

「違いを見つける!」解析事例をご紹介 メタボロミクスをもっと身近に、そして簡単に。

株式会社島津製作所 分析計測事業部

講演の内容

1. **メタボロミクスの概要**
2. 分析ワークフロー（前処理から多変量解析）
3. 応用事例
4. 違いをみる解析をプラスチックに応用した事例

違いや類似性を見つける



2つのサンプルを比較する
(疾患と健常者を比較)



健常者



疾患



3つ以上のサンプルを比較する
(品種や製品間の違いを評価)



品種間の評価



違いを認識出来ているのに、その原因を客観的なデータとして示すことが出来ない。

分析したが、評価の仕方が分からない

3

オミックスとは

網羅的分析を行い、目的の現象について研究する手法

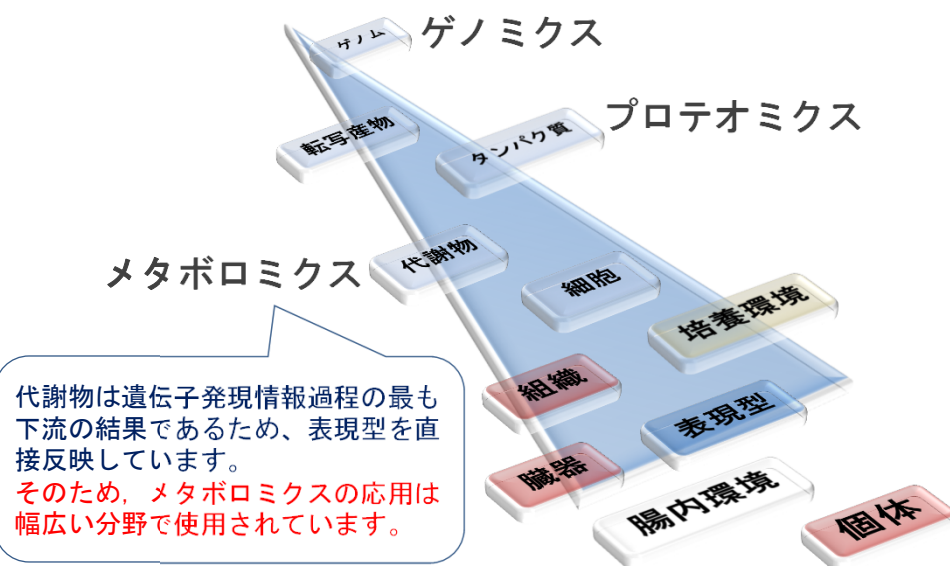
分析対象	
ゲノミクス	DNA
トランスクリプトミクス	mRNA
プロテオミクス	タンパク質
メタボロミクス	代謝物



代謝物を網羅的に検出し、その結果を分析するために使用される一連の技術を指します。

4

オミックスの関係



5

メタボロミクスが応用される分野

医用

疾患の原因物質の特定や早期発見を目的とした**疾患バイオマーカー探索**など、医用分野において幅広く用いられています。



健常者



疾患

食品

品質管理や品質予測など幅広い分野への応用がなされています。加えて生体中の代謝物は、食品の味や香りなどに広く関わることから、呈味成分の解析や発酵食品の品質の安定化など、食品の研究開発に応用する動きが進んでいます。



品種間の評価

6

メタボロミクスに使用する分析装置（1）



GC-MS



LC-MS

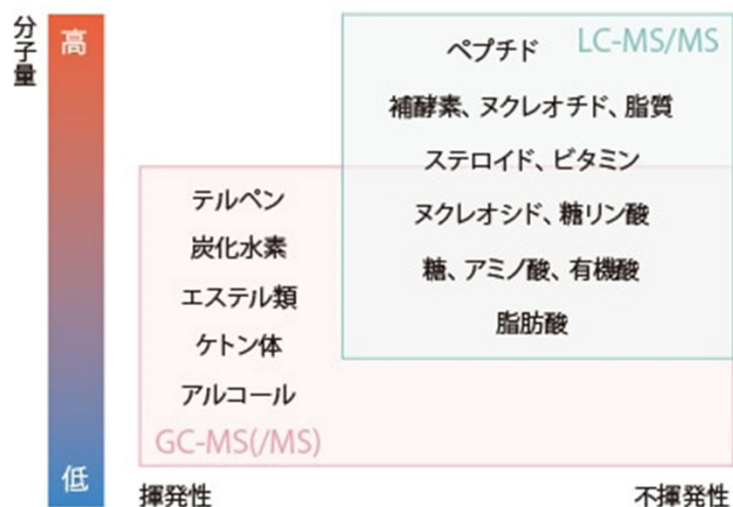
装置の特徴

GC-MS
1回の測定で数百成分を網羅的に測定可能
堅牢性に優れたスタンダードな測定法
導入コストが低い
網羅的測定のファーストチョイス

LC-MS
特定の代謝物（～100成分）を簡便に測定可能
前処理を含め、短時間で測定可能
分子量が高く、不揮発性の代謝物も測定可能
特定成分を効率的にルーティン測定するのに最適

