

出したり、口を開閉する動きを加えると、顔の内部の特徴にも新生児は注意を向けることができる (Bushnell, 1979)。

ここでひとつ問題提起をすると、これら新生児期に認められる視覚機能が、明暗情報を処理するメラノプシンを基礎としたシステムで処理されている可能性がある、ということである。動きに敏感な新生児期の視覚特性は、動きに伴って生じる背景の明暗情報の変化を知覚しているだけかもしれない。また、顔認識のルールが顔の輪郭の知覚になっている点も、顔とバックグラウンドの明暗コントラストで知覚処理が行なわれている可能性がある。しかし、新生児期の視覚機能がメラノプシンだけで構成される仮説を否定する例として、顔の中の動き（舌の突き出し、口の開閉）を新生児が真似る現象がある (Meltzoff & Moore, 1977)。新生児がメラノプシン機能のみを使い、影のコントラストから、舌・口といった顔の中のパーツの動きを認知することはむずかしく思える。以上のように考えると、メラノプシンが新生児の知覚・認知にかかわっている可能性を否定できないが、加えて白黒識別がメインのロドプシン、あるいは未熟なコーンオプシンを介した映像処理が同時に機能している可能性がある。

4 メラノプシンは早産児の発達にどのように影響するのか

早産児は少なくともメラノプシンを使って、明暗情報を脳で処理していると考えて良さそうだ。ヒト早産児の発達に与える光環境の影響を調べた代表的な研究として、明暗サイクルのある光環境と24時間明るい光環境（恒明環境ともよばれる）の2つの環境で体重増加を比較した研究がある。

アメリカで行なわれた臨床研究では、明暗サイクルのある光環境で保育された早産児20名、恒明環境で保育された早産児21名が対象となった。その後の経過観察で、①体重増加、②ミルク投与が胃チューブから哺乳ビンに移行した時期、③核黄疸という神経症を予防するための光療法が必要だった期間、④人工呼吸器を使用した期間、といった点において明暗サイクルのある光環境で保育された早産児の方が、恒明環境の早産児より治療経過がよかったと報告されている (Miller et al., 1995)。同様の報告がイギリスからの臨床研究からも出ていて、明暗サイクルのある光環境で保育された早産児の方が、恒明環境の早産

児に比べ、睡眠時間が長く、体重増加がよかったと報告されている (Mann et al., 1986)。現在でも日本の早産児・新生児室では、恒明環境を光環境として選択している施設が多いのが現状である。赤ちゃんの発達を考えると、臨床研究で綿密な光条件の比較を行なった上で、明暗サイクルのある光環境の導入を検討する必要があるかもしれない。

恒明環境が生物時計 (視交叉上核) に与える影響を調べるために、マウス新生児を対象に私達が行なった実験によれば、新生児マウスの脳は、大人マウスの脳より光に対し感受性が高いことがわかっている (図11-5: カラー口絵参照)。出生当日より24時間明るい環境 (恒明環境) に3週間おかれた新生児マウスの生物時計は全例で不安定になり、明暗サイクルが存在する光環境では存在しない時計遺伝子の発現パターンが観察された。これに対し、大人マウスの生物時計を不安定にさせるためには、4か月という長期間、恒明環境に暴露する必要があった。加えて、大人マウスの生物時計が不安定になる割合は全体の10%のみで、恒明環境に抵抗性がある (Ohta et al., 2005)。これは、新生児マウスの生物時計が恒明環境でほぼ100%不安定になるのに比べ対照的である (Ohta et al., 2006)。

この新生児期の光感受性の高さは、光刺激に対するメラノプシン反応の発達経過 (マウス) にも観察される。生後0-5日にかけて、メラノプシンを含有する網膜節細胞の数は増加し、その後しだいに大人レベルの密度に細胞数が減少する。また、光刺激に対する節細胞の反応をカルシウムイオン濃度の変化で評価した実験でも、生後0日の方が生後5日に比べ、反応性が高いことが示されている (Sekaran et al. 2005)。

新生児期の高い光感受性は、太陽光にコントロールされた出生直後からの明暗サイクルに体の生理メカニズムのリズムを同調させるという意味で、非常に重要な役割を担っているように思える。しかし、一方で光刺激に対する過度の暴露は、その高い感受性のために、新生児の発達に不利益な効果を与える可能性も残している。たとえば前述したように、恒明環境に暴露された早産児の体重増加が、明暗サイクルのある光環境で保育された早産児より悪いことが報告されている (Mann et al., 1986; Miller et al., 1995)。また、新生児突然死症候群は出生時体重1,000g以下の早産児で起こりやすく、光環境も含め保育器内の

不適切な人工環境が症候群の原因となっている可能性がある (Malloy & Hoffman, 1995)。

5 早産児・新生児の視覚研究が追求するテーマとして重要なものは何か？

生後の視覚環境は、体の成長スピードを決めるという生物学的な意味だけでなく、養育者の顔認識、それに続く母子間コミュニケーションという社会心理的な意味からも、発達初期の赤ちゃんの生存にとって重要な意味をもつ。赤ちゃんの視覚の発達が、明暗情報の処理（メラノプシン）から始まり、形・色を認識する映像情報の処理（ロドプシン・コーンオプシン）に移行していくことがわかった。しかし、その発達スピードは緩やかで、映像情報の処理に辿りつくのに生後5か月かかる。特に早産児では、明暗情報の処理を行なうメラノプシンのみが発達初期に働いている可能性が高く、早産児がもつ視覚の限界をサポートすることが、赤ちゃんの健やかな成長を達成するために重要だ。

早産児・新生児の成長を補助するという視点から、以下の3つが、赤ちゃんの視覚環境を考える上で重要なテーマである。

- ①早産児・新生児の発達と光環境の関係を明らかにすること：現在の知見では、メラノプシンを基礎とした生物時計は、ホルモン・神経伝達を介し、生後の光情報を体全体に伝達可能な唯一のメカニズムである。過去の臨床研究で指摘されたように、光環境は赤ちゃんの体重増加といった生後発達に影響する。このメカニズムを心理学・生物学・医学を通し明らかにし、赤ちゃんにとって最適な生後の視覚環境を見つけることが重要である。生物学（特に分子生物学）の弱点は、その実験技術の性質上、ほ乳類では対象がマウス・ラットに限られることが多く、ヒト・サルを対象とすることは通常倫理的に許されていない。この生物学の弱点を心理学の手法で補い、生物学で得られたマウスの知見を、効率よくヒトにフィードバックできる可能性がある。
- ②早産児の赤ちゃんと母親との愛着形成をサポートする情報提供を行なうこと：早産児は、妊娠40週で生まれた満期出産児に比べ、映像情報を扱うロドプシン・コーンオプシンが未熟で、養育者の顔認識が満期出産児と異なると

推測される。そのため、出生直後は養育者の視覚的な働きかけに対し早産児の反応は乏しく、その数週間後に周囲の視覚環境により敏感に反応する時期がやってくる。早産児においては、虐待児症候群の発生率が満期出産児に比べ高く (Leventhal et al., 1989 ; Stanton et al., 1994 ; DiScala et al., 2000 ; Kivlin et al., 2000), その原因の1つとして養育者が赤ちゃんへの愛着をスムーズに形成できない点が指摘されている。発達過程についての事前の情報提供が、反応の乏しい早産児のお子さんに対するご両親の理解をうながし、その後の適切な母子関係を育成する手助けになる可能性がある。視覚発達の科学的な記載・根拠を提示することは、早産児をもつ養育者の愛着形成をサポートする上で重要である。

- ③赤ちゃんの視覚・認知メカニズムにおけるメラノプシンの役割を明らかにすること：過去の研究において、新生児期の視覚メカニズムがロドプシン（網膜桿体細胞）の機能を中心に考察されてきた。しかし、最近の視覚研究により、そのメカニズムの一部は明暗情報の処理を主体とするメラノプシン（網膜節細胞）の機能で処理されている可能性が出てきた。ロドプシン・メラノプシンの2つの光受容体を基礎に、これまでの早産児・新生児の視覚メカニズムをとらえ直すことにより、視覚・認知研究に新たな展開・理論構築が生まれる可能性がある。たとえば、「メラノプシンは早産児の視覚認知にどのようにかかわっているのか」「初期のメラノプシンを基礎とした明暗情報処理の発達が、その後のロドプシン・コーンオプシンを中心とした映像情報処理の発達に影響するのか」といった疑問は赤ちゃんの視覚発達を考える上で興味深いテーマである。

触覚・嗅覚・聴覚・味覚といった他の知覚に比べ、赤ちゃんの視覚機能は出生時に未熟なため、生後環境の影響をより受けやすいといえる。特に保育器という人工環境で生後数週間も管理される早産児にとって視覚環境の整備の意義は大きく、多分野にわたるアカデミックな視覚研究が赤ちゃんのより健全な発達に直接つながることだろう。

今日の治療指針

私はこう治療している

総編集

山口 徹 北原光夫 福井次矢

責任編集

相澤 久道	相澤 好治	有賀 徹
飯田 三雄	飯塚 一	井廻 道夫
内山 聖	太田 伸生	小澤 敬也
楠田 聡	郡 健二郎	小林 祥泰
島田 和幸	谷原 秀信	富野康日己
中川 武正	中谷 壽男	中村 利孝
夏目 長門	藤田 次郎	前沢 政次
松本 俊夫	水沼 英樹	三森 経世
八木 聰明	山田 信博	山脇 成人
行岡 哲男		

