

レチノイン酸によるマウス眼形成異常の成立臨界期

尾関 年則

名古屋市立大学医学部眼科学教室

要 約

眼形成異常の成立臨界期を決定するため、妊娠 7 日 (7 日群), 8 日 (8 日群), 9 日 (9 日群), 10 日 (10 日群) あるいは 11 日 (11 日群) の C 57 BL/6 NJcl マウスの腹腔内にレチノイン酸を 12.5 mg/kg 投与した。実験母獣数は各群 5 匹で、胎生 18 日に胎仔の外形観察を行ったのち、眼部の連続切片を作製して組織学的に検討した。外形観察では、7 日群で小眼球、口唇・口蓋裂、中枢神経系異常など種々の外表奇形がみられたが、8 日群では小眼球のみ観察され、9 日群以後では外表奇形は認められなかった。組織学的には、無眼球は 7 日群のみに成立し、その成立

臨界期は胎生 7 日以前であった。小眼球、胎生裂閉鎖不全、無水晶体眼および水晶体胞分離不全は 7 日群と 8 日群で観察されたため、成立臨界期は 8 日以前であり、前房隅角形成異常は 9 日群までみられたため、9 日以前であることが明らかになった。(日眼会誌 102: 95—100, 1998)

キーワード: 眼形成異常, 成立臨界期, レチノイン酸, マウス胎仔

Critical Time for Developmental Eye Abnormalities Induced by Retinoic Acid in Mouse Fetuses

Hironori Ozeki

Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School

Abstract

To identify the critical time for developmental eye abnormalities, pregnant C 57 BL/6 NJcl mice were injected intraperitoneally once with 12.5 mg/kg of retinoic acid on days 7 (day - 7 group), 8 (day - 8 group), 9 (day - 9 group), 10 (day-10 group), and 11 (day-11 group) of pregnancy. Each group consisted of 5 pregnant mice. The fetuses were observed grossly on day 18 of gestation, and the eyes were examined histologically in serial sections. Various gross malformations such as microphthalmos, cleft lip and palate, and central nervous system anomalies were observed in the day - 7 group. However, microphthalmos was the only gross malformation found in the day - 8 group, and there were no gross malformations in the other 3

groups. The histological examinations indicated that the critical time for anophthalmos was day 7 of gestation or earlier because of its appearance in the day-7 group alone. The critical time for microphthalmos, faulty closure of the embryonic fissure, aphakia, and faulty separation of the lens vesicle was day 8 of gestation or earlier considering their occurrence in both day 7 and day 8 groups, and the time for goniodysgenesis was day 9 of gestation or earlier because of its appearance in the day 7, day 8, and day 9 groups. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 95—100, 1998)

Key words: Developmental eye abnormalities, Critical time, Retinoic acid, Mouse fetus

I 緒 言

レチノイン酸¹⁾はビタミン A の活性型誘導体で、細胞や組織の発生過程を制御する形態形成因子(morphogen)の一つである。レチノイン酸には催奇形性があり²⁾, その催奇形作用は主に頭部神経堤細胞の遊走障害によること³⁾が証明されている。著者ら⁴⁾は妊娠 7 日の C 57 BL/

6 NJcl マウスにレチノイン酸を投与して、胎仔にさまざまな眼形成異常が高率に成立することを報告し、レチノイン酸が眼形成異常の研究に有用な物質であることを示した。

ある催奇形因子が作用して特定の先天異常が成立する胎齢の範囲は、その先天異常の成立臨界期(critical period)⁵⁾と呼ばれている。眼形成異常の成立臨界期を明ら

別刷請求先: 467 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 尾関 年則
(平成 9 年 6 月 20 日受付, 平成 9 年 9 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Hironori Ozeki, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School,
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi-ken 467, Japan

(Received June 20, 1997 and accepted in revised form September 11, 1997)

かにすることは、その発生の予防につながる有用な研究である。

本研究では、さまざまな時期の妊娠マウスにレチノイン酸を投与して、種々の眼形成異常の成立臨界期を決定し、マウスとヒトの胎生期を比較することにより、ヒト眼形成異常の成立臨界期を類推した。