7

メタボロミクスに使用する分析装置（2）



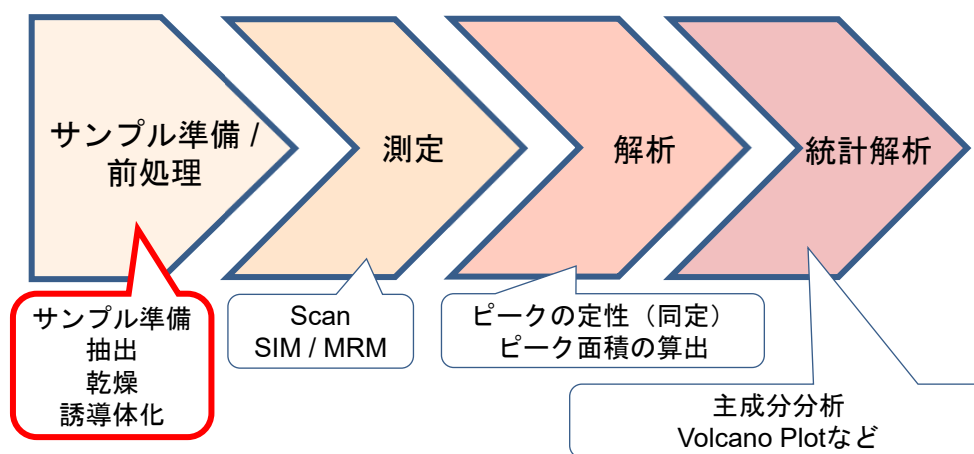
8

講演の内容

1. メタボロミクスの概要
2. 分析ワークフロー（前処理から多変量解析）
3. 応用事例
4. 違いをみる解析をプラスチックに応用した事例

9

サンプル準備から統計解析までのフロー



10

GC-MS分析用のサンプル準備と前処理

サンプル準備

縮分・破碎・サンプリング
(固体試料の場合は10-100mg 程度を使用)

代謝物の抽出

水：クロロホルム：メタノールの混合液で
親水性代謝物を抽出する。(除タンパク)

乾燥

遠心エバポレータによりメタノールを揮発
凍結乾燥にて水分を完全に除去

誘導体化

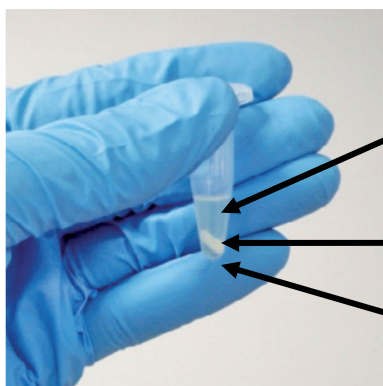
メトキシアミン/ピリジン溶液でメトキシ化
MSTFAにてTMS化

11

前処理

代謝物の抽出

水：クロロホルム：メタノールの混合液で
親水性代謝物を抽出する。(除タンパク)



上層：水,メタノール層
親水性代謝物 (糖、アミノ酸、有機酸など)

中間層：タンパク質
(タンパク質が少ないものでは見えない)

