

Technical Report

統計解析ソフトによるマウス脳の脂質解析

Lipid analysis of the mouse brain by statistical-analysis software

緒方是嗣¹、松本結実¹

Abstract:

MSイメージングにおいては、分析によって得られる膨大なデータをいかに効率よく解析できるかが重要な要素となります。iMScope専用の表示解析ソフト「Imaging MS Solution解析」は、ピーク検出、PCA (Princial Component Analysis)、HCA (Hierarchical Cluster Analysis)、ROI (Region of Interest) 解析を実装しており、簡便にその解析を実現します。マウス脳切片のMSイメージングデータについて、ピーク検出からPCA解析を行なって、脳の構造と一致する3種類の分布特徴をもつ脂質をグルーピングしました。また、これらの脂質の分布について、顕微鏡画像との重ね合わせ機能を使うことで、視覚的に分布の局在を示すことができることを示しました。

Keywords: MSイメージング、統計解析、Imaging MS Solution、PCA、HCA、ROI、重ね合わせ

1. MSイメージングとデータ解析

MSイメージングとは、切片上の二次元空間を、細かく連続的にレーザー照射することによって発生したイオン化物を、質量分析計でマススペクトルとして収集し、得られたデータから m/z 、位置情報、信号強度を使って平面的に画像化したものです。

得られるマススペクトルは、生体組織を直接分析しているために数百から数千を超える非常に多くのピークが含まれる複雑なパターンを持っており、通常分離精製後に分析して得られるマススペクトルとは大きく異なります。さらに、そのひとつひとつが二次元の位置情報を持っているため、扱うべき情報量は膨大です。これを人の手で処理していくことは現実的ではないため、自動で解析できるツールが必要となります。そこで、統計解析の手法を採用して、有意なMSイメージングデータを簡便に抽出できるようにソフトウェアを開発しました。

イメージング質量顕微鏡iMScopeは、一分析あたり最大250×250ピクセルのマススペクトルを取得することができ、その解像度も最小5 μmピッチと非常に細かい領域を分析をすることが可能なシステムです。この精密なデータを解析するために、iMScope専用の表示解析ソフト「Imaging MS Solution解析」を提供します。

2. 表示解析ソフト「Imaging MS Solution解析」

イメージング質量顕微鏡iMScopeで使用される表示解析ソフト「Imaging MS Solution解析」では、ピーク検出、PCA (Princial Component Analysis)、HCA (Hierarchical Cluster Analysis)、ROI (Region of Interest) 解析を実装し、面倒な解析手法の条件設定なしに、その多彩な解析の実現を可能にしました。

PCAは、Princial Component Analysisの略称で、主成分分析を指します。マススペクトルからピーク行列を抽出し、その m/z イメージのうち、特徴的なパターンを主成分として見つけ出す解析法です。特異的な分布をとる m/z 値を見出し、その類似の分布をとる m/z 値も併せて見出します。

HCAは、HCA (Hierarchical Cluster Analysis) の略称で、階層的クラスタ分析を指します。 m/z イメージをそれぞれ比較することで、類似の m/z イメージをクラスタ(グループ)としてまとめる解析法です。クラスタ間の距離の遠さ(不整合係数)を使って、クラスタごとの類似性を評価することができます。樹形図や不整合係数情報を表示させて、類似性を確認することができます。

