

# 質量分析計データを活用した 統計解析ソリューション



# 多変量解析

多変量解析は、統計学の一分野であり、複数の変数間の関係を分析する手法です。この手法は、データの解釈や予測において非常に有用であり、工学や社会科学、金融など様々な分野で活用されています。

質量分析計のデータを活用した統計解析において、多変量解析はデータの意味を見出すために重要な手法です。多変量解析を用いることで、様々な検体の特徴や関連性を明らかにすることができます。例えば、特定の物質の含有量が異なる検体を比較する場合、多変量解析を用いることで、その物質が他の変数とどのように関連しているのかを明確にすることができます。

さらに、多変量解析は異常値の検出や予測モデルの作成にも役立ちます。質量分析計のデータを解析することで、異常なデータ点を特定し、問題の原因を見つけることができます。また、過去のデータをもとに将来のトレンドを予測するモデルを作成することも可能です。

しかし、多変量解析にはデータの前処理（欠損値の除去など）と統計結果の解釈（PCAの軸の意味など）という2つの課題があります。データの欠損や外れ値の存在も解析結果に影響を及ぼす可能性があります。また多くの変数が絡み合う場合や、相互作用が存在する場合には、解釈が難しくなることがあります。

本誌ではこれらの課題を克服した統計事例をご紹介します。

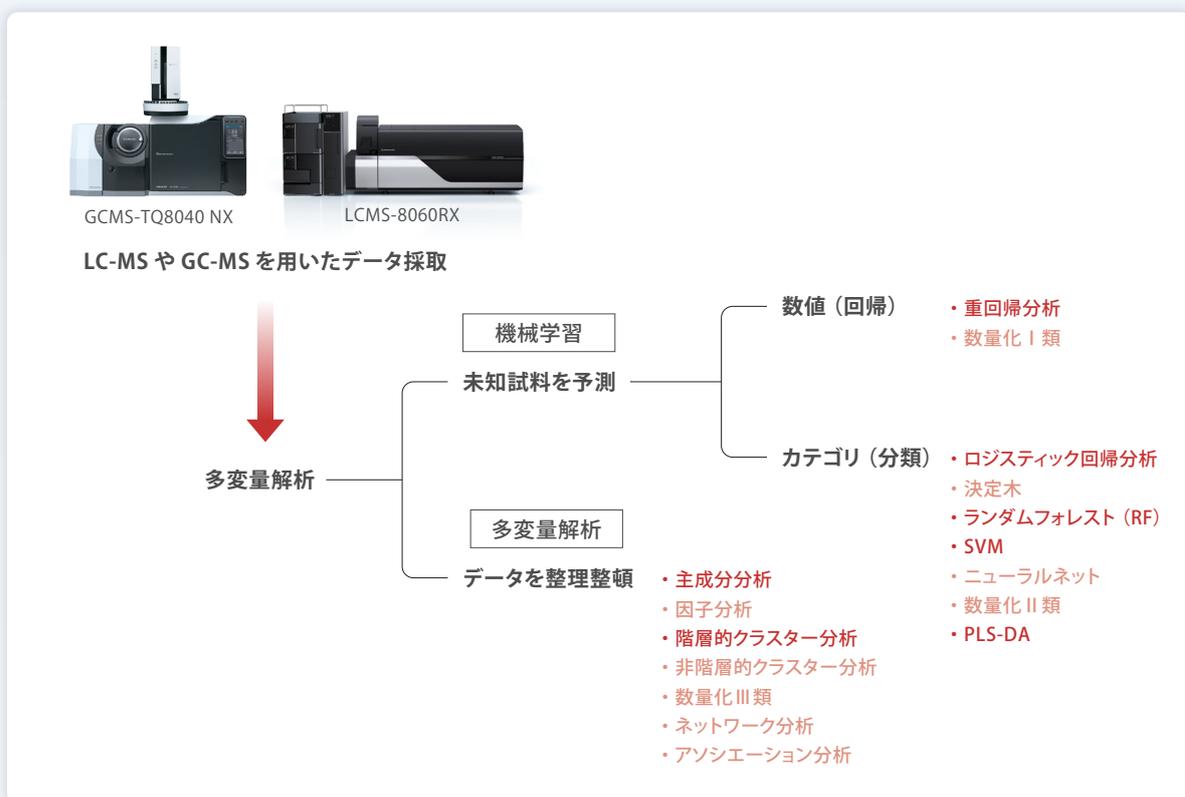


図1 質量分析計データで使用されることが多い多変量解析手法（赤太文字）



## 市場トレンド

### 多変量解析を用いたアプリケーションの割合

質量分析計を製造・販売する主な7社の2021年11月から2023年2月発行の918報のアプリケーションを調査したところ多変量解析を用いたアプリケーションは28報で全体の3%でした。

