

ヒトの卵胞発育と排卵 —IVF-ET の臨床から—

生水 真紀夫¹⁾, 寺元 章吉²⁾

1) 千葉大学大学院医学研究院生殖医学

2) Natural ART Clinic 日本橋

1. はじめに

体外受精胚移植による治療がはじまって30年が過ぎ、技術や知識の進歩により治療成績は大きく向上した。採卵のための卵巣周期も、自然周期から調節過排卵周期へと移り、一度の採卵で多数の卵子を回収することが可能となっている。またホルモン検査や超音波検査、さらにはタイムラプスによる低侵襲の胚観察法が導入されて精度の高いモニタリングが可能となり、良好胚作出のためのさまざまな試みが行われている。このような進歩は、体外受精治療成績の向上という恩恵の他に、それまで目にする事のなかったヒト初期胚発生などについての知見を多くもたらしている。

ここでは、体外受精によって明らかとなったヒトの妊孕についての知見のうち、1) 非主席卵胞内卵子における還元分裂再開、2) 卵胞破裂における卵子放出不全の2つについて紹介する。これらの知見は、ヒトの妊孕に関して従来の考えに見直しをせまるものである。

2. 非主席卵胞内で卵子は成熟する

主席卵胞と非主席卵胞

成人女性では、原始卵胞の一部が発育を開始しておよそ90日をかけて前胞状卵胞にまで発育する¹⁾。前胞状卵胞では、増生した顆粒膜細胞が6層以上となり隙間なく卵子を取り囲む。その後、卵胞の成長・増大に伴い顆粒膜細胞間に隙間ができ、この隙間が癒合して単一の卵胞腔を形成して胞状卵胞となる。一度に30個あまりの卵胞が同時に発育して胞状卵胞に達すると考えられており、この一群の同期した発育卵胞を卵胞コホートと呼ぶ。この卵胞コホートは、黄体期後半のプロゲステロン低下に伴うFSH上昇（FSHサージ）に反応して発育増大をはじめめるが、月経周期5日目頃（3～5mm）までにコホー

トのうちの1つが選択され（主席卵胞）その後増大を続けて排卵に至る²⁾。一方、選択されなかった残りの胞状卵胞は小型卵胞のまま増大を停止して、排卵（破裂）することなく閉鎖する³⁾（図1）。

原始卵胞内の卵子は、第1還元分裂前期の複糸期で還元分裂を停止し、卵核包（germinal vesicle）を形成したGV期卵子として観察される。卵胞発育が始まると卵子は増大し胞状卵胞になるころまでにmeiotic competency（卵胞から取り出すと還元分裂を再開し、MII（metaphase II）期卵子にまで成熟する能力）を獲得する⁴⁾。主席卵胞の顆粒膜細胞にはFSH受容体が発現しており、FSH依存性に顆粒膜細胞の増殖とアロマターゼの発現誘導が起こる⁵⁾（図2）。アロマターゼが産生するエストロゲンは顆粒膜細胞の増殖を促し、その結果、主席卵胞はさらに増大して大量のエストロゲンを産生する。エストロゲンは卵胞周囲の血管新生を促進するので、主席卵胞はより多くの血流供給を受け増大が加速される。顆粒膜細胞の増殖がピークを越えるころになると、LH受容体が発現して顆粒膜細胞はLH依存性へと変わる。この結果、卵胞期後半のFSHが低下した環境でも卵胞は発育を継続することができ、LHサージに反応して卵胞壁の破裂（排卵）をきたす。

これに対して、非主席卵胞では顆粒膜細胞増殖は弱くアロマターゼがほとんど発現せず、LH受容体も誘導されない。卵胞期中頃に主席卵胞が産生するエストロゲンにより血中FSH値が低下すると、FSH依存性のままの非主席卵胞の顆粒膜細胞は増殖を停止し、変性（閉鎖）に陥る⁶⁾。この非主席卵胞内に存在する卵子はGV期卵子で、顆粒膜細胞にはLH受容体が発現していないことからLHサージに反応することはできず、LHサージの後も還元分裂を再開することなくGV期に止まっていると考えられている³⁾。

自然周期体外受精での観察

小卵胞採卵を併用した体外受精の開発

体外受精における採卵には、FSH製剤を投与して多数の卵胞を一度に発育させて多数の卵子採取を目指す調

連絡先：生水真紀夫，千葉大学大学院医学研究院生殖医学
〒260-8677 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1
TEL：043-226-2121
FAX：043-226-2122
E-mail：shozu@faculty.chiba-u.jp