II 実験方法

実験動物は C 57 BL/6 NJcl マウスを用い、未経産で発情期の雌と健康な雄を一晚同一飼育箱に入れ、翌朝、陰栓のみられた雌を妊娠 0 日とした。-15℃ で保存しておいた全トランス型レチノイン酸 (Sigma Chem Co, St Louis) 100 mg をとうもろこし油 50 ml に溶解し、妊娠 7 日 (7 日群), 8 日 (8 日群), 9 日 (9 日群), 10 日 (10 日群) あるいは 11 日 (11 日群) のマウス腹腔内に 12.5 mg/kg 注射した。レチノイン酸は光に弱いので、投与前に溶解して使用した。各群の実験母獣数は 5 匹で、妊娠 18 日に母獣を屠殺して胎仔を取り出し実体顕微鏡で外形観察を行い、直ちに室温の Bouin 液で 2 日間固定した後、眼部を切り出してさらに 5 日間同液で固定した。上昇エタノール列

で脱水、キシレンで透徹、パラフィンに包埋後、厚さ 4.0 μm の前額断の眼部連続切片を作製した。キシレンで脱パラフィン、下降エタノール列で水和した切片をヘマトキシリン液に室温で 5 分間浸漬後、水洗し、続いてエオジン液に室温で 5~10 分間浸漬し、上昇エタノール列で脱水、キシレンで透徹、合成封入剤で封入した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行った各切片は光学顕微鏡で観察した。

III 結果

1. 外形観察結果

外形観察結果を表 1 に示す。着床総数に対する死亡胎仔の割合は、7 日群では 44.2% で、8 日群 22.2%, 9 日群 7.0%, 10 日群 4.4%, 11 日群 2.2% と順に減少した。生存胎仔数に対する異常胎仔の割合は、7 日群 87.5%, 8 日群 14.3% で、9 日群以後では異常胎仔はみられなかった。各群で観察された外表奇形を表 2 に示す。外形観察のみで



図 1 外形観察における定型的虹彩欠損 (7 日群)。

いずれも胎生 18 日の C 57 BL/6 NJcl マウスで、左の胎仔は正常、右は定型的虹彩欠損。右の胎仔では、下方の虹彩が欠損し (矢印)、瞳孔は西洋梨状を呈している。

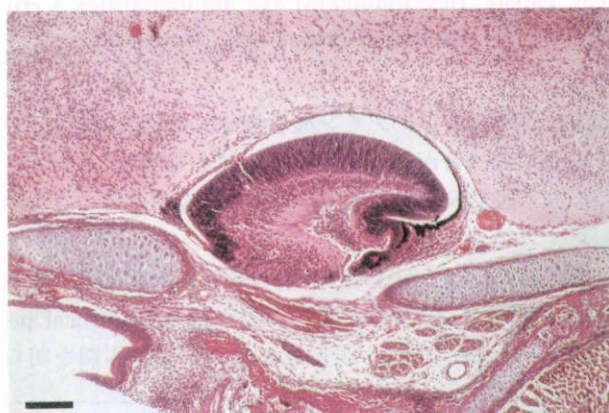


図 2 ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色の光学顕微鏡 (光顕) 写真。高度の小眼球 (7 日群)。

