

に使用率が低かった。ただし、大動物（イヌ）については、全例で被覆剤が用いられていた。なお、ヒトにおいては必ず被覆剤が用いられていた。この違いの原因には、げっ歯類では被覆剤を剥がすことがあることや、手術後に長期間の飼育をしないで場合があることがあげられる。

参考までに「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」には、組織を丁寧に取扱い、効果的な止血を行い、壊死した組織や縫合糸等の異物を最小限とすること、手術部位が汚染していた場合の処置方法等が規定されており、さらに、切開創を閉じ、術後24～48時間は滅菌した被覆剤で保護すること、被覆剤の交換の前後並びに手術部位に触れる前後は、消毒薬で手洗いをすること等が規定されている。

6) 術中又は術後感染管理のための抗生物質等の使用

抗生物質を使用しないと回答したのはSPF及びコンベンショナルな環境でそれぞれ17及10件であり、抗生物質を使用すると回答したのはSPF及びコンベンショナルな環境でそれぞれ12及6件であった。抗生物質を使用するかどうかは、手術の種類によるとの回答が1件あった。また、使用するのは侵襲性の高い時であるとの回答が1件からあった。さらに、抗生物質等の投与期間については術後3日～1週間後までであるとの回答も2件あった。なお、大動物（イヌ）のテレメトリー試験の場合には、全例で術後感染防止のために抗生物質等の抗菌剤が用いられていた。

7) 手術後の動物の飼育

手術後の動物の飼育に関する回答を以下に示す。

	複数の動物を同じケージで飼育	1ケージに1匹		1匹がふさがるまでケージに1匹ずつ飼育し、その後複数飼育する。
		エリザベスカラー	有	
SPF	5	22	3	2
コンベンショナル	1	17	1	2

その他、手術後、傷がふさがるまでエリザベスカラーをした上でケージに1匹ずつ飼育し、その後複数飼育するとの回答が、コンベンショナルな環境で1件あり、また、手術後その日のうちに実験に使用するため飼育なしとの回答があった。SPF及びコンベンショナルな環境ともに、1ケージに1匹の飼育が多かったが、本アンケートについては毒性試験、薬理試験、薬物動態試験の場合が含まれており、また、医療機器の埋植試験について実施している施設からの回答はなかった。このため、本調査の目的である埋植試験において使用された動物について、傷口を動物自身で舐めることができる状態か、また、他の動物に舐められる状態かどうかに関する情報の収集は得られなかった。

(4) 異物発がんの経験の有無及び経験のある場合にはその内容等

異物発がんに関する経験のあるとした回答はなかった。

(5) マイクロチップの使用の有無、並びにマイクロチップによる発がんの経験の有無及び経験のある場合にはその内容等

マイクロチップを使用しているとの

回答は1件のみであり、マイクロチップを埋植された動物はマウス（C57BL6J）、使用目的は個体識別、使用数は約2000匹/年であった。また、マイクロチップによる発がんの経験はないとのことであった。

マイクロチップの埋植に際しては70%エタノールで挿入予定部位から同心円状に消毒し、挿入部の拡大等を考慮し、十分な範囲を消毒し、約1分放置後、市販されている滅菌済みのマイクロチップを同じく滅菌済みのマイクロチップ挿入器を用いて挿入するとされている。

文献調査について

本年度は、埋植時等の術野の無菌性等に関する文献等による情報収集、並びにp53遺伝子及び感染/炎症による発がんに関する情報収集、さらに異物発がんに関する情報収集を行なったが、労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）（平成17年度～平成19年度）生物由来の医療機器に関わる国際的調和に関する研究—埋設型医療機器素材の安全性評価の再評価と国際調和—の平成19年度の報告書に記載した事項以外に、あらたに注目すべき情報はなかった。

E まとめ

本アンケートの調査により、マウスやラット等の場合とヒトの場合とで異なると考えられる手術環境を以下に示す。ただし、本アンケート調査の結果は、非GLP下で実施される薬理試験及び薬物動態試

験の結果であり、また、医療機器の埋植試験を実施している施設からの回答がなかったが、SPF下でのげっ歯類の手術環境についての情報はおよそ収集できたと考える。

①手術部位の皮膚の前処置（消毒）にSPF環境及びコンベンショナル環境ともに70%エタノールが56～57%程度用いられていた。ヒトの場合で殆どがポピドンヨード又はクロルヘキシジン（ヒビテン）が用いられている。その理由はその効果がアルコールより高いこととされており、アルコール単独の消毒では手術部位の皮膚の前処置が不十分である可能性が考えられる。

②切開部位以外の部位からの感染をさけるために切開部位以外の部位を覆布で覆うことは殆ど行なわれていない。

③手術機器、特に動物に直接触れるピンセット、ハサミやメス等についてはヒトでは滅菌されたものが使用されているが、マウスやラット等のげっ歯類ではSPF環境の場合においても滅菌（乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌及びガス滅菌）は72%、消毒（アルコール、ヒビテン等）は28%であった。また、これらの手術機器の同一動物での再使用のみならず、同一実験中で他の動物にも再使用されていることから、これらの手術機器による感染等の可能性が考えられる。

④術後の創傷の管理としてげっ歯類では通常は抗菌剤の投与はせず、また、切開創を被覆剤で保護しない。つまり、傷口からの感染の防御が不十分な可能性が高い。

⑤動物自身が舐める又は別の個体に舐められる等して、傷口からの細菌（口内細菌や皮膚常在菌等）感染が起きる可能性について検討するために必要な長期飼育の動物に関する情報が不足しているが、本アンケート調査の回答によれば多くの場合は1動物が1ケージに飼育されていたため、他の動物により傷をなめられる可能性は低いと考えられる。ただし、その場合でもエリザベスカラーをしていない場合が殆どであり、手術後の保定器具により身動きできない場合及び創傷の位置が動物自身でなめることができない場合を除き、動物自身がなめることによる傷口からの感染の可能性は否定できない。