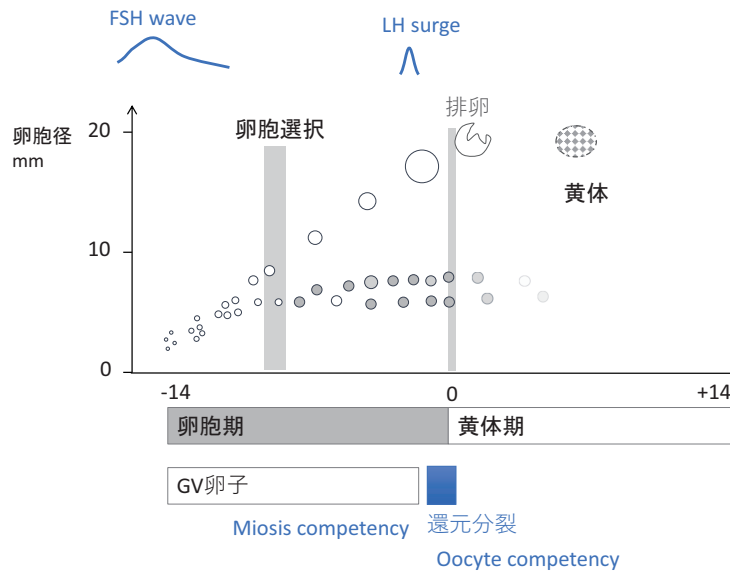


図1 主席および非主席卵胞の発育と卵子の成熟

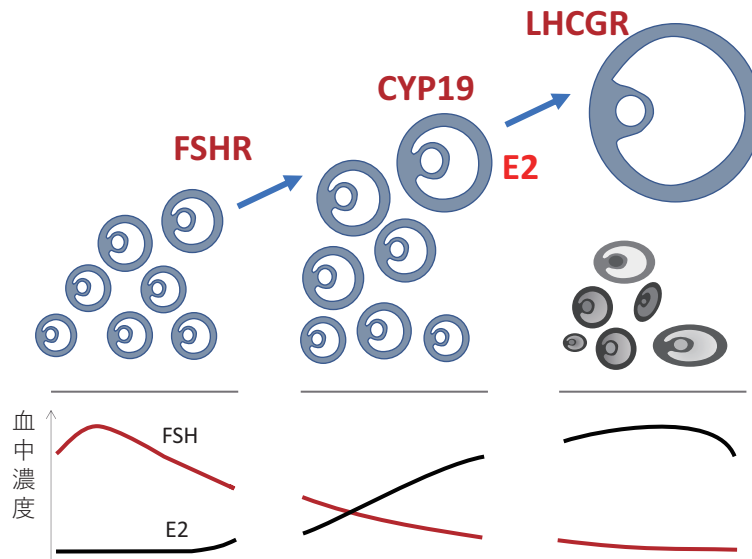


図2 主席卵胞と非主席卵胞の関係
FSH, follicle stimulating hormone; CYP19, aromatase; LHCGR, luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor.
文献5より改変.

節過排卵周期法と、排卵誘発剤を用いずに自然に発育する主席卵胞（通常1個）からの採卵を目指す自然周期法とがある。後者は、治療費が安く卵巣過剰刺激症候群など重篤な疾患発症のリスクがないこと、自然に選択された最も良好な卵子が採取できる可能性があることなどのメリットがあり、一部の治療施設で第1選択となっている。

自然周期法では、採取される可能な卵子が主席卵胞からの1個に限られるため妊娠率が低いことが課題となっている。そこで、主席卵胞以外の卵子供給源として、非

主席卵胞が注目されるようになった。最初に試みられたのは、卵胞期中期の小型卵胞（非主席卵胞と主席卵胞）からGV期卵子を採取し、体外で成熟培養して、MII期（成熟）卵子となったものを体外受精に用いる方法（in vitro maturation; IVM-IVF）である⁷⁾。一方、著者らは通常自然周期法で主席卵胞から採卵を行う際に、その周囲に存在する非主席卵胞内卵子を採取して体外受精に用いる方法を開発した⁸⁾（図3）。この卵子の由来は、主に非主席卵胞に該当と考えられるが、1) 臨床的には超音波検査で小型の卵胞として同定されること、2) LH

