

遅延排卵の卵および妊孕現象に及ぼす 影響に関する基礎的研究

東京大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 坂元正一教授)

佐藤 孝道

Experimental Studies of the Causative Role of Delayed Ovulation in Reproductive Wastage

Kodo SATO

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo

概要 遅延排卵の卵及び妊孕現象に及ぼす影響からヒト誘発排卵例を含めた流産の原因と遅延排卵の関係を検討するために、ヒトの現象との比較が可能な動物実験モデル(ラット)を用いて基礎実験を行った。

実験Ⅰ: 対照群(18匹), pentobarbital sodium によつて LH surge を block することにより排卵を2日遅延させた群(19匹), estradiol benzoate により発情間期を延長し排卵を遅延させた群(20匹)のそれぞれについて、妊娠2日目の卵及び妊娠20日目の胎仔を比較検討した。

実験Ⅱ: 下垂体摘除ラットに PMS 100 i.u. 及び HCG 100 i.u. を2日(5匹), 3日(8匹), 4日(13匹), 5日(8匹), 6日(3匹)の間隔で投与し排卵を誘発, 交尾させた後妊娠0日の卵につき形態学的及び染色体学的に比較検討した。

以上の実験の結果, 以下のことが明らかとなつた。

1) 卵胞が充分発育しているにもかかわらず内因性の LH surge が発来せずその結果排卵が遅れた場合(いわゆる遅延排卵)には, 発生異常の頻度が増加するが, 発情間期の延長による排卵の遅延は発生異常の原因とはならない。

2) ゴナドトロピンによる排卵誘発に於いても, HCG 投与の timing が遅れると, 遅延排卵と同様の現象が起り発生異常の頻度が増加する。

3) ラットでは遅延排卵によつて受精不能卵, 形態異常卵及び多精子受精卵が増加し, その結果妊娠末期では流産(着床痕)の増加や生仔数の減少が観察される。また奇形の頻度も増加するようである。

4) ヒトに於けるゴナドトロピン誘発排卵妊娠例の高い流産率に, 遅延排卵現象の関与している可能性と, 治療法改善の方向が示唆された。

Synopsis The causative role of delayed ovulation in reproductive wastage was studied using mature virgin rats.

1) The developments of ova and fetuses were examined in pregnancy taking place at the ovulation delayed by blockage of LH surge (socalled "delayed ovulation") or the first ovulation after prolonged diestrus, compared with those in natural conceptions. Increased incidence of abnormally developed ova and decreased numbers of implantation sites and viable fetuses were observed only in the pregnancy following "delayed ovulation". These results suggest that mere prolongation of the cycle without blockage of LH surge has no teratogenicity.

2) In hypophysectomized rats, ovulation was induced with PMS and HCG given at various intervals between 2 and 6 days and mating was took place. The relationship between the interval of injection and developmental abnormalities of ova at 1-cell stage was studied. With a 3-day interval, the highest fertilization rate was observed; extension to 4 or more days significantly reduced the incidence of fertilization; the number of ova containing supernumerary sperm and polyploidy increased however. Thus the same phenomenon as "delayed ovulation" occurs, when the injection of HCG is delayed, and suggested to be related to the high incidence of spontaneous abortion in the pregnancies after gonadotropin-induced ovulation also in man.

緒 言

卵・卵胞の成熟から排卵，受精に到る一連の現象が正常であるためには，back ground である視床下部一下垂体一卵巣系の正確かつ周期的な内分泌環境が前提となるべきことは，自明の理である。しかし，ヒトで妊孕の起る性周期をもつと考えられる場合でさえ，約10%も流産することは，新しい観点から流産の真因を深究すべきことを求めているように思われる。

流産胎児に於ける染色体異常の発見率が，生産児のそれが0.5%である¹⁾のに比べて50%以上にも達する²⁾ことから，染色体異常が他の原因による奇形と共に，今日，流産の重要な因子であると考えられるようになった。勿論，染色体異常個体発生の原因及び，原因を遺伝や臨界期の催奇形因子に見い出せない一部の奇形の成因が，配偶子形成過程や受精周辺期の何らかの異常に基づくことは言うまでもないが，更に遡行しての原因は尚不明という他はない。興味あることは，最近，内分泌制御系の異常に基づく卵・卵胞の成熟，排卵過程の障害が，排卵周期異常のみならず，受精能を含めての卵自体の変化による流産や奇形を招来する可能性を示唆する事実が出て来たことである。

著者が既に報告した³⁾ように，東大産婦人科教室に於ける最近4年間の誘発排卵妊娠の予後を見ると，妊娠4カ月までの流産率は，clomiphene 単独投与12/58例=20.7%，HMG-HCG 療法5/21例=23.9%にも及ぶ。後者では多胎を含むとは言え，満期産率は57.1%にすぎない。産婦人科臨床にとって，このような異常の原因の究明は，原因不明とされていた一般流産の原因把握と共に，何にもまして重要な課題である。