〈五十音順〉

医学書院

消化管異物	東京都立府中 病院小児科	黒澤 照喜	1113	小児の急性脳症, ライ症候 群	大分大学教授	泉 道博	1144
小児の鉄欠乏性貧血	弘前大学 大学院教授	伊藤 悦朗	1114	小児の重症筋無力症	杏林大学教授	岡 明	1146
小児の特発性血小板減少性 紫斑病	鹿児島大学 大学院教授	河野 嘉文	1114	筋ジストロフィー	新潟大学教授	西澤 正豊	1147
小児の白血病	信州大学医学 部附属病院	小池 健一	1115	脳性麻痺	岩手医科大学 教授	千田 勝一	1147
神経芽腫	愛知医科大学 教授	鶴澤 正仁	1116	言葉の遅れ	JA北海道厚生 医療副院長	沖 潤一	1148
ビタミンK欠乏性出血	三重大学 大学院教授	駒田 美弘	1117	小児のヒステリー	こども心身 発達研究所	富田 和巳	1149
小児の血管性紫斑病 (アレ ルギー性紫斑病, アナ フィラクトイド紫斑病, ヘノッホ・シェーンライ ン紫斑病)	神戸大学 大学院教授	飯島 一誠	1117	*小児の注意欠陥・多動性障 害 (ADHD)	東京医科大学 教授	星加 明徳	1150
川崎病	北里大学教授	石井 正浩	1118	小児の摂食障害	富山県立高 原長	江川 充	1150
若年性特発性関節炎 (若年 性関節リウマチ)	千葉大学 大学院准教授	下条 直樹	1120	被虐待児症候群 (子どもへ の虐待)	長岡中央総合 病院院長	田中 篤	1151
リウマチ熱	横浜国立大学 大学院教授	横田 俊平	1121	泣き入りひきつけ (憤怒け いれん)	お茶の水女子 大学教授	榎原 洋一	1152
小児の HIV 感染症	国立国際医療 センター小 児科	松下 竹次	1122	夜驚症	筑波大学 大学院教授	宮本 信也	1152
原発性免疫不全症候群	北海道大学 大学院准教授	川村 信明	1124	夜尿症	青森病院院長	和賀 忍	1153
*小児の気管支喘息	群馬大学 大学院教授	荒川 浩一	1125	不登校	国立成育医療 センター医長	宮尾 益知	1154
小児の食物アレルギー	新潟大学教授	鳥谷部真一	1127	ダウン症候群 (21-トリソ ミー症候群)	東北大学 大学院教授	松原 洋一	1155
小児の急性腎炎症候群	関西医科大学 教授	金子 一成	1128	腰椎穿刺, 髄液採取法 (⇒ 117 頁)			
小児の慢性腎炎症候群	兵庫医科大学 主任教授	谷澤 隆邦	1129	風疹 (⇒ 176 頁)			
小児のネフローゼ症候群	新潟大学医学 部附属病 院講師	池住 洋平	1130	麻疹 (はしか) (⇒ 177 頁)			
小児の尿路感染症	久留米大学 医療センター 教授	伊藤 雄平	1132	水痘 (⇒ 182 頁)			
溶血性尿毒症候群	東京女子医科 大学教授	服部 元史	1133	流行性耳下腺炎 (ムンプス, おたふくかぜ) (⇒ 183 頁)			
小児の腎不全	西札幌病 院院長	星井 桜子	1134	伝染性紅斑 (⇒ 184 頁)			
学校における腎疾患学童生 徒の管理	近畿大学教授	竹村 司	1135	予防接種の安全性と有効性 (⇒ 198 頁)			
*低身長	大阪大学 大学院教授	大崗 恵一	1136	先天性心疾患 (⇒ 332, 333 頁)			
先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症)	帝京大学教授	見玉 浩子	1137	先天性胆道拡張症 (⇒ 461 頁)			
くる病	秋田大学教授	高橋 勉	1138	小児の糖尿病 (⇒ 589 頁)			
思春期早発症	旭川医科大学 教授	藤枝 憲二	1139	学習障害とコミュニケーション障害 (⇒ 815 頁)			
小児の肥満	新潟大学医学 部附属病 院講師	菊池 透	1140	自閉症とアスペルガー症候群 (⇒ 816 頁)			
小児の無菌性髄膜炎	福島県立医科 大学教授	細矢 光亮	1140	チック障害 (⇒ 817 頁)			
小児の細菌性髄膜炎	新潟県立 新潟医 学部	大石 智洋	1141	家庭と学校のメンタルヘルス (⇒ 818 頁)			
熱性けいれん	滝川キリスト 教病院部長	鍋谷まこと	1142	斜頸 (⇒ 870 頁)			
小児のてんかん	慶應義塾大学 教授	高橋 孝雄	1143	先天性股関節脱臼 (⇒ 870 頁)			
				先天性内反足 (⇒ 871 頁)			
				小児の肘周辺骨折 (⇒ 872 頁)			

数増加、脈圧の開大、心拡大・肺うっ血、無呼吸、乏尿、体色不良、肝腫大などがみられる。心エコーにて動脈管の太さやカラードプラによる血流幅や左右肺動脈拡張期血流速度または収縮期血流との比、Mモード法による左房/大動脈径の比や左室拡張期末期径などを経時的にみる。

治療方針

A 早産児動脈管開存症の予防と全身管理

過剰な水分投与や貧血、感染、低酸素血症などの増悪因子を排除することが予防につながる。心不全治療としては水分制限やカテコールアミン・利尿薬の使用、人工呼吸管理、貧血の是正などを行う。

B プロスタグランジン合成阻害薬による薬物学的閉鎖療法

心エコー所見で動脈管そのものが太く、血流幅が広い場合は重篤化しないうちに治療するのがベストと考えられる。インドメタシン静注療法は保険適用があり、薬物学的閉鎖療法の主流である。インダシン静注用の使用量・使用方法を処方例に示す。12時間間隔での3回投与を原則としているが、副作用発現率が約半数と無視できないため、副作用発現と効果をみながら以降の投与を決める。インドメタシンの副作用としては乏尿、腎不全、低血糖、出血傾向、消化管出血、消化管穿孔、壊死性腸炎などが挙げられる。

処方例 患児の生後時間に応じて、下記1) - 3)のいずれかの用量を12 - 24時間間隔で通常3回投与する。

- 1) 初回投与：生後48時間以内 インダシン静注
用 1回目0.2 mg/kg, 2回目0.1 mg/kg, 3回目0.1 mg/kg 2-3時間以上かけて 静注
 - 2) 初回投与：生後2-7日未満 インダシン静注
用 1回目0.2 mg/kg, 2回目0.2 mg/kg, 3回目0.2 mg/kg 2-3時間以上かけて 静注
 - 3) 初回投与：生後7日以上 インダシン静注用
1回目0.2 mg/kg, 2回目0.25 mg/kg, 3回目0.25 mg/kg 2-3時間以上かけて 静注
- 投与に際しては次の点に留意する。

- a) 投与後に無尿または著明な乏尿(尿量:0.6 mL/kg/時未満)が現れたら腎機能が正常化するまで次の投与は行わない。
- b) 1回目あるいは2回目の投与で動脈管の閉鎖が得られた場合は、以後の投与は行わずに経過を観察しても差し支えない。
- c) 投与終了後48時間以上経過して動脈管が閉鎖している場合は追加投与の必要はない。

C 予防投与

インドメタシン予防投与については議論があり、

施設により使用基準がつけられている。予防投与は通常0.1 mg/kg(治療量の半分)で、急性期の重度の頭蓋内出血の発生を減じる可能性がある。

D 結紮術

結紮術(クリッピング術含む)は動脈管開存症の最終的な治療法である。手術適応はプロスタグランジン合成阻害薬が無効な場合とプロスタグランジン合成阻害薬の使用禁忌(腎不全、重度頭蓋内出血の急性期、血小板減少など)が存在する場合である。施設によって手術適応に差があるのが現状である。なお、日本未熟児新生児学会による診療ガイドラインが作成される予定である。

新生児の慢性肺疾患

chronic lung disease (CLD) of the newborn

松田 直 東北大学病院准教授・小児科

病態と診断

従来、慢性肺疾患 (CLD) とは早産児の呼吸窮迫症候群 (RDS) に続発する気管支肺異形成 (BPD) や慢性子宮内炎症と関連する Wilson - Mikity 症候群などを含む新生児期の慢性呼吸障害を示す疾患概念であった。しかし、人工肺サーファクタント [サーファクテン (S-TA)] 療法の普及と人工換気療法の改良に伴い、近年では嚢胞期から肺胞期にかけて肺胞新生が停滞することによる気腫性変化 (fewer and larger alveoli) を主徴とする、肺胞ならびに肺血管系の成長障害がその本質的病態と考えられるようになった (new BPD)。診断は生後1か月もしくは修正週数36週ごろの酸素依存性と胸部X線所見に基づいて行われる。大多数のCLDでは児の成長に伴い自然軽快を期待できるが、慢性子宮内炎症、びまん性絨毛膜羊膜ヘモジデロース (DCH)、成育限界出生 (嚢胞期早期)、症候性動脈管開存 (PDA)、肺低形成、酸素毒性、陽圧換気、気道感染などが増悪因子となり、重症例では肺高血圧 (PH) に対する長期的な循環管理を必要とする。

治療方針

現時点では肺胞新生を促進させる治療法が解明されていないため、増悪因子への曝露を最小限にとどめることと、PHの進行を見逃さないことが治療の要点となる。

A 出生前の母胎管理

胎児に皮膚成熟が得られる妊娠23週後半までの妊娠延長を基本とするが、それ以降では慢性子宮内炎症やDCHが疑われ、羊水の安定小泡試験 (SMR) で過成熟と判定された場合には、母体にス

B 胎児心拍モニタリング

高度変動一過性徐脈や持続性徐脈は、低心拍量による低血圧となると考えられ、また子宮内感染もPVL発症危険因子として報告されている。適切な分娩管理、娩出時期の検討が必要である。

C 適切な呼吸循環管理

IVH予防には出生後の蘇生処置を含め、保温、minimal handlingは基本となる。カテコールアミンの投与、輸血など血圧変動をきたしやすいものは投与量や投与速度に注意する。また、不必要な体位変換や気管内吸引、気胸、動脈管開存症、アシドーシス、高炭酸ガス血症なども回避するよう努めなければならぬ。鎮静薬の投与も考慮すべきである。呼吸循環の安定化が必要である。