以上の結果から、GLP施設等におけるSPFマウスやラットの手術に関して、ヒトの術後感染の制御の観点からは、SPFとしての管理及び取扱いに加え以下のような点に注意して行うことが必要と考える。

- (a) 切開部位以外の部位からの感染をさけるため、切開部位以外の部位を覆布で覆う。
- (b) 皮膚の消毒にはポビドンヨードを用い、消毒に必要な時間放置後に皮膚の切開等を行う。
- (c) 手術に用いるピンセット、ハサミやメス等は滅菌して用い、少なくとも別の動物への再使用は避ける。
- (d) 可能であれば、切開部位からの感染を避けるため被覆剤等で覆う。
- (e) 他の個体に傷口をなめられると皮膚常在菌、口内細菌等により汚

染されるため、1匹ずつケージで飼育する。また、傷口を自身で舐めることが可能な場合は、エリザベスカラー等を装着させる等して、動物自身で舐めることができないようにする。

- (f) 試験成績に影響しない場合は、手術前及び／又は手術直後に適切な抗菌剤を使用する。

参考資料等

1. CDC: Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection (手術部位感染防止ガイドライン), 1999. Infect Cont Hosp Epidemiol 1999;20:247-278
<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/SSI.pdf>
 2. 品川長夫、術後感染防止のための抗菌薬選択、Jpn J Antibiotics, 57-1, 11-32, 2004
 3. 品川長夫、周術期抗菌薬投与の基本的考え方—ガイドライン作成への提言—、日化療会誌 49 (S-B)、71-89、2001
 4. 特定外来生物へのマイクロチップ埋込み技術マニュアル (環境省) (<http://www.env.go.jp/nature/intro/4document/microchip/index.html>)
 5. ISO10993 (医療機器の生物学的評価方法)
- F. 健康危惧情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表等

- 1) Takano-Ohmuro, H., Yoshida, L.S., Yuda, Y., Morioka, K., Kitani, S. Shikonin inhibits IgE-mediated histamine release by human basophils and Syk kinase activity. *Inflamm. Res.* 2008, 57(10), 484-488.
- 2) Toyota, N., Takano-Ohmuro, H., Yoshida, L.S., Araki, M., Yoshinobu, K., Suzuki-Toyota, F. Suppression of cardiac troponin T induces reduction of contractility and structural disorganization in chicken cardiomyocytes. *Cell Struct. Funct.* 2008, 33(2), 193-201.
- 3) 厚生労働科学研究 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業生物由来の医療機器にかかわる国際的調和に関する研究—埋設型医療機器素材の安全性評価の再評価と国際調査—平成17年度～平成19年度報告書（分担研究者）、2008年

2. 学会発表

- 1) 森岡清和、大室弘美、森岡瑞枝
ラット胎仔・新生仔・成体の洞毛・体毛・皮膚関連組織におけるビメンチンおよび平滑筋アクチンの局在
第49回日本組織細胞化学会総会・学術集会、平成20年10月、長崎大学坂本キャンパス
- 2) 大室弘美、吉田ルシア幸子、入江かをる、氷見敏行、湯田康勝、河田登美

枝 アセチルコリンによる血管平滑筋弛緩反応に及ぼすシコニンの影響. 第82回日本薬理学会年会、平成21年3月、パシフィコ横浜

別添 5

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

該当無し。

IV. 研究成果の刊行物・別冊

該当無し。

平成 21 年 2 月

各位

**実験動物の飼育環境、手術時の術野の無菌性（皮膚の消毒、手術時の無菌性等）
並びに術後感染制御等に関するアンケート調査の御願い**

武蔵野大学薬学部医薬品情報学研究室
大室 弘美

拝啓 時下、ますますご清栄のこととお慶び申し上げます。

平成 20 年度より厚生労働科学研究費補助金による「体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な安全性評価に関する研究—発がん性を主体とした再評価と国際調和—」（代表研究者：国立医薬食品研究所 関田清司）（H20—H22）では、体内埋設型医療機器の安全性に関する評価を適切に行うために、「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因である可能性について様々な面から検討しております。

本調査は日本 QA 研究会のご協力を得て、上記研究の分担研究者である武蔵野大学の研究室が、実験動物の飼育環境、手術時の術野の無菌性（皮膚の消毒、手術時の無菌性等）並びに術後感染制御等に関する情報を得るために行うものです。

調査内容は、ヒトの手術の場合と比較するために「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection (CDC)」に記載されている手術環境に関する事項に関連したものが主です。さらに、異物発がんのご経験やマイクロチップに関するものがあります。

ご多忙中のところ大変申し訳ございませんが、貴施設において、動物（げっ歯類及び非げっ歯類）を使用して手術等を行っている部門（部署）それぞれそれぞれにおいてご回答いただきたくお願い申し上げます。