眼杯内板および外板組織のみが頭蓋底に存在する。バーは 140 μm

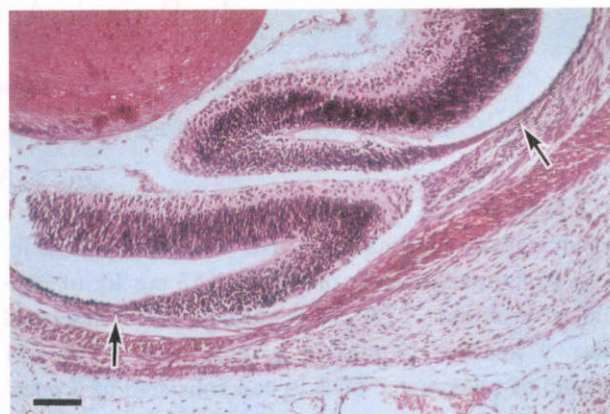


図 3 HE 染色の光顕写真。無水晶体眼に伴った小眼球 (7 日群)。

全長にわたって胎生裂 (矢印) は閉鎖しておらず、連続切片による観察でも水晶体組織は存在しない。硝子体腔には間葉組織が充満し、小眼球である。バーは 110 μm

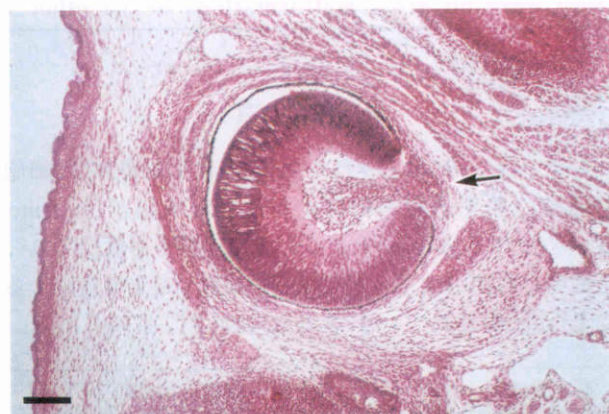


図 4 HE 染色の光顕写真。胎生裂閉鎖不全 (8 日群)。

胎生裂縁で眼杯が癒合せず、眼杯内板が大きく外反して (矢印)、同部の外板は欠損している。バーは 70 μm

無眼球と小眼球の鑑別は不可能であるため、胎生 18 日の正常眼より僅かに小さいものから、眼部に隆起やぶどう膜色素が全くみられないものまですべて小眼球とした。7 日群では小眼球の 83.3% をはじめ、口唇・口蓋裂、外脳症などの中枢神経系の異常、低位耳介、顔面形成異常、虹彩欠損(図 1) など種々の外表奇形が多発していたが、8 日群では小眼球が 14.3% に観察されたのみであった。

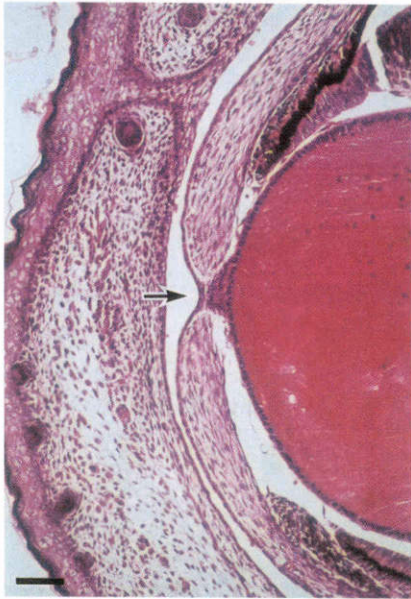


図 5 HE 染色の光顕写真. 水晶体胞分離不全(7 日群). 角膜上皮と水晶体上皮が水晶体茎(矢印)で連続しており、その部で角膜実質・内皮は欠損している。また、隅角部の形成も不良である。バーは 55 μ m



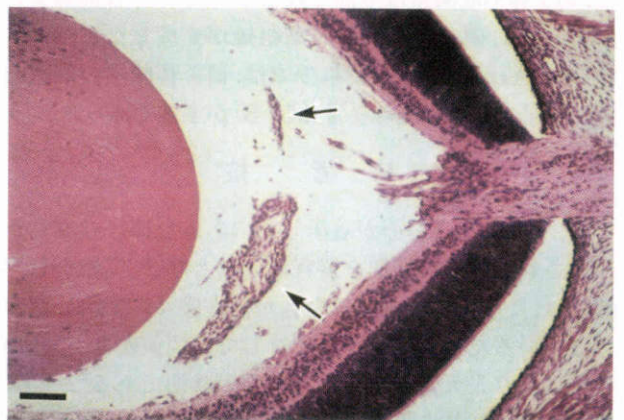
図 6 HE 染色の光顕写真. 前房隅角形成異常(9 日群). 隅角部には間葉組織が充満し(矢印), 上方では眼杯前縁部の伸展も阻害されている。また、虹彩索状物が角膜後面に付着している。バーは 70 μ m