低CO₂血症は脳血管の収縮から脳虚血が生じPVL発症の危険性が増す。適切な人工呼吸管理、自発呼吸がある場合はnDPAP (nasal Directional positive airway pressure) など、低CO₂血症予防の呼吸管理が重要である。また、急性期離脱後で晚期肺不全の徴候がみられた場合は血圧低下に伴う脳虚血を防ぐため速やかに輸液管理やステロイド投与を行う。

D インドメタシン

早産時の動脈管開存症に適応とされるインドメタシンを生後早期から低用量で数日投与することによってIVHの発症が予防されることが報告されている。

わが国における多施設共同ランダム化二重盲験比較試験では、超低出生体重児において生後6時間以内にインドメタシン注0.1 mg/kgを24時間ごとに1回6時間の持続投与を計3回投与することによって、副作用を増大させることなく重症IVH (III, IV度)をプラセボ群に比べ半減させた。

早産児の貧血

anemia of prematurity

細野 茂春 日本大学准教授・小児科学系小児科学分野

病態と診断

A 病態

乳児は出生時の循環血液量が少ない児ほど早期に貧血状態となり重症化する。早産児に起こる貧血を未熟児貧血とよぶ。発症要因から、生後1-2か月に出現しエリスロポエチンの反応性に起因する早期貧血と、生後4か月以降に発症する鉄欠乏に起因する後期(晩期)貧血とに大別される。

B 診断

ヘモグロビン値12 g/dL未満を一般的に貧血と定義する。早期貧血では貧血状態でも網状赤血球数が低値である。後期貧血では小球性低色素性貧血と血清鉄、フェリチンの低値、総鉄結合能、不飽和鉄結合能が上昇する。

治療方針

早期貧血に対しては初期循環血液量を増やすための臍帯の後期結紮、採血量の最小化と造血能を高めるためのエリスロポエチン療法が主体となる。後期貧血に対しては経腸栄養確立後の鉄剤投与が重要である。

A 早期貧血

1. エリスロポエチン 出生体重1,500 g未満の児ではヘモグロビン値が12 g/dL前後に低下した場合にエリスロポエチンの投与を開始する。経腸栄養が100 mL/kgに確立次第、鉄剤を投与する。

処方例 下記1), 2)を併用する。

- 1) エスポー注 1回200単位/kg 週2回 皮下注
- 2) インクレミンシロップ (鉄として6 mg/mL) 4-6 mg/kg (鉄として) 分1-2

中止基準: 修正在胎週数37週以降ヘモグロビン濃度が10 g/dL前後で安定すれば両剤を中止する。

2. 赤血球輸血 次の症状を呈する場合に考慮する。詳しくは未熟児早期貧血に対する輸血ガイドラインを参照されたい。

- a) 呼吸障害が認められない早産児: ①ヘモグロビン値8 g/dL未満, ②ヘモグロビン値が8-10 g/dLで貧血による症状を認めるとき。
- b) 呼吸障害を合併している児は別途考慮。

処方例 採血後2週間以内に下記を用いる。

MAP (赤血球保存用添加液) 加赤血球濃厚液 1回10-20 mL/kg 輸血 輸血速度はうっ血性心不全が認められない未熟児では1-2 mL/kg/時とし、うっ血性心不全が認められる未熟児では心不全の程度に応じて別途考慮

B 後期貧血

1,500 g未満の児は経腸栄養が確立しだい、鉄剤を投与する。

処方例

インクレミンシロップ (鉄として6 mg/mL) 4-6 mg/kg (鉄として) 分1-2

中止基準: 体重2,300-2,500 gでヘモグロビン値が10 g/dL前後で安定していれば中止する。

37 光パルス

— Light Pulse

脊椎動物、無脊椎動物、植物を問わず多くの概日システムにおいて明暗サイクルは最も強力な概日時計の同調因子である。恒暗条件下において短時間の光処理を行い、概日時計の位相や振幅に与える影響を調べる実験を行う際のこの光処理は光パルスとよばれる。

概日時計に影響を与えるパルスを与えた概日時計の位相に対して、生じた位相変異の大きさをプロットした図は位相反応曲線 (phase response curve: PRC) とよばれ、概日時計の同調様式を検討するうえで重要である (図 1, 2)。主観的昼の光パルスはほとんど位相変異が起こさないが、主観的夜の前半には位相の後退を、主観的夜の後半には位相前進を惹起する。光パルスに対する位相反応曲線の形はこれまでに調べられたほとんどすべての生物に共通で、光パルス型の位相反応曲線とよばれる。また、主観的夜の中心付近に位相変異の方向が位相後退から位相前進に変化する概日時計の位相が存在するが、この位相はクロスオーバーポイントとよばれる。この位相に強い光パルスを与えるとクリティカルパルスとして作用して概日時計が停止することがある。

位相反応曲線作成の際に得られた概日リズムのデータから、パルスを与えた概日時計の位相に対して、位相変異後の位相をプロットした図は位相転移曲線 (phase transition curve) とよばれる (図 2)。この曲線の傾きの平均値が 1 に近い値を示す場合、1 型の位相反応曲線、0 に近い傾き

を示す場合は 0 型の位相反応曲線に分類される。一般に光パルスの強度が強くなると位相変異の大きさは大きくなり、位相反応曲線は 0 型から 1 型に移行する。

様々な波長の単色光の光パルスを用いて位相変異の光用量依存性を調べることにより、概日時計の光同調に関与する概日光受容体の波長特異性を決定することができる。

一方、恒明条件下で短時間の暗処理を行うことを暗パルス (dark pulse) 処理とよぶが、この場合の位相反応曲線は光パルスタイプの位相反応曲線と形が異なり、主観的昼の中間から主観的夜の前半に位相の前進を、主観的夜の後半から主観的昼のはじめに位相後退が惹起される (図 3)。げっ歯類の自発行動の概日リズムを指標に概日時計からの出力を検証する場合、ハムスターを新しい輪回し型行動計測装置に移した場合やトリアゾラムなどの薬物を投与した場合に得られる位相反応曲線は暗パルスの位相反応曲線とよく似た形を示すことから、これら光刺激以外の刺激による位相変位は非光同調 (non-photoc entrainment) と総称されることもある。 (飯郷雅之)

文 献

- 1) 高橋三郎他：臨床時間生物学，pp.1-328，朝倉書店，1990。
- 2) Pittendrigh, C. S. : *Handbook of Behavioral Neurobiology, Volume 4, Biological Rhythms* (Aschoff, J. ed.), pp.95-124, Plenum, 1981.
- 3) Dwyer, S. M. and Rosenwasser, A. M. : *J. Biol. Rhythms*, 15, 491-500, 2000.

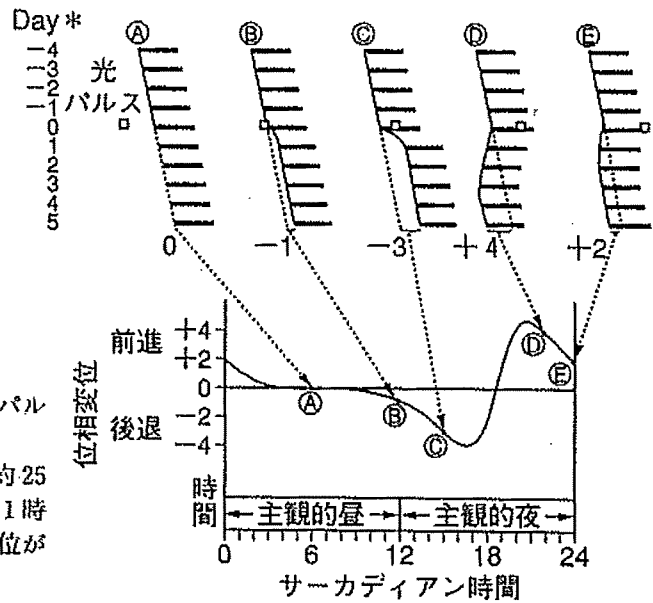


図1 ゴールデンハムスターの行動リズムの光パルスによる位相変位¹⁾
 恒暗条件下でゴールデンハムスターの行動は約25時間周期の概日リズムを示すが、様々な位相で1時間の光パルス処理を施すと位相依存的な位相変位が惹起され、位相反応曲線を描くことができる。

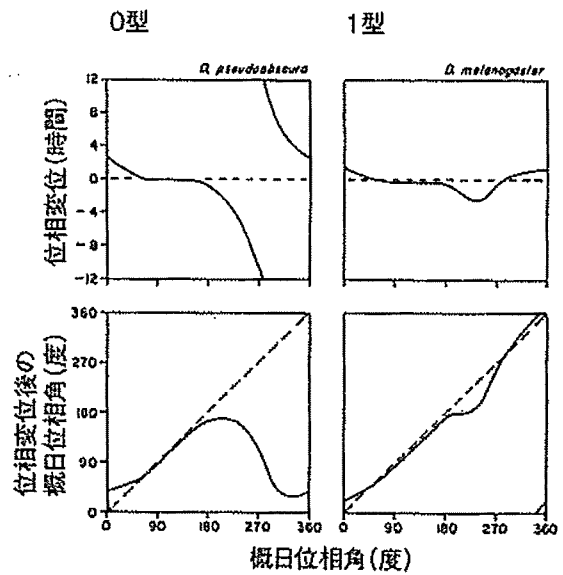


図2 2種のショウジョウバエ (ウスグロシショウジョウバエ *Drosophila pseudoobscura* およびキイロショウジョウバエ *D. melanogaster*) における光パルスに対する位相反応曲線と位相転移曲線²⁾
 恒暗条件下で飼育したショウジョウバエに15分間100ルクスの光パルスを与えると、ウスグロシショウジョウバエでは0型、キイロショウジョウバエでは1型の位相反応曲線を描く。