- 手法別** | それらアプリケーションの手法別内訳は主成分分析 21 報、階層クラスタ解析 4 報、ボルケーノプロット 3 報、PLS-DA 3 報となっており、主成分分析がよく利用されています。
- 分野別** | 医薬分野 5 報、ライフサイエンス・臨床分野 6 報、食品分野 14 報、化学分野 3 報で、試料入手が容易でビッグデータを取得し易い食品分野が多変量解析を最も使用しています。
- 装置別** | LC-MS 8 報、LC-Q/TOF 7 報、GC-MS 8 報、MALDI 2 報、FT-IR 2 報、Raman 1 報で、LC-MS や GC-MS のデータが最も頻繁に多変量解析に用いられます。

## 統計ソフトウェア

### マルチオミクス解析パッケージ

2 群比較でボルケーノプロットによりマーカー探索されたい方、代謝経路図による相関解析を実施したい方にお勧めです。



PCA、階層クラスタ解析、ボックスプロットの他に、2 群に限り比較可能で p 値だけでなく 2 群間の面積比も考慮してマーカー探索可能なボルケーノプロットと、当社のデータベースに対応した代謝経路図上で相関解析が可能な VANTED 機能が搭載されています。統計機能に関してはマルチオミクスや質量分析計データに限らず対応可能です(例：においデータ、体重や年齢などのメタデータ)。

### eMSTAT Solution

PCA で分離しない試料をお持ちの方、2 群以上の試料群間でマーカー化合物を検索されたい方、未知試料を判別されたい方にお勧めです。



PCA、階層クラスタ解析、T 検定、ボックスプロットの他に、3 群以上の試料群間の各化合物の p 値を計算し統計的に差異のある化合物(マーカー候補)を検出する ANOVA、PCA より試料群を分けやすい PLS-DA (例：遺伝子が異なるハエ 2 群であれば PCA で充分分かれるが、青チーズ常温保存と冷蔵保存の 2 群比較や血統が異なる牛肉 A 群と B 群など差異が小さいと予測されるもの)、未知試料を 2 群の試料群のどちらに属するか判別可能な SVM、未知試料を 2 群以上の試料群のどれに属するか判別可能なランダムフォレストなどが搭載されています。



# 統計解析に際し実施するデータ前処理例 脂肪酸による判別分析モデルの構築



Application &gt;

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構と島津製作所は「食」の機能性成分解析を目的とした共同研究により、生産地域の異なる大麦を試料、それらに含有されるC4からC24までの脂肪酸化合物の面積値を変数として地域判別モデルを構築しました。



Smart Metabolites Database Ver.2には50成分の脂肪酸測定用メソッドが記載されています。EI イオン化法とCIイオン化法のどちらも搭載されており、当社独自のSmart EI/CI イオン源と組み合わせることで真空を落とすことなく両メソッドで測定可能です。

## ■ 分析

大麦中の脂肪酸の抽出と誘導体化はナカライテスク株式会社の脂肪酸メチル化キット (P/N : 06482-04) を使用しました。GC-MSの分析条件では、キャリアガス制御に線速度一定モードを用いており、簡単にFIDに移管が可能です。この事例では、Excelで以下のようなデータ前処理を行いました。

- ①飽和化合物の消去
- ②欠損値（面積値 0）を含む化合物の消去
- ③正規分布になっていない化合物の消去
- ④面積値が正か負の相関関係のある 2 つの化合物の面積値を平均して 1 つの新たな化合物作成

## ■ 試料

産地の異なる大麦

## ■ 使用装置

GC-MS System : GCMS-QP2020 NX  
Ion source : Smart EI/CI イオン源

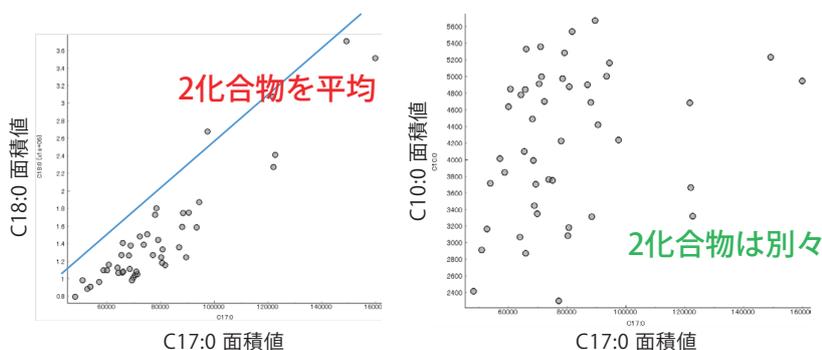


図2 相関関係にある2つの化合物検索

## ■ まとめ

GCMS-QP2020 NXを用いて脂肪酸分析を行いました。大麦サンプルの脂肪酸分析を行いLabSolutions Insightと機械学習ソフトを用いて判別モデルを作成しました。高い精度のモデルが作成され、未知サンプル 3 点も正しく判別できました。

