、菊川美一、浅川竹仁、清水哲也：ヒト排卵期の卵胞液における

- prostaglandinsとその意義に関する研究、第39回日本産婦人科学会、東京、1987、4、3。
- (4) 石川睦男：Prostaglandins と抑制物質、第32回日本不妊学会シンポジウム、金沢、1987、11、24。
- (5) 柴田繁男、石川睦男、清水哲也：初期胚の細胞内代謝に関する研究—卵子細胞内pH の測定：第40回日本産婦人科学会、大阪、1988、4、4。発表予定

## 研究成果

1.研究目的：受精周辺期の卵代謝すなわち、配偶子成熟期、受精期、卵割期、胚盤胞期などの代謝機構は全く不明であるという過言ではない。現在まで受精周辺期の呼吸代謝の検討は少なく、ウニの受精卵の報告のみである。しかし、この報告も受精卵をホモジュナイズしてpH を測定するための細胞内制御系を破壊している可能性がある。本研究は、哺乳類の受精周辺期の卵の呼吸代謝を解明するため、NMRによる卵の代謝計測の基礎的情報を得ることを目的とした。

### 2.研究成績：

#### (1) 微小電極法による初期胚組織酸素濃度測定

微小電極を用い受精前後、初期卵割期における卵細胞内呼吸代謝に関し基礎的検討を行った。

方法：ゴールデンハムスターをPMS-hCGにて排卵誘発し、トリプシン処理による透明帯除去卵を使用した。m-TAPL培養液内で細胞内酸素分圧測定用微小電極(Fragile Microelectrode)をマイクロマニピュレーター操作下にて卵子内に挿入しTCP製ケミカルマイクロセンサーシステム(Model 1201)により卵細胞内酸素濃度の測定を行った。さらにcapacitation完了後の精子をinseminationし受精前後の卵細胞内、酸素濃度およびin vivoでの卵割期の酸素濃度の測定を行った。

その結果：①培養液中の $PO_2$ 濃度が83.9～99.0 mmHgを示したのに対し、未受精卵の $PO_2$ は38.0～63.8 mmHgであった。②in vitroにおける受精前後の細胞内 $PO_2$ の濃度は著明な変化を示さなかった。③in vivoにおける2細胞卵の $PO_2$ は $58.5 \pm 5.6$  mmHgを示し、未受精卵およびinsemination後の卵に比し有意な上昇を示した。④4細胞卵、6～8細胞卵の $PO_2$ はおのおの $59.7 \pm 6.2$  mmHg、 $60.7 \pm 3.1$  mmHgを示し、卵割の進行にともない $PO_2$ の上昇傾向を認めた。以上より、微小電極法により初めて受精前後、初期卵割期の細胞内 $PO_2$ 測定に成功し初期卵割期より卵細胞内 $PO_2$ が上昇することを認め、この時期より呼吸代謝活性が賦活化される可能性が示唆された。

以上の成績の詳細は添付してある以下の別刷を参照されたい。

◎ 千石一雄、石川睦男、柴田繁男、清水哲也：初期胚の細胞内呼吸代謝に関する研究—微小電極法による初期胚組織酸素濃度測定—、日本産科婦人科学会雑誌、38巻、10号、1727—1732。1986。

(資料1参照)

#### (2) 胚盤胞の薬物代謝

受精卵の代謝の一つとして、受精卵の環境因子としての薬物の受精卵へ移行に関する基礎的検討を行った。すなわち胚盤胞へ、in vivoで投与されたcaffeine, nicotine, DDT, barbital, thiopentalなどが着床前の胚盤胞へ移行すること、Fabro & Sieberなどが明らかにしている。今回、性ステロイドのestradiolとcephalosporine系抗生剤のcefotaximeの家兎胚盤胞への移行を検討した。

cephalosporine系のcefotaximeはplasma中16200 cpm/ml、子宮へはplasma中の30%、5060cpm/gの分布を示し、blastocystへは340.0 cpm/ml、子宮への移行が少ないためplasma比0.02と、ほとんど痕跡程度であった。一方、estradiolはplasma中4650cpm/mlに対し、子宮には3.5倍の16500

cpm/gと高い蓄積を示し、blastocystへは、1370cpm/gの移行が認められ、plasma比 0.3 と高値を示した。この成績から、in vivoで投与された estradiol は blastocyst へ移行し、cephalosporine 系抗生物質の移行の少ないことから、in vitroで autoradiography を行い、in vivoと同様の成績であることを認めた。

以上の成績の詳細は添付してある以下の別刷を参照されたい。

- ◎ Ishikawa, M. , Sengoku, K. , Kasamo, M. , Yamashita, K. and Shimizu, T. : penetration of estrogen and cephalosporine into the preimplantation blastocyst. Biological Research in Pregnancy. vol. 7, No.4, 176-178, 1986.