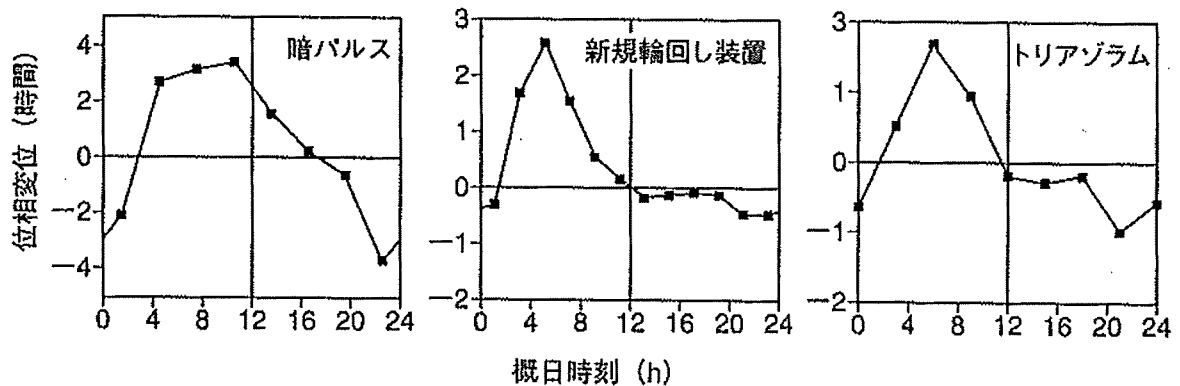


図3 暗パルス、新規輪回し型行動測定装置、ならびにトリアゾラムに対する位相反応曲線³⁾
 三者の位相反応曲線はほぼ同じ形になっている。

54 松果体

— Pineal Organ

脊椎動物の松果体 (pineal organ; pineal gland; epiphysis) は、間脳の第三脳室背側壁が膨隆して発生する器官であり、通常、頭蓋骨の下、脳の表面に位置するが、ヒトにおいては大脳皮質の発達のため脳を中心部に位置する (図1)。解剖学的には非常によく目立つ器官であるが、その機能は長い間不明であった。17世紀にはデカルトをして松果体を「精神の座」と言わしめた。19世紀には松果体腫瘍の患者の春期発動が早まったことから松果体は性腺の発育に関与するといわれるようになった。

1917年にMcCordとAllenはウシ松果体がカエルや魚類の黒色素胞に作用して体色を明化させる物質を含むことを見だし、1958年にLernerらがN-アセチル-5-メトキシトリプタミンの構造をもつメラトニンをその原因物質として単離・同定して以来、松果体に関する研究は飛躍的に進展した。Kappersによる松果体への交感神経入力の証明、Axelrodらによるメラトニン合成系の解明、Quayによる日周リズムの発見、Oksche, Collinらによる電子顕微鏡観察やDodt, 森田らの電気生理学的研究による非哺乳類松果体の光感受性の証明、さらにはMenakerらによるイエスズメ松果体移植実験による概日時計局在の証明や、出口らによるニワトリ松果体自身にメラトニン合成を制御する概日時計が存在することの発見など、松果体機能の解析は時間生物学研究の最先端を進んできた。現在では松果体は、概日時計と光により合成が制御されるメラトニンを介して様々な生理機能の日周リズム・年周リズムを制御する重要な器官として認識されている。

形態学的にみると、松果体は一般に遠位

部は発達して松果体嚢を、基底側は脳室壁へ移行する細い松果体莖を形成する。メクラウナギ類や鯨類に松果体はみられない。ヤツメウナギや魚類は副松果体 (parapineal organ) をもち、松果体とともに松果体複合体 (pineal complex) を形成する。また、カエルでは松果体嚢の一部が前方へ遊離して前頭器官 (frontal organ) を、爬虫類の副松果体は発達して頭頂眼 (parietal eye) を形成する (図1)。また、ヒト (とくに老人) の松果体には脳砂とよばれる石灰性の沈着物がみられるが、その機能は不明である。

松果体は系統発生の過程で光受容内分泌器官から内分泌器官へと変遷を遂げた (図1)。すなわち、魚類や両生類の松果体細胞は光受容細胞であり、形態学的には網膜の錘体とよく似た形状の発達した外節をもつ。また、魚類や両生類の松果体の光受容能は電気生理学的にも証明されている。爬虫類や鳥類の松果体においては、光受容細胞の外節は退化し遺残的となるが、光受容能はもち続けている。松果体に発現する光受容蛋白質としてはこれまでに魚類ではエクソロドプシン、Vertebrate Ancient オプシン、鳥類ではピノプシンなどが同定されている。また、これらのオプシンの発色団として11-*cis*-レチナールや11-*cis*-3-デヒドロレチナールの存在も知られている。哺乳類の松果体細胞は外節および内節を欠落し、光受容能はもたないが、胎児期には光受容関連蛋白質を発現することが知られている。

上述の通り系統発生の過程で松果体は光受容内分泌器官から内分泌器官へと変遷を遂げたが、それと同時に松果体の神経支配は求心性神経支配から交感神経支配へと変

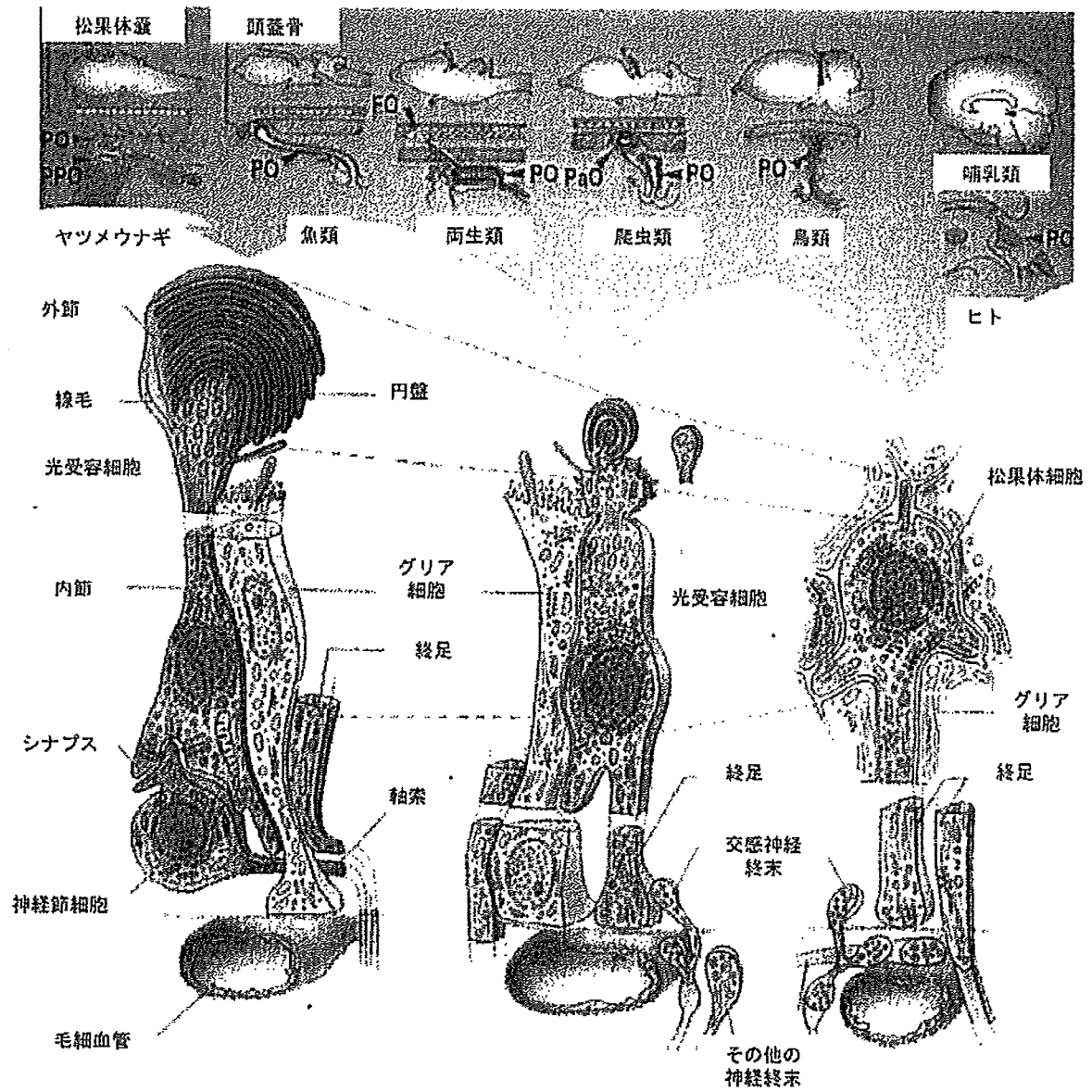


図1 系統発生における松果体の変遷¹⁾

各種脊椎動物の脳の矢状断，松果体付近の構造，ならびに松果体に存在する細胞の模式図。

PO：松果体；PPO：副松果体；FO：前頭器官；PaO：頭頂眼。

系統進化の過程で松果体の光受容細胞の外節は退化して松果体細胞に変遷し，松果体は光受容内分泌器官から内分泌器官へと変遷を遂げた。

化した。すなわち、松果体莖を介して中枢神経系に直接投射する神経節細胞の数は魚類、両生類、鳥類の順に減少し、哺乳類ではみられない(図2)。その一方で松果体に投射する交感神経は両生類でごく少数みられるにすぎないが、鳥類、哺乳類では豊富に存在する。

松果体は脊椎動物を通じてメラトニンを合成する内分泌器官である。その合成には概日時計や光受容体が関与しており、メラトニン分泌は、明暗条件下では暗期に高く明期に低い日周リズムを、恒暗条件下では主観的夜に高く主観的昼に低い概日リズムを示すが、恒明条件下では光により抑制される。系統発生の過程でメラトニン合成を支配する概日時計、ならびに松果体からのメラトニン分泌を制御する光受容体の局在も変遷を遂げた(図3)。すなわち、魚類、両生類、爬虫類の松果体においては、松果体自身に概日時計とその同調に関与する光受容体が存在し、培養条件下でも松果体からのメラトニン分泌概日リズムは環境の明暗サイクルに同調できる。一方、哺乳類の松果体は光受容能をもたない。そのため、網膜の光受容細胞で受容された環境の明暗サイクルは、網膜一視床下部神経路を介して視交叉上核の概日時計を同調し、視交叉上核からの出力が室傍核、さらには上頸神経節を經由し、交感神経を介して松果体におけるメラトニン合成を調節する。哺乳類の松果体に存在する交感神経終末からは夜間にノルアドレナリンが放出され、主に β