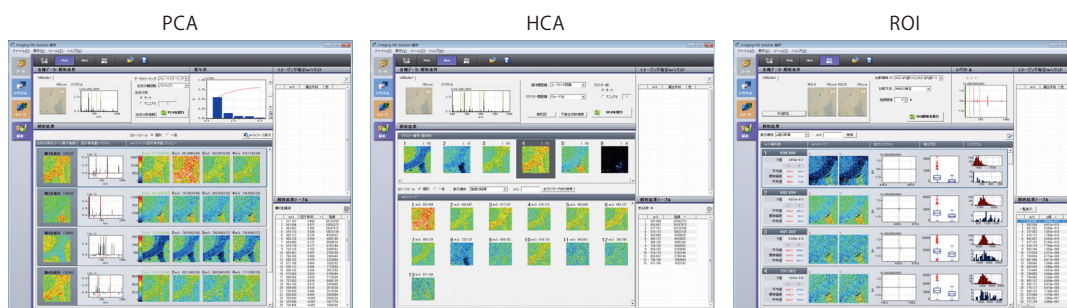


Fig. 1 データ解析ソフトウェア

「Imaging MS Solution解析」つづき

ROI解析は、ひとつのイメージングデータにおいて、指定した複数のROI (Region of Interest)間またはROI内外の強度差の検定を行なうものです。「イオン強度差が無い」という仮説に対して、「強度差がないかもしれない」という確率をp値で示します。値が小さいほど、強度差をもつ可能性が高いといえ、それぞれのROIに指定した領域に特徴的に分布する m/z 値をもつ分子があると言えます。例えば、同一組織内の癌部/非癌部に対し、別々のROIを設定し、ROI解析を行なうことで、癌部に特異的な分子を検出できるといった解析が可能になります。

本レポートでは、マウス脳の切片に対し、iMScopeを用いてMSイメージングを行なったデータに対して、脂質関連の分子を中心にPCA解析の実例について報告します。

3. マウス脳切片に対するMSイメージング解析

3-1. 分析条件

サンプル	: マウス脳切片 (約10 μm 厚)
スライドガラス	: ITOガラス (Sigma Aldrich #578274)
測定装置	: iMScope
マトリックス	: DHB(スプレー)
ピクセル数	: 110 \times 213
空間分解能	: 50 μm
測定範囲 (m/z)	: 650.000 ~ 1000.000
測定時間	: 7 min
ピークピック	: 自動(100本) マトリックスピーク一部除外
PCA解析	: 自動(デフォルト設定)