敬具

アンケート記入上のお願い

1. 動物を使用する試験を行っている部門(部署)、例えば、毒性試験、薬理試験及び薬物動態試験で動物を使用している場合には、それぞれの部門でご記入をお願い致します。アンケート用紙及び返信用封筒は3セット同封致しましたが、4部門以上ある場合には、申し訳ございませんが、回答用紙をコピーしてご使用いただきたくお願い致します。
2. ご回答は、あてはまる番号を○で囲むか、記入欄にご記入ください。
3. 特に指定のない場合は、1つのみ選んでご回答ください。
4. 企業情報は日本QA研究会でマスクしていただきますので、情報の流出等のご迷惑をおかけすることはありません。
5. ご回答は本調査の目的以外には使用しません。ただし、日本QA研究会を通じ皆様のご了解を頂いた上で、学術目的で発表する場合があります。
6. ご回答は、**3月17日(火)までに同封の封筒にてご返送**をお願い致します。

【アンケートの内容等に関するお問合せ先】

本アンケート調査の趣旨や記入等に関するお問合せは、下記に御願いたします。

武蔵野大学薬学部医薬品情報学研究室

担当者：大室 弘美

電話：042-468-8654 又は 042-468-8608

E-mail：hiromiohmuro@gmail.com

問1 貴部門(部署)で実施している試験等についてお伺いします。

以下、「貴部門」としてお伺いいたしますが、貴施設が「部」、「室」等である場合には、以下の質問の「貴部門」を適宜読み替えて、ご回答ください。

なお、以下のA～Bについて複数実施している場合には、それぞれ別のアンケート用紙をご使用下さい。用紙が不足する場合には、お手数ですが、コピーしてご回答いただきたく御願申し上げます。

A 貴部門で実施している試験は、以下のどれですか。

1. 毒性試験(医薬品)
2. 毒性試験(医療機器)
3. 薬理試験
4. 薬物動態試験

5. その他 ()

注：上記のご回答は上記の試験を1つ選択してください。なお、複数の試験を実施している場合には、お手数ですが、本アンケート用紙をコピーしてご回答ください。

B A でご回答の試験で用いている動物は、以下のどれですか。

1. マウス 2. ラット 3. ウサギ 4. イヌ 5. ネコ
6. その他 ()

注：①複数の動物をご使用の場合には、複数ご回答ください。複数のご回答の場合には、以降の設問には主にげっ歯類の場合をご回答ください。
②また、げっ歯類でマウスとラットをご使用の場合は、マウスについてご回答いただき、マウスとラットで異なる点についてのみ、どのように異なるのかを該当する部分の欄外等にわかりやすくご記入下さい。
③げっ歯類以外に非げっ歯類をご使用の場合で、以下のご回答がマウスと同様の場合は、異なる点についてのみどのように異なるのかを該当する部分の欄外等にわかりやすくご記入下さい。
④げっ歯類以外に非げっ歯類をご使用の場合で、以下のご回答がげっ歯類と異なる点が多い場合には、お手数ですが、本アンケート用紙をコピーしてご回答ください。
⑤非げっ歯類を複数ご使用の場合には、上記②、③又は④に準じてご回答ください。

C Bの動物の飼育環境は、以下のどれに当てはまりますか。

1. SPF 2. コンベンショナル

D 動物飼育環境が SPF の場合は、以下の表中のようなモニタリングが実施されていると思います。

種類	モニタリング目的	モニタリング項目
施設	バリアが有効に機能しているか	室間差圧、気流の方向、高圧蒸気滅菌、HEPAフィルタ等
環境	動物の生理条件を一定に保ち、ストレスを与えていないこと確認	温湿度、明暗周期、騒音や照度等
	施設の清浄度を知るため	落下細菌数、換気回数、塵埃数、アンモニア濃度等
	試験に影響を与える化学物質を摂取しているかどうか	飼料、飲用水、床敷のコンタミナシ等
動物	SPFの確認	特定病原体

* 飼育環境のモニタリングに関して以下にご回答ください。

1. HEPA フィルターの種類 _____
 2. 落下細菌数 _____
 3. 落下菌数の検査のタイミング _____
 3. 飲料水の滅菌方法 _____
 4. 特定病原体について、特に貴施設で注意を払っているものがありましたら、ご記入 　　く　　だ　　さ　　い　　。
- _____

問 2 手術環境についてお伺いします。

A 術前の動物の除毛の有無

1. 除毛する。
 - 1-1 除毛方法は以下のどれですか。
 - ①直前 ②1時間以上前 ③その他 (_____)
 - 1-2 除毛方法は以下のどれですか。
 - ①剃刀による剃毛 ②脱毛剤 (名称: _____) ③その他 (_____)
2. 除毛しない。

(理由: _____)

B 手術部位の皮膚の前処置

1. 消毒剤は以下のどれを用いていますか。また、皮膚の清拭後何分おいてから皮膚を切開していますか。(複数回答可)
 - _ 70%エタノール (約__分放置)
 - _ ポビドンヨード (濃度又は製品名: _____、 約__分放置)
 - _ クロルヘキシジン (濃度又は製品名: _____、 約__分放置)
 - _ その他

(成分名 : _____、濃度又は製品名: _____、
____分程度放置)
2. 消毒の範囲は以下のどれですか。
 - ①切開予定部位から同心円状に消毒し、切開部の拡大等を考慮し、十分な大きさ
 - ②切開予定部位よりも少し大きめな範囲
 - ③その他 (_____)

C 手術担当者の手指等の消毒

1. 手指等の洗浄・消毒について、実施しているものすべてに○をつけてください。

① 消毒薬による手洗い

有の場合は、消毒薬の名称：_____

② 消毒薬による肘の消毒

a する。 b しない。

③ スクラブの使用

有の場合は、使用する部位に○をつけてください。(複数回答可)

a 指、b 指、c 肘、d その他 ()

④ その他 (実施方法が上記以外：)