著者は，原因要素の検討の中から，いわゆる遅延排卵に焦点をあてるべきであると考え検討を行った。遅延排卵は，配偶子形成過程の異常の一つであり，両棲類⁴⁾やラット⁴⁾⁵⁾⁷⁾で染色体異常や奇形などの発生異常の原因となることが知られており，ヒトでも臨床的にしばしば遭遇する月経周期15日目以降の排卵¹⁰⁾やピル服用中止後の排卵でも，同様の現象が起る可能性が報告されているか

らである。

しかし，遅延排卵現象の本態に関しては，なお未解明の点も少なくない。排卵の遅延は一つの現象ではあつてもその原因は単純ではない。排卵の時間的遅延そのものが発生異常の原因となるのか，あるいは排卵の遅延を伴った配偶子形成過程のより本質的な異常にその原因があるのかという問題も，その本態に関係する重要な問題である。本研究の実験Iでは，この問題を解明するための基礎的段階として，ラットを用いて，二種類の異なるtypeの排卵の遅延と発生異常との関係を比較し，排卵の単なる時間的遅延が発生異常の原因となり得るか否かについて検討した。

更に，実験IIでは，上述の教室に於る臨床事実の解明のため，排卵誘発剤の投与方法によつては，理論上遅延排卵を起し流産に繋がる異常が発生し得るか否かを，ラットを用いて検討した。また本実験では，ヒトの現象をもある程度類推し得る動物実験モデルとするために，動物特有の周期をもつ内因性ゴナドトロピンの影響を除去すべく下垂体摘除ラットを用い，あわせてその実験モデルとしての有用性を検討した。

実験方法

1. 実験対象

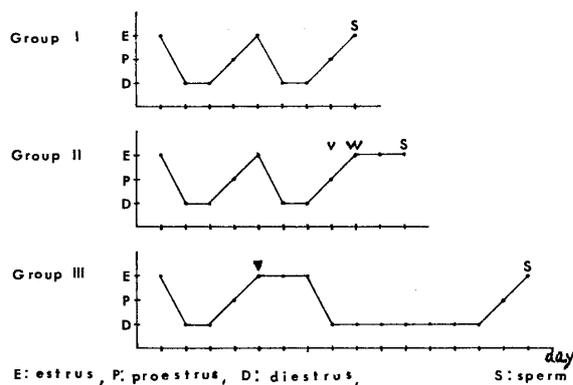
温度及び照明時間が一定の環境下で飼育した体重180gから240gのWistar系成熟処女ラットを用いた。照明は，午前5時から午後7時までとし，規則的な4日性周期であることを3周期以上確認したものを実験に供した。

2. 実験I——人工的遅延排卵，偽妊娠後の卵と発生異常に関する実験——

a. 実験群

ラットは3群に分け第1群を対照群とした。第1群(計18例)では，発情前期の午後雄と同居させ，翌朝膣スミア中に精子の認められたものを妊娠0日とした。第2群(計19例)は，pentobarbital sodiumを用いてLH surgeをblockし，発情期の延長により排卵を2日遅延させた。pentobarbital sodiumは，Everett et al.⁶⁾の方法に準じて，発情前期の午後1時50分と翌日の午後1時

図1 実験処置と膣スメアの変化(実験I)



v pentobarbital sodium 30 mg/kg injection
 proestrus: 1:50 pm
 2nd day : 1:50 pm, 3:30 pm
 ▼ estradiol benzoate 2.5 μ g injection
 estrus : 1:50 pm

50分, 3時30分の計3回, 1回あたり30mg/kgを腹腔内へ投与した。pentobarbital sodium 最終投与の翌日の午後雄と同居させ, 更にその翌朝, 膣スメア中に精子の認められたものを妊娠0日とした。第3群(計20例)は, estradiol benzoateを用いて発情間期を延長することにより排卵を遅延させた群であり, 一種の偽妊娠状態後の初回排卵を利用したと考えてよい。estradiol benzoateは, 発情期の午後1時, 1匹あたり2.5 μ gを皮下投与した。延長した発情間期の後の最初の発情前期の午後雄と同居させ, 翌朝膣スメア中に精子の認められたものを妊娠0日とした。図1に, 各群の実験処置とそれぞれの膣スメアの典型的な変化を示した。

b. 妊娠初期に於ける卵の検討

以上のようにして妊娠した各群ラットのうち約半数は, 妊娠2日目に開腹し, 黄体数を数え, 卵管内より卵を回収した。卵の回収には, TC 199 + 20% fetal calf serum を用い flushing 法によつた。回収した卵は直ちに位相差顕微鏡下で, 採卵数, 形態異常卵数, 侵入精子数, 未受精卵数, 受精卵の分割の進行状況につき検討した。