## Smart EI/CI イオン源

Smart EI/CI イオン源は、汎用的に利用されるEIの感度を損なわず、イオン源を交換せずにCIのデータを採取できることを目的として新たに開発したイオン源です。脂肪酸のようにEIやCIイオン化法の両方で測定可能な分析で役立ちます。



Product &gt;

# 変化傾向が類似する化合物を検出した例 性別による加齢の差異解析



Application >

性別により加齢による健康状態の変化に差異があり、男性は心臓病や脳卒中などの生活習慣病に罹患し介助が必要になることが多く、女性は骨や筋力の衰えにより運動機能が低下し自立度が落ちていく傾向があることが知られています。70歳以上85歳未満の健康者の血清に含まれる一次代謝物をガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）で測定し、マルチオミクス解析パッケージで代謝経路図に面積値を投影し相関解析を実施しました。



- Smart Metabolites Database Ver. 2を用いることで簡単にGC-MSを用いた一次代謝物測定が可能です。
- マルチオミクス解析パッケージを用いることで一次代謝物測定データを代謝経路図に可視化し、年代別解析や相関解析により各試料群に特徴的な成分を検出できます。

## ■ 分析

サンプルの前処理はメタボロミクス前処理ハンドブック（カタログ No. C146-2181）の手法に従って行い、GC-MSの分析条件は Smart Metabolites Database Ver.2を用いました。データ採取モードとして Multiple Reaction Monitoring（MRM）を用いることで、37分の分析時間で604成分の化合物を高感度に測定することができました。

## ■ 試料

70歳以上85歳未満の10人の健康者の血清（男性：n=5、女性：n=5）

## ■ 使用装置

GC-MS System : GCMS-TQ8040 NX

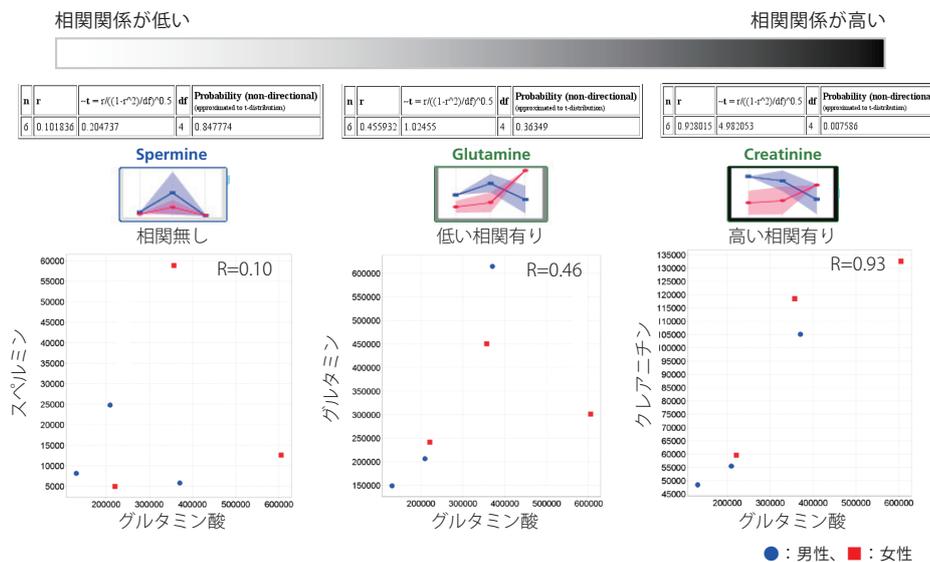


図3 グルタミン酸と各化合物の相関結果を示す散布図（マルチオミクス解析パッケージの画像）  
（化合物名：青色はGC-MS測定成分、緑色はGC-MSとLC-MSで両方測定可能な成分）

## ■ まとめ

検出された243成分を基にマルチオミクス解析パッケージにより代謝経路図への投影と年代別解析と相関解析を行いました。その結果、性別および年代別で差異のある一次代謝物を検出することができました。

## マルチオミクス解析パッケージ

当社が提供する代謝物分析用の各種メソッドパッケージ・データベースと連携し、メタボロミクスデータ解析作業を効率化します。直感的に捉えることができる可視化されたデータは、創薬や機能性食品、バイオ工学などライフサイエンス研究を強力にサポートします。