初回治療 771名 (771周期), 30-40歳

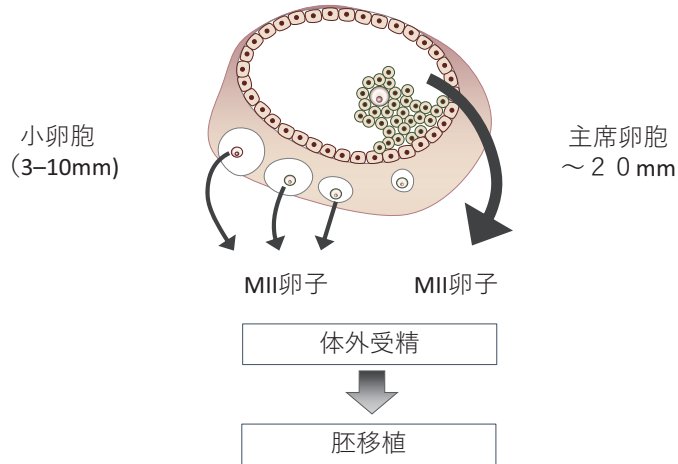


図3 小卵胞採卵を併用した自然周期体外受精胚移植 (研究デザイン)

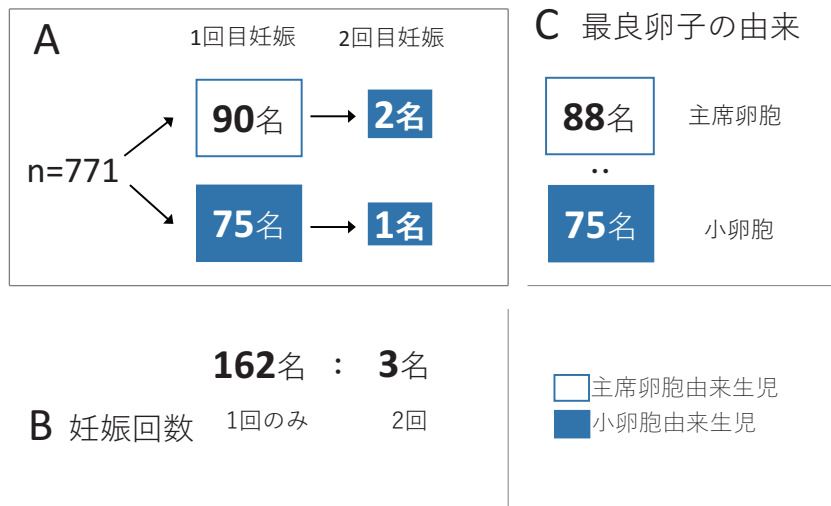


図4 小卵胞採卵を併用した自然周期体外受精胚移植の妊娠成績 (生児)

A: 採卵を一度だけ実施し, その後得られたすべての胚を一旦凍結し, その後, 一周期当たり一胚ずつ移植した. 最初の妊娠が得られたときの胚の由来 (主席卵胞, 小卵胞) で分類した. 1回目の妊娠が主席卵胞であった90名のうち, 2名のみが余剰の小卵胞由来胚で妊娠したことを示す. 1回目の妊娠が小卵胞由来であった75名のうち, 2回目妊娠が余剰の小卵胞で得られたものが1名で, 主席卵胞で2回目の妊娠を得た症例はなかった. 3回以上妊娠した症例はなかった.

B: Aを縦に集計した妊娠回数別の人数を示した.

C: 最良卵子の由来が確実に決定できたもの数. 1回目が主席卵胞由来, 2回目が小卵胞での妊娠であった2名については, どちらが最良が決定できないので除いて集計した数値である.

サージ後すなわち排卵期の卵胞であることから, 「小卵胞」と呼んでIVM-IVFに用いられる非主席卵胞とは区別している (IVM-IVFは, 卵胞期中期までの卵胞から採取した卵子で, かつGV期卵子であることを前提としている). これに対して, 小卵胞は成熟卵子を意識して用いる.