クロロホルム層
脂溶性代謝物

12

GC-MS分析での前処理

乾燥

遠心エバポレータによりメタノールを揮発
凍結乾燥にて水分を完全に除去



遠心エバポレータ



凍結乾燥機

この操作をしっかりと行わないと誘導体化が上手くいきません。

13

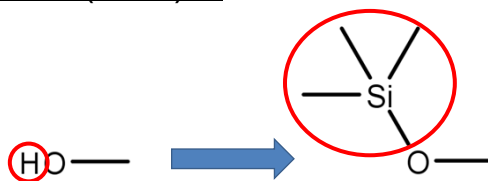
GC-MS分析での前処理

誘導体化

メトキシアミン/ピリジン溶液でメトキシ化
MSTFAにてTMS化

親水性代謝物（アミノ酸、有機酸、脂肪酸、糖、核酸など）は揮発しにくい
ため、**揮発しにくい化合物を揮発しやすくするための、分子の加工が必要**

トリメチルシリル(TMS)化



この反応は水が含まれると水とも反応してしまうため、しっかりと**乾燥**させる

14

前処理ハンドブックのご紹介

無償版

基本的な前処理方法のワークフロー
をご紹介します



<https://www.an.shimadzu.co.jp/pdf/c146-2181.pdf>

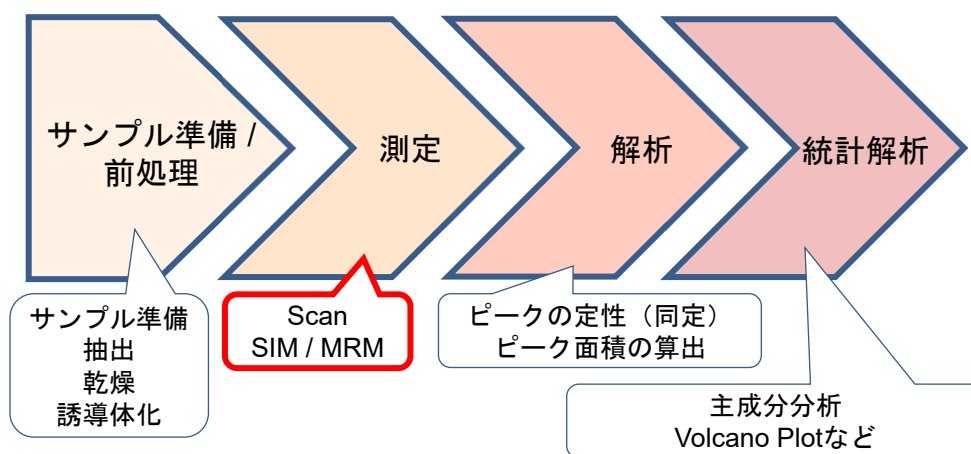
製品版

前処理から多変量解析までのワーク
フローをご紹介します



15

サンプル準備から統計解析までのフロー



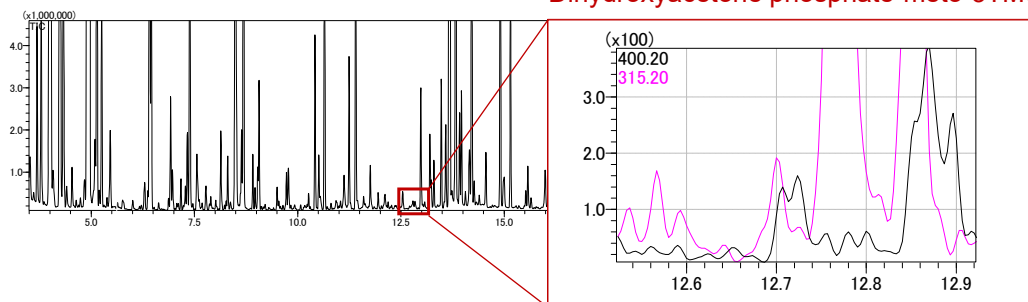
16

メタボロミクスの課題① スキャン分析

分離や感度が悪い

- 夾雑物が多く、みたいピークが見られない場合がある。
- 感度が低く、検出できない。

Dihydroxyacetone phosphate-meto-3TMS



スキャン分析（トータルイオンカレントクロマトグラム）

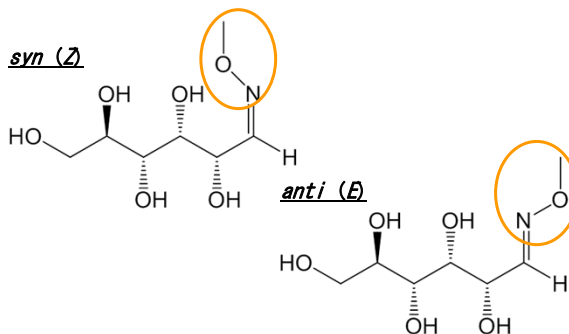
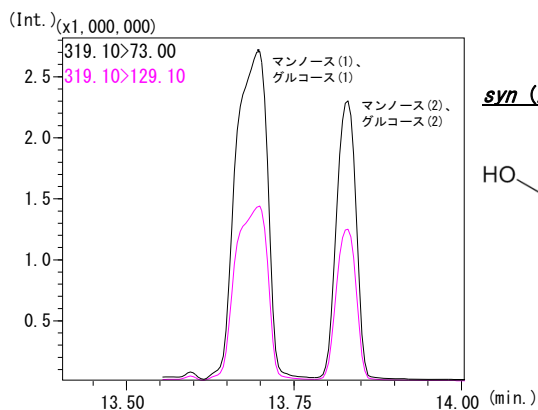
17

メタボロミクスの課題② 糖類分析

糖類の定量が難しい

メトキシム-TMS誘導体化では、

- 立体異性体により、1つの糖から2つのピークが検出される。
- 複数の糖が含まれている場合、ピーク分離できない可能性がある。



18

Smart Metabolites Database Ver.2

Smart Databaseシリーズ

- 化合物ごとに、イオン情報、MRM情報（最適なトランジションとコリジョンエネルギー）、保持指標といった情報が登録されたGC-MS(/MS)用データベース。
- データベースから簡単にメソッドを作成することが可能。
- データベースに新規化合物を簡単に追加することもでき、カスタマイズ性にも優れる。

残留農薬分析



環境汚染物質分析



法薬毒物分析



代謝分析



香気分析



New!

New!