2. 組織学的観察結果

各群でみられた組織学的眼形成異常を表 3 に示す。無眼球は神経外胚葉由来の眼組織が全く認められないものとし、小眼球には、神経外胚葉由来の眼組織が僅かに観察されるもの(図 2)から、種々の眼形成異常に伴って胎生 18 日の正常眼より小さくなったもの(図 3)まですべて含めた。無眼球は 7 日群のみに認められた。小眼球、胎生裂縁で眼杯が癒合せず、内板が外反して同部の外板が欠損する胎生裂閉鎖不全(図 4)、連続切片で観察しても水晶体成分が存在しない無水晶体眼(図 3)、角膜上皮と水晶体上皮が水晶体茎で連続する水晶体胞分離不全(図 5)は 8 日群まで、前房、虹彩や隅角部に形態学的異常がある前房隅角形成異常(図 6)は 9 日群まで成立した。無水晶体眼では、全例とも全長にわたって胎生裂は閉鎖していなかった。マウスの正常発生では、第一次硝子体に相当する硝子体腔内の間葉組織は、胎生 16 日にはほぼ退縮する⁶⁾とされているため、今回観察した胎生 18 日の硝子体腔内に



A



B

図 7 HE 染色の光顕写真. 硝子体形成異常, A: 重度(7 日群), B: 軽度(10 日群).

A: 硝子体腔に間葉組織が充満し、水晶体後囊が裂けて水晶体成分が硝子体中に散在している。また、後囊付近の水晶体線維細胞も変性している。バーは 55 μ m

B: 硝子体腔に僅かな間葉組織塊(矢印)がみられる。バーは 70 μ m

表 1 外形観察結果

	7 日群	8 日群	9 日群	10 日群	11 日群
実験母獣数	5	5	5	5	5
着床総数(1 母獣平均)	43(8.6)	45(9.0)	43(8.6)	45(9.0)	45(9.0)
死亡胎仔数(%*)	19(44.2)	10(22.2)	3(7.0)	2(4.4)	1(2.2)
生存胎仔数(%*)	24(55.8)	35(77.8)	40(93.0)	43(95.6)	44(97.8)
外表奇形胎仔数(%**)	21(87.5)	5(14.3)	0	0	0

*：着床総数に対する割合，**：生存胎仔数に対する割合

表 2 各群の外表奇形

単位：胎仔数					
	7 日群	8 日群	9 日群	10 日群	11 日群
小眼球	20(83.3)	5(14.3)	0	0	0
口唇・口蓋裂	8(33.3)	0	0	0	0
中枢神経系の異常	7(29.2)	0	0	0	0
低位耳介	6(25.0)	0	0	0	0
顔面形成異常	4(16.7)	0	0	0	0
虹彩欠損	4(16.7)	0	0	0	0

括弧内は各群の生存胎仔数に対する百分率

表 3 各群の組織学的眼形成異常

単位：眼数					
	7 日群	8 日群	9 日群	10 日群	11 日群
無眼球	17(35.4)	0	0	0	0
小眼球	21(43.8)	9(12.9)	0	0	0
胎生裂閉鎖不全	16(33.3)	8(11.4)	0	0	0
無水晶体眼	10(20.8)	7(10.0)	0	0	0
水晶体胞分離不全	7(14.6)	7(10.0)	0	0	0
前房隅角形成異常	8(16.7)	8(11.4)	8(10.0)	0	0
硝子体形成異常	15(31.3)	19(27.1)	16(20.0)	34(39.5)	18(20.5)

括弧内は各群の生存胎仔の眼数に対する百分率

間葉組織が存在する例はすべて硝子体形成異常と判定した。硝子体形成異常は全群で観察されたが、7 日群および 8 日群では、硝子体腔内に間葉組織が充満した重度の異常(図 7 A)が多く、9 日群以後では、硝子体腔内の間葉組織が少量である軽度の異常(図 7 B)が主体であった。

IV 考 按

発生学的に、受精卵が着床したのち主な器官の原基が形成されるまでの期間を器官形成期と呼び、実験奇形学的には、この器官形成期は細胞が最も盛んに細胞分裂を行っているため催奇形因子に対しての閾値が低く、その投与により先天異常が発生しやすい時期である⁵⁾。一方、それ以前の着床前期では催奇形因子による胎児致死作用は強いが、死を免れたものは正常発生を営み、それ以後の胎児期では、一般に形態学的異常は惹起されず、種々の機能障害を示すのみ⁵⁾とされている。マウスの器官形成期は胎生 7～13 日である⁷⁾ため、眼形成異常の成立臨界期の決定を目的とした本研究では、胎生 7 日から順に 11 日まで催奇形因子のレチノイン酸を投与した。