(資料 2 参照)

### (3) 磷脂質の代謝に関する基礎的検討

Phospholipidは生体の組織特に細胞膜での呼吸代謝に関する重要な役割を荷っている。今回磷脂質の基礎的役割として、糖尿病合併妊娠の chinese hamster の胎仔肺の磷脂質の変動をモデルとして検討した。その結果、全体の phosphatidylcholine の含有には変化がなかったが、糖尿病群の胎仔肺の dipalmitoyl 種が正常群に比し減少していた。さらに、Phosphatidylglycerol が糖尿病群で減少していた。この成績は糖尿病合併妊娠において胎児肺成熟が遅延し、RDS 発症頻度が増加する病態を解明するものである。

以上の成績の詳細は添付してある以下の別刷を参照されたい。

- ◎ Sasaki, K. , Ishikawa, M. , Shimizu, T. and Akino, T. : Fetal lung phospholipid in Chinese hamster with spontaneous diabetes. International J. Feto-Maternal Medicine, in press.

(資料 3 参照)

### (4) 排卵周辺期におけるプロスタグランディンの意義

Prostaglandins (PG<sub>2</sub>) のヒト排卵への関与を解明する一環として、排卵直前の成熟卵採取卵胞液、未成熟卵採取卵胞液および卵未採取卵胞液のPGs, Estradiol (E<sub>2</sub>)、Progesterone (P<sub>4</sub>)、LH, FSH濃度を測定し、比較検討した。

対象はIVF-ET, GIFT 療法施行の29症例からえられた卵胞液 117検体である。排卵直前期の卵胞液採取後、卵の有無・成熟度を確認し、-40°C下に保管した。PGs、各種ホルモンの測定はRIAにて行った。

Prostanoidsの intraassay C. V.は、PGF 18.7%、PGE 16.8%、6 keto PGF<sub>1α</sub> 18.4%、TXB<sub>2</sub> 12.1%であった。成熟卵採取卵胞、未成熟卵採取卵胞、卵未採取卵胞の順に卵胞液濃度 (pg/ml) を平均値で示すと、PGFは995;766;704、PGEは11732;7772;7951であった。PGF、PGEともに成熟卵採取卵胞は卵未採取卵胞に比し有意に高値を示した (P<0.05)。未成熟卵採取卵胞はPGFで両者の中間の値を示し、PGEは卵未採取卵胞より低値を示した。6 keto PGF<sub>1α</sub> は905;715;852を示し、成熟卵採取卵胞で未成熟卵採取卵胞に比し有意に高値となり (P<0.05)、卵未採取卵胞は両者の中間の値を示した。TXB<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>、LH、FSHに関しては、3者間に有意差を認めなかった。

卵胞レベルでみると、ヒト排卵直前期の卵成熟・排卵機構においてPGF、PGE、PGI<sub>2</sub>、がTXA<sub>2</sub>、steroids, gonadotropinsよりも、より重要な役割を果たしている可能性を明らかにした。

以上の成績の詳細は添付してある以下の別刷を参照されたい。

◎ 石川睦男：Prostaglandinsと抑制物質、第32回日本不妊学会シンポジウム「ホルモン抑制物質と生殖」1987年11月24日（金沢）

（資料4参照）

(5) 核磁気共鳴法による胚盤胞の代謝の基礎的検討

近年、受精現象をさまざまな面から分析し、そのメカニズムの解明を行おうとされつつある。しかしながら、生きた状態での発生生物学的な中心課題である細胞内pHの変化の測定については、ウニ卵においてInoue & Yoshioka (1980) らが行い、受精前後のウニの卵細胞内のpH変化はほとんどないと報告した。しかし、Winklerら(1982)は、受精後、ウニ卵のpHは0.43アルカリ側へShiftすると報告するなど、受精前後のpHの変化はいまだ結論がでていないのが現状である。

一方、哺乳動物卵のpHの受精前後における変化は、全く解明されていない。それは、卵自体が非常に小さいことと、一度に多数の卵を得ることは不可能に近いためであった。

しかしながら、NMR測定装置の向上により、小片の組織内<sup>31</sup>Pの変化も可能となりつつある。そこで、今日、われわれは家兔のblastocystを用いることにより、<sup>31</sup>Pのシグナルを得ることができるかを試みた。

【材料および方法】

供試動物は、体重2.5～3.0 kg（生後3～5年）の雌ウサギ（Japanese white）を用い、交配用雄としては、同種の体重3.5～5.0 kg（生後4～6年）を使用した。過排卵処置として、PMSCT 100 I. U.を筋注し、72時間後に雄と強制交尾法にて交配し、直ちにhCG 100 I. U.を耳静脈へ静注した。交尾後6日目の着床直前の直径0.1～0.3 mmのblastocystを子宮内灌流法で生理的食塩水にて行うことによって得た。blastocystは20～40個が1羽の雌から得られ、10～21個を内径5 mm、高さ20 mmのNMR用特殊ガラス管へ入れ、Parafilmで封入後、銅コイル内に固定後<sup>31</sup>P-NMRにてリンのスペクトルの測定を行った。装置は、FT-270 HT FTNMRを用い、室温にて109.25 MHzで0.398秒に1回積算して行った。15分（1790回）、30分（3115回）、1～10時間まで各1時間間隔で行い、16時間（115200回）で終了した。NMRに用いなかった残りの卵は、室温での培養と、さらに残りは凍結保存を行った。