19

Smart Metabolites Database Ver.2

①豊富なMRM情報を登録

代謝物の網羅分析用途（メトキシム-TMS誘導体化）に540成分のMRMトランジションを登録。ヒトの生体試料から植物の2次代謝物まで登録。



②「糖類専用」のメソッドで半定量値を算出

糖類定量用メソッドでは、誘導体化法を最適化することにより、糖類を選択的に検出することができます。24種類の主要な糖類の半定量値を算出することができます。

③初心者のメタボローム分析をサポート

前処理から多変量解析までの手法を示したメタボロミクスハンドブックを用意。フィルター機能により、検出可能性の高いものにフォーカスして分析可。

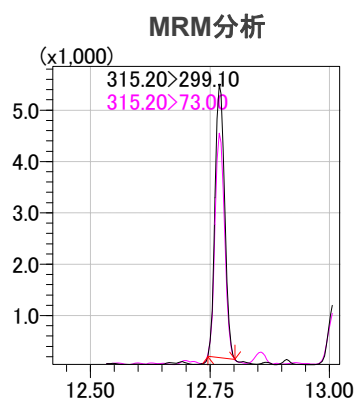
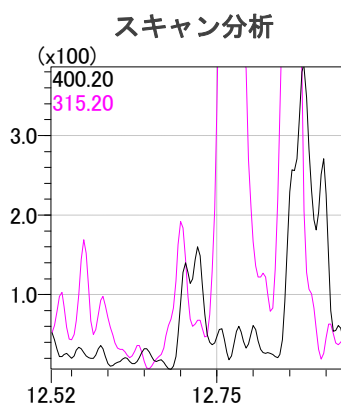
20

ソリューション① | 豊富なMRM情報を登録

分離や感度が悪い ➤ MRM分析にて高感度・高分離

- 夾雑成分の影響により検出が困難な成分も正確に検出可能。
- 代謝物一斉分析メソッドの登録成分数は540

Dihydroxyacetone phosphate-meto-3TMS



21

MRM登録成分の一例

新規追加成分の一例

作用

カテキン (カテキン、エピカテキン、 エピガロカテキン)	渋み・苦味 抗酸化作用、殺菌抗菌作用
クロロゲン酸	抗酸化作用、脂肪の蓄積を抑える効果
キナ酸	アルツハイマー予防、尿路感染症予防
カフェ酸	リラックス効果、がん予防
テアニン	旨味・甘味 リラックス効果
フェルラ酸	アルツハイマー予防
植物ステロール (β -シトステロール、カンペステロール、 スチグマステロール)	コレステロールの吸収を抑える効果

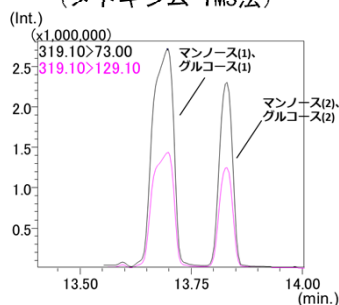
22

ソリューション② | 糖類専用メソッドを収録

糖の定量が難しい▶最適化された誘導体化で実現

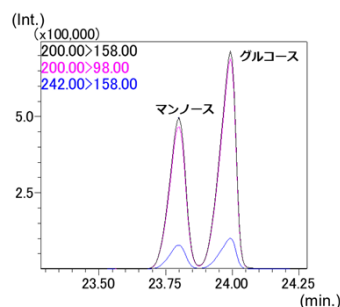
- 検量線情報が登録されており、半定量値を算出することができます。
- 前処理方法は代謝物分析と共有しているので、作業負担は極力減らしております。

従来のメソッド
(メトキシム-TMS法)