小卵胞採卵併用自然周期体外受精の成績

771名の不妊症患者に, 小卵胞採卵を併用した自然周

期法による体外受精胚移植を実施した. 主席卵胞の発育をモニターして, 採卵日を決定し主席卵胞から採卵した. その際, 主席卵胞の周囲に存在する2-10mmの小型卵胞も穿刺して卵子を回収し体外受精に用いた. その結果, 主席卵胞からは合計466個 (0.6個/人) のMII期卵子が回収され, 90名の生児が得られた (図4, 表1). 小卵胞からは, 902個 (1.2個/人) のMII期卵子が回収され, 78名の生児が得られた. 結局, 771名の不妊症患者に1回の自然周期採卵を実施したところ, 168名 (22%) の

表1 小卵胞卵子併用 IVF の回収卵子

(N=771)	小卵胞	主席卵胞	P
≥1個	675人	473人	<0.0001*
回収卵子	3,557個	498個	
卵子成熟度			
MII (%)	902 (25.4)	466 (93.6)	<0.0001*
MI (%)	322 (9.1)	21 (4.2)	
GV (%)	2,333 (65.6)	11 (2.2)	

生児が得られた(図4)。この結果は、小卵胞採卵を併用することにより自然周期体外受精の成績は2倍に向上することを示している。さらにこの結果から、小卵胞の「生理」について下記の示唆が得られた。

「小卵胞」内で卵子は成熟する

小卵胞から回収された3557個の卵子のうち25% (902個)がMII期卵子であり、体外成熟培養を行うことなく体外受精胚移植治療に用いることができ(表1)、小卵胞由来卵子の成熟率(25%)は主席卵胞から回収された卵子の成熟率(93.6%)より低いが、小卵胞のMII期卵子数の総主席卵胞(466個)の2倍にあたる。これまで閉鎖卵胞内で卵子は成熟しない考えられてきた⁹⁾。今回、この成績はこの考えが必ずしも正しくないことを示している。LHサージ後に非主席卵胞内で卵子が成熟すること、さらにそのなかの相当数の卵子が生児への発生能を獲得しているという発見は驚きであった。

卵胞コホートあたりの生児は1人

168名の妊娠者のうち、1回のみ妊娠したのが165名、2回妊娠したのが3名、3回以上の妊娠例はなかった(図4B)。複数回の妊娠症例の頻度は、1人から採取された卵子の妊娠が独立事象であると仮定したときの期待値の1/3以下と低かった(p<0.05)。この観察は、自然周期では生児まで発生する能力を獲得する卵子が、周期当たり1つになるようFSHが調節されていることを示すものかもしれない。ヒトは、多排卵から単一排卵へと進化して、子の生存率を高める方向に進化してきた。この単一排卵の実行過程はFSHである。これまで、FSHの分泌調節のセットポイントの目標が排卵数1と考えてきたが、生児への発生能を有する卵子数1にセットされていると理解する方が適切かもしれない。排卵数が1の場合、染色体異常率を考慮すると生まれてくる子の数は1を下回ることになる。非主席卵胞からの卵子も加えると生まれてくる子どもの数が1となるのは偶然だとして

も、自然調節の妙を感じさせる。

最良卵子の約半数が非主席卵胞に存在する

自然周期で選択される卵胞は最良の卵胞であり、主席卵胞には最も良好な卵子が存在するので主席卵胞から採卵を行う自然周期法では効率よく最良卵子を回収できると考えられてきた。しかしながら、われわれの成績によると、最良卵子(生児になった卵子)が主席卵胞に存在したのは54%(88人)、いずれかの小卵胞に存在したのが46%(75名)であった(図4C)。すなわち、最良卵子の半数近くは主席卵胞ではなく小卵胞に存在していた。小卵胞採卵の併用により、体外受精胚移植の妊娠率が2倍に上昇することは、まさにこの最良卵子の半分が小卵胞に存在していることを示している。主席卵胞の卵子の半数近くが最良ではない卵子を有していることは驚きであった。このことは、異数体などの染色体異常は卵胞選択に関与していないことを示唆しており、異数体の発生が卵胞選択の後に起こることを考慮すると納得できる現象である。すなわち、卵胞選択が行われる時期の卵子は、いまだGV期にあり、その後起こる異数体発生を予知することはできないことによると思われる。

小細胞卵子の安全性

小卵胞由来胚盤胞から生まれてきた児の予後について調査を行った¹⁰⁾。小卵胞由来の胚盤胞移植を行った452名と主席卵胞由来の胚盤胞移植を行った620名よりなるコホート研究で、妊娠率、先天異常率を比較した。胚盤胞当たりの妊娠率(43.8% vs. 47.9%, p=.14)、出生児あたりの大奇形率(1.5% vs. 1.3%)、小奇形率(1.9% vs. 1.3%)に有意差は見られなかった。観察された奇形率は、わが国の体外受精データベースの奇形率と同等であった¹¹⁾。生児の性比や出生体重、妊娠期間などについても影響は見られず、小卵胞由来胚を用いた体外受精胚移植は、主席卵胞を用いた体外受精と同程度に安全であることが示唆された。小卵胞由来卵子が胚盤胞に到達する確率は、主席卵胞由来卵子より低いものの、一旦胚盤胞に達した胚では生児獲得率は卵胞の種別にかかわらず、およそ50%で一定であった。