2. 手術着及びマスク、手袋の使用

① 手術用の着衣

a 着用する。 b 着用しない。

② マスク

a 着用する。 b 着用しない。

③ 滅菌手袋

a 着用する。 b 着用しない。

④ その他 ()

D 手術室の環境

1. 手術専用の部屋がありますか

① 有 ② 無 ③ その他 ()

2. 手術専用室又は手術を行う部屋の換気は1時間に何回行いますか。

___回

3. 手術専用室又は手術を行う部屋にHEPA フィルターを使用していますか。

① 使用している

使用している場合：HEPA フィルターの種類 ()

② 使用していない。

③ その他 ()

4. 手術専用室又は手術を行う部屋の消毒はどのように行っていますか。複数回答可

① 定期的に消毒する。

使用する消毒薬の名称 ()

消毒方法：a 拭取り b 散布 c その他 ()

② 汚れている場合のみ消毒する

使用する消毒薬の名称 ()

消毒方法：a 拭取り b 散布 c その他 ()

- ③手術と手術の間に消毒する
 使用する消毒薬の名称 ()
 消毒方法：a 拭取り b 散布 c その他 ()
- ④その他 ()
 使用する消毒薬の名称 ()
 消毒方法：a 拭取り b 散布 c その他 ()

問3 術中及び術後の感染制御等についてお伺いします。

A 手術機器（主に動物に直接接触れるもの）の滅菌又は消毒はどのように行っていますか。

複数回答可。

- ①乾熱滅菌（対象： _____ 等）
 滅菌条件 ____℃ _____分
 滅菌の確認方法 (_____)
- ②高圧蒸気滅菌（対象： _____ 等）
 滅菌条件 ____℃ _____分
 滅菌の確認方法 (_____)
- ③その他
 対象 _____
 滅菌方法 _____
 滅菌の確認方法 _____

B 手術中に1回使用したメス、ハサミ、ピンセット等は、同じ手術中に再使用しますか。

1. 再使用しない。
2. 同じ動物であれば再使用する。
 - ① 再使用する場合に、消毒しない。
 - ② 再使用前に消毒する。→③へ
 - ③消毒する場合には、どのような消毒を行いますか。
 - a アルコール消毒 b アルコールにつけた後にバーナーにかざす。
 - c その他 (_____)
3. 同じ一連の実験であれば、別の動物でも再使用する。
 - ① 再使用する場合に、消毒しない。
 - ② 再使用前に消毒する。→③へ

③消毒する場合には、どのような消毒を行いますか。

a アルコール消毒 b アルコールにつけた後にバーナーにかざす。

c その他 ()

4. その他

()

C 埋植材料の滅菌又は消毒はどのように行っていますか。

ご経験のある場合は、ご回答ください。複数回答可。

①乾熱滅菌 (対象：) 等)

滅菌条件 ____℃ ____分

滅菌の確認方法 ()

②高圧蒸気滅菌 (対象：) 等)

滅菌条件 ____℃ ____分

滅菌の確認方法 ()

③その他

対象

滅菌方法

滅菌の確認方法

D 手術中の切開部位からの感染を防ぐために、切開部位以外の部位を覆布等で覆いますか。

①覆布等で覆う。 ②覆わない。 ③その他 ()

E 術後手術切開創管理の方法はどのように行っていますか。

1. 切開創はどのように閉じていますか。

①閉じない。

(理由：)

②手術用接着剤を用いる。(商品名等)

③クリップ等を用いる。(商品名等)

④その他 ()

2. 切開創を滅菌した被覆剤で保護しますか。

①しない。(理由：)

②手術用接着剤を使用した場合は保護しない。

③傷口を消毒した場合は被覆剤で保護しない。

(消毒薬の商品名：)

- ④被覆剤等で保護する（被覆剤等の名称： _____）
 （被覆方法： _____）
 ⑤その他（ _____）

F 術中又は術後感染管理のために抗生物質等は使用しますか。

- ① 使用しない。
 ② 使用する。→③へ
 ③ 使用するのとはどのような場合ですか。→④
 （ _____）
 ④ 使用する場合、抗生物質等の投与期間（ _____）
 ⑤その他（ _____）

G 手術後の動物の飼育はどのように行っていますか。

（傷口を動物自身で舐めることができる状態か、また、他の動物に舐められる状態かどうかに関する情報を必要としています。）

- ①手術後は、複数の動物を同じケージに飼育する。
 ②手術後は、ケージには1匹ずつ飼育する。
 ③手術後は、傷を舐めない様にエリザベスカラーをした上でケージに1匹ずつ飼育する。
 ④手術後、傷がふさがるまではケージに1匹ずつ飼育し、その後複数飼育する。
 ⑤手術後、傷がふさがるまでエリザベスカラーをした上でケージに1匹ずつ飼育し、その後複数飼育する。
 ⑥その他（ _____）

問4 異物発がんについて、お伺いします。

A 貴部門でご経験がある場合に、以下の問にお答え下さい。

1. 異物発がんを発症した動物種（strainも）、異物の種類、発症までの期間、がんの種類等、わかる範囲でご記入ください。

2. 異物発がんを発症した動物の手術環境について、問2 (A、B、C) 及び問3 (A、B、C) のご回答と異なる点がありましたら、以下にご記入ください。

問5 マイクロチップのご使用について、お伺いします。

A 貴部門でマイクロチップを使用していますか。

a 使用していない。 b 使用している。 _ Bへ

B マイクロチップの使用目的と使用された動物数について、わかる範囲でご記入下さい。

埋植された動物種 (及び strain)	使用目的(例：固体識別)	数 (/年、 _年間で _匹等)