マンノースとグルコースが分離できずに混ざったピークが2本見られる

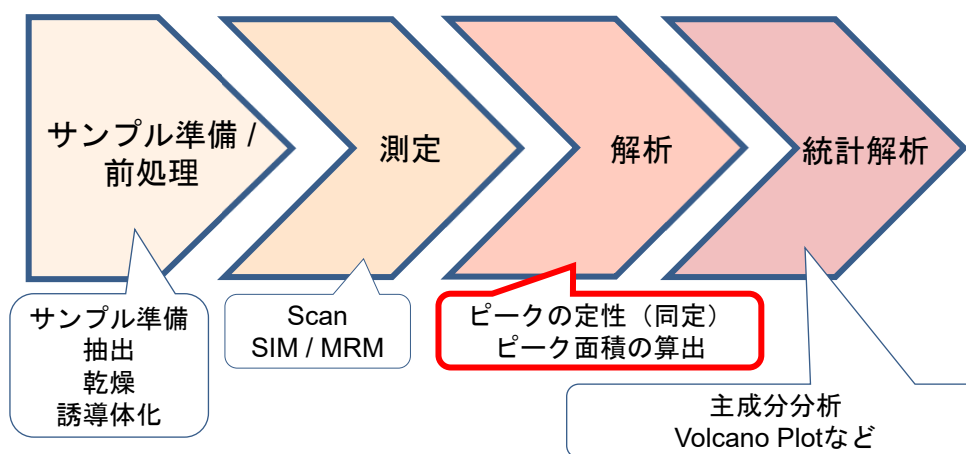
糖類専用メソッド



糖類を選択的に検出可能

23

サンプル準備から統計解析までのフロー



24

メタボロミクスの課題③ データが膨大

膨大なデータの取り扱い

- 網羅的かつ多くのサンプルのデータを扱うメタボロミクスでは、解析作業に負担がかかります。

Smart Metabolites Database Ver.2
のフィルター機能による省力化



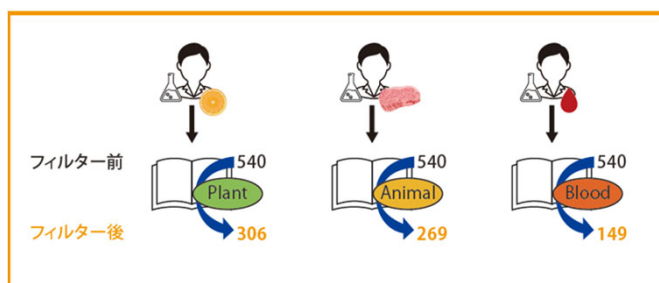
Peakintelligence for GCMS
のAIによるピーク検出



25

ソリューション③ | フィルター機能の搭載

フィルター機能では、サンプルから検出される可能性のある代謝成分のみを選択して測定あるいは解析することができます。解析作業を省力化することができます。



フィルター	登録成分数
全成分 (MRM)	540
植物 (食品)	306
動物 (食品)	269
血液 (血漿)	149
尿	171
細胞	224

26

ソリューション③ | AIによるピーク検出

クロマトグラムのピーク検出をAIがアシストして、**熟練者と同等**レベルの解析を**パラメータフリー**で実現



パラメーター設定からの開放

- 人による解析結果の差をなくす -



信頼のアルゴリズム

- AI技術による高い解析信頼性 -

90%
熟練分析者とAI処理との
データ一致度



劇的な作業効率化

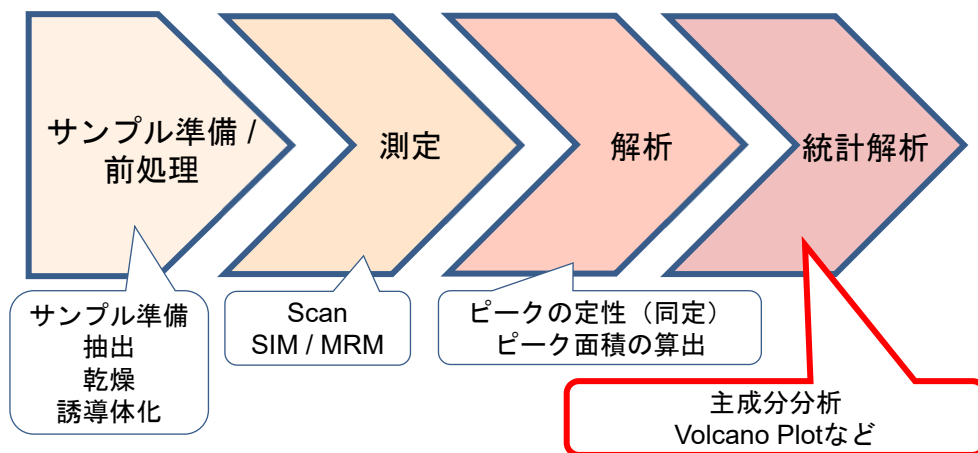
- 分析者の働き方を変える -

1/4
従来法と比較した作業時間



27

サンプル準備から統計解析までのフロー



28

マルチオミクス解析パッケージ