今回の結果から、レチノイン酸による C 57 BL/6 NJcl

マウス胎仔の無眼球の成立臨界期は胎生 7 日以前、小眼球、胎生裂閉鎖不全、無水晶体眼および水晶体胞分離不全のそれは胎生 8 日以前、前房隅角形成異常のそれは胎生 9 日以前であることが明らかになった。白井⁶⁾は Jcl/ICR マウスに mycotoxin の一種である ochratoxin A を投与し、小眼球、胎生裂閉鎖不全、無水晶体眼および水晶体胞分離不全の成立臨界期は胎生 8 日以前、前房隅角形成異常のそれは胎生 9 日以前と報告している。この結果は、使用したマウスや催奇形因子の種類は異なるものの、今回の結果と一致しており、マウスではこれらの眼形成異常の臨界期はほぼ決定されたといえる。また、Padmanabhan ら⁸⁾は妊娠 8～14 日のいずれかの日にラット母獣へ多量のビタミン A を投与して、胎生 21 日の胎仔を観察し、無眼球や小眼球などの眼形成異常は、妊娠 8 日あるいは 9 日の投与で最も高率に成立したことを報告している。ラットの妊娠 8～9 日はマウスの妊娠 7～8 日、ラット胎生 21 日はマウス胎生 18 日に相当する⁵⁾⁷⁾⁹⁾ため、Padmanabhan ら⁸⁾の結果は今回の結果と一致している。

無眼球は眼胞および眼杯の形成障害により成立するため、臨界期は胎生 7 日以前と決定できる。同様に胎生裂閉

鎖不全、無水晶体眼および水晶体胞分離不全は、それ以後の発生過程の障害、すなわち、前二者は胎生裂の閉鎖障害、後者は眼杯と水晶体胞の相互作用の障害によるため、臨界期は胎生 8 日以前、前房隅角形成異常はさらに後期の異常、すなわち、神経堤細胞の前眼部への遊走障害によるため、臨界期は胎生 9 日以前になったと考える。マウスでは、眼杯や水晶体板の発生は胎生 9 日、眼杯や水晶体胞の発生は胎生 10 日、前眼部への神経堤細胞の遊走は胎生 11 日で、さらに、胎生裂は胎生 10 日に出現して胎生 12 日までに完全に閉鎖する⁶⁾⁷⁾とされている。催奇形因子による先天異常の成立臨界期は、その器官の原基が発生する時期より早い期間⁵⁾とされており、本研究の結果はこの原則に一致している。

無水晶体眼は、臨床的には稀な先天異常¹⁰⁾¹¹⁾で、Manschot¹⁰⁾は無水晶体眼を水晶体板が誘導されない原発性と水晶体が形成されたのち、何らかの理由で吸収、消失した続発性の二つに分類し、原発性無水晶体眼では定型的ぶどう膜欠損がほぼ全例で合併するため、その成立に胎生裂の閉鎖障害が関与していることを提唱した。本研究の無水晶体眼は、胎生期に連続切片で観察しても水晶体組織が全く観察されなかったことから原発性と考えられ、さらに、全例で胎生裂閉鎖不全がみられ、Manschot¹⁰⁾の説を支持する結果であった。

馬嶋¹²⁾は小眼球症の成因を発生病理学的に、①眼胞發育障害、②眼杯形成障害、③前眼部間葉異発生、④水晶体起因性、⑤硝子体起因性、⑥胎生裂閉鎖不全、⑦眼球壁發育障害の七つに分類し、小眼球はこれらが単独、または複数作用して発生するとしている。本研究でも、⑦以外の成因が単独あるいは複数関与した小眼球は 8 日群まで成立していたが、9 日群以後に観察された前房隅角形成異常や硝子体形成異常は、いずれも異常の程度が軽かったため小眼球を伴わなかったと考える。