C マイクロチップを埋植する場合の機器や皮膚の消毒方法についてご回答ください。

1. 皮膚の消毒をしますか。

①しない。 ②する。→ 2へ

2. 消毒する場合は消毒剤は以下のどれを用いていますか。また、皮膚の清拭後何分おいてから皮膚を切開していますか。(複数回答可)

_ 70%エタノール (約__分放置)

_ ポビドンヨード (濃度又は製品名：____、 約__分放置)

_ クロルヘキシジン (濃度又は製品名：____、 約__分放置)

_ その他

(成分名 : _____、濃度又は製品名：____、
____分程度放置)

3. 消毒する場合の消毒の範囲は以下のどれですか。

①切開予定部位から同心円状に消毒し、切開部の拡大等を考慮し、十分な大きさ

②切開予定部位よりも少し大きめの範囲

③その他 ()

D マイクロチップによる異物発がんのご経験のある場合には、わかる範囲で以下についてご記入ください。

動物種と数	がん腫	発がんまでの経過時間と最終発がん時の週齢	飼育環境 (SPF 又はコンベンショナル)

以上、ご協力ありがとうございました。

Methodology article

Open Access

"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays

Jun Kanno*^{†1}, Ken-ichi Aisaki^{†1}, Katsuhide Igarashi¹, Noriyuki Nakatsu¹, Atsushi Ono¹, Yukio Kodama¹ and Taku Nagao²

Address: ¹Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan and ²President, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Email: Jun Kanno* - kanno@nihs.go.jp; Ken-ichi Aisaki - aisaki@nihs.go.jp; Katsuhide Igarashi - igarashi@nihs.go.jp; Noriyuki Nakatsu - n-nakatsu@nihs.go.jp; Atsushi Ono - Atsushi@nibio.go.jp; Yukio Kodama - kodama@nihs.go.jp; Taku Nagao - nagao@nihs.go.jp

* Corresponding author [†]Equal contributors

Published: 29 March 2006

Received: 06 November 2005

BMC Genomics 2006, 7:64 doi:10.1186/1471-2164-7-64

Accepted: 29 March 2006

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/7/64>

© 2006 Kanno et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Transcriptome data from quantitative PCR (Q-PCR) and DNA microarrays are typically obtained from a fixed amount of RNA collected per sample. Therefore, variations in tissue cellularity and RNA yield across samples in an experimental series compromise accurate determination of the absolute level of each mRNA species per cell in any sample. Since mRNAs are copied from genomic DNA, the simplest way to express mRNA level would be as copy number per template DNA, or more practically, as copy number per cell.

Results: Here we report a method (designated the "Percellome" method) for normalizing the expression of mRNA values in biological samples. It provides a "per cell" readout in mRNA copy number and is applicable to both quantitative PCR (Q-PCR) and DNA microarray studies. The genomic DNA content of each sample homogenate was measured from a small aliquot to derive the number of cells in the sample. A cocktail of five external spike RNAs admixed in a dose-graded manner (dose-graded spike cocktail; GSC) was prepared and added to each homogenate in proportion to its DNA content. In this way, the spike mRNAs represented absolute copy numbers per cell in the sample. The signals from the five spike mRNAs were used as a dose-response standard curve for each sample, enabling us to convert all the signals measured to copy numbers per cell in an expression profile-independent manner. A series of samples was measured by Q-PCR and Affymetrix GeneChip microarrays using this Percellome method, and the results showed up to 90 % concordance.

Conclusion: Percellome data can be compared directly among samples and among different studies, and between different platforms, without further normalization. Therefore, "percellome" normalization can serve as a standard method for exchanging and comparing data across different platforms and among different laboratories.

Background

Normalization of gene expression data between different

samples generated in the same laboratory using a single platform, and/or generated in different geographical