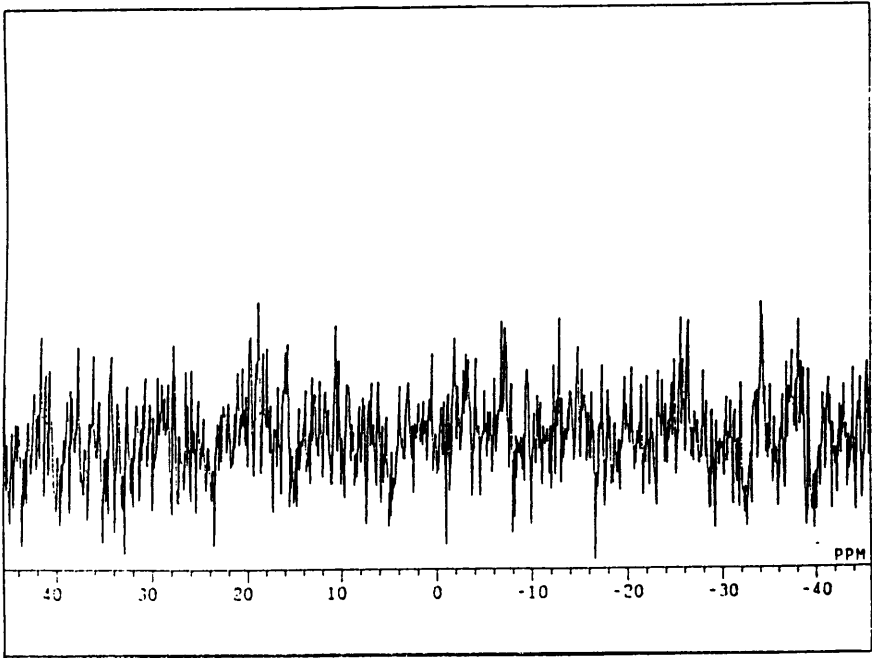
培養は室温にて4時間、16時間行い、実体顕微鏡下とトリパンブルーによる生体染色にて、その生存性を調べた。

凍結は、急速凍結法を用い、30% Glycerol+0.25M Sucroseを用いて5分間平衡後、-170℃で5分間保持後、-196℃の液体窒素中浸入し保存した。

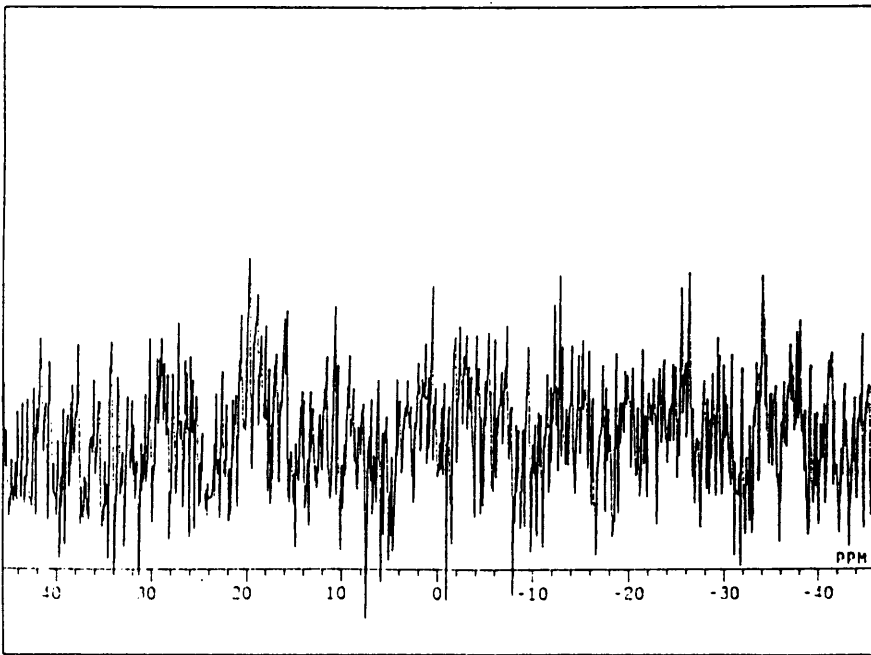
【結果】

①無機リンは30分後（3115回）から、増加傾向を示し、2時間（14418回）後からスペクトルは明瞭になり、16時間後には無機リンのみとなった。クレアチンリン酸や $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -ATPのスペクトルは15分から16時間不明瞭のままであった（図1、2、3、4）。②培養したblastocystは、4時間後はほとんど全部生存していたが、16時間後にすべて死滅していることが、この条件下で生染色により判明した。③30% glycerol+0.25M sucroseを用いて、5分間平衡後、-170℃で5分間保存し、-196℃の液体窒素中に入れ保存する急速凍結法を行った。凍結後の0.5 M sucroseによる一段階希釈による融解後の生存性は認められなかった。