Product >



## 3群以上比較可能なANOVAによるマーカー探索例 酒類の劣化解析



Application &gt;

食品を評価する際は、人による官能試験により味、香り、おいしさ、等級などが評価されてきましたが客観性に欠けるものでした。本稿では、市販の日本酒および白ワインを苛酷な条件下にて保管し、アミノ酸、有機酸、ヌクレオシド、ヌクレオチドといった親水性代謝物にどのような変化がみられるのかについて、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）を用いて網羅的に分析し、多変量解析により検証した事例を紹介します。



一次代謝物LC/MS/MSメソッドパッケージを用いることで食品中の代謝物を網羅的に分析できます。

### ■ 分析

12,000 rpmで5分間遠心分離し、その上清を超純水で100倍希釈したものをLC/MS/MS分析用サンプルとしました。

### ■ 試料

市販の日本酒2種類（冷蔵で販売されているもの）と白ワイン1種類

### ■ 使用装置

LC-MS System : LCMS-8060NX  
Column : Kinetex C8  
(150 mm × 2.1 mm I.D., 2.6 μm)

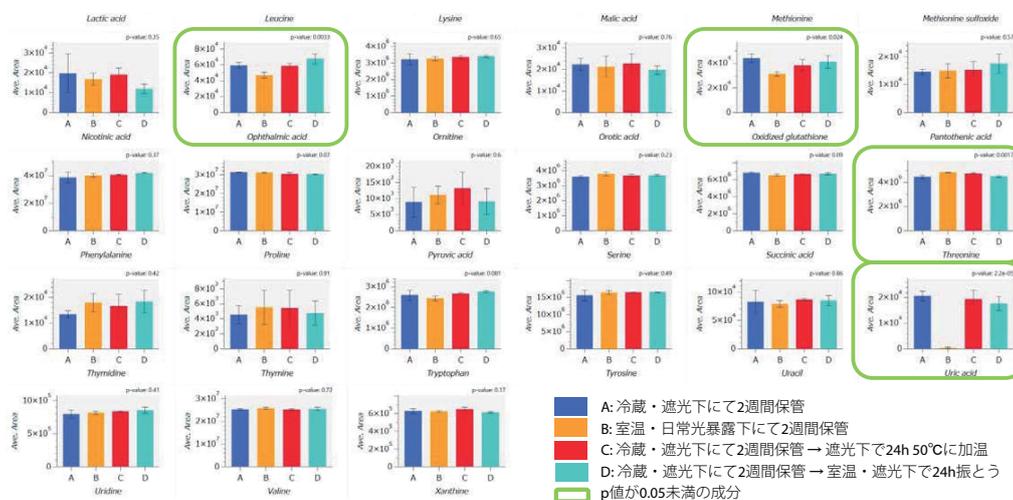


図5 日本酒-1における各保管条件間のANOVA検定結果

### ■ まとめ

室温・日光暴露下にて2週間保管した試料群においてトリプトファンの上昇とキヌレニンの上昇を確認することができ、高温下に24時間さらした試料群もわずかに同じ傾向が見られました。LC-MS/MSを用いたフードメタボロミクスを行うことで、酒類の劣化を特徴づける成分の網羅的探索が可能です。

### 超高速トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8060RX

新開発のフォーカス電極によりイオンのみを効率よく質量分析計内部に導入できます。夾雑成分は除去されるので、汚れによる影響が少なく、生体試料でも安定した分析が可能です。



Product &gt;

# 主成分分析によるマーカー探索例

## トマトの品種解析



Application &gt;

近年、メタボロミクスは、食品分野で応用されており、食品中の構成成分の比率の違いから、機能性成分の探索、品質評価法の確立、経時劣化の予測などさまざまな用途で利用されています。Smart Metabolites Database Ver.2を用いたトマトの品種間による構成成分の多変量解析とサンプル間で差異のあった糖類の含有濃度の比較結果について紹介します。



benefits

- メタボロミクスにおける代謝物一斉分析から多変量解析までを簡単にこなせます。
- サンプル分類フィルター機能は、検出の可能性が高い成分だけを絞りこみ、データ解析を効率化します。
- 糖類定量用メソッドにより、サンプル中の24成分の糖類のおおよその濃度が算出できます。

### ■ 分析

適切な大きさにカットしたトマトを凍結乾燥させました。得られた乾燥試料10 mgをBligh & Dyerの方法をベースとした前処理プロトコルにて抽出し、メトキシム-TMS誘導体化しました。なお、内部標準にはリビトールを用いました。GC-MS/MSの測定は、Smart Metabolites Database Ver.2を使用し、サンプル分類フィルターは“植物”に設定しました。

### ■ 試料

市販されているトマト4種類 (n=3)