硝子体形成異常は全群に認められ、今回の研究では、その成立臨界期を決定することはできなかった。他の眼形成異常の発生率がいずれも 7 日群から順に減少したのに対して、硝子体形成異常では、7 日群から 9 日群までは 31.3%、27.1%、20.0% と順に減少し、10 日群で 39.5% と再び増加していた。実験奇形学的には、ある異常の発生率が異なる投与日で再び増加する場合には、二つの異なった機序がその異常の成立に関与している⁵⁾¹³⁾とされている。白井⁶⁾は ochratoxin A を妊娠 7~11 日の Jcl/ICR マウスに投与して、胎仔に成立した硝子体形成異常を検討し、本研究と同様の結果を報告して、硝子体形成異常の成立には、硝子体原基そのものが過形成になった場合と、本来は退縮していく硝子体腔内の間葉組織が退縮せずに遺残した場合の二つの機序があると提唱した。本研究では、8 日群以前の硝子体形成異常には硝子体腔を埋め尽くす多量の間葉組織がみられ、9 日群以後では硝子体腔内の間葉組織は少量のみであったことから、8 日群以前の硝

子体形成異常には硝子体原基の過形成が、9 日群以後には間葉組織の退縮の異常が関与しているものと考ええる。

マウスとヒトの胎芽期および胎児期を比較すると、本研究でレチノイン酸を投与したマウスの胎生 7~11 日は、ヒトの胎生 2.5~8 週、マウスを観察した胎生 18 日は、ヒトの胎生 20 週に相当する⁵⁾⁷⁾⁹⁾。レチノイン酸投与によるマウス胎仔の眼形成異常の臨界期からヒトのそれを類推すると、無眼球の成立臨界期は胎生 2.5 週以前、小眼球、定型的ぶどう膜欠損に相当する胎生裂閉鎖不全、無水晶体眼および Peters 奇形に相当する水晶体胞分離不全のそれは胎生 4 週以前、Axenfeld - Rieger 症候群に相当する前房隅角形成異常のそれは胎生 5 週以前で、いずれもかなり早期であることが注目される。

レチノイン酸は、ビタミン A すなわちレチノールのカルボン酸で、生体内でレチノールはレチナールを経てレチノイン酸へと代謝されたのち、主にその生理活性を発揮する¹⁴⁾。ビタミン A を妊娠 8 日のハムスターに経口投与すると、投与 6 時間後には胎芽の頭部間葉組織に形態学的変化が出現することが報告¹⁵⁾されている。また、ラットへ経口投与されたレチノイン酸は、投与 1 時間後から 4 時間後にかけて血中濃度が最高を示し、その後、数時間で急速に減少すること¹⁶⁾が知られている。さらに、生体内でレチノイン酸がレチノールへと逆に変換されることはなく、投与されたレチノイン酸が肝臓など体内に貯蔵されることはない¹³⁾¹⁴⁾¹⁶⁾。以上のことから、レチノイン酸は、短時間で吸収されて胎芽に作用し、短時間で代謝されて体内への蓄積もないため、今回のような先天異常の成立臨界期の研究に適した催奇形因子である。また、Shenefelt¹³⁾は、妊娠ハムスターに胎仔の LD₅₀(median lethal dose)を目標とした量のレチノイン酸を投与して、中枢神経系、骨格系および内臓系の先天異常の成立臨界期を検討し、経口、静脈内あるいは腹腔内投与による臨界期の差はないことを証明しており、本研究では、光により活性の低下しやすいレチノイン酸をとうもろこし油に溶解して使用しているため、投与時間が短く、予定した量を確実に投与でき、手技が比較的容易な腹腔内投与を選択した。

ビタミン A の催奇形性は従来から広く知られていた¹⁷⁾¹⁸⁾が、近年、欧米では各種ビタミン剤が濫用され、妊婦のビタミン A の過剰摂取による流・早産や出生児の先天異常の発生に対して、再び警告されている¹⁹⁾。Rothman ら²⁰⁾は 1 日 10,000 IU 以上のビタミン A を妊娠 6~7 週以前に連日内服していた妊婦の出生児では、中枢神経系や心臓などに頭部神経堤細胞の発生異常が多発したのに対して、同時期以後に同量のビタミン A を内服していた妊婦の出生児には、そのような先天異常は発生しなかったことを報告している。今回、母獣に投与したレチノイン酸の 12.5 mg/kg は、7 日群の胎仔の LD₅₀ を目標としたもので、Rothman ら²⁰⁾が危険性を示したビタミン A 1 日 10,000 IU の 320 日分、あるいは妊婦の 1 日の摂取必要