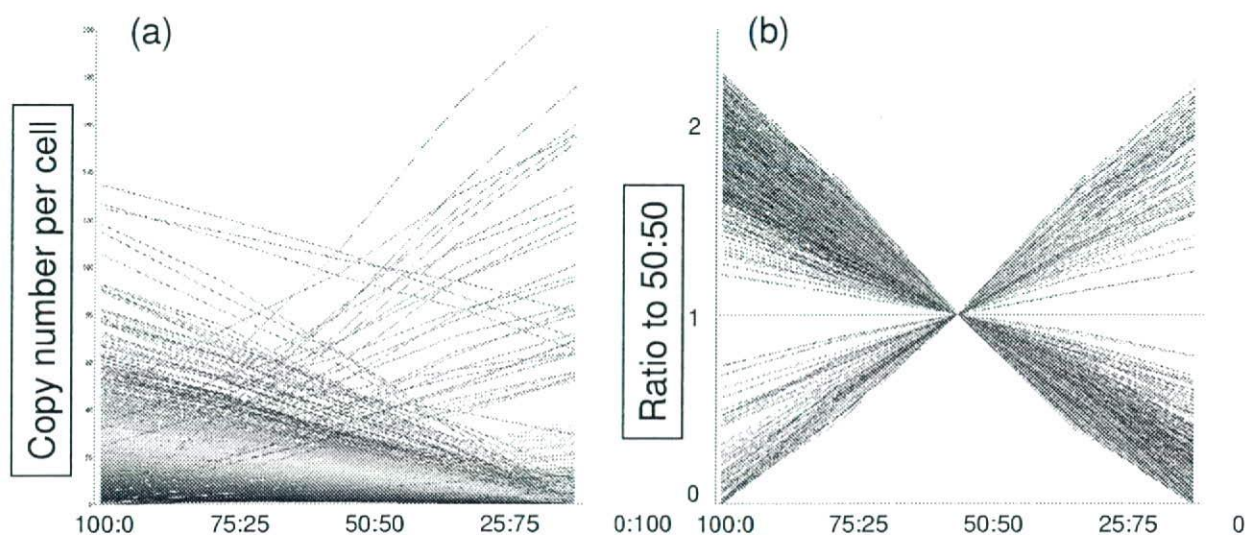


Figure 1

Dose-response linearity check by LBM. Dose-response linearity of the Affymetrix GeneChip by the LBM (liver-brain mix) sample set. Five samples, i.e. mixtures of mouse liver and brain at ratios of 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100, were spiked with GSC and measured by Affymetrix GeneChips Mouse430-2. Signals were normalized by the PerCellome method as described in the text. Line graphs are in (a) copy numbers and (b) ratio to 50:50 sample for the top 1,000 probe sets with coefficient of correlation (R^2) closest to 1 among those having 1 copy or more per cell in the 50:50 sample (19,979 probe sets out of 45,101). The number of probe sets with $R^2 > 0.950$ was 8,655, and $R^2 > 0.900$ was 11,719.

regions using multiple platforms, is central to the establishment of a reliable reference database for toxicogenomics and pharmacogenomics. Transforming expression data into a "per cell" database is an effective way of normalizing expression data across samples and platforms. However, transcriptome data from the quantitative PCR (Q-PCR) and DNA microarray analyses currently deposited in the database are related to a fixed amount of RNA collected per sample. Variations in RNA yield across samples in an experimental series compromise accurate determination of the absolute level of each mRNA species per cell in any sample. Normalization against housekeeping genes for PCRs, and global normalization of ratiometric data for microarrays, is typically performed to account for this informational loss. Additional methods, such as the use of external mRNA spikes, reportedly improve the quality of data from microarray systems. For example, Holstege et al. [1] described a spike method against total RNA, based on their finding that the yields of total RNA from wild type and mutant cells were very similar. Hill et al. [2] reported a spike method against total RNA for normalizing hybridization data such that the sensitivities of individual arrays could be compared. Lee et al. [3] demonstrated that "housekeeping genes" cannot be used as a ref-

erence control, and van de Peppel et al. [4] described a normalization method of mRNA against total RNA using an external spike mixture. To achieve satisfactory performance they used multiple graded doses of external spikes, covering a wide range of expression, in order to align the ratiometric data by Lowess normalization [5]. Hekstra et al. [6] presented a method for calculating the final cRNA concentration in a hybridization solution. Sterrenburg et al. [7] and Dudley et al. [8] reported the use of common reference control samples for two-color microarray analyses of the human and yeast genomes, respectively. These are pools of antisense oligo sequences against all sense oligos present on the microarray. Instead of antisense oligos, Talaat et al. [9] used genomic DNA as a common reference control in studies of *E. coli*. Statistical approaches have been proposed for ratiometric data to improve inter-microarray variations, especially of non-linear relations [10]. However, because control samples may differ among studies, ratiometric data cannot easily be compared across multiple studies unless a common reference, such as a mixture of all antisense counterparts of spotted sense sequences is used [7-9]. Nevertheless, as long as the normalization is calibrated to total RNA, variations in total RNA profile cannot be effectively cancelled out. Although

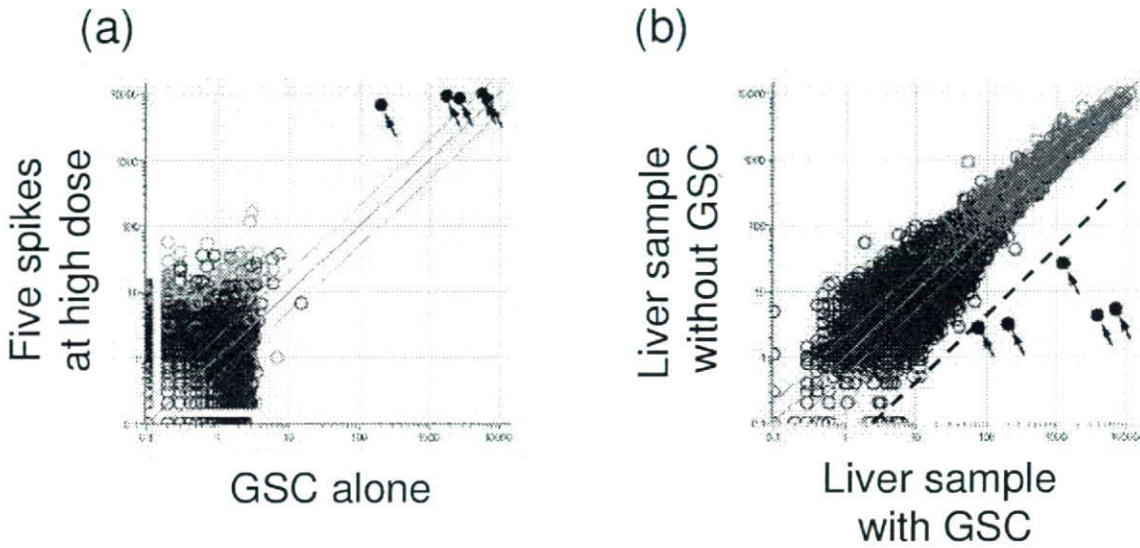


Figure 2
Cross-hybridization of GSC. Cross-hybridization of the GSC spike mRNAs to Affymetrix GeneChip. (a) A scatter plot of a blank sample with the GSC (horizontal axis) and a blank with the five spike RNAs at a high dosage (vertical axis) measured by MG-U74v2A GeneChips (raw values generated by Affymetrix MAS 5.0 software). The five spikes are indicated by black dots with arrows. Signals of the murine probe sets were below 20 on the horizontal axis, indicating negligible cross-hybridization of GSC spike mRNAs to the murine probe sets. (b) A scatter plot of a liver sample with GSC (horizontal axis) and without GSC (vertical axis) measured by MG-U74v2A GeneChips. The five spikes are again indicated by black dots with arrows. The dotted line is the 1/25 fold (4%) line. Cross-hybridization of mouse liver mRNAs to the GSC signals was considered negligible (less than 4%).

some of these reports share the idea that "absolute expression" and "transcripts per cell" should entail robust normalization, further practical development to enable universal application has been awaited.