簡単な操作で有意に差のある化合物を抽出。



2群比較用

- ・ボルケーノプロット

多群比較用

- ・主成分分析 (PCA)
 - ・階層的クラスタリング (HCA)
 - ・箱ひげ図 (Boxplot)
- を簡単に使うことができます。

その他の機能

- ・代謝マップ

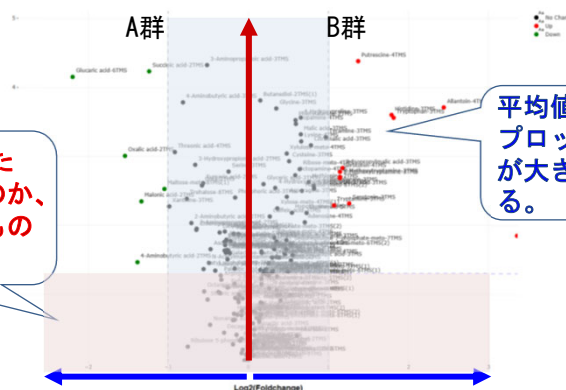
29

2つのサンプルを比較して差異を見つける



火山分布 (Volcano Plot) では、2つのサンプル間の詳細な比較が可能です。

p-valueでは、見つけた差異が、バラつきなのか、統計的に意味のあるものか判断できる。



平均値の比率を横軸にプロットするので、差が大きいものが見つかる。

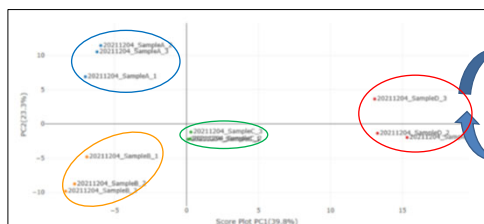
横軸は各サンプルの平均値の比。→両端ほど比が大きく、中央ほど比が小さい。
縦軸は $-\log_{10}(\text{p-value})$ 。設定した値から、バラつきか統計的に意味のある差かを判別。

30

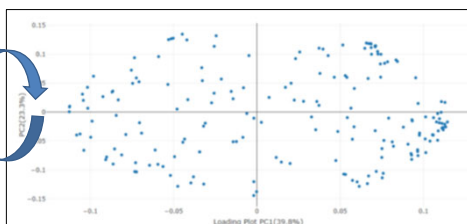
3つ以上のサンプルを比較する (1)

主成分分析 (PCA) では、違いを大きく表すための重み付けをして合成し、視覚的に読み取れる2次元のグラフに投影します。

スコアプロット (サンプル)



ローディングプロット (化合物)



サンプルの特徴を読み取る

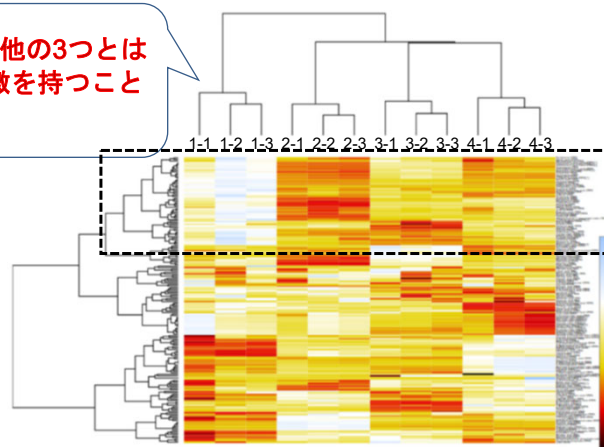
原因となる化合物の情報を
読み取る

31

3つ以上のサンプルを比較する (2)

階層的クラスタリング (HCA) では、似ているもの同士を近く、似ていないものを遠くに描きます。HeatMapはサンプルに由来する相対的な量比をグラデーションで表示します。