量 3,200 IU¹⁴⁾ の 1,000 日分に相当する多量ではあるが、本研究の結果も、妊娠早期のビタミン A 摂取の危険性を示している。

本研究で得られた結果は、ヒト胎生 2.5 週～5 週以前という本人も妊娠に気づいていないことが多い妊娠早期に、ビタミン A 類などの催奇形因子への曝露により小眼球、無眼球、胎生裂閉鎖不全など重篤な眼形成異常を起こす可能性を警告するものである。

稿を終えるに当たり、御校閲賜りました馬嶋昭生名誉教授に深謝いたします。

本論文の要旨は第 101 回日本眼科学会総会で発表した。

本研究は文部省科学研究費奨励研究 A 08771508 の援助を受けて行った。

文 献

- 1) **Slack JMW**: We have a morphogen. *Nature* 327: 553—554, 1987.
- 2) **Kochhar DM**: Teratogenetic activity of retinoic acid. *Acta Path Microbiol Scand* 70: 398—404, 1967.
- 3) **Wiley MJ, Cauwenbergs P, Taylar IM**: Effects of retinoic acid on the development of the facial skeleton in hamsters. Early changes involving cranial neural crest cells. *Acta Anat* 116: 180—192, 1983.
- 4) **尾関年則, 白井正一郎, 馬嶋昭生**: レチノイン酸によるマウス胎仔の眼形成異常. *日眼会誌* 101: 293—298, 1997.
- 5) **谷村 孝**: 環境因子によるヒトの奇形—とくに臨界期について—, 鈴木雅洲(編): 産婦人科 MOOK 25 奇形—早期発見と出生後の対策—, 金原出版, 東京, 97—122, 1983.
- 6) **白井正一郎**: 眼先天異常と遺伝子. 眼先天異常の成立機序. *日眼会誌* 95: 1206—1237, 1991.
- 7) **亀山義郎**: 眼球の発生異常. 中島 章, 他(編): 薬物と感覚障害. ソフトサイエンス社, 東京, 52—69, 1980.
- 8) **Padmanabhan R, Singh G, Singh S**: Malformations of the eye resulting from maternal hypervitaminosis A during gestation in the rat. *Acta Anat* 110: 291—298, 1981.
- 9) **亀山義郎**: 比較発生病理学よりみた中枢神経系の先天異常. 脳と発達 3: 449—459, 1971.
- 10) **Manschot WA**: Primary congenital aphakia. *Arch Ophthalmol* 69: 71—77, 1963.
- 11) **Johnson BL, Cheng KP**: Congenital aphakia. A clinicopathologic report of three cases. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 34: 35—39, 1997.
- 12) **馬嶋昭生**: 小眼球症とその発生病理学的分類. *日眼会誌* 98: 1180—1200, 1994.
- 13) **Shenefelt RE**: Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid. Relation to dose and stage at treatment. *Teratology* 5: 103—118, 1972.
- 14) **日本ビタミン学会**: ビタミンハンドブック 1. 脂溶性ビタミン. 化学同人, 京都, 11—30, 1989.
- 15) **Marin-Padilla M**: Mesodermal alterations induced by hypervitaminosis A. *J Embryol Exp Morphol* 15: 261—269, 1966.
- 16) **Desmukh D, Malathi P, Rao K, Ganguly J**: Absorption of retinoic acid (vitamin A acid) in rats. *Indian J Biochem* 1: 164—166, 1964.
- 17) **Cohlan SQ**: Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117: 535—536, 1953.
- 18) **小谷貞彦**: ビタミン A 過剰投与による眼奇形の形態発生. *大阪市医学会雑誌* 7: 132—149, 1958.
- 19) **Oakley GP, Erickson JD**: Vitamin A and birth defects. Continuing caution is needed. *N Engl J Med* 333: 1414—1415, 1995.
- 20) **Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen UDT, Mannino S, Milunsky A**: Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med* 333: 1369—1373, 1995.