受容体を介して松果体細胞に作用し、セカンドメッセンジャーであるcAMP合成を促進し、cAMPがメラトニン合成の律速酵素であるアシルアルキルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ活性の発現を誘導する。鳥類の松果体におけるメラトニン合成制御はこれらの中間型をとり、松果体自身に存在する概日時計と光受容体による制御を受けるのみならず、網膜で受容された光も視交叉上核に存在する概日時計を介してメラトニン合成を制御する。ただし、交感神経終末から放出されたノルアドレナリンは α 受容体を介してメラトニン分泌を抑制する。

近年、時計遺伝子の発現・機能解析による概日時計分子機構の解明が進展した結果、自律的な概日時計をもつ魚類や鳥類の松果体においては、哺乳類の視交叉上核に存在する概日時計と同様の時計遺伝子群のネガティブフィードバックループを中心的なメカニズムとしてもつ概日時計分子機構が機能していることがわかってきた。

(飯郷雅之)

文 献

- 1) Falcón, J.: *Prog. Neurobiol.*, 58, 121-162, 1999.
- 2) 佐藤哲二・和氣健二郎: 内分泌器官のアトラス(日本比較内分泌学会編), pp.16-25, 講談社, 1987.
- 3) 飯郷雅之: 生物時計の分子生物学(海老原史樹文・深田吉孝編), pp.83-95, シュプリンガー・フェアラーク東京, 1999.

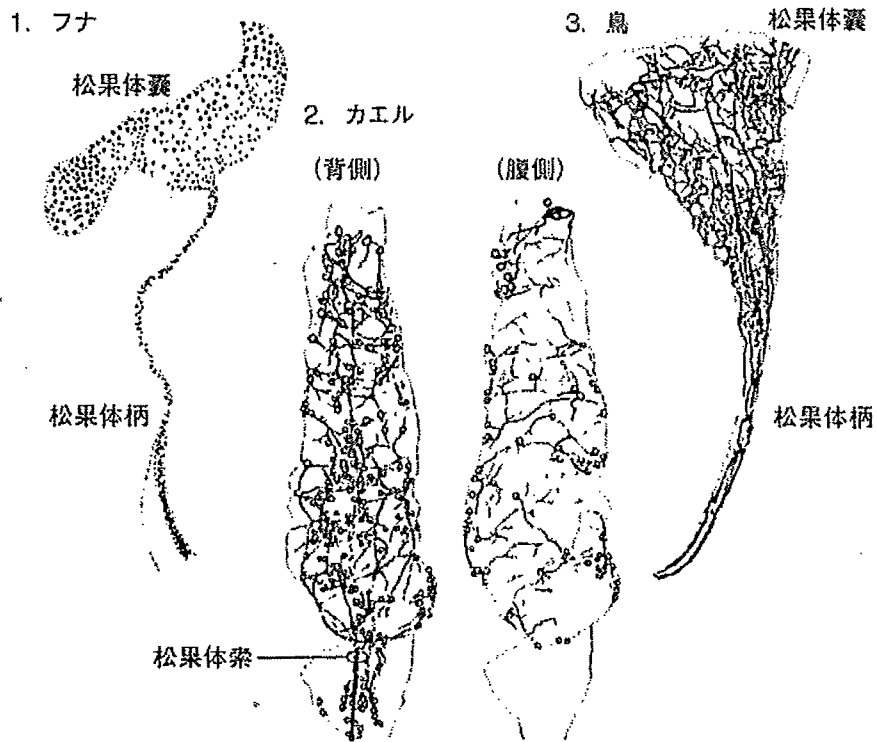
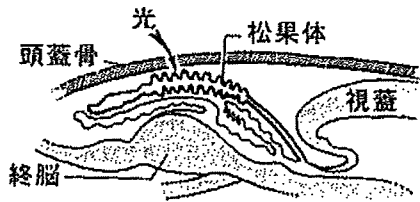
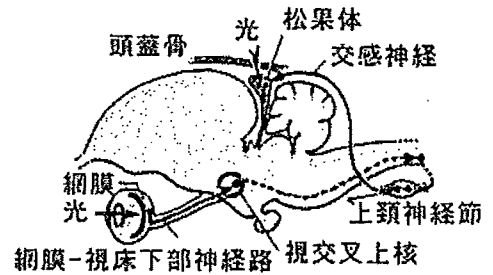


図2 魚類, 両生類, 鳥類の松果体における神経節細胞の分布²⁾

A. 魚類 (バイク)



B. 鳥類 (ニワトリ)



C. 哺乳類 (ラット)

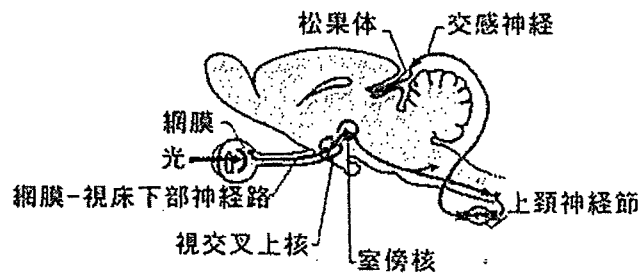


図3 松果体におけるメラトニン合成を制御する概日時計と光受容器の系統発生における変遷³⁾

Monitoring Preterm Infants' Vision Development with Light-Only Melanopsin is Functional

A 27-week-old, 949-g preterm infant was born with respiratory distress. With administration of surfactant and the use of low-pressure ventilation strategies, his respiratory function gradually matured, and respiratory support became unnecessary at 31 weeks' gestational age. At 33 weeks' gestational age, ophthalmoscopic examination detected no signs of retinopathy of prematurity. The infant's pupillary light reflexes (PLRs) to both white and monochromatic light also were evaluated to assess visual perception.

As shown in the Figure, in darkness the infant's pupils opened and reached maximum size as a result of spontaneous PLR, as did the adult's (left column). At 33 weeks' gestational age, the infant's pupils did not respond to 600-nm single-wavelength light ($5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), which lies outside the range of perceptibility of melanopsin, the only sensor functioning at this early developmental stage; in contrast, the adult's pupils completely contracted in the same single-wavelength light (middle column). But the infant's eyes responded as much as the adult's eyes to white light ($28 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), including wavelengths $< 590 \text{ nm}$ (right column), suggesting that the infant's PLR has already matured sufficiently to function to similarly to the adult's PLR.

The human retina contains 3 types of visual sensors: rhodopsin, coneopsin, and melanopsin. Melanopsin controls the PLR and also sets the brain clock, which controls sleep-wake

cycles. The light environment in the nursery has been associated with the growth of preterm infants in clinical studies, with exposure to light-dark cycles improving weight gain more effectively than exposure to either constant light or constant darkness. Simply examining the PLR of preterm infants with a particular light wavelength can provide information on the ongoing developmental process of vision, aiding the scientific design of more appropriate lighting conditions for infants. ■

Supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (to H.O.) from the Ministry of Health, Labor & Welfare, Takeda Science Foundation, and Research Foundation for Opto-Science and Technology. Ethical approval for the study was granted by the ethnics committee of Tohoku University (approval 2007-76). Acknowledgment available at www.jpeds.com.

Takushi Hanita, MD
Hidenobu Ohta, MD, PhD
Tadashi Matsuda, MD, PhD
Center for Perinatal Medicine

Hiroshi Miyazawa, MD
Department of Ophthalmology
Tohoku University Hospital
Sendai, Japan

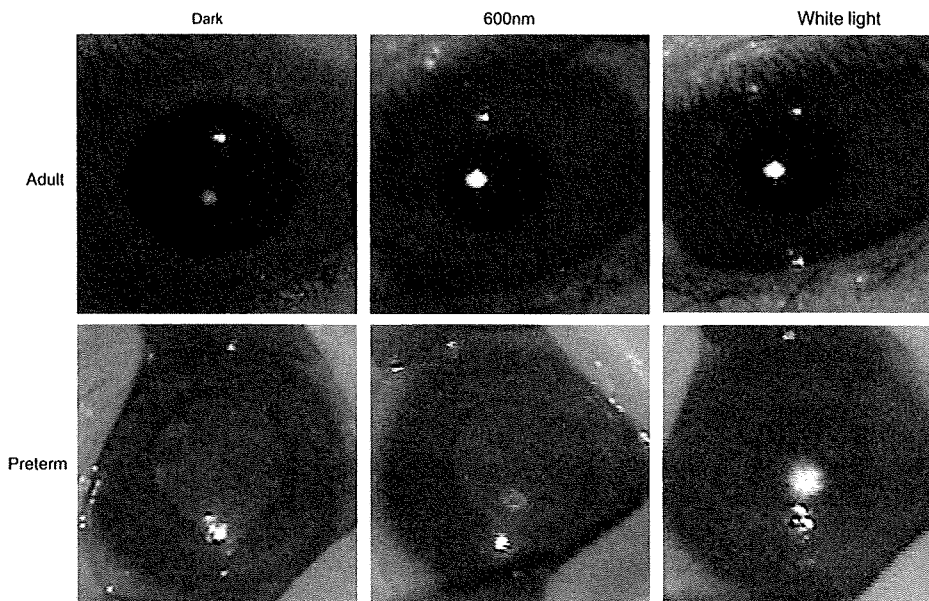


Figure. Left, PLRs of an adult and a 33-week preterm infant under complete darkness; middle, 600-nm single-wavelength light; right, and white light.