c. 妊娠末期胎仔の検討

各群の残り約半数のラットは, 妊娠20日目に開腹し, 黄体数, 着床数, 生仔数, 着床痕数を確認

した。更に生仔に関しては, Bouin 液で固定後, Wilson 法¹⁸⁾による検索を行い, 内性器による性別の判定と共に, 外表・内臓奇形の有無を検討した。

3. 実験II —ゴナドトロピン誘発排卵に於ける遅延排卵と卵の異常に関する研究—

a. 実験群

内因性ゴナドトロピンの影響を除外し, 外から投与されたゴナドトロピンのみの影響を検討するために, 下垂体摘除ラットを用いた。下垂体摘除は, 小山の外耳道法¹²⁾変法により行い, 下垂体摘除後7~14日目実験に用いた。下垂体摘除が完全か否かは, 膣スメアの変化と, 解剖時の下垂体部の検索により確認し, 不完全と判定されたものは実験群から除外した。排卵誘発には, pregnant mare serum (PMS, セロトロピン: 帝国臓器) と, human chorionic gonadotropin (HCG, HCG-モチダ: 持田製薬) を, それぞれ1,000i.u./mlの濃度で, 0.6%食塩水に溶解したものを皮下注として用いた。注射時刻は午後2時と決め, PMS 100i.u. 投与後, それぞれ2日, 3日, 4日, 5日, 6日の間隔をおいた5群に, HCG 100i.u. を投与した。HCG 投与の午後, 雄と同居させ, 翌朝膣スメア中に精子が認められた場合, 交尾したものと判定した。図2に各群の実験処置とそれぞれの膣スメアの典型的な変化を示した。

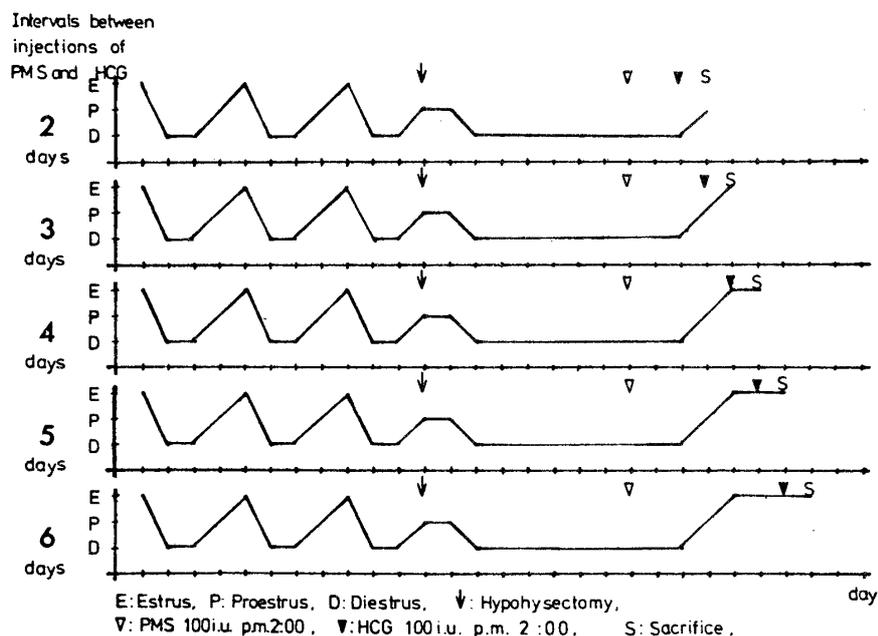
b. 卵の回収及び形態学的検討

膣スメア中に精子が認められた日の午後開腹し, 卵管内より卵を flushing 法により, TC 199 + 20% fetal calf serum + Kanamycin 100 μ g/ml の培養液中に回収した。回収した卵は直ちに位相差顕微鏡下で, 採卵数, 形態異常の有無, 侵入精子数, 雌雄前核, 極体の状態を観察した。

c. 受精卵染色体標本の作成と分析

受精卵については, 形態異常等に関する観察の後, 直ちに同じ培養液に colcemid を最終濃度 0.06 μ g/ml の割合で加えた液中で, 37°C, 5% CO₂ の条件下において培養した。卵は, 翌朝, 上口らの方法¹¹⁾に準じて染色体標本を作成し, 染色体分析および前核の判別が可能なるものを分析の

図2 実験処置と腔スミアの変化(実験II)



対象とし、多倍体の頻度を検討した。

実験成績

1. 実験I

a. 排卵の遅延処置の成功率及び交尾率

第2群で pentobarbital sodium によつて、排卵の一日遅延に成功した割合は、予備実験に使用したラットも含めて88.9% (32/36例)、2日遅延に成功した割合は75.0% (27/36例)であつた。また、第3群で estradiol benzoate による排卵の遅延は全例に成功し、前回排卵と延長した発情間期後の初回排卵との間隔は平均 10.8 ± 2.8 (M \pm S.D.) 日であつた。また各群の処置に成功したものの中で交尾したものは、第1群88.9% (24/27例)、第2群88.9% (24/27例)、第3群90.9%