サンプル1は他の3つとは
異なった特徴を持つこと
が分かる



化合物に着目すると、
相対的な量比を確認す
ることが出来る。

32

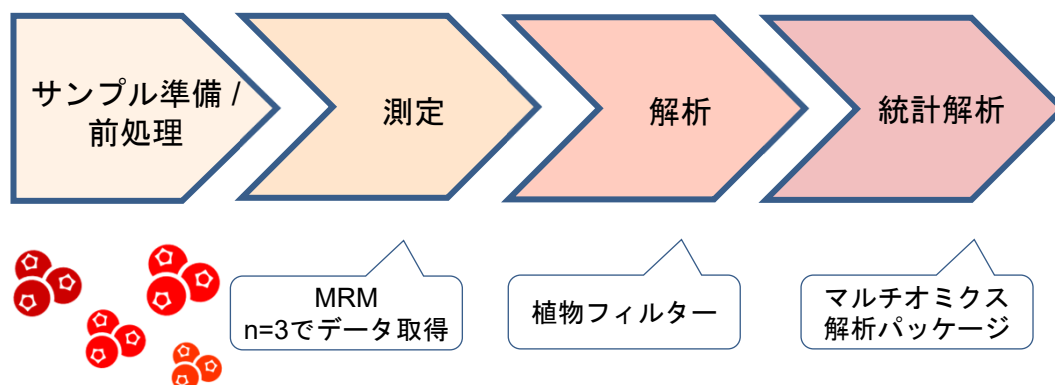
講演の内容

1. メタボロミクスの概要
2. 分析ワークフロー（前処理から多変量解析）
3. 応用事例
4. 違いをみる解析をプラスチックに応用した事例

33

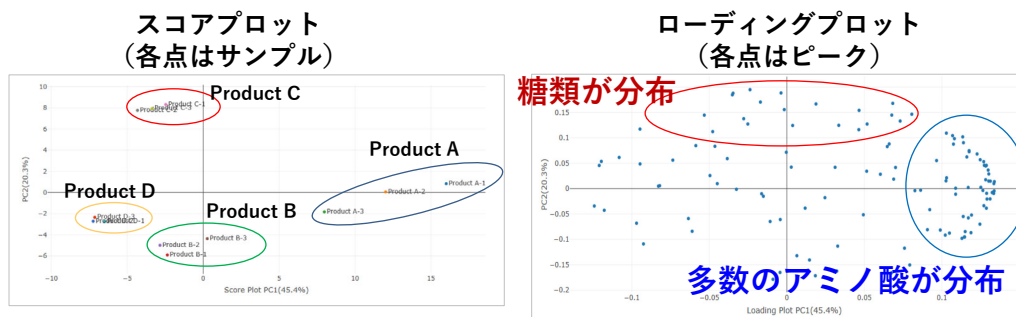
品種の異なるトマトを比較する

サンプル : 4種類のトマト（Product A, B, C, D）
測定 : MRM（Smart Metabolites Database Ver.2のメソッド）
多変量解析 : 主成分分析（マルチオミクス解析パッケージ）



34

品種の異なるトマトを比較する（代謝物編）



Product Aはアミノ酸、Product Cは糖類の含有量が多い傾向が確認された

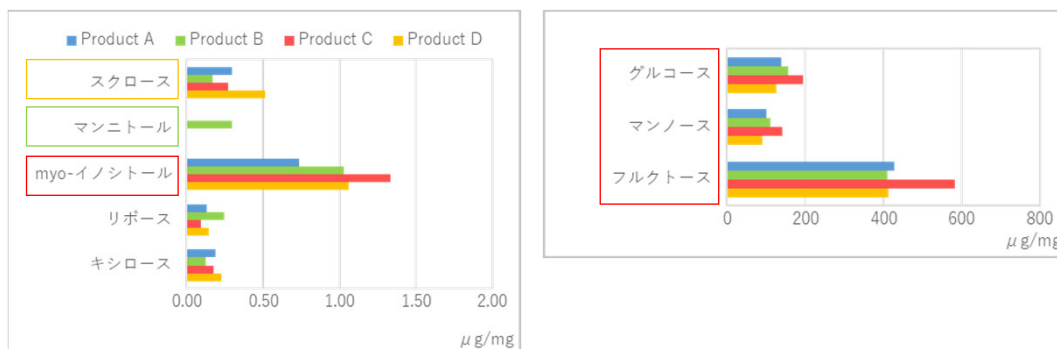


糖類に違いがあるが、定量などは難しいため、糖類専用メソッドにて詳細を確認する。

35

品種の異なるトマトを比較する（糖類編）

- 糖類専用分析メソッドにて各品種における作物中の濃度を算出したところ、糖の違いを確認することができました。



Product B・・・マンニトール

Product C・・・myo-イノシトール、グルコース、マンノース、フルクトース

Product D・・・スクロース

36

講演の内容

1. メタボロミクスの概要
2. 分析ワークフロー（前処理から多変量解析）
3. 応用事例
4. 違いをみる解析をプラスチックに応用した事例

37

プラスチックフィルムの分析例

目的：食品包装などに使用されていた
5種類のポリプロピレンフィルムを比較します



サンプル1
A社使用
無色透明
食品包装用途



サンプル2
B社使用
無色透明
食品包装用途



サンプル3
A社使用
カラー印刷有
食品包装用途



サンプル4
A社使用
無色透明
食品包装用途



サンプル5
A社使用
無色透明
箸袋

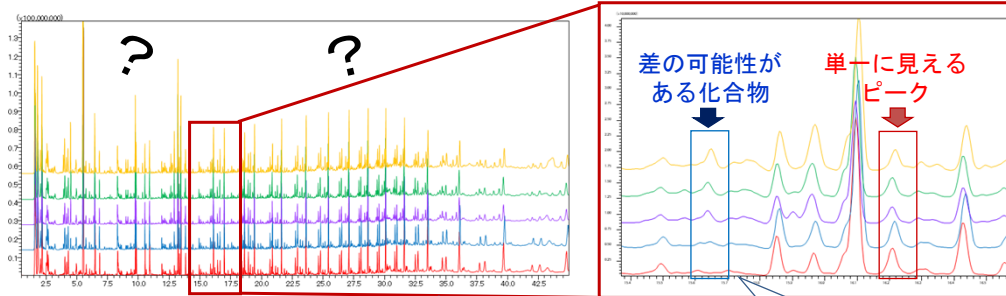
装置：熱分解GCMS
分析：Scan
サンプル量：0.2 mg
繰り返し分析回数：n = 3
解析ソフトウェア：AnalyzerProXD

38

どのピークが差を表している？



- 無数のピークが出現し差にあたる成分を見つける作業は労力が必要
- 微小なピークは大きなピークに埋もれてしまうことがある



全てのピークを考慮にいれて評価する？
(情報量が多く、処理することが出来ない。)