小卵胞卵子の成熟機序

非主席卵胞内で卵子が胚盤胞および生児への発生能をもつMII卵子にまで成熟していることが明らかになったが、その卵子成熟のメカニズムは今のところよく分かっていない。

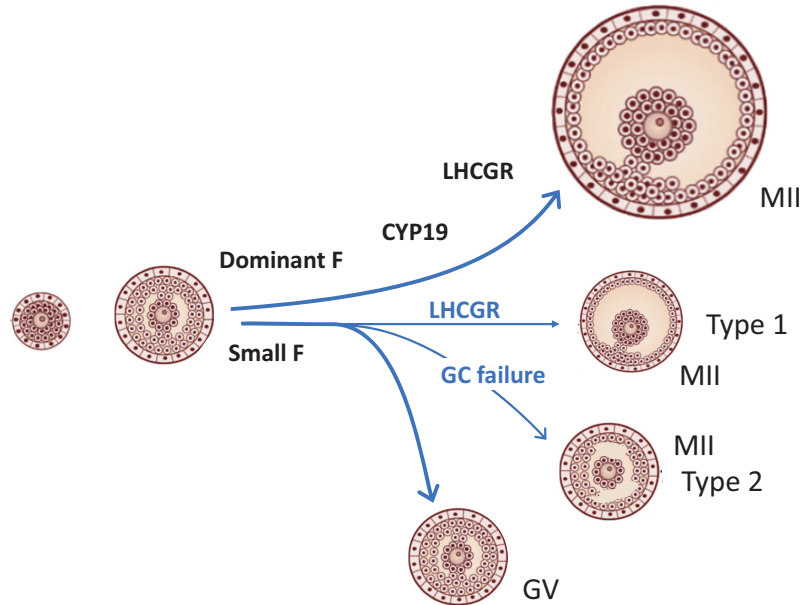


図5 減数分裂再開機序

前胞状卵胞はFSH依存性でFSHサージに反応して増大を始める。主席卵胞(Dominant F)では、顆粒膜細胞にCYP19が発現しその後LHCGRを発現する。LHサージに反応して、抑制シグナルが解除されて還元分裂が再開される。

小卵胞には、LHCGRが発現しており、LHサージに反応して減数分裂を再開するもの(Type 1)と、顆粒膜細胞のアポトーシスにより機能不全をきたし抑制シグナルが低下することにより還元が再開する(Type 2)がある。

主席卵胞における卵子成熟機構

発育卵胞の顆粒膜細胞は構成的にcGMPを産生しており、これがコネキシン43を介して放射冠細胞に、さらにコネキシン17を介して放射冠細胞から卵子に移送され、最終的に卵細胞内のホスホジエステラーゼ3A活性を抑制している¹²⁾。この結果、卵細胞ではcAMPが高く保たれて、還元分裂の再開が持続的に阻止されている。一方、卵細胞ではGPR3のリガンド非依存性の活性化により恒常的にcAMPが産生されている。

LHサージにより顆粒膜細胞のLH受容体が活性化されると、AREGやEGFの活性化を介して顆粒膜細胞のcGMPが低下し、卵細胞のcGMPが低下する。その結果、卵子のホスホジエステラーゼ3Aが活性化してcAMPが低下し解除されて、還元分裂が再開する¹³⁾。

すなわち、卵細胞は還元分裂再開のアイドリング状態にあり、顆粒膜細胞からのシグナルで還元分裂再開が持続的に抑制されている。LHサージは顆粒膜細胞に作用して抑制シグナルを解除することにより、卵細胞の自立的な還元分裂再開を許容すると理解される。実際に、卵胞内GV期卵子が還元分裂を再開する能力を獲得するには、前胞状卵胞の段階での卵胞発育の過程が必要と考えられている。

小卵胞における卵子成熟機構

LH受容体を発現していないとされる小卵胞(非主席卵胞)内卵子が一部とはいえ、還元分裂を再開する機序はどのようなものであろうか。われわれは、小卵胞卵子の成熟機序について以下の2つの機序を推定している(図5)。