### ■ 使用装置

GC-MS System : GCMS-TQ8040 NX  
Column : BPX-5 (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 μm)

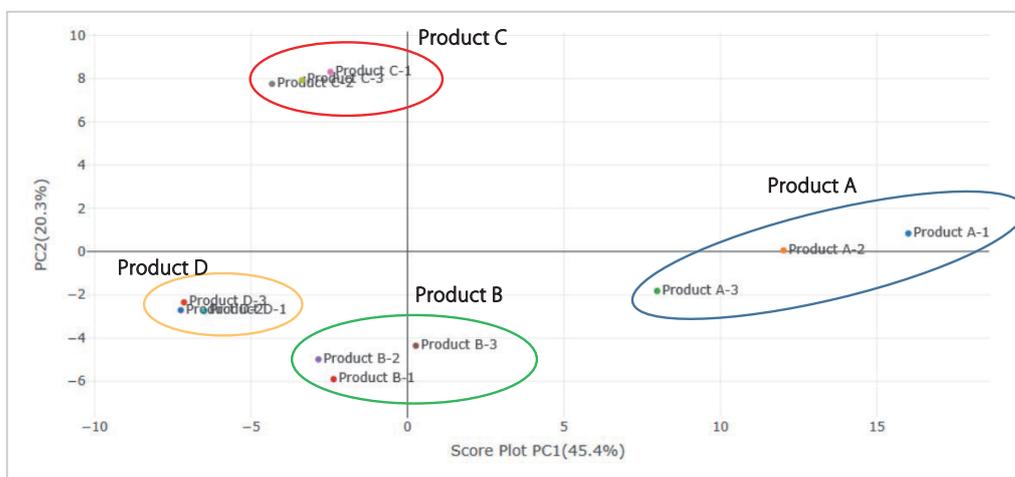


図 6 トマト4種類における検出された代謝成分のスコアプロット

### ■ まとめ

Smart Metabolites Database Ver.2とマルチオミクス解析パッケージを用いて、代謝成分を多変量解析することにより、トマトの品種間による差異を区別することが可能でした。また、糖類に着目した個別分析を行うことにより、多変量解析で示唆された差異を詳細に解析することができました。

### Smart Metabolites Database Ver.2

本データベースには約600成分の一次代謝物が分析対象化合物として登録されておりメソッドを最適化する必要がなく、代謝物分析の大幅な効率化が図れます。



Product &gt;

# 階層クラスタ解析によるマーカ探索例 遺伝子変異ハエの代謝物差異解析



Application >

遺伝子変異とは、DNA塩基配列に起こる変化のことで、置換、挿入、欠失など様々な種類があります。遺伝子変異が生じると、タンパク質が正しく合成されなくなったり、機能しなくなったりする可能性があります。代謝物とゲノム情報の統合解析は、疾患の治療薬開発や個別化医療につながる可能性のある重要な基礎研究とされています。そこで、遺伝子変異が代謝物に及ぼす影響を調べる手法が重要になります。



- マルチオミクス解析パッケージを用いることで、GC-MSにより得られた測定結果を簡便に可視化できます。
- 主成分分析、階層クラスタ解析、ボルケーノプロットおよび代謝マップなどの統計手法が利用でき、サンプル間の差異を見つけることができます。

## ■ 分析

50匹の黄色ショウジョウバエを分析に用いました。50匹のうち20匹は野生型、残りの30匹は遺伝子変異型のハエでした。10匹で1つのサンプルを形成することとし、野生型2サンプル、遺伝子変異型3サンプルの合計5サンプルを用意しました。ハエ試料はすり潰して均一化しました。

均一化した試料にメタノール：水：クロロホルム（2.5:1:1）の抽出液を添加して振とうすることで、代謝物を抽出しました。水相を分取後、遠心濃縮してメタノールを除去し、残った水相を凍結乾燥器で乾固させました。乾固した試料は、メトキシアミンを用いたメトキシム誘導体化、およびN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（MSTFA）を用いたトリメチルシリル（TMS）誘導体化により処理しました。

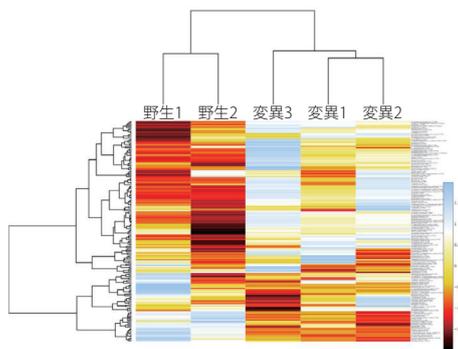


図7 野生型と遺伝子変異型のハエの階層クラスタ解析

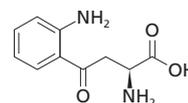
## ■ 試料

黄色ショウジョウバエ（野生型と遺伝子変異型）

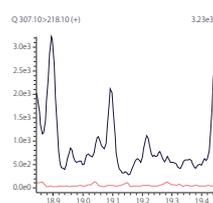
## ■ 使用装置

GC-MS System : GCMS-TQ8040 NX  
Column : DB5 (30 m × 0.25 mm I.D., df=1µm)