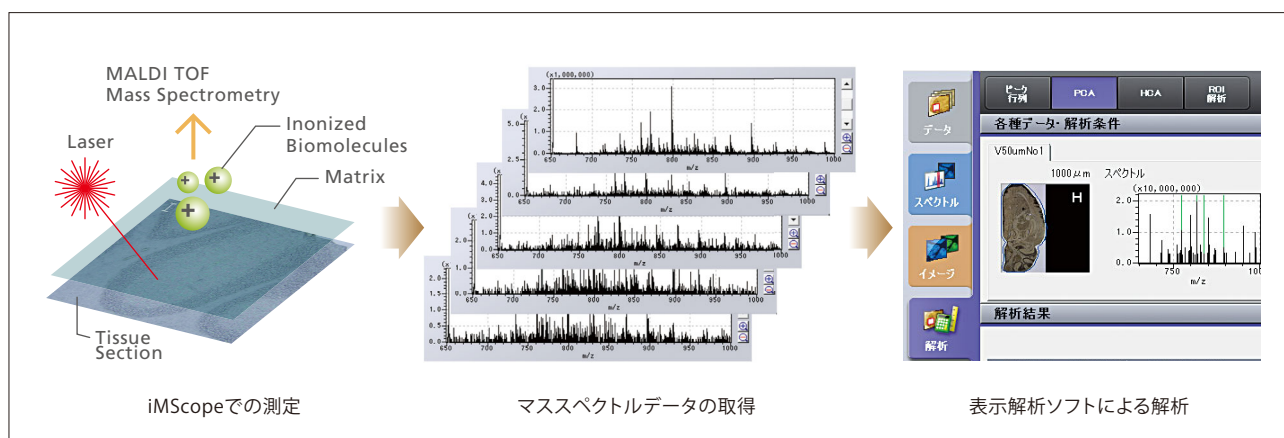


Fig. 2 解析のフロー

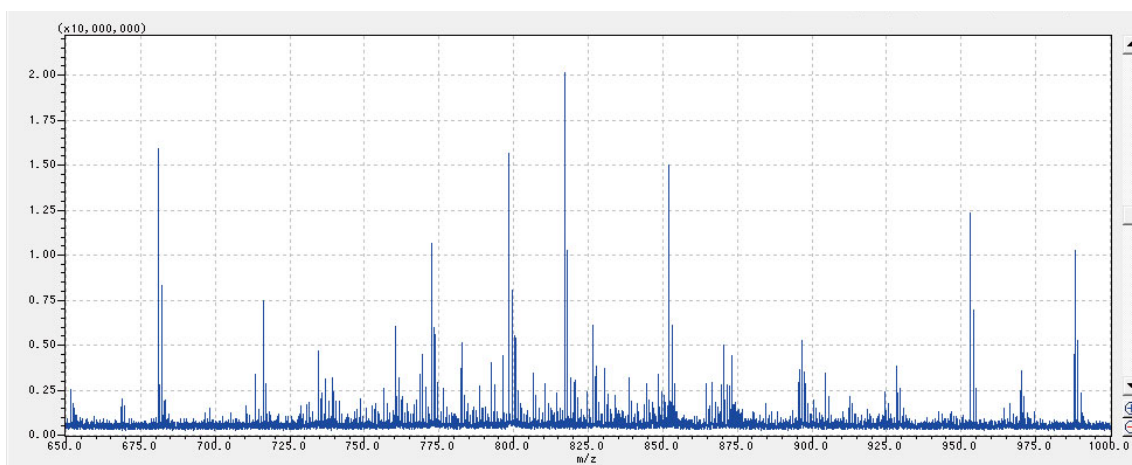


Fig. 3 全領域のマススペクトル(最大)

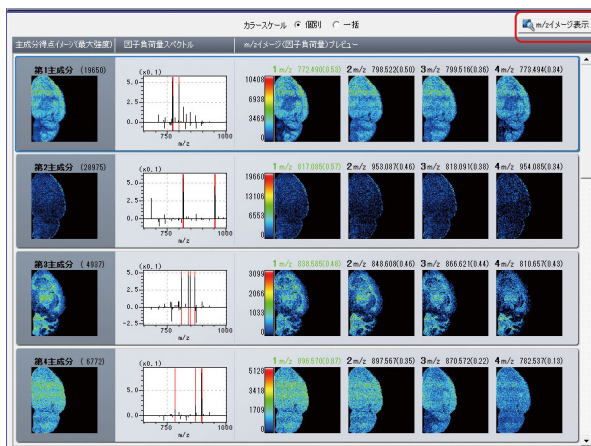


Fig. 4 PCA解析結果画面

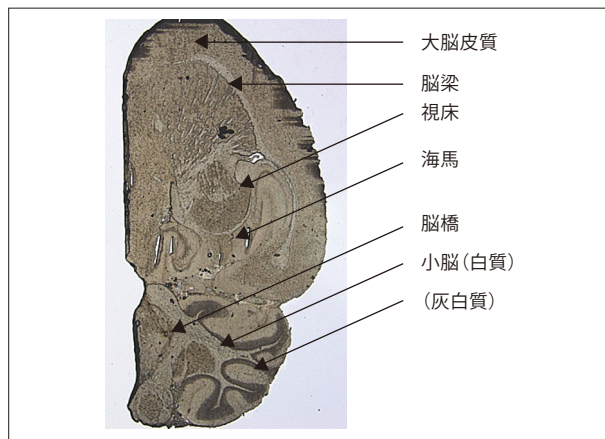


Fig. 5 顕微鏡画像増と各部名称

3-2. MS分析とイメージング解析

実験は3-1の分析条件とFig. 2のフローに従って進めました。マウスの脳切片の全領域に対してMS分析を行って、表示解析ソフト「Imaging MS Solution解析」で、ピーク検出、PCAまで自動で行ないました（ピーク本数のみ100本に変更。デフォルトは50本）。ピーク検出は、「最大強度」を選択し、全領域で最も高いピークを検出するように設定しました（Fig. 3）。PCAで得られた主成分数は37で、Fig. 4には、上位4成分を表示しました。スクロールバーを下げることで37成分すべてを確認し、顕微鏡画像（Fig. 5）との相関が高くみえた3成分を選択しました。m/zイメージ表示（Fig. 4右上囲み）により、各成分に含まれる分子（m/z）のイメージをそれぞれ確認し、その中から各グループ6例を表示しました（Fig. 6）。

その分布パターンと、Fig. 5の顕微鏡画像の名称と対応させると、グループAは、脳梁、脳橋、視床、小脳白質に特徴的に分布。グループBは、小脳灰白質、海馬に特徴的に分布。グループCは海馬、大脳皮質（特に前頭葉付近）に特徴的に見られています。

データベース検索（Human Metabolome Database (ver.3.0)）により、いずれのグループの、それぞれのm/zは、どれもPE（フォスファチジルエタノールアミン）かPC（フォスファチジルコリン）の一種である推定されました。