第1の機序は、主席卵胞と同様に顆粒膜細胞のLH受容体を介する機序である(図5, Type 1)。小卵胞由来MII卵子の卵子卵丘複合体(cumulus oocyte complex, COC)を観察すると、およそ50%のCOCで主席卵胞のCOCと同様に卵丘細胞が膨潤し、卵から放射冠細胞が離解する所見が認められた。これらの卵丘細胞で、主席卵胞の1/2~1/3程度のLH受容体mRNAを検出することができた。したがって、非主席卵胞内の一部の卵胞では、顆粒膜細胞にLH受容体が発現し、LHサージに反応して還元分裂抑制機序が解除されているものと推定される。小型卵胞の顆粒膜細胞におけるLH受容体発現は、手術により摘出された卵巣や卵胞穿刺標本でRT-PCRによっても確認されている¹⁴⁾。

第2の機序は卵丘細胞の機能不全である(図5, Type 2)。卵丘細胞の変性や細胞死によりcGMP産生が低下して還元分裂の抑制ができなくなり卵子の還元分裂が再開するという機序である。小卵胞由来MII卵子のCOCを観察すると、40%が未熟なCOCであった。これらの

表2 自然周期 IVF-ET における破裂卵胞穿刺の妊娠成績

卵子	破裂後穿刺 (n=587)		破裂前穿刺 (n=10,822)		p	RR	[95%CI]
	n	%	n	%			
回収数	255	43%	8,977	83%	<0.0001	0.18	[0.15-0.21]
Viable	206		7,225		n.s.	1.02	[0.75-1.39]
Damaged	49		1,752		n.s.	1.00	[0.76-1.33]
成熟度							
M II	194	94%	6,610	92%	n.s.	1.47	[0.84-2.66]
M I	5	2%	526	7%	<0.01	0.30	[0.13-0.78]
GV	7	3%	89	1%	<0.05	2.69	[1.30-5.57]
発生能							
成熟	199	78%	7,087	79%	n.s.	0.95	[0.71-1.27]
受精	167	66%	6,081	68%	n.s.	0.91	[0.70-1.17]
良好胚盤胞	68	27%	2,814	33%	n.s.	0.80	[0.61-1.05]
臨床妊娠	40	16%	1,477	17%	n.s.	0.95	[0.68-1.32]
生児	28	11%	1,085	12%	n.s.	0.90	[0.61-1.73]

卵丘細胞には核濃縮が多く認められ、TANEL法でアポトーシスであることが確認され、卵丘細胞のアポトーシスの多く生じたものにMII卵子が認められる傾向が受け入れられた¹⁵⁾。今回の観察は、LHサーージ後の観察であり、抑制シグナルの低下のみによって還元分裂の再開が生じたのか、抑制シグナル低下にLHサーージが加わって生じたものかは区別できない。

ブタでは、LHサーージ後に卵巣内に残った卵胞の卵子の多くがMII卵子であったとの報告がある¹⁶⁾。マウス卵巣の観察でも、卵丘細胞の変性した閉鎖卵胞内卵子にしばしばMII卵子が認められている¹⁷⁾。ヒトにおける卵巣組織での報告は見当たらないが、今後の検討が必要である。

3. 卵胞破裂後に卵子が卵胞内に止まる

体外受精における採卵に関する問題の1つは、採卵予定時刻より前に自然排卵が生じて卵胞穿刺が行えなくなることである。これを防ぐために、GnRHアンタゴニストやGnRHアゴニスト投与によるLHサーージの抑制が行われている。しかしながら、これらの予防処置を実施しても早期の排卵が一定の率で発生する。そこでこの問題の解決策の1つとして、われわれは破裂した卵胞の穿刺を行い、50%近い卵胞から卵子の回収が可能なることを報告した¹⁸⁾。

破裂後の主席卵胞穿刺

11,942周期の自然周期体外受精周期のうち、10%(1071周期)で予定採卵時刻の前に主席卵胞が破裂していることが確認された。この1071周期中587周期で破裂後卵胞