Here, we report a method for normalizing expression data across samples and methods to the cell number of each sample, using the DNA content as indicator. This normalization method is independent of the gene expression profile of the sample, and may contribute to transcriptome studies as a common standard for data comparison and interchange.

Results

Dose-response linearity of the measurement system as a basis for the Percellome method

The fidelity of transcript detection is the key to this "per cell" based normalization method, which generates transcriptome data in "mRNA copy numbers per cell". The Q-PCR system was tested by serially diluting samples to confirm the linear relationship between Ct values and the log

of sample mRNA concentration (data not shown). High density oligonucleotide microarrays from Affymetrix [11] were used in our experiments. We tested the linearity of the Affymetrix GeneChips using a set of five samples made of mixtures of liver and brain in ratios of 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, and 0:100 (designated "LBM" for liver-brain mix). The results showed a linear relationship ($R^2 > 0.90$) between fluorescence intensity and input for a sufficient proportion of probe sets, i.e. about 37% of the probe sets in the older MG-U74v2 and 70% in the newest Mouse Genome 430 2.0 GeneChip were above the detection level (approximately one copy per cell) in the 50:50 sample (Figure 1) [see Additional files 1 and 2].

Dose-response linearity alone is not sufficient to generate true mRNA copy numbers. An important additional requirement is that the ratio of signal intensity to mRNA copy number should be equal among all GeneChip probe sets of mRNAs and PCR primers. The Q-PCR primer sets were designed to perform at similar amplification rates to minimize differences between amplicons. The melting

Table 1: The spike factors for various organs/tissues

Species	Organ/Tissue (adult, unless otherwise noted)	Spike Factor	total RNA/genomic DNA	SD
Mouse	Liver	0.2	211	46
Mouse	Lung	0.02	22	4
Mouse	Heart	0.05	-	-
Mouse	Thymus	0.01	8	2
Mouse	Colon Epithelium	0.05	105	30
Mouse	Kidney	0.1	-	-
Mouse	Brain	0.1	-	-
Mouse	Suprachiasmatic nucleus (SCN)	0.1	-	-
Mouse	Hypothalamus	0.1	63	4
Mouse	Pituitary	0.1	52	8
Mouse	Ovary	0.02	35	4
Mouse	Uterus	0.02	42	12
Mouse	Vagina	0.02	81	38
Mouse	Testis	0.15	56	7
Mouse	Epididymis	0.07	53	16
Mouse	Bone marrow	0.02	14	3
Mouse	Spleen	0.02	-	-
Mouse	Whole Embryo	0.15	97	36
Mouse	Fetal Telencephalon E10.5-16.5	0.1	48	9
Mouse	Neurosphere (E11.5-14.5)	0.03	42	10
Mouse	E9.5 embryo heart	0.15	58	15
Mouse	cell lines	0.2	-	-
Rat	Liver	0.2	-	-
Rat	Kidney	0.2	-	-
Rat	Uterus	0.04	56	5
Rat	Ovary	0.04	56	9
Human	Cancer Cell Lines	0.2	116	26
Xenopus	liver	0.03	-	-
Xenopus	embryo	0.15	-	-

temperature was set between 60° and 65°C with a product size of approximately 100 base pairs using an algorithm (nearest neighbor method, TAKARA BIO Inc., Japan), and the amplification co-efficiency (E) was set within the range 0.9 ± 0.1 ($E = 2^{\{-(1/\text{slope})\}} - 1$ on a plot of \log_2 (template) against Ct value). For the GeneChip system, the signal/copy performance of each probe set depended on the strategy of designing the probes to keep the hybridization constant/melting temperature within a narrow range, ensuring that the dose-response performances of the probe sets were similar (cf. <http://www.affymetrix.com/technology/design/index.affx>). Failing this, any differences should at least be kept constant within the same make/version of the GeneChip. Taking into consideration the biases that lead to imperfections in estimating absolute copy numbers in each gene/probe set, we developed normalization methods to set up a common scale for Q-PCR and Affymetrix GeneChip systems.

The grade-dosed spike cocktail (GSC) and the "spike factor" for the Percellome method

A set of external spike mRNAs was used to transfer the measurement of cell number in the sample (as reflected by its DNA content) to transcriptome analysis. For the

spikes, we utilized five *Bacillus subtilis* mRNAs that were left open for users in the Affymetrix GeneChip series. The extent to which the *Bacillus* RNAs cross-hybridized with other probe sets was checked for the Affymetrix GeneChip system. The GSC was applied to Murine Genome U74Av2 Array (MG-U74v2) GeneChips with or without a liver sample. As shown in Figure 2, cross-hybridization between *Bacillus* RNAs and the murine gene probe sets was negligible [see Additional files 3 and 4]. Mouse Genome 430 2.0 Array (Mouse430-2), Mouse Expression Arrays 430A (MOE430A) and B (MOE430B), Rat Expression Array 230A (RAE230A), *Xenopus laevis* Genome Array and Human Genome U95Av2 (HG-U95Av2) and U133A (HG-U133A) Arrays sharing the same probe sets for these spike mRNAs showed no sign of cross-hybridization with the *Bacillus* probes (data not shown).