Maternal Feeding Controls Fetal Biological Clock

Hidenobu Ohta^{1,2,3,9*}, Shanhai Xu^{1,2,9}, Takahiro Moriya^{4,9}, Masayuki Iigo^{5,9}, Tatsuya Watanabe^{1,3}, Norimichi Nakahata⁴, Hiroshi Chisaka^{1,2}, Takushi Hanita^{1,3}, Tadashi Matsuda^{1,3}, Toshihiro Ohura³, Yoshitaka Kimura⁶, Nobuo Yaegashi², Shigeru Tsuchiya³, Hajime Tei⁷, Kunihiro Okamura^{1,2}

1 Center for Perinatal Medicine, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan, **2** Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan, **3** Department of Pediatrics, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan, **4** Department of Cellular Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan, **5** Department of Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Tochigi, Japan, **6** Tohoku University Biomedical Engineering Research Organization, Sendai, Japan, **7** Research Group of Chronogenomics, Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, Tokyo, Japan

Abstract

Background: It is widely accepted that circadian physiological rhythms of the fetus are affected by oscillators in the maternal brain that are coupled to the environmental light-dark (LD) cycle.

Methodology/Principal Findings: To study the link between fetal and maternal biological clocks, we investigated the effects of cycles of maternal food availability on the rhythms of *Per1* gene expression in the fetal suprachiasmatic nucleus (SCN) and liver using a transgenic rat model whose tissues express luciferase *in vitro*. Although the maternal SCN remained phase-locked to the LD cycle, maternal restricted feeding phase-advanced the fetal SCN and liver by 5 and 7 hours respectively within the 22-day pregnancy.

Conclusions/Significance: Our results demonstrate that maternal feeding entrains the fetal SCN and liver independently of both the maternal SCN and the LD cycle. This indicates that maternal-feeding signals can be more influential for the fetal SCN and particular organ oscillators than hormonal signals controlled by the maternal SCN, suggesting the importance of a regular maternal feeding schedule for appropriate fetal molecular clockwork during pregnancy.

Citation: Ohta H, Xu S, Moriya T, Iigo M, Watanabe T, et al. (2008) Maternal Feeding Controls Fetal Biological Clock. PLoS ONE 3(7): e2601. doi:10.1371/journal.pone.0002601

Editor: Naomi Rogers, University of Sydney, Australia

Received: October 4, 2007; **Accepted:** June 5, 2008; **Published:** July 2, 2008

Copyright: © 2008 Ohta et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Grants-in-Aid for Scientific Research (to H.O.) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture and from the Ministry of Health, Labour and Welfare; a grant from Kanzawa Medical Research Foundation (to H.O.)

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: hideohta@mail.tains.tohoku.ac.jp

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Most living organisms exhibit circadian rhythms, oscillations with a period of approximately 24 hours, in their behaviors and physiological functions, including activity, sleep, metabolism and body temperature. Circadian rhythms normally entrain to daily environmental cycles and free-run with a period of approximately 24 hours (called “circadian period”) in the absence of environmental cues [1]. Circadian period is remarkably precise for each species and differs slightly from 24 hours [2,3]. In mammals, the circadian timing system is organized as a hierarchy of multiple organ oscillators [4,5]. Among them the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the anterior hypothalamus function as the master pacemaker at the top of the hierarchy, which coordinates clocks in peripheral organs such as the heart, lung, liver, kidney, pancreas and uterus [6]. At the molecular level, cellular clocks in the organs are controlled by autoregulatory transcriptional and translational feed back loops of key “clock genes”, in which BMAL1 and CLOCK proteins drive expression of the *Per* and *Cry* genes while the PER and CRY proteins in turn suppress the transcription of their own genes. In the circadian system, the light-dark (LD) cycle is the most reliable and effective external signal that synchronizes (entrains) biological rhythms with the environment. In mammals,

photoc information is perceived by specialized retinal photoreceptors and conveyed directly to the SCN of the hypothalamus, which is hypothesized to transfer circadian information to the other organs through hormonal signals or the nervous systems [1].

During fetal development, however, the situation is different. Fetuses do not respond directly to the entraining effects of light, but the timing of their biological clock is nevertheless coordinated with the environmental light-dark cycle. This prenatal entrainment of the fetal biological clock is the result of communication of time-of-day information from the mother to fetus in the uterus [7,8]. In addition, based on postnatal behavioral rhythms, maternal-fetal communication of circadian phase is considered to be disrupted by destruction of the maternal SCN, suggesting that the fetal clock is regulated by the maternal entraining signal [7,9]. Previous studies focused on the possibility that the maternal signal comes from hormones regulated by the maternal SCN since fetuses are anatomically separated from maternally-originated tissues by the placenta and maternal-fetal neural communication does not exist. Removal of selected maternal endocrine organs (pineal, pituitary, ovary, adrenal, thyroid and parathyroid), however, does not seem to disrupt maternal-fetal communication of circadian phase in the rat fetal clock, indicating that the rhythmic hormonal outputs from these glands may not be necessary [10].

In this study, we focused on a maternal signal, which is not directly controlled by the maternal SCN, by using a restricted feeding (RF) schedule to examine the possibility of feeding-related factors being a synchronizer for the fetal SCN. When food is available only for a limited time each day in an RF schedule, rats increase their locomotor activity 2 to 4 hours before the onset of food availability [11]. Entrainment of anticipatory locomotion by RF occurs independently of the LD cycle, suggesting that the circadian oscillators entrained by RF are distinct from those entrained by light. Surprisingly, RF does not influence the phase of clock gene expressions in the adult SCN but does influence locomotor activity and the clock gene rhythmicity in the other organs [12–14]. Thus, this is an ideal model to test the effect of maternal circadian signals independent of the maternal SCN on the fetuses. Moreover, synchronization can be found between the phase of locomotor activity of an SCN-lesioned mother rat who has been entrained through RF while still pregnant, and that of her newly born offspring, suggesting that fetal clocks can be controlled by RF on mothers [15]. With a transgenic rat model in which the mouse *Per1* gene promoter has been linked to a luciferase reporter, we continuously monitored the rhythmic expression of *Per1*, one of the key “clock genes”, by recording light emission from tissues *in vitro* [4]. We used this model to investigate the effects of maternal feeding on the communication between mother and the fetal SCN during pregnancy.

Results and Discussion

We first exposed pregnant *Per1-luc* rats to an RF regimen, in which food was available only for 4 hours during the light portion of a 12-hour:12-hour LD cycle, and recorded their locomotor activity, for 22 days of pregnancy after mating. Within 10 days, the rats began to increase their behavioral activity a few hours before food became available, and also shifted their locomotor-active period from night to daytime (Fig. 1). After 21 days of RF

and one following day of fasting, we sacrificed the animals; explanted both the fetal SCN and liver as well as the maternal SCN and liver and measured luciferase activities from each tissue *in vitro* (Fig. 2, Fig. 3 and Fig. 4). Despite the marked effects of this regimen on maternal locomotor behavior, the phase of the maternal SCN rhythm was unaffected (one-way ANOVA, $p > 0.05$; the peak times for ad lib and restricted feeding were 43.9 ± 1.4 h and 44.2 ± 0.8 h (mean \pm s.d., throughout) respectively) and remained phase-locked to the light cycle, even after 21 days of RF (Fig. 4). This result is consistent with previous studies which report that RF does not entrain the adult SCN and supports the general notion that entrainment to cycles of food availability does not directly involve the maternal SCN [12–14]. In contrast, the circadian clock in the fetal SCN was entrained by the 4-hour RF regimen (Fig. 2, Fig. 4) and phase-advanced by 4.7 h (one-way ANOVA, $p < 0.01$; the peak times for ad lib and restricted feeding were 50.0 ± 1.1 h and 45.2 ± 2.1 h respectively). This suggests that the fetal SCN may have a unique ability to adapt temporally to changes in the maternal feeding pattern unlike the adult SCN. The fetal SCN showed prominent *Per1-luc* circadian rhythms (23.3 ± 1.7 h, $n = 5$, in the ad lib feeding and 22.5 ± 2.0 h, $n = 5$, in the RF for the calculated free running periods of the fetal SCN *in vitro*; no statistical difference between the two groups) with smaller (0.32-fold) trough-to-peak amplitudes compared to those of the maternal SCN.

Our finding of *Per1-luc* circadian rhythms in the rat fetal SCN differs from the findings of some previous studies that did not detect clear *Per1* circadian rhythms in the rodent fetal SCN by *in situ* hybridization [16–21]. In addition to possible variation due to putative strain and species difference, this discrepancy might be explained by the technical difficulty in measuring the low-amplitude *Per1* circadian expressions in the developing SCN by *in situ* hybridization, which requires a delicate combination of the proper affinity of designed probes to the target *Per1* mRNA and the appropriate film exposure time for successful detection of weak

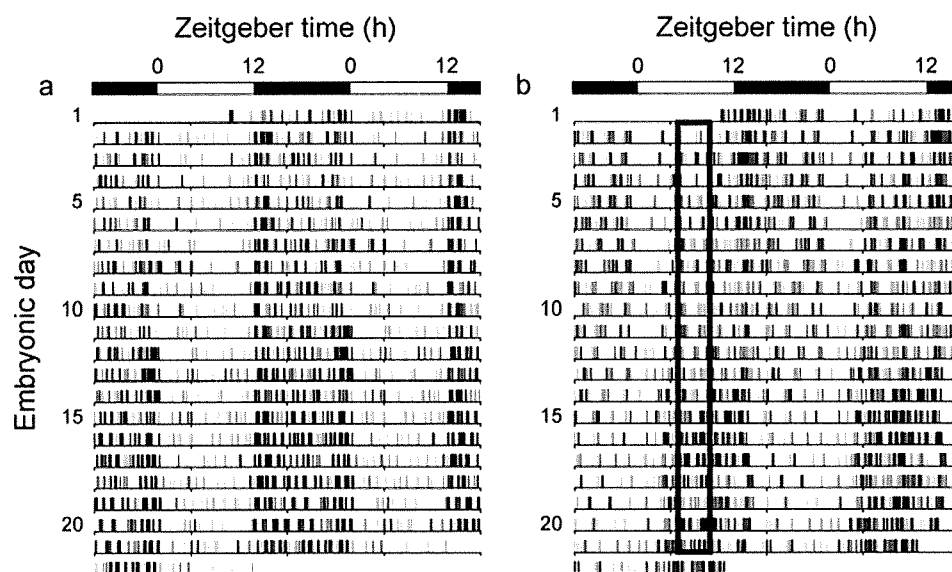


Figure 1. Representative locomotor activity records from pregnant *Per1-luc* transgenic rats. (a) shows activity in an animal under ad lib feeding. (b) shows activity in animals given access to food for 4 hours each day (the restricted feeding (RF) group). The open boxes in (b) indicate the daily food-access interval. The bars at the top indicate the light period in white and dark period in black. For rats in the RF group, food access was restricted to a 4-hour period at zeitgeber time (ZT) 5–9 for 21 days of pregnancy (where ZT0 is lights on and ZT12 is lights off). RF in (b) resulted in typical anticipatory activity occurring before food access. During the RF, activity is generally increased and the nighttime activity is shifted forward toward the food-access period of daytime.
doi:10.1371/journal.pone.0002601.g001