(20/22例)で、交尾率は各群の間に差がない。

b. 黄体数

妊娠2日及び20日目の開腹時における平均黄体数は、第1群12.9個/匹(ラット数=18)、第2群11.6個/匹(ラット数=19)、第3群12.6個/匹(ラット数=20)であり、各群の間に有意の差はない。

c. 妊娠初期に於ける卵の検討結果

i) 形態異常(表1)

回収卵のうち正常な形態所見を示したものは、第1群では83% (90/108個)、第2群では65% (66/101個)、第3群では82% (82/100個)であり、第2群で正常発育卵が有意に減少していた ($P < 0.01$)。逆に、不均等卵割や細胞の萎縮、変性、分

表1 Incidences of morphologically abnormal development observed in the zygotes on day 2 of gestation (実験I)

	No. of litters	No. of CL	No. of eggs examined	Morphological findings			
				Normal (%) ¹	Abnormal (%) ¹	Abnormal ? (%) ¹	Unfertilized (%) ¹
Group I	11	135	108	90(83%)	6(6%)	2(2%)	10(9%)
Group II	12	135	101	66(65%)**	19(19%)**	5(5%)	11(11%)
Group III	10	125	100	82(82%)	6(6%)	3(3%)	9(9%)

¹ Based on examined ova.

** Highly significant difference from the Group I ($p < 0.01$).

表2 Incidences of supplementary sperm observed in the zygotes on day 2 of gestation (実験I)

	No. of eggs examined	No. of eggs with single sperm	No. of eggs with supplementary sperm
Group I	108	19	4
Group II	101	22	22**
Group III	100	18	4

** Highly significant difference from the Group I (p<0.01).

割の停止など明らかな形態異常を示す卵は、第1群では6% (6/108個)、第2群では19% (19/101個)、第3群では6% (6/100個)に見られ、やはり第2群で有意に増加した (P<0.01)。また、正常卵、異常卵の頻度は、第1群と第3群の間ではほとんど差がない。

ii) 卵割への多精子侵入卵数 (表2)

単一の精子が卵割に認められる卵の頻度は、各群でほとんど差がないが、多精子が卵割に認められる卵の頻度は、第1群、第3群がそれぞれ4/108個、4/100個に対して、第2群は22/101個であり、有意に増加していた (P<0.01)。

iii) 卵割の進行

卵割の進行状況を未受精卵を除いて検討すると、第1群と第3群の間ではその分布にほとんど差は見られなかったが、第2群では4分割卵が減少し (第1群の65.3%に比べ、45.6%)、一方2分割以下の卵 (第1群の22.4%に比べ33.3%) と、8分割以上の卵 (第1群の1.0%に比べ5.6%) の割合が増加していた。なお、第2群の8分割以上の卵については、正常に受精をした卵と、いわゆる fragmentation を起こしつつある卵を妊娠2日

目の時点で鑑別するには困難があり、実際にはその大部分が fragmentation であると考えられる。

d. 妊娠末期胎子の検索結果

i) 着床痕, 生仔数, 着床痕数 (表3)

第1群7例, 第2群7例, 第3群10例の母体ラットにつき検討の結果, 一匹あたりの平均胎仔数は, 第1群12.3, 第2群8.3, 第3群11.6であり, 第2群で生児数が有意に減少した (P<0.01)。また, 流産に相当すると考えられる着床痕数は, 第2群で着床数63に対し5であり有意に高い (P<0.05)。生仔数と着床数を加えた着床数も, 第1群12.4/匹, 第2群9.0/匹, 第3群11.8/匹と, 有意ではないが第2群で少ない。

ii) 生仔の性比及び外表・内臓奇形 (表4)

各群の胎子の雌雄の比は, 第1群43/43, 第2群20/38, 第3群60/56と, 第2群で雌が多い傾向

表4 Sex ratios and developmental abnormalities of internal organs in near-term fetuses (実験I)

	No. of fetuses examined	Sex ratios ♂/♀	Developmental abnormalities in internal organs
Group I	86	43/43	Hydronephrosis ; 1
Group II	58	20/38	Hydronephrosis ; 3 Fused placenta ; 1 ASD ; 1 Hernia + ASD ; 1
Group III	116	60/56	ASD ; 1

が認められたが, 有意の差はない。また, 外表・内臓奇形の頻度も, 第1群1/86, 第3群1/116に比べ, 第2群は6/58で, 第2群に多発する傾向があり, 癒合胎盤, 腹壁ヘルニアなどが認められた。

表3 Numbers of implantation sites, viable fetuses and degenerating sites on day 20 of gestation

(実験I)

	No. of litters	No. of CL	No. of implantation sites	No. of viable fetuses	No. of degenerating sites
Group I	7	97	87 (12.4)	86 (12.3)	1 (0.1)
Group II	7	86	63 (9.0)	58 (8.3)**	5 (0.7)*
Group III	10	126	118 (11.8)	116 (11.6)	2 (0.2)

(): No./No. of litters.