## Kynurenine-3TMS



遺伝子変異型



野生型

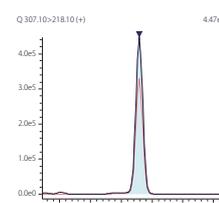


図8 野生型より遺伝子変異型で減少がみられた化合物のクロマトグラム

## ■ まとめ

野生型および遺伝子変異型の黄色ショウジョウバエの代謝物を、ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-TQ8040 NXで分析しました。代謝物を網羅的に検出した結果を、マルチオミクス解析パッケージを用いて主成分分析、階層クラスタ解析、ボルケーノプロット、代謝マップで解析しました。その結果、遺伝子変異により差異が生じた代謝物を可視化することができました。

## トリプル四重極型ガスクロマトグラフ 質量分析計 GCMS-TQ8040 NX

高感度・長期安定性イオン源や高効率率リジョンセルの搭載により、高感度かつ長期にわたり安定した代謝物分析を実現します。



Product >

# ボルケーノプロットによる2群比較例 紙巻煙草のにおい成分分析



Application >

官能評価は時間とコストがかかるうえに主観的な要素が含まれており、結果が環境や状況に影響されます。そのため、客観的な評価方法を確立することが求められています。紙巻煙草の刻み葉の充填度とにおいは密接に関連しており、統合解析によりこれらの要素の関連性を解明することで紙巻煙草の品質向上や新たな製造方法の開発につながります。



統計ソフトウェア「マルチオミクス解析パッケージ」を用いることでGC-MS、X線CTシステム、官能評価による統合解析が可能です。

## ■ 分析

X線CTシステムによる充填度解析については、CT撮影によってボリウムデータを取得し、グレースケール値を閾値で仕分けすることで、葉（巻紙を含む）と空気を分離しました。領域を作成するため煙草の葉部を円筒形状（Φ 4.6 mm × 60 mm）で囲みました。このとき、先端から10 mmの間隔で6区画に分けます。その後、各領域における“葉”の画素数を数えることで各領域（Φ 4.6 × 10 mm）の体積%を算出しました。GC-MSによるにおい成分分析に際しては、巻紙をほどき、中に含まれる葉を固相マイクロ抽出用バイアルに500 mg（各銘柄の紙巻煙草 3本、n=3）秤量しました。

## ■ 試料

市販の3つの異なる煙草銘柄の紙巻煙草

## ■ 使用装置

GC-MS System : GCMS-TQ8040 NX  
NDI System : XSeeker 8000

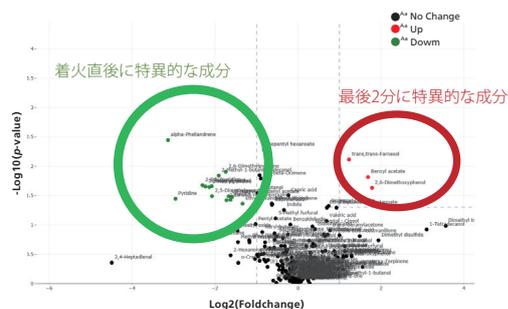


図9 着火直後2分と最後の2分のボルケーノプロット解析

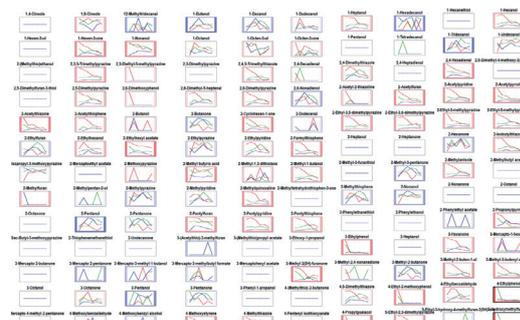


図10 紙巻煙草1~3の充填度とにおい成分の関連性

## ■ まとめ

本稿では3つの異なる紙巻煙草の刻み葉と着火後のガス試料をガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ8040 NX）と卓上X線CTシステムXSeeker 8000と官能評価を用いて多角的に評価しました。X線CTシステムによる充填度測定値とGC-MSにより検出された295成分と官能評価値をマルチオミクス解析パッケージにより主成分分析、階層クラスター解析、ボルケーノプロット解析、相関分析などで統合解析し各銘柄や充填度で特徴的なにおい成分を検出することができました。