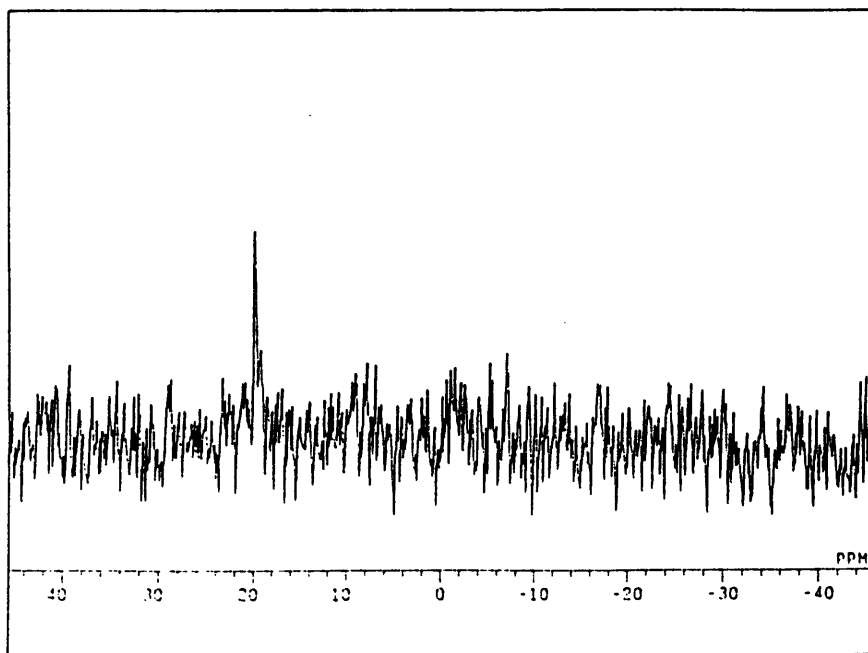
（図1、2、3、4参照）



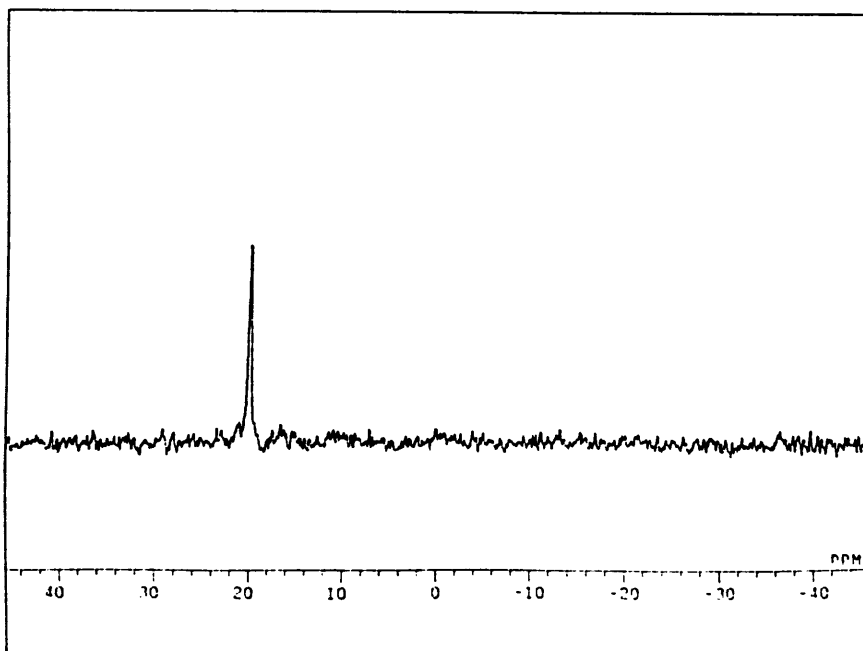
(图-1) 15分



(图-2) 30分



(圖—3) 2時間



(圖—4) 16時間

## 【考 察】

1. 受精現象による細胞内pHの変化はウニ卵で試みられているが、未だ結論が出ていない。一方、哺乳類動物卵の細胞内呼吸代謝は全く試みられていなかった。本研究で、4時間まで生存しているblastocystで哺乳類動物卵としては初めて、無機リンのスペクトルを検出することができた。2. ATPのスペクトルと区別が不明瞭の点から、測定法の改良が必要である。3. 0.1～0.3 mm径の大きなblastocystの凍結は急速凍結法は不適當な可能性があり、他の凍結融解法の選択が必要であることが示唆された。