* Significant difference from the Group I (p<0.05).

** Highly significant difference from the Group I (p<0.01).

表5 The effect on ovulation of the intervals between injections of PMS and HCG

(実験II)

Interval between PMS and HCG (days)	Total no. of rats	Ovulated rats		No. of ova / Ovulated rat (S.E. ²)
		No.	% ¹	
2	5	0	0	0
3	8	8	100.0	16.6±5.0
4	13	13	100.0	17.5±2.5
5	8	8	100.0	31.5±4.4
6	3	2	66.7	19.5±2.8

¹ Based on total rats.² S.E. : Standard error.

表6 The effects on fertilization of the intervals between injections of PMS and HCG

(実験II)

Interval between PMS and HCG (days)	Rats ovulated and mated		No. of ova examined	Ova fertilized		Fertilized ova with supplementary sperm	
	No.	% ¹		No.	% ²	No.	% ³
3	7	87.5	131	97	74.0	23	23.7
4	8	61.5	143	62**	43.4	36*	58.1
5	3	37.5	65	28*	43.1	14	50.0
6	1	50.0	16	0**	0	0	

¹ Based on ovulated rats.² Based on examined ova.³ Based on fertilized ova.* Significant difference from the group of 3-days interval ($p < 0.05$).** Highly significant difference from the group of 3-days interval ($p < 0.01$).

2. 実験II

a. PMS と HCG の投与間隔と排卵誘発率および排卵数 (表5)

回収された卵の有無をもつて排卵誘発の成否とし、またその数を排卵数とした。PMS と HCG の投与間隔が2日の群では5例全例に排卵が認められず、一方3日、4日、5日のそれぞれ8例、13例、8例のラットでは全例に排卵が認められた。また投与間隔が6日の群では、3例中2例に排卵が誘発された。一匹あたりの排卵数は、投与間隔が5日の場合が最高で31.5±4.4 (M±S.E.) 個であった。

b. PMS と HCG の投与間隔と受精卵数 (表6)

排卵をしかつ交尾をしたラット (投与間隔3日群7例、4日群8例、5日群3例、6日群1例) から回収した卵を検討の対象とした。受精卵の回収卵中に占める割合は、投与間隔3日の群では

74.0% (97/131個)、4日では43.4% (62/143個)、5日では43.1% (28/65個)、6日では0% (0/16個)であり、投与間隔が3日の場合が最も多く、投与間隔が4日以上になると有意に減少した (投与間隔4日、6日では $P < 0.01$ 、5日では $P < 0.05$)。逆に、受精不能卵は投与間隔の延長により増加しており、投与間隔が6日の場合は、ほとんどすべての卵が fragmentation を起していた。

c. PMS と HCG の投与間隔と胚卵腔への多精子侵入 (表6)

胚卵腔への多精子侵入卵の受精卵に占める割合は、投与間隔が3日の場合が最も少く、23.7% (23/97個)であり、投与間隔が4日ないし5日ではそれぞれ58.1% (36/62個)、50.0% (14/28個)と増加した。(投与間隔4日では $P < 0.05$ で有意)。

d. PMS と HCG の投与間隔と多倍体の頻度 (表7)

表7 The relation between the incidence of polyploidy and the interval of PMS and HCG injections
(実験II)

Interval between PMS and HCG (days)	No. of ova fertilized	No. of ova studied		Diploid	Polyploid			
		No.	% ¹		Triploid	Tetraploid	Total	% ²
3	97	70	72.2	67	2*	1	3	4.3
4	62	38	61.3	35	3*	0	3	7.9
5	28	17	60.7	15	1*	1	2	11.8

¹ Based on fertilized ova.

² Based on studied ova.

* Polyspermic.

写真1 二倍体(実験II)