## Smart Aroma Database

香気に重要な500成分以上の分析情報や官能情報が登録されており、検出化合物の半定量値を算出することが可能です。MRMモードによる高感度な相対定量分析で確かかつ簡便に香り成分を検出します。



Product >

# 分離能力の高いPLS-DAによるマーカー探索例 植物油種の識別



Application &gt;

近年の研究では、培養液中の有機/無機成分の変動による抗体生産量や品質への影響について多くの報告があります。さらに有機/無機成分は培養液中で相互作用しながらその動態に影響することも知られているため、代謝の理解には培養液中の有機/無機成分両方の分析が必要と考えられます。



- eMSTAT Solutionはクロマトグラフ装置による測定データだけでなくMALDIによる測定データにも使用可能です。
- 卓上型MALDI-TOF質量分析計は簡便で迅速にデータを得ることができ、より多くのデータを統計解析に使用することができます。

## ■ 分析

油試料を等量のマトリックス溶液、カチオン化剤と共に、MALDI測定用ステンレスプレート上に滴下して乾燥させました。マトリックスは2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB、10 mg/mL)をメタノールに溶解させたもの、カチオン化剤はヨウ化ナトリウム(1 mg/mL)をテトラヒドロフランに溶解させたものを用いました。測定は卓上型MALDI-TOF質量分析計MALDI-8020を用いて行いました。

各マススペクトルから得られたピークリストをeMSTAT Solutionソフトウェアを用いて多変量解析を行うことにより、各油種の識別を試みました。

## ■ 試料

市販の植物油6種  
(オリーブ油3種、アマニ油、ヒマワリ油、グレープシード油)

## ■ 使用装置

MALDI System : MALDI-8020

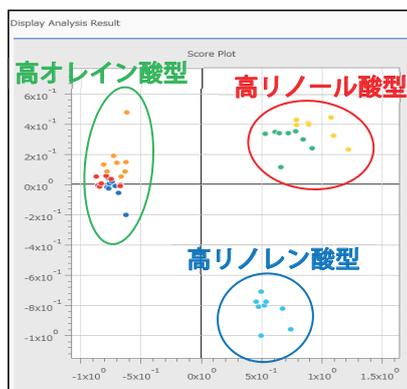


図 11 植物油の多変量解析結果 (スコアプロット)

●オリーブ油 A ●オリーブ油 B ●オリーブ油 C  
●アマニ油 ●ヒマワリ油 ●グレープシード油

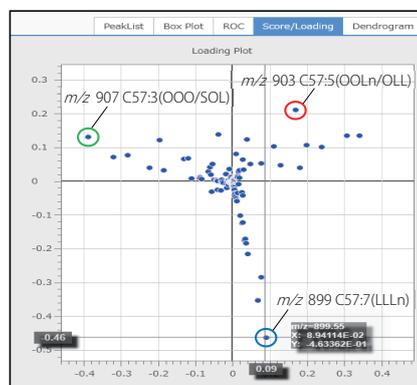


図 12 植物油の多変量解析結果 (ローディングプロット)

## ■ まとめ

卓上型MALDI-TOF質量分析計MALDI-8020と統計解析ソフトを用いて、植物油を主要構成脂肪酸ごとに簡便・迅速にグループ分けできることが示されました。今回は脂質を測定対象としましたが、同様の分析は、タンパク質、糖鎖、合成品、生体試料などの多様な成分にも適用することが可能と考えられます。

## マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型質量分析計 MALDI-8020

コンパクトでありながら、ペプチド、タンパク質、ポリマーやオリゴ核酸などのQCやプロファイリング用途の測定を簡便かつ精密に行うことができます。



Product &gt;

# 回帰モデル構築によるブランド指標の探索例 和牛の肥育農家や血統の判別



Application >

年間1,900頭前後（全国の0.7%）のみ出荷される非常に希少価値の高い鳥取和牛61頭の牛肉をガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ8040 NX）、紫外可視分光光度計（UV-1280）、食肉脂質測定装置（相馬光学）、マイクロ波乾燥式水分計（CEM Japan 株式会社）、目視評価を用いて多角的に評価し、eMSTAT Solutionにより農家別や血統別でブランド指標となりえる成分を探索しました。



- GC-MSとSmart Metabolites Database Ver.2やSmart Aroma Databaseを組み合わせて用いることで簡単に一次代謝物や香り成分の試料間比較が可能です。
- UVでグリコーゲンを測定し、GC-MSでグリコーゲン由来の分解物を測定し、統合解析することが可能です。