### (6) 未受精卵および受精卵の凍結融解法に関する基礎的検討

哺乳類受精卵からNMR信号を検出するにはその質量が不十分なため、試料の集積が必要となり、そのための凍結技術が必須となる。そのため、マウス・ウサギを過排卵後交配し、受精卵を交配後の時間より各時期の受精卵を採取する。さらに過排卵後の未受精卵を採取し受精能を獲得した精子により試験管受精を行う。これらの各時期のin vivoの受精卵、in vitro 受精卵を10%グリセリンを含む20%FSC加PBS内に入れ自動凍結装置を用いて冷却し、液体窒素中でストロー保存をする。

各時期の受精後同一時期の受精卵を用いて微温湯で融解し培養を行う。本研究の目的はこの融解した受精卵から超伝導FT-NMR装置を用いて、NMR信号の検出を行い、どの程度の受精卵の数、分量で信号検出が可能であるかという基礎的検討である。哺乳動物の未受精卵凍結法に関しては、凍結融解後も再現性ならびに生存性の高い方法は未だ確立されていないのが現状である。今回、マウス未受精卵および受精卵の凍結融解後も高い生存率を示す凍結融解法の基礎的検討を行った。凍結法はprogram freezerを用いた緩慢法で行い、希釈法(0.5 M sucrose)と耐凍剤を組み合わせた以下の4実験を試みた。①耐凍剤として、10% glycerol + 0.25 M sucroseを用い、希釈は1-step sucrose法を行った。②耐凍剤は、1.5 M DMSO + 0.25 M sucrose、希釈は1-step sucrose法。③耐凍剤は、10% glycerol + 0.25 M sucrose、希釈は5-step sucrose法。④耐凍剤は、1.5 M DMSO + 0.25 M sucrose、希釈は5-step sucrose法を行った。対照として、採卵後直ちに体外受精または体外培養し、発育した卵を生存とした。未受精卵の生存率は、① 17.5 % ② 13.5 % ③ 19.2 % ④ 45.4 %、対照 60.1 %であった。受精卵は、① 72.6 %、② 64.4 % ③ 56.3 % ④ 25.0 %、対照 67.1 %であった。未受精卵では、耐凍剤として1.5 M DMSO + 0.25 M sucroseを用い、希釈法は5-step sucrose法を行った。④の方法が他の3方法よりも有意に生存率が高かった ( $P < 0.01$ )。受精卵では④の方法が生存率は他の3方法よりも有意に低く ( $P < 0.01$ )、①、②、③には有意の差は認められなかった。未受精卵では、耐凍剤として1.5 M DMSO + 0.25 M sucroseを用い、希釈法として、5-step sucrose法を用いた際に高い生存率を得ることができ、未受精卵の新たな凍結融解希釈法の開発に成功した。さらに未受精卵と受精卵の至適凍結希釈法が異なることより両者の耐凍能に差異のあることを示唆した。

以上の成績の詳細は添付してある以下の別刷を参照されたい。

◎ 清水哲也、高田久士、石川睦男：未受精卵の凍結保存。産婦人科の実際、36巻5号、607-613、1987。  
(資料5参照)

◎ 高田久士：マウス未受精卵および受精卵の凍結融解法に関する研究。日本産科婦人科学会雑誌、40巻4号、1988年掲載予定。  
(資料6参照)



(7) 初期胚の細胞内呼吸代謝に関する研究—卵子細胞内pHの測定

初期胚の細胞内環境についてわれわれは、すでに呼吸代謝に関して $PO_2$ 濃度を指標としてin vitroで微小電極法による直接測定を試みた成績を報告した。今回細胞内pHの変化を指標として、受精前後の卵細胞内呼吸代謝に関し基礎的検討を行った。

【方法】実験動物は、成熟ゴールデンハムスターを用いた。未受精卵は、自然排卵により卵管より採取し、酵素処理により透明帯を除去した。受精卵は、排卵前日自然交尾をさせ翌日卵管より採取し、前核形成したものを用いた。(Fig. 1)。

pH測定用の微小電極は、microfilament glassで作成しliquid ion exchangerを先端に詰めたものを使用した。amplifierは、Electrometer Model FD 223 (WPI社製)を用いた (Fig. 2)。微小電極の操作はMicromanipulatorで、位相差顕微鏡下にmicroinjectionを行った。

【成績】細胞内pHを、受精卵および未受精卵各20個について測定した。(Fig. 3、Fig. 4)はおのおの未受精卵、受精卵の実測を示す。これらの成績をまとめるとFig. 5のように、受精卵が未受精卵に比し有意にpHの上昇が確認された。受精後細胞内pHの上昇は、すでに棘皮動物で指摘されているが、今回の実験で哺乳類であるゴールデンハムスターでも上昇することが初めて確かめられた。細胞内pHを高くすると先体反応が起きやすくなることが棘皮動物で明らかになっている。今回の成績は先体反応による物質代謝が、細胞内pHの上昇と深く関わっていることを示唆する事実と考え報告する。