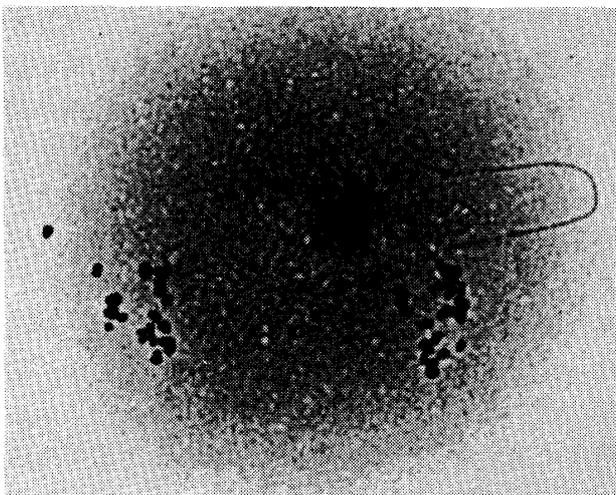
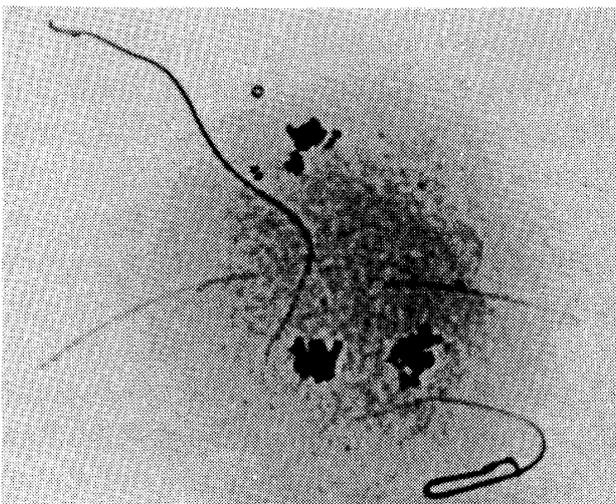


写真2 三倍体(実験II)



投与間隔が3日, 4日, 5日の群で, 多倍体に関する分析が可能であったものは, それぞれ受精卵のうち72.2%, 61.3%, 60.7%であった。多倍

体の頻度は, 投与間隔3日では4.3% (3/70個), 4日では7.9% (3/35個), 5日では11.8% (2/15個)であり, 投与間隔の延長により多倍体の頻度が増加する傾向が認められた。また, 多倍体のうち三倍体については, すべて2本の受精精子尾部が認められ, 二精子受精に起因する三倍体と考えられた。一方, 四倍体の2個の卵はいずれも精子を認めなかった。写真1, 写真2にそれぞれ二倍体と三倍体の標本を示した。

考 察

1. 1962年 Mikamo¹⁴⁾は, 人為的にホルモン投与をしなければ実験室内では排卵を起さないとされるアフリカツメガエルを用いて遅延排卵に関するはじめての系統だつた研究を行つた。すなわち, 排卵刺激をせず濾胞内に卵を長期間にわたつて滞留させた後排卵させると, 正常な卵と共に多数の受精不能卵, 異常卵割卵, 死亡卵が生じること, またこうして受精した卵から生じた個体には無脳症, 小頭症, 単眼症など種々の奇形を伴うことが多いことを報告した。逆に排卵を頻回にすれば, 異常卵や奇形は減少するという。

遅延排卵と呼ばれるこの現象は, 本来リズムカルに進行すべき卵胞の発育から排卵への過程が遅延し, そのために卵にある種の変性が起り, 受精不能卵や異常受精卵の原因となる場合を指すと考えられている。したがつて, 一般的には「遅延排卵」と呼ばれているが, むしろ「濾胞内の卵の過熟」という呼称の方が適切かと考えられる。ここでは広く用いられている「遅延排卵」の語を用いた。

その後、Fugo and Butcher et al.⁴⁾⁵⁾⁷⁾は、4日性周期をもつ雌ラットに pentobarbital sodium を投与し、LH surge を block することにより排卵を2日遅延させると、受精不能卵や異常受精卵の増加と共に、着床初期胚の染色体異常や生仔奇形の増加が見られることを報告し、哺乳動物に於ても遅延排卵が起り得ることが明らかとなった。また、その機序に関する解明もすすみ、遅延排卵により起る卵の異常は、紡錘系の退行変性による染色体不分離（アフリカツメガエル¹⁹⁾）、卵透明層や卵細胞膜表面の多精子受精防御機構の破壊による多精子受精（ラット¹⁶⁾）、受精能に深い関係をもつとされる卵の cortical granule の減少（ラット¹⁷⁾）などが起り得ることが明らかとなった。しかし、卵にそうした変化を起す機序の詳細は、まだよくわかっていない。

2. 一方、実験動物と同じ様にヒトに於ても遅延排卵現象が起り得るか否かは、臨床的にはきわめて興味深い問題であるが、まだ結論は得られていない。

流産胎児の分析をもとに、ヒトに於ても遅延排卵現象が起るとする報告はいくつかあり、例えば Hertig¹⁰⁾ は、ヒトの受精後3週中ばまでの初期胚34例を検討し、月経周期15日目以降の受精では発生異常が高いことを報告している。また最近では Boué et al.⁹⁾ が、自然流産胎児のうち多倍体のものは、月経15日目以降の排卵、受精に多いとしている。月経周期15日目以降の排卵は、月経周期異常の婦人にしばしば観察されるので、もしこれが発生異常の原因となるとすれば、臨床的にはきわめて重大な問題と言わざるを得ない。

しかし、実験Iで明らかになつたように、排卵の単なる時間的遅延がすべて発生異常の原因となるわけではない。同じ排卵の遅延を起こさせたにしても、LH surge を block し発情期を延長することによつて排卵を遅延させた第2群では、異常受精卵、多精子の囲卵腔への侵入卵や着床痕数が増加し、生仔数が減少したのに対し、発情間期の延長により排卵を遅延させた第3群では対照群との間にほとんど差を認めなかつた。このことは、卵