## ■ 分析

GCMS-TQ8040 NXとSmart Metabolites Database Ver.2を用いて有機酸、糖、核酸、脂肪酸、アミノ酸などの一次代謝物488成分を測定しました。またSmart Aroma Databaseを用いてSPME Arrowにより40℃での香り成分476成分を測定しました。399成分の一次代謝物と170成分の香り成分が検出されました。

UV-1280を用いてヨウ素結合分析法によりグリコーゲン含有量を測定しました。また、食肉脂質測定装置によりオレイン酸と一価不飽和脂肪酸、マイクロ波乾燥式水分計を用いて粗脂肪含量、粗蛋白含量、水分含量を測定しました。

目視評価で牛肉の色（BCS：Beef Color Standard）、脂肪交雑の度合い（BMS：Beef Marbling Standard）、牛脂肪色基準（BFS：Beef Fat Standard）、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪の厚さ、歩留等級、肉質等級などを判別しました。

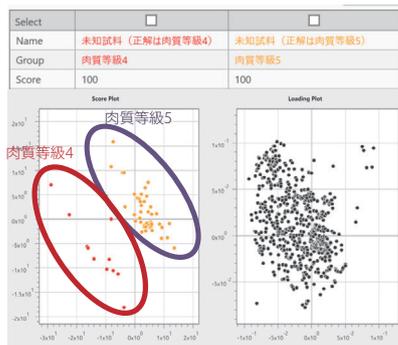


図 13 SVM回帰モデルによる未知試料の肉質等級判別結果

## ■ 試料

和牛61頭の牛肉

## ■ 使用装置

GC-MS System	: GCMS-TQ8040 NX
UV System	: UV-1280
マイクロ波乾燥式水分計	: ProFat (CEM Japan 社)
食肉脂質測定装置	: S-7040 (相馬光学)

Select	<input type="checkbox"/>
Name	未知試料 (正解は農家2)
Group	農家2
Score	70

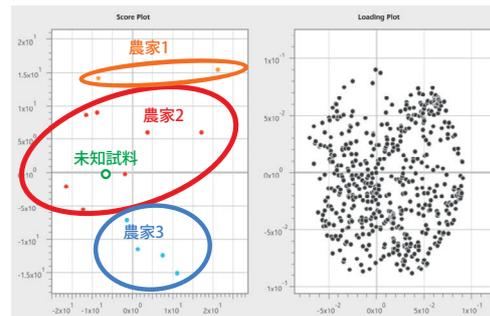


図 14 ランダムフォレスト回帰モデルによる未知試料の農家判別結果

## ■ まとめ

和牛61頭の牛肉をGCMS-TQ8040 NX、UV-1280、食肉脂質測定装置、マイクロ波乾燥式水分計、目視評価を用いて多角的に評価し、ブランド指標となりえる成分を探索しました。検出された603の項目を基にeMSTAT SolutionによりSVMとランダムフォレストを用いて血統別や農家別の判別モデルを構築しました。

## 統計解析ソフトウェア eMSTAT Solution

LC-MS、GC-MS、MALDIなどのデータに対応しており、多変量解析だけでなく未知試料を判別するSVMやランダムフォレスト機能も備えたソフトウェアです。



Product >

本文書に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。  
なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。  
本製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証等を受けておりません。  
治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。  
トラブル解消のため補修用部品・消耗品は純正部品をご採用ください。  
外観および仕様は、改良のため予告なく変更することがありますのでご了承ください。

# 株式会社 島津製作所

## 分析計測事業部

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

製品情報



価格お問合せ



東京支社 (官公庁担当) (03) 3219-5631  
(大学担当) (03) 3219-5616  
(会社担当) (03) 3219-5622  
関西支社 (06) 4797-7230  
札幌支店 (011) 700-6605  
東北支店 (022) 221-6231  
郡山営業所 (024) 939-3790

つくば支店 (官公庁・大学担当) (029) 851-8511  
(会社担当) (029) 851-8515  
北関東支店 (官公庁・大学担当) (048) 646-0095  
(会社担当) (048) 646-0081  
横浜支店 (官公庁・大学担当) (045) 311-4106  
(会社担当) (045) 311-4615  
静岡支店 (054) 285-0124

名古屋支店 (官公庁・大学担当) (052) 565-7521  
(会社担当) (052) 565-7531  
京都支店 (官公庁・大学担当) (075) 823-1604  
(会社担当) (075) 823-1603  
神戸支店 (078) 331-9665  
岡山営業所 (086) 221-2511  
四国支店 (087) 823-6623

広島支店 (082) 236-9652  
九州支店 (官公庁・大学担当) (092) 283-3332  
(会社担当) (092) 283-3334

島津コールセンター ☎ 0120-131691  
(操作・分析に関する相談窓口) IP電話等: (075) 813-1691