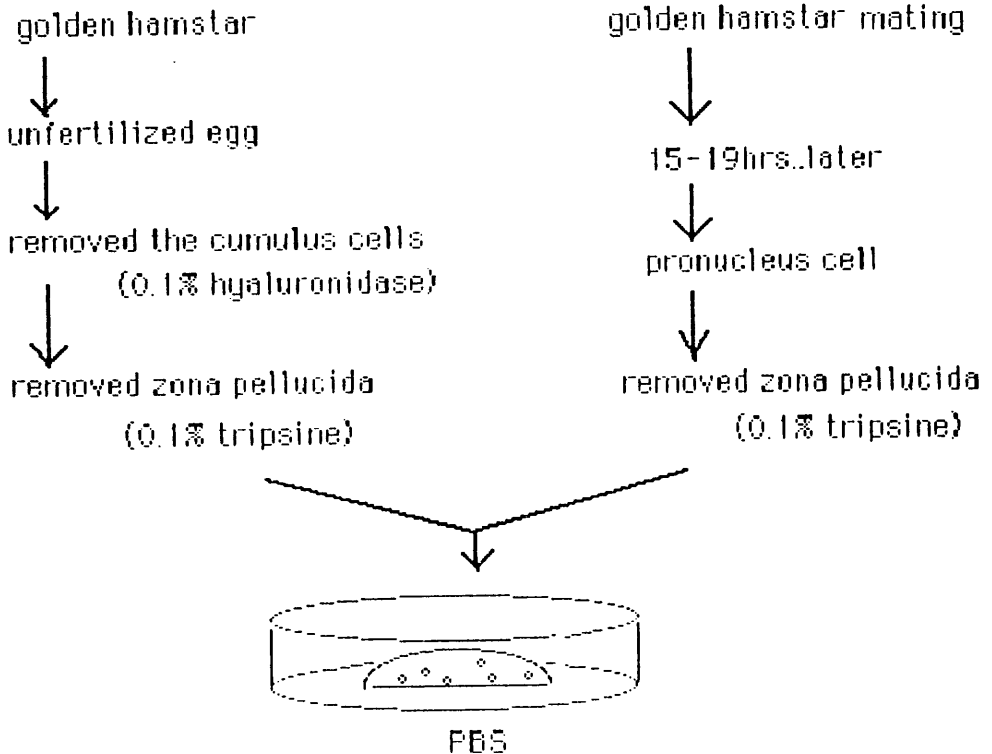


Fig.1 Materials

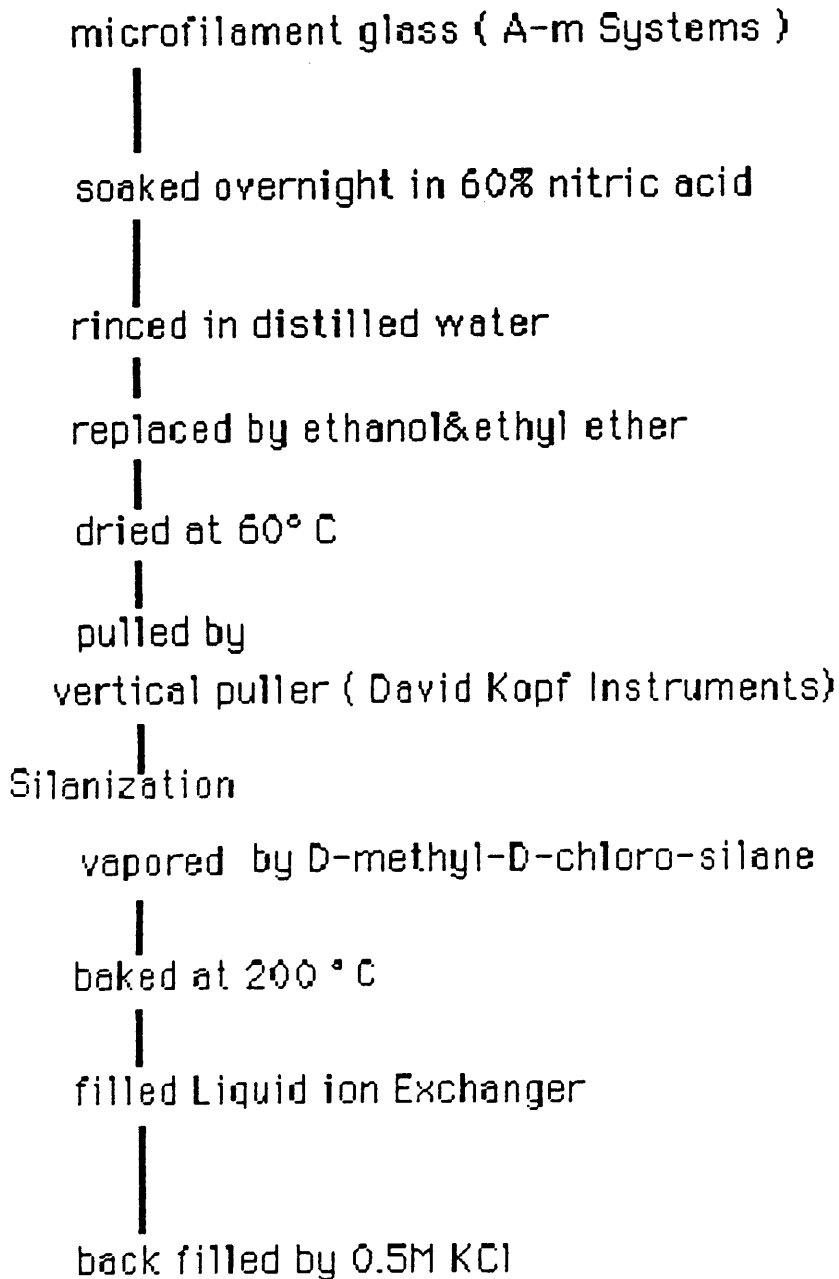


Fig.2 making of hydrogen ion selective microelectrode

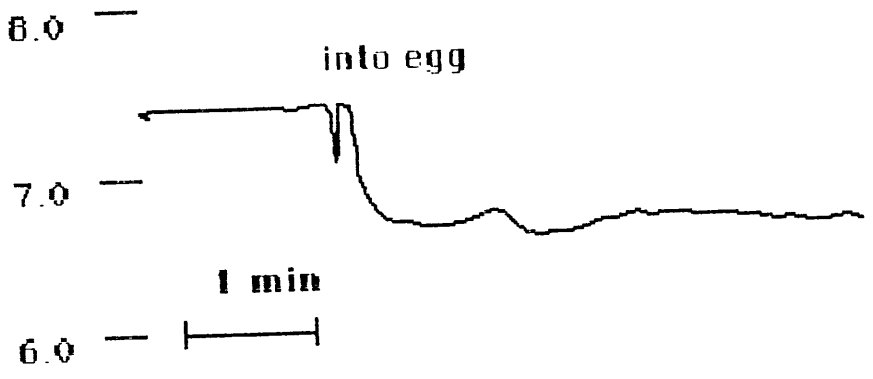


Fig.3 intracellular pH change of unfertilized egg

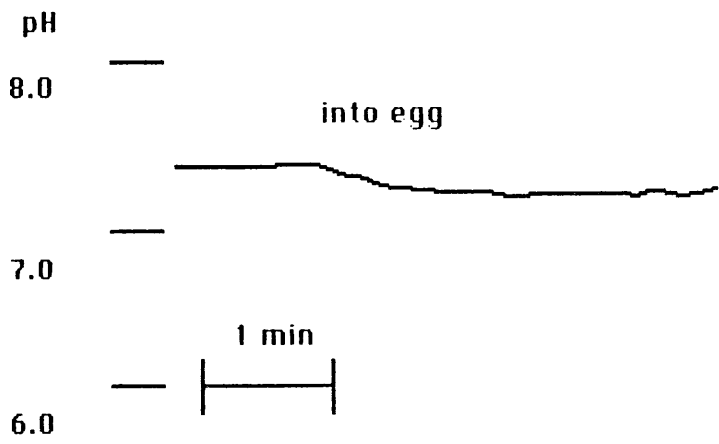