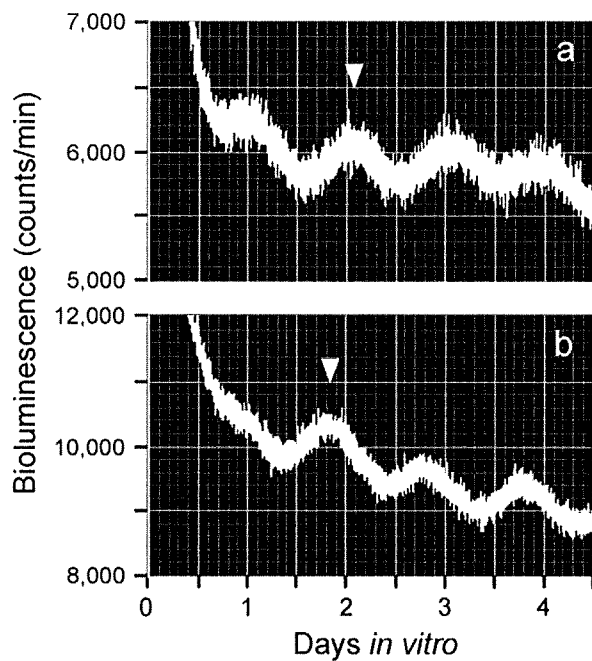


Figure 2. Rhythms of light emission by fetal SCN explants. Shown are raw data from (a) a fetus of an *ad lib* fed control pregnant animal and (b) a fetus of a pregnant animal that had been exposed to a 4-hour RF regimen for 21 days after mating. Because the pattern of light emission is quite variable during the first 12 to 14 hours after explantation, we consider that the phase of the tissue *in vivo* is best reflected by the phase of the peak during the first full subjective day (1 to 2.5 days after explant) as previously described [13]. The phase of these peaks is consistent from animal to animal (Fig. 4). Here, the phase statistically chosen is indicated by the inverted triangles. doi:10.1371/journal.pone.0002601.g002

radio-labeled *Per1* expression without over-saturation. To ensure correct measurements, we surgically made purely coronal SCN slices from *Per1-luc* transgenic fetal rats to detect *Per1-luc* signals directly from the fetal SCN and eliminate the background *Per1-luc* expressions from other neighboring brain tissue. In addition, highly-sensitive photo multiplier tubes were used to capture the low level *Per1-luc* signals. Our findings in the present study are consistent with previous reports on circadian rhythms in the firing rates and metabolic activities of the rat fetal SCN [7,22,23] and are also supported by *in-vivo* imaging data which demonstrated day-night differences in *Per1-luc* expressions throughout the whole body of *Per1-luc* rat fetuses during the late gestational period [24].

The circadian phases in the fetal liver in RF also showed phase-advance, advancing by 7.4 h compared to those in *ad lib* feeding ($n = 5$ for each group, one-way ANOVA, $p < 0.01$; the peak times for *ad lib* and restricted feeding were 39.1 ± 1.6 h and 31.7 ± 1.8 h respectively; Fig. 3, Fig. 4), indicating that the fetal liver clock as well as the fetal SCN was entrained by the maternal RF regimen. The relatively smaller phase advance in the fetal SCN compared to the fetal liver in maternal RF may be explained by a possible competition in the fetal SCN between a stronger maternal-feeding based synchronizer and other unknown signals which subtract from the phase advance induced by maternal RF. Although *Per1-luc* circadian rhythms were detected in the fetal liver (23.5 ± 1.1 h, $n = 5$, in the *ad lib* feeding and 24.2 ± 1.5 h, $n = 5$, in the RF for the calculated free running periods; no statistical difference between the two groups), the oscillations were damped with smaller (0.28-fold) trough-to-peak amplitudes compared to those of the maternal liver. This is in contrast to fetal SCN circadian rhythmicity which

displays more distinct oscillations, suggesting a more immature nature of the molecular clock in the fetal liver at this developmental stage. The phases in the maternal liver in RF also phase-advanced by 9.1 h compared to those in *ad lib* feeding as previously reported ($n = 5$ for each group, one-way ANOVA, $p < 0.01$; the peak times for *ad lib* and restricted feeding were 57.1 ± 1.1 h and 48.0 ± 1.2 h, respectively; Fig. 4) [13].

Our data invite a reexamination of the previous models of maternal-fetal communication in the mammalian circadian system. Previous studies have been trying to find the signals between maternal and fetal SCN based on a hypothesis that signals regulated by the maternal SCN, which is entrained by a daily light-dark cycle, exclusively control the fetal SCN [9,10]. This study, however, suggests that maternal-feeding signals might be an alternative mechanism controlling the fetal SCN. Since RF did not affect the maternal SCN (Fig. 4), the present study indicates that fetal SCN are not directly controlled by hormonal signals regulated by maternal SCN but by maternal feeding. Further study is still required to identify possible alternative signals from mother to fetuses in the RF paradigm. A more direct way to confirm the findings of this study would be to employ more advanced *in-vivo Per1-luc* imaging of the fetal SCN in the pregnant uterus, however, such a technique has yet to be developed [25,26].

Our results also have potential practical importance particularly for both normal and abnormal pregnancies [27–29]. During pregnancy, a regular daily-lifestyle schedule with appropriate amounts of sleep and nutrition is regularly recommended for pregnant women to achieve healthy fetal growth. So far studies on maternal feeding have only focused on the nutritional requirements for healthy fetal growth. However, this study illustrates that the maternal feeding schedule itself also has powerful effects on fetal physiology by influencing time information in maternal-fetal communication. In this rodent study, fetal biological clock as well as maternal behavior was strongly influenced by RF even though the maternal SCN remained adjusted to the light-dark schedule. This indicates that maternal-feeding signals can be more influential on fetuses than the maternal SCN during pregnancy and that perhaps time information relating to the LD cycle is relayed to the fetus via the mother's own LD-cycle based feeding cycle. The most appropriate maternal feeding schedules should be explored to achieve the sound physiology and healthy development of both fetuses *in utero* and preterm infants *ex utero*.

Materials and Methods

Animals and housing

Homozygous male and female transgenic *Per1-luc* rats (Japanese Wistar) expressing 6.7 kb of the mouse *Period1(Per1)* promoter driving firefly luciferase were used for this study. Timed-pregnant *Per1-luc* rats were housed individually in cages on a 12-hour:12-hour light-dark (LD) cycle (lights on at 08:00h and lights off at 20:00h; 200 lux at cage level during light period). The rats were exposed to a restricted feeding (RF) or *ad lib* feeding. For rats in the RF group, food access was restricted to a 4-h period at zeitgeber time (ZT) 5–9 for day 21 of pregnancy (where ZT0 is lights on and ZT12 is lights off). The RF rats adjusted the timing of their food intake to the limited feeding period within several days and also adjusted their daily food consumption to match normal daily intake levels as previously reported [11]. On day 22 of pregnancy, the last day of tissue culture, the pregnant rats under *ad lib* and restricted feeding were fasted to prevent the direct effects of food intake on the fetal SCN, to make sure not just one feeding event, but repeated feeding cycles over day 0–21 of pregnancy contributed to any changes in the fetal SCN rhythms. Locomotor

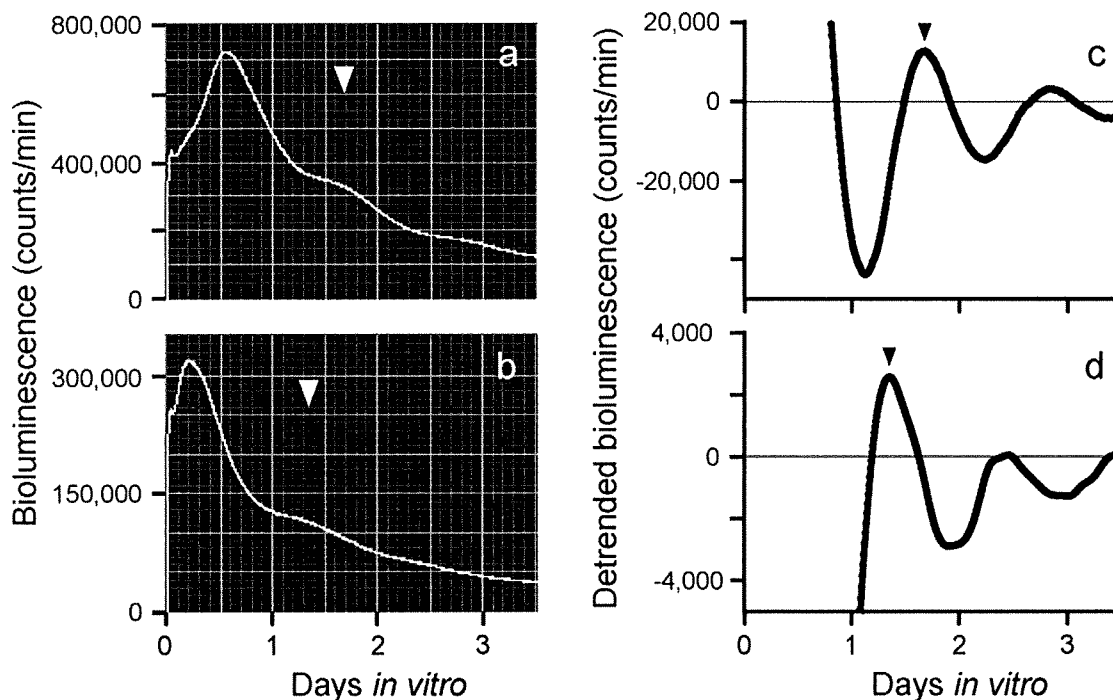


Figure 3. Rhythms of light emission by fetal liver explants. Shown are raw data (a) and detrended data (c) from a fetus of an *ad lib* fed control pregnant animal. (b) and (d) show raw and detrended data, respectively, from a fetus of a pregnant animal that had been exposed to a 4-hour RF regimen for 21 days after mating. The peak of the phase during the first full subjective day (1 to 2.5 days after explant) as statistically chosen is indicated by the white and black inverted triangles. The white inverted triangle in (a) and the black inverted triangle in (c) indicate the same peak time statistically chosen, as do the white and black triangles for (b) and (d), respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0002601.g003