の穿刺を行ったところ、43%(255)の周期で卵子が回収できた(表2)。回収された卵子(変性などにより卵子成熟度の判定が不可能であったものを除く)のうち94%(194個)がMII期卵子で、そのうち11%から生児(28名)が得られた。破裂前の卵胞穿刺(通常の採卵)では、83%の周期で卵子が回収され、そのうち92%がMII期卵子で、12%に生児(1085名)が得られている。すなわち、卵胞破裂後にも半数近くの卵子が卵胞内に止まっていること、この卵子は若干過熟であるが生児への発育能は破裂前に回収された卵子と同等であることが示された。この結果は、卵胞壁の破裂と卵子の放出と連続して起こる過程ではあるが、別のイベントであることを明確に示している。齧歯類の卵巣の組織学的観察では、黄体の中にとどき卵子が発見されることが知られている。卵胞壁の破裂が必ず卵子の放出を伴うのではないことはヒトだけの現象ではないように思われる。

1980年と1984年にヒト体外受精治療周期で卵胞破裂後の卵胞穿刺により卵子が回収できたとの報告がなされている^{19,20)}。当時は、LHサーージの検出も困難で超音波検査による卵胞のモニタリングも行われておらず、自然周期で腹腔鏡下に採卵が行われていた。そのため、腹腔鏡を施行した際にすでに卵胞が破裂しているという事態が時々生じていた。1980年の報告はそのような状況でやむなく破裂した卵胞を穿刺してみたところ、卵子が回収できたという2症例の報告であった。その後、同じグループから、破裂後穿刺22名のうち13例で卵子の回収ができたことが報告された²⁰⁾。このときの報告では妊娠は得られていない。以後、破裂後卵胞穿刺に関する報告は2019年のわれわれの報告まで見当たらない。これは、1980年代後半に超音波検査による卵胞モニタリングが導入さ

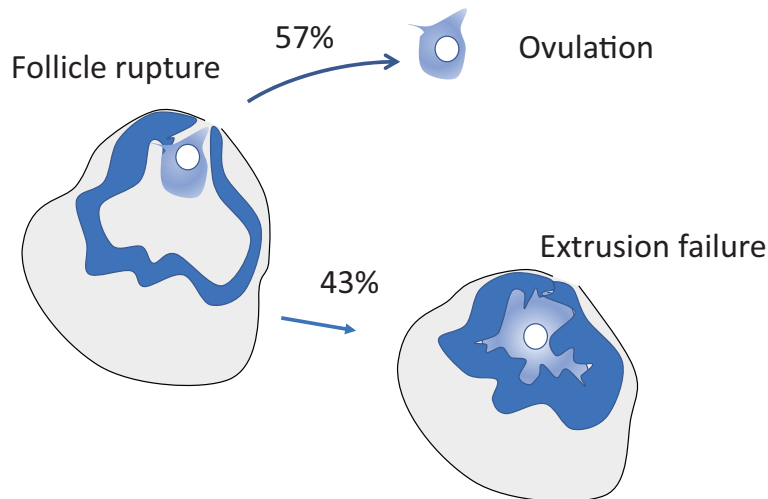


図6 卵胞破裂, 排卵と卵子放出不全

れ、卵胞の破裂をリアルタイムに認識できるようになったために破裂後に穿刺を試みる機会がなくなったことによると思われる。多くの医師が、卵胞破裂により卵子がすでに放出されていると考えていたと思われる。

卵子放出不全

破裂後も高率に卵胞内に卵子が止まっているという発見は、不妊症患者の観察から得られた知見であり、一般化には注意が必要である。しかしながら、われわれは正常女性においても破裂後の卵子の卵胞内遺残が生じている可能性があるのではないかと考えている。これは、以下の間接的な状況から示唆される。ヒトの妊孕性は他の種に比較して低く、周期当たり0.25程度と見積もられている。初期胚や流産胚の50%に染色体異常があり流産もしくは妊娠に至らないとしても、それだけでは0.25と低い妊孕性を説明するのは難しい。破裂後も卵子が卵胞内に50%残存することは、0.25と低い妊孕性を説明する可能性がある。

原因不明不妊は、卵管の通過性が正常で精子にも子宮にも異常が認められない。この原因不明妊娠では、体外受精により妊娠が成立しやすいことが知られている。破裂後に卵子が卵胞内に止まった場合には妊娠は成立しないと考えられるが、体外受精では卵胞から卵子を回収して子宮内に移植するため、潜在的な卵子の放出不全の治療となっている可能性がある。実際に、破裂後卵子放出不全が原因不明不妊の原因となっているか、あるいは正常周期でも群前発生するような事象なのかは今後の検討が必要である。