Fig.4 intracellular pH change of fertilized egg

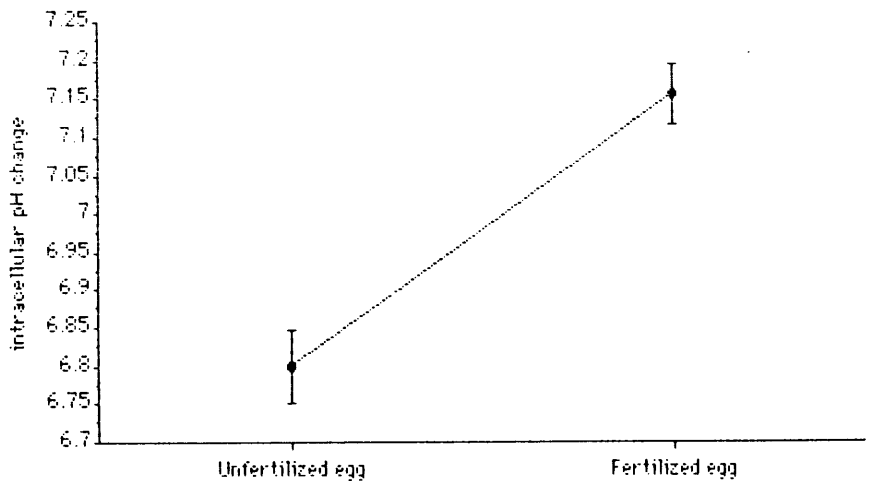


Fig.5 intracellular pH change

## (8) NMRによる排卵周辺期の卵巣代謝の検討

生体組織のエネルギー代謝は磷酸代謝で調節されている。 $^{31}\text{P}$ -NMRの計測は、非侵襲的に生体内の磷酸レベルを生体内変換を得ることのできる利点を有する。この方法を用いて、排卵周辺期の家兎の卵巣におけるエネルギー代謝の検討を行った。