activity of the rats was recorded by infrared motion sensors using an online system (Actograph System, Rapid Fire Computer, Japan). Animal care and use were reviewed and approved by the Committee for Animal Research of Tohoku University.

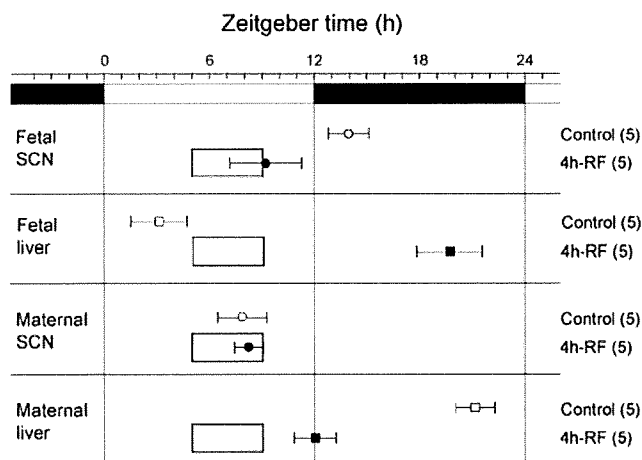


Figure 4. Effects of 4-hour restricted feeding on tissue luciferase rhythmicity. The average times (\pm s.d., shown by error bars) of peaks from the different tissues are plotted against the LD cycle shown at the top of each panel. The timing and duration of food availability at ZT5-9 is indicated by open boxes in each section. The sample size is shown in parentheses. The phases of fetal SCN, fetal liver and maternal liver rhythmicity were significantly different from control values in all groups of RF rats (one-way ANOVA, $p < 0.01$); the phase of maternal SCN rhythmicity was not significantly different between control and 4h-RF groups.
doi:10.1371/journal.pone.0002601.g004

Assessment of circadian periods and phases of the fetal and maternal SCN

Following behavioral assessment, both pregnant *Per1-luc* rats and their homozygous fetuses were sacrificed for recordings of SCN rhythmicity on day 22 of pregnancy, one day before expected birth. We sacrificed one fetus each from five different litters of both *ad-lib* and restricted-feeding type pregnant rats and their mothers at ZT11 and rapidly removed fetal and maternal brains ($n = 5$ for each) as well as maternal liver ($n = 5$). We also prepared a separate set of pregnant *Per1-luc* rats in *ad lib* and RF to sample the fetal livers ($n = 5$ for each group) in the same manner. The paired SCN (coronal sections of 300 μ m thickness, made with a vibroslicer) and the liver tissues (1-mm thickness) were cultured on membrane inserts (Millicell-CM, Millipore, Bedford, MA) in 1 mL of medium (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 10 mM HEPES (Sigma), 2% B27, 25 U/mL penicillin, 25 μ g/mL streptomycin, 2.2 mg/mL NaHCO_3 , 4 mM L-glutamine, and 0.1 mM beetle luciferin (Promega, Madison, WI). Unless noted, medium ingredients were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Each culture was sealed in a Petri dish and maintained at 36°C in darkness. Bioluminescence was collected in counts per minute for 4.5 days without a medium change using a photomultiplier tube (HC8259MOD, Hamamatsu Corp., Shizuoka, Japan).

Phase, period, and amplitude were determined using modified published methods [30–32]. First, original data (1-min bins) were smoothed by an adjusting-averaging method with 2-hour running means as described [30]. Then the data set were detrended by subtracting the 24 hour running average from the raw data using Exmax software (gift from Mr. Tuiyoshi Yaita and Dr. Shigenobu Shibata, Waseda University, Tokyo, Japan). Peak time was defined as the highest point in detrended data. The period of *Per1-luc*

activity (recorded from 24 to 108 h *in vitro*) was assessed for each SCN culture and calculated by averaging the period between the first and second peaks and the period between the second and third peaks. The *Per1-luc* amplitude for an SCN culture was calculated as the difference between the first trough and second peak of the detrended curves of the bioluminescence. Statistical comparisons for these data from the RF and *ad lib* groups were performed by one-way ANOVA ($p < 0.05$).

Acknowledgments

We thank the Institute for Animal Experimentation at Tohoku University Graduate School of Medicine for use of its facilities and their technical

assistance. We also thank Dr. Shin Yamazaki, Mr. Seiji Suzuki, Mr. Masahiro Takemura, Mr. Yoshinori Takamatsu, Mr. Atsushi Kamoshida, Mr. Toshiro Takahashi, Dr. Noriyuki Kasai, Dr. Shinya Okano, Ms. Teruko Sueta, Ms. Tomomi Kibushi, Mr. Keisuke Nishio, Mr. Sei-ichi Ohtake, Mr. Akio Itoh and Mr. Thor Masuda for their technical advice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HO TM NN HC TH TM TO YK NY ST HT KO. Performed the experiments: HO SX TM MI TW. Analyzed the data: HO SX TM MI. Contributed reagents/materials/analysis tools: HT. Wrote the paper: HO SX TM MI.

References

- Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES (2003) A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 4: 649–661.
- Pittendrigh CS, Daan S (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J Comp Physiol* 106: 223–252.
- Czeisler CA, Duffy JF, Shanahan TL, Brown EN, Mitchell JF, et al. (1999) Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science* 284: 2177–2181.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, et al. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 88: 682–685.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, et al. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5339–5346.
- Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES (2007) Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 195: 187–198.
- Reppert SM, Schwartz WJ (1983) Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science* 220: 969–971.
- Parraguez VH, Valenzuela GJ, Vergara M, Ducsay CA, Yellon SM, et al. (1996) Effect of constant light on fetal and maternal prolactin rhythms in sheep. *Endocrinology* 137: 2355–2361.
- Davis FC, Gorski RA (1988) Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol [A]* 162: 601–610.
- Reppert SM, Schwartz WJ (1986) Maternal endocrine extirpations do not abolish maternal coordination of the fetal circadian clock. *Endocrinology* 119: 1763–1767.
- Froy O (2007) The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* 28: 61–71.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, et al. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14: 2950–2961.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291: 490–493.
- Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, et al. (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 6: 269–78.
- Weaver DR, Reppert SM (1986) Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. *Brain Res Dev Brain Res* 46: 291–296.
- Shimomura H, Moriya T, Sudo M, Wakamatsu H, Akiyama M, et al. (2001) Differential daily expression of *Per1* and *Per2* mRNA in the suprachiasmatic nucleus of fetal and early postnatal mice. *Eur J Neurosci* 13: 687–693.
- Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K (2002) Effects of nursing mothers on *rPer1* and *rPer2* circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *Eur J Neurosci* 15: 1953–1960.
- Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K (2003) Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *Eur J Neurosci* 17: 1628–1634.
- Sládek M, Sumová A, Kováčiková Z, Bendová Z, Laurinová K, et al. (2004) Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6231–6236.
- Li X, Davis FC (2005) Developmental expression of clock genes in the Syrian hamster. *Brain Res Dev Brain Res* 158: 31–40.
- Kováčiková Z, Sládek M, Bendová Z, Illnerová H, Sumová A (2006) Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *J Biol Rhythms* 21: 140–148.
- Shibata S, Moore RY (1987) Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 431: 311–315.
- Burgoon PW, Lindberg PT, Gillette MU (2004) Different patterns of circadian oscillation in the suprachiasmatic nucleus of hamster, mouse, and rat. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190: 167–171.
- Saxena MT, Aton SJ, Hildebolt C, Prior JL, Abraham U, et al. (2007) Bioluminescence imaging of period1 gene expression *in utero*. *Mol Imaging* 6: 68–72.
- Abraham U, Prior JL, Granados-Fuentes D, Piwnica-Worms DR, Herzog ED (2005) Independent circadian oscillations of Period1 in specific brain areas *in vivo* and *in vitro*. *J Neurosci* 25: 8620–8626.
- Yoshikawa T, Yamazaki S, Menaker M (2005) Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *J Biol Rhythms* 20: 500–512.
- Mirmiran M, Ariagno RL (2000) Influence of light in the NICU on the development of circadian rhythms in preterm infants. *Semin Perinatol* 24: 247–257.
- Kennaway DJ (2002) Programming of the fetal suprachiasmatic nucleus and subsequent adult rhythmicity. *Trends Endocrinol Metab* 13: 398–402.
- Gluckman PD, Hanson MA (2004) Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 305: 1733–1736.
- Meerlo P, van den Hoofdakker RH, Koolhaas JM, Daan S (1997) Stress-induced changes in circadian rhythms of body temperature and activity in rats are not caused by pacemaker changes. *J Biol Rhythms* 12: 80–92.
- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, et al. (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* 22: 350–356.
- Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG (2005) Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8: 267–269.