We prepared a cocktail containing in vitro transcribed *Bacillus* mRNAs in threefold concentration steps, i.e. 777.6 pM (for AFFX-ThrX-3_at), 259.4 pM (for AFFX-LysX-3_at), 86.4 pM (for AFFX-PheX-3_at), 28.8 pM (for AFFX-DapX-3_at) and 9.6 pM (for AFFX-TrpX-3_at). By referring to the amount of DNA in a diploid cell and employing a "spike factor" determined by the ratio of

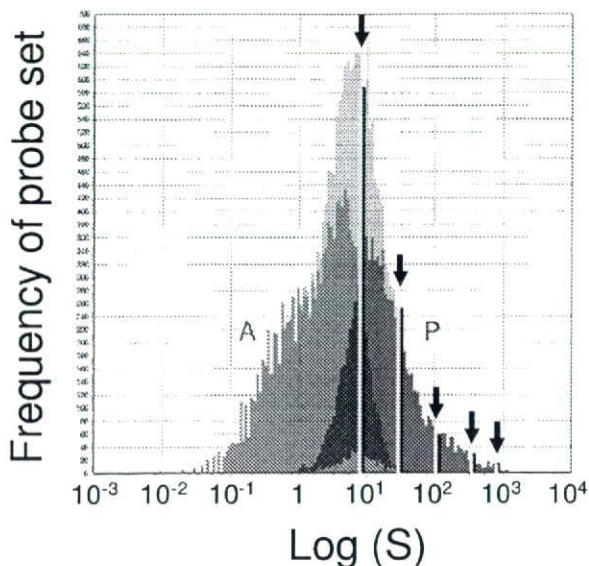


Figure 3
Positioning of GSC spike mRNAs in Affymetrix GeneChip dose-response range. A frequency histogram of the probe sets of Affymetrix GeneChip Mouse430-2 is shown. The histogram for all probe sets (gray) shows near-normal distribution. Blue columns are the "present" calls (P), red columns "absent" calls (A) and green "marginal" calls. The five yellow lines indicate the positions of the GSC spike mRNAs that are chosen to cover the "present" call range by a proper "spike factor".

total RNA to genomic DNA in a tissue type (Table 1), the spike mRNAs were calculated to correspond to 468.1, 156.0, 52.0, 17.3 and 5.8 copies per cell (diploid), respectively, for the mouse liver samples (spike factor = 0.2). The ratio of mRNAs in the cocktail is empirically chosen depending on the linear range of the measurement system and the available number of spikes. Here, we set the ratio to three to cover the "present" call probe sets of the Affymetrix GeneChip system (Figure 3).

We tested this grade-dosed spike cocktail (GSC) by Q-PCR and confirmed that the Ct values of the spike mRNAs were linearly related to the log concentrations (cf. Figure 4a), i.e. could be expressed as

$$Ct = \alpha \log C + \beta \quad \{1\}$$

The GSC was also tested by the GeneChip system and it was confirmed that the log of the spike mRNA signal intensities was linearly related to the log of their concentrations (cf. Figure 4b),

$$\log S = \gamma \log C + \delta \quad \{2\}$$

The linear relationship between the Ct values (Ct) and the log of RNA concentration (log C) was reasonable given the definition of Ct values (derived from the number of PCR cycles, i.e. doubling processes). The linear relationship between the log of GeneChip signal intensity (log S) and the log of RNA concentration (log C) was rationalized by the near-normal distribution of log S over all transcripts (cf. Figure 3).

Calculation of copy numbers of all genes/probe sets per cell

As described above, using a combination of DNA content and the spike factor of the sample, the GSC spike mRNAs become direct indicators of the copy numbers (C) per cell. When the samples were measured by Q-PCR or GeneChip analysis, the five GSC spike signals in each sample should obey function {1} for Q-PCR and function {2} for GeneChip with a good linearity. If the observed linearity was poor, a series of quality controls was performed and the measurement repeated. The coefficients of the functions were determined for each sample by the least squares method. Under the assumption that all genes/probe sets share the same signal/copy relationship, signal data for all genes/probe sets were fitted to the functions {1'} or {2'}, which are the individualized functions of {1} and {2} for each sample measurement (i).

$$Ct = \alpha_i \log(C) + \beta_i \quad \{1'\}$$

$$\log(S) = \gamma_i \log(C) + \delta_i \quad \{2'\}$$

(i = sample measurement no.)

The Q-PCR Ct values (Ct) and microarray signal values (S) of all mRNA species in the sample (i) are converted to copy numbers per cell (C') by the inverses of functions {1'} and {2'}, i.e. {3} and {4} below:

$$C' = B^{((Ct-\beta_i)/\alpha_i)} \quad \{3\}$$

for Q-PCR (Figure 4a);

$$C' = B^{((\log S - \gamma_i)/\delta_i)} \quad \{4\}$$

for GeneChips (Figure 4b),

where B is the logarithmic base used in {1} and {2} (see Materials and Methods for details).

Real world performance of the Percellome method

The correspondence between Q-PCR and GeneChip was tested using a sample set from 2,3,7,8-tetrachlorodiben-zodioxin (TCDD)-treated mice. Sixty male C57BL/6 mice