卵子放出不全の機序

破裂後の穿刺により回収されたCOCには、破裂前の

表3 主席卵胞から回収されたCOCの成熟度

顆粒膜細胞	破裂済み		破裂前	
	数	割合	数	割合
Immature	26	14.6%	16	3.4%
Mature	142	79.8%	450	96.4%
Overmature	6	3.4%	1	0.2%
others	4	2.2%	0	0.0%
Total	178		467	

卵胞から回収されたCOCに比較して、未熟なCOCと過熟なCOCが多く、逆に成熟COCが少なかった(表3)。したがって、卵子放出不全の原因の一部が、顆粒膜成熟とLHサージのミスマッチである可能性が示唆された。しかし、破裂後卵胞から回収されたCOCのうち、約80%が成熟COCを有しており、これら多くの卵胞での放出不全の機序は不明である。

4. おわりに

体外受精の臨床応用により、それまでブラックボックスの中にあつたヒトの妊孕現象について多くの知見が得られるようになった。なかでも排卵誘発薬を用いずに自然周期で行われる体外受精は、正常月経周期に最も近くヒトの正常な妊孕についてもさまざまな知見を与える。これまで疑うことのなかった“常識”についても見直す天賦の機会となっている。

本講演の内容は、第24回生殖内分泌学会特別講演で発表した。

引用文献

1. Gougeon A (1986) Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1, 81-87.
2. Gougeon A, Lefevre B (1983) Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 69, 497-502.
3. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC (2009) Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* 30, 465-493.
4. Kristensen SG, Mamsen LS, Jeppesen JV, Botkjaer JA, Pors SE, Borgbo T, et al (2017) Hallmarks of Human Small Antral Follicle Development: Implications for Regulation of Ovarian Steroidogenesis and Selection of the Dominant Follicle. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 376.
5. Clement F, Monniaux D (2013) Multiscale modelling of ovarian follicular selection. *Prog Biophys Mol Biol* 113, 398-408.
6. Son WY, Chung JT, Herrero B, Dean N, Demirtas E, Holzer H, et al (2008) Selection of the optimal day for oocyte retrieval based on the diameter of the dominant follicle in hCG-primed in vitro maturation cycles. *Hum Reprod* 23, 2680-2685.
7. Lim JH, Yang SH, Xu Y, Yoon SH, Chian RC (2009) Selection of patients for natural cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes. *Fertil Steril* 91, 1050-1055.
8. Teramoto S, Osada H, Sato Y, Shozu M (2016) Nondominant small follicles are a promising source of mature oocytes in modified natural cycle in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 106, 113-118.
9. Gougeon A, Testart J (1990) Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil Steril* 54, 848-852.
10. Teramoto S, Osada H, Sato Y, Shozu M (2019) Pregnancy and neonatal outcomes of small follicle-derived blastocyst transfer in modified natural cycle in vitro fertilization. *Fertil Steril* 111, 747-752.
11. Tatsumi T, Jwa SC, Kuwahara A, Irahara M, Kubota T, Saito H (2017) No increased risk of major congenital anomalies or adverse pregnancy or neonatal outcomes following letrozole use in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 32, 125-132.
12. Conti M, Hsieh M, Zama AM, Oh JS (2012) Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 356, 65-73.
13. Richani D, Gilchrist RB (2018) The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum Reprod Update* 24, 1-14.
14. Jeppesen JV, Kristensen SG, Nielsen ME, Humaidan P, Dal Canto M, Fadini R, et al (2012) LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E1524-1531.
15. Okubo T, Shimada M, Segawa T, Miyauchi O, Ohmi K, M M, et al (2016) Apoptosis detection protocol in granulosa cells using TdT-mediated dUTP nick end labeling method. *Journal of Clinical Embryologist* 18, 7-12.
16. Isobe N (1996) Studies on the relationship between cumulus cells surrounding pig oocytes and its meiotic progression and the application of this relationship to in vitro fertilization. *J Fac Appl Biol Sci* 35.
17. Sato E, Miyamoto H (1989) Morphological analysis of resumption of meiosis observed in oocyte of mouse vesicular follicles. *Acta Anatomica Nipponica* 64, 267-273.
18. Teramoto S, Osada H, Shozu M (2019) Prematurely ruptured dominant follicles often retain competent oocytes in infertile women. *Sci Rep* 9, 15041.
19. Craft I, Shelton K, Yovich J, Smith D (1980) Ovum retention in the human. *Fertil Steril* 34, 537-541.
20. Stanger JD, Yovich JL (1984) Failure of human oocyte release at ovulation. *Fertil Steril* 41, 827-832.