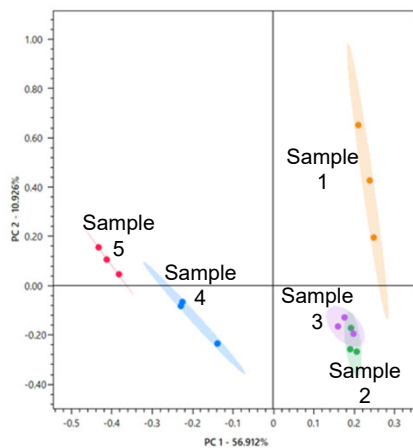
1つのピークだけに
注目する？
(他のデータが違い
を表していることは
無いのか？)

39

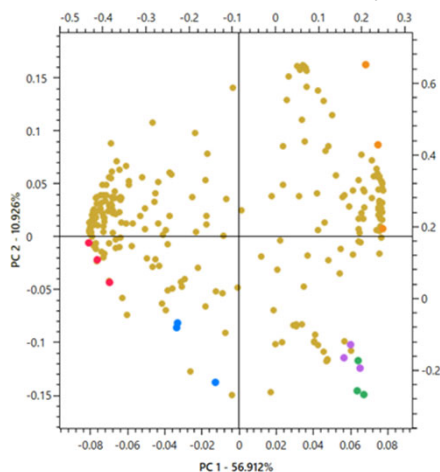
PCAで3つ以上のサンプルを比較する

PCAでは、違いを大きく表すための重み付けをして合成し、視覚的に読み取れる2次元のグラフに投影します。

スコアプロット (サンプル)



ローディングプロット (化合物)



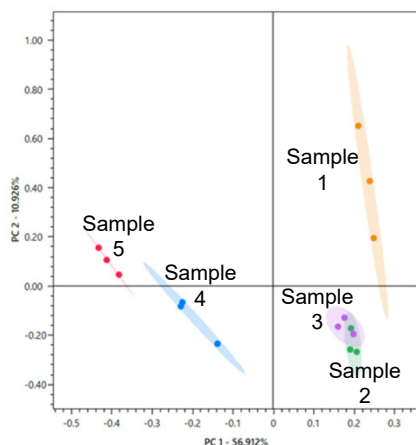
40

3つ以上のサンプルの類似性や差を見つける

スコアプロットからサンプルの特徴を読み取る。

PC1, PC2はどの程度の情報を投影しているかを表す

スコアプロット (サンプル)



横軸に注目すると、
Sample 1, 2, 3、Sample 4、Sample 5
に分けられる。
さらに縦軸に注目すると、
Sample 2と3が似ていることが分かる。

なぜそのような分かれ方をしているの
かはローディングプロットで確認する

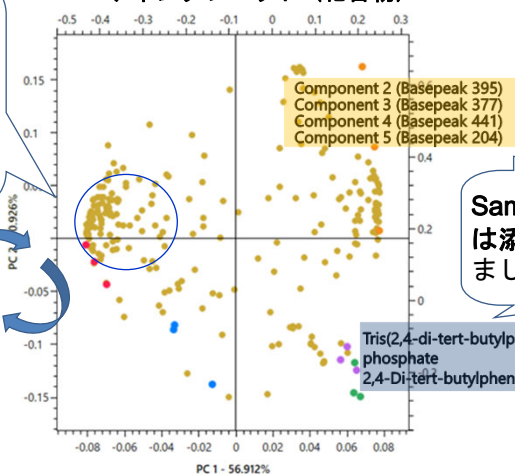
41

原因となる化合物を探す

ローディングプロットから原因となる化合物の情報を 読み取る。

横軸が負の成分は、
Sample 5と4で面積値
が大きい傾向にありま
した。
これらは、全てのサン
プルから共通して見
つかるピークでした。

ローディングプロット (化合物)



Sample 2,3とSample 1
は添加剤等に違いがありました

42

メタボロミクスをもっと身近に、そして簡単に。

- **メタボロミクス（生命現象の原因をみつける）**
 - ・ **Smart Metabolites Database**により、簡便に測定を行うことができる。
 - ・ 夾雑成分の多いサンプルでもMRM分析により、**代謝成分を正確に検出**することができる。
 - ・ 糖類専用のメソッドにより、これまで困難だった**糖類の定性・定量**が可能になる。
 - ・ **Peakintelligence for GCMS**では、AIによる波形処理で、パラメータを設定することなく熟練者のピーク抽出を再現。
- **多変量解析（違いをみつける解析）**
 - ・ **マルチオミクス解析パッケージ**を用いると、初心者の方でも簡単に主成分分析や階層的クラスリング解析によって差異を探索できる。

43

本ご紹介した内容

- メタボロミクス前処理ハンドブック



- アプリケーションニュース
「Smart Metabolites Databaseを用いたトマト品種間の多変量解析」



- アプリケーションニュース
「熱分解-GC-MSを使用した食品包装フィルムの差異解析」



44