胞が充分發育しているにもかかわらず LH surge が発来せず、そのために排卵が遅延した場合にのみ発生異常が誘起されることを示している。

この実験Iの結果をそのままヒトにあてはめる訳にはいかないが、月経周期15日目以降の排卵にはいくつかの type があり得るから、そのすべてが実験第2群に相当するとは考えられない。しかし、estrogen positive feedback 機構の障害により卵胞の充分な發育にもかかわらず LH surge が遅れる場合には、発生異常の原因となるような遅延排卵が起る可能性は考えられよう。

3. ゴナドトロピンによる排卵誘発は、今日ヒト不妊症の治療に広く用いられ、すぐれた排卵誘発効果をあげている。しかし、排卵誘発妊娠の20～30%にも及ぶ高い流産率¹⁾⁹⁾、その流産胎児での三倍体やトリソミーなどの染色体異常の増加³⁾、更には家兎⁸⁾ やマウス²⁾ でもゴナドトロピンによる過排卵誘発後の胚盤胞で、モザイク、異数体、多倍体などの染色体異常が増加するなどの事実は、排卵誘発後の流産の増加に胎児側の要因が関与している可能性、すなわち排卵誘発が何らかの機序で発生異常を誘起し、そのために流産が高頻度で起る可能性を示唆している。

排卵誘発が発生異常の原因となる機序としては、① 排卵誘発剤の卵への直接の作用、② 卵胞や卵巣を介しての作用、③ 本来閉鎖卵胞となるべき異常卵や変性卵が排卵される可能性、④ 遅延排卵現象の関与、⑤ 排卵後の異常内分泌環境の作用などが考えられ、それぞれの点からの検討が必要である。しかし、従来から行なわれてきた動物実験の方法は、動物特有の周期性をもつ内因性ゴナドトロピンの影響下で外からゴナドトロピンを投与し過排卵を誘起する方法であつたために、内因性、外因性のゴナドトロピンが複雑に関係し合い、排卵誘発のどの作用が発生異常の原因となるかを分析することが出来なかつた。この点を考慮し、本実験IIでは、下垂体摘除により内因性ゴナドトロピンの影響を除去したラットを用いた。

ゴナドトロピン誘発排卵に於て、HCG 投与の

timing のズレは当然濾胞内卵の過熟につながるはずであり、それは遅延排卵と同様の現象を惹起すると考えられる。実験Ⅱの結果は、まさに HCG 投与の時期が、異常受精卵の発生に関係することを明らかにした。すなわち、PMS と HCG の投与間隔が3日以上の場合排卵は認められ、投与間隔を4日あるいはそれ以上に延長することにより、受精不能卵、多精子侵入卵や多倍体の頻度が増加し、実験Ⅰの第2群と同様の遅延排卵現象が観察された。

本実験では動物特有の周期性をもつ内因性ゴナドトロピンの影響を除去してあるので、ヒトの排卵誘発時に起り得る現象をも、この実験結果からある程度類推し得るであろう。ヒトに於て、ゴナドトロピン誘発排卵時の HCG 投与の時期は、頸管粘液や血中エストロゲン値を指標として決定されるが、これらは卵胞発育の状態を反映してはいるものの、個々の症例での HCG 投与至適時期を示すとは限らない。症例によつては結果的に HCG 投与が遅れて行なわれるものがあり、それが異常受精卵の発生、高い流産率につながる可能性のあることが本実験により示唆されたと言える。

なお、前述のように排卵誘発が卵に与える影響にはさまざまな機序が考えられ今後に残された問題は多いが、これらの研究のためにも、下垂体摘除ラットは有用な実験モデルであると考えられる。

4. 遅延排卵が、受精卵や胎児に与える影響として、本実験Ⅰ、Ⅱで観察された受精不能卵や多精子侵入卵の増加、多倍体の増加、流産（着床痕数）の増加や生存胎子の減少、奇形の増加などは、諸家の報告^{4) 5) 7) 16)}と一致する。

美甘ら¹⁶⁾は、ラットの遅延排卵による多倍体の発生が、多精子受精によるものであることを明らかにしたが、本実験Ⅱでも三倍体のすべてが、二本の受精精子尾部をもつところから、やはり二精子受精がその原因と考えられた。一方、四倍体については標本中に精子を見出し得なかつたが、標本作成中に精子を失つた可能も否定はできな

い。いずれにしても、ラットの遅延排卵時に見られる三倍体の成因は主に二精子受精によると考えられるが、最近、和気ら²⁾は、マウスで過排卵を誘起すると digyny, すなわち減数分裂の異常による三倍体が多発することを報告している。この三倍体の成因の相違は、動物種や実験条件によるものかも知れないが、今後に残された興味深い問題である。