【方法】Japanese whiteにPMS 100 I.U.を投し、その4日後にHCG 100 I.U.を投与し、家兎卵巣の灌流を行った。一方は $^{31}\text{P}$ -NMRの測定に使用し、他方は排卵の確認のため、controlとして使用した。 $^{31}\text{P}$ -NMR spectraは周波数 109.25 MHz、検出信号 $10\mu\text{ sec}$ . 繰り返しinterval 0.5 sec、検出時間30 minで12-16hrの間 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -ATP、Pi、PMEを計測した。その結果、HCG 100 I.U. 投与後30 min後より16hrまで計測したが、 $\alpha$ -ATPのnotchが経時的に変化したか、それ以外の著明な変化は見られなかった。以上より、十分 $^{31}\text{P}$ -NMR計測はHCG投与30分後より24時間程行えることが明らかとなった。

今後、灌流停止によるHypoxiaの影響、排卵現象と $^{31}\text{P}$ -NMR信号との正確な相関を検討する予定である。さらに、HCG投与なしで卵巣を灌流し、in vitroでHCGを投与してその効果をみる。さらに、基準物質をあらかじめ入れておくことにより、 $^{31}\text{P}$ -NMRによる細胞内pHの測定を行い、排卵前後で比較検討を行う予定である。

## ま と め

受精周辺期の卵の呼吸代謝は現在のところ全く不明なので本研究を施行した。

### (1) 微小電極法による初期胚組織内酸素濃度測定

未受精卵、受精卵における呼吸代謝をゴールデンハムスターを用いて検討した。その結果、微小電極法により初めて受精前後、初期卵割卵の細胞内 $\text{PO}_2$ 測定に成功し、初期卵割卵より卵細胞内 $\text{PO}_2$ が上昇することを認め、この時期より呼吸代謝活性が賦活化される可能性が示唆された。

### (2) 胚盤胞の薬物代謝

受精卵の代謝を検討するため、家兎の胚盤胞への性ステロイド、抗生物質の移行を検討した。セファロsporin系抗生剤の胚盤胞への取り込みはほとんど認められなかったが、性ステロイドのエストラジオールは、明らかな移行と蓄積が認められた。このことは、子宮内において、着床前に胚盤胞へestrogenが移行し、活発に代謝している可能性が明らかとなった。

### (3) 磷脂質の代謝に関する基礎的検討

磷脂質は細胞膜での呼吸代謝に関与している。糖尿病合併妊娠の胎仔肺のphosphatidyl-glycerolの含有が有意に減少していることを明らかにした。この成績は糖尿病合併妊娠において胎児肺成熟が遅延し、RDS発症頻度が増加する病態を解明するものである。

### (4) 排卵周辺期におけるプロスタグランディンの意義

PGsのヒト排卵現象における意義の究明のため、排卵直前期の卵胞液中のPGs濃度を測定した。その結果、成熟卵採取卵胞は卵未採取卵胞に比し、PGEならびにPGFの濃度は有意に高かった。このことは、卵胞レベルで見ると、ヒト排卵直前の卵成熟、排卵機構にPGE、PGFが重要な役割を果している可能性を明らかにした。

### (5) 核磁気共鳴法による胚盤胞の代謝の基礎的検討

NMRによる胚盤胞のPのスペクトル測定を行い、胚盤胞で哺乳動物卵としては初めて、無機

リンのスペクトルを検出することができた。

(6) 未受精卵および受精卵の凍結融解法に関する基礎的検討

哺乳動物受精卵よりNMR信号を検出するにはその質量が不十分なため、試料の集積が必要となりそのためには凍結技術が必要となる。今回、未受精卵では、耐凍剤として1.5 M DMSO+0.25M sucroseを用い希釈法として、5-step sucrose法を用いた際に高い生存率を得ることができた。また、未受精卵と受精卵の至適凍結希釈法が異なることが明らかとなった。

(7) 初期胚の細胞内呼吸代謝に関する研究—卵子細胞内pHの測定

微小電極法による細胞内pHの測定を基に、受精前後の卵細胞内呼吸代謝に関し、基礎的検討を行った。その結果、受精卵の細胞内pHが未受精卵に比し有意の上昇が確認された。

(8) NMRによる排卵周辺期の卵巣代謝の検討

$^{31}\text{P}$ -NMRによる排卵周辺期の家兔卵巣におけるエネルギー代謝を検討した。その結果、HCG投与後30分から16時間の間 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -ATP、Pi、DMEの計測が可能となり、今後排卵周辺期における $^{31}\text{P}$ -NMRによる細胞内pHの測定の可能性を明らかにした。

以上に記した研究成果から、所期の目的の実験等の確立に関する基礎的な部分は達成されたと思われる。今後、これらの成績をふまえ、受精卵の非侵襲的な代謝の計測について現在端緒にあり、今後さらに検討を加えてゆく必要がある。その成績も除々に蓄積されており、近い将来公表の予定である。