遅延排卵が、染色体異常以外の奇形発生にも関与するか否かもまた、興味ある問題の一つである。Butcher et al.⁵⁾は、遅延排卵後のラット胎仔に、無脳症、胎児水腫、癒合胎盤などの外表奇形が有意に増加することを報告しているが、内臓奇形に関する検索は行っていない。本実験Ⅰでは、内臓奇形の検索も行つたが、やはり第2群の遅延排卵群で、癒合胎盤やヘルニア、水腎症、ASD などが増加する傾向が認められた。しかし、水腎症は奇形でないとする考え²⁰⁾もあり、ASD は判定上の問題が残る。いずれにしても、遅延排卵による奇形発生の可能性は充分考えられ、遅延排卵そのものの卵への影響によるものか、あるいは遅延排卵後の異常な子宮内環境によるものかの鑑別が今後必要である。

稿を終るに臨み、御懇切なる御指導と御校閲を賜つた恩師坂元正一教授に深甚なる感謝の意を表するとともに、御指導、御助言を戴いた水野正彦助教授、神保利春講師をはじめ教室諸兄に心から感謝致します。

なお、本研究の一部は、厚生省心身障害研究費補助金によつた。

文 献

1. 佐藤孝道, 小池貞徳, 森 宏之, 神保利春, 水野正彦, 坂元正一: 誘発排卵による妊娠の予後. 日不妊誌, 22: 416, 1977 (抄録).
2. 和気徳夫, 清水哲也, 高木信夫, 佐々木本道: 排卵誘発剤使用後のマウス胚胞期における細胞遺伝学的検討. 日産婦誌, 29: 1373, 1977 (抄録).
3. Boué, J., Boué, A. and Lazar, P.: Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. Teratology, 12: 11, 1975.
4. Butcher, R.L. and Fugo, N.W.: Overripeness and the mammalian ova. II. Delayed ovula-

- tion and chromosomal anomalies. *Fertil. Steril.*, 18: 297, 1967.
5. *Butcher, R.L., Blue, J.D. and Fugo, N.W.*: Overripeness and the mammalian ova. III. Fetal development at midgestation and at term. *Fertil. Steril.*, 20: 223, 1969.
 6. *Everett, J.W. and Sawyer, C.H.*: A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinol.*, 47: 198, 1950.
 7. *Fugo, N.W. and Butcher, R.L.*: Overripeness and the mammalian ova. I. Overripeness and early embryonic development. *Fertil. Steril.*, 17: 804, 1966.
 8. *Fujimoto, S., Pahlavan, N. and Dukelow, W.R.*: Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *J. Reprod. Fertil.*, 40: 177, 1974.
 9. *Hack, M., Brish, M., Serr, D.M., Insler, V. and Lunenfeld, B.*: Outcome of pregnancy after induced ovulation. *J.A.M.A.*, 211: 791, 1970.
 10. *Hertig, A.T.*: Morphological criteria of the time of ovulation in the human being. In *Human ovulation*, (ed. C.S. Keefer), 75. Little, Brown & Co., Boston, 1965.
 11. *Kamiguchi, Y., Funaki, K. and Mikamo, K.*: A new technique for chromosome study of murine oocytes. *Proc. Jpn. Acad.*, 52: 316, 1976.
 12. *Koyama, R.*: A simple method of hypophysectomy in rats. *Endocrinol. Jpn.*, 9: 321, 1962.
 13. *Lubs, H.A. and Ruddle, F.H.*: Chromosomal abnormalities in the human population: Estimation of rates based on New Haven newborn study. *Science*, 169: 495, 1970.
 14. *Mikamo, K.*: Overripeness of the eggs in *Xenopus laevis* Daudin. *Am. Zool.*, 2: 541, 1962.
 15. *Mikamo, K.*: Intrafollicular overripeness and teratologic development. *Cytogenet.*, 7: 212, 1968.
 16. *Mikamo, K. and Hamaguchi, H.*: Chromosomal disorder caused by preovulatory overripeness of oocytes. In *Aging gametes*, (ed. R.J. Blandau), 72. Karger, Basel, 1975.
 17. *Peluso, J.J. and Butcher, R.L.*: The effect of follicular aging on the ultrastructure of the rat oocyte. *Fertil. Steril.*, 25: 494, 1974.
 18. *Wilson, J.G.*: Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In *Teratology*, (ed. J.G. Wilson and J. Warkany), 262. The Univ. Chicago Press, Chicago, 1965.
 19. *Witschi, E. and Laguens, R.*: Chromosomal aberrations in embryos from overripe eggs. *Devel. Biol.*, 7: 605, 1963.
 20. *Woo, D.C. and Hoar, R.M.*: "Apparent hydronephrosis" as a normal aspect of renal development in late gestation of rats. *Teratology*, 6: 191, 1972.

(No. 4322 昭53・2・8 受付)