今回は実施していませんが、MSMS分析を行うことで分子種を特定することができます。iMScopeには、分析済み領域に対し、レーザー照射点を半ピッチずらして設定できるモードがあり、分析後にすぐに解析を行えば、同じサンプルのほぼ同じ領域を分析することができます。

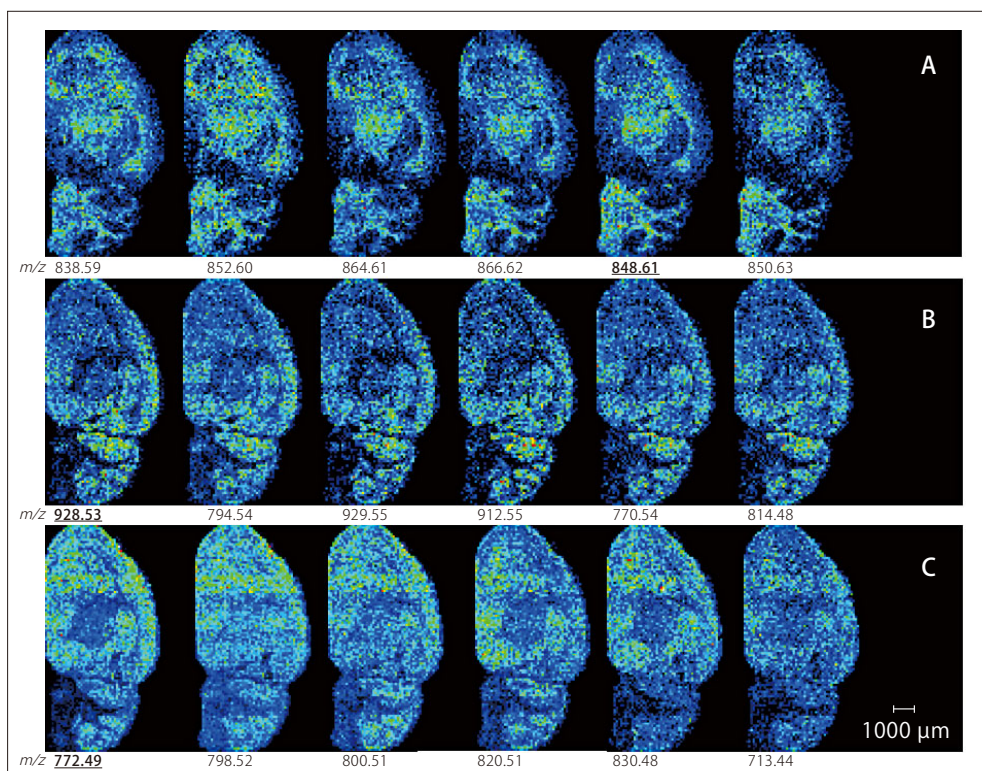


Fig. 6 PCA解析により得られたグループ例

3-3. 顕微鏡画像との重ね合わせ

PCA解析で各領域に特徴的な局在を示した分子種を顕微鏡画像と重ね合わせて表示しました (Fig. 7)。前節3.2において、MSイメージング像 (Fig. 6) から、顕微鏡画像 (Fig. 5) に対応する部位名称の推定をおこないましたが、顕微鏡画像に重ね合わせたイメージを得ることで、各領域での局在をより視覚的に、かつ直接的に示すことができました。今回、50 μm の空間分解能での解析を行ないましたが、脳梁や海馬の非常に細い構造をもつ部位に対しても、当該分子の分布と顕微鏡像が良く一致していることが見て取れます。

「Imaging MS Solution解析」では、光学画像と m/z イメージの重ね合わせや複数の m/z イメージの重ね合わせ表示機能を搭載しており、細かな位置調整無しに、簡便にかつ正確に重ね合わせ表示ができます。また、MSMS分析のデータについても同様に重ね合わせ可能です。重ね合わせたイメージは、「イメージのコピー」により、簡便にお使いの文書ソフトやプレゼンテーションソフトに貼り付けることができます。

サンプルご提供: 浜松医科大学 医学部

4. 最後に

以上のように、データ解析におけるサポートツールとして、「Imaging MS Solution解析」では、PCAをはじめとする3種類の統計解析とピーク検出を自動で行なうことができるような機能をご用意いたしました。また、ユーザー自身による設定で、より詳しい解析も可能となります。

イメージング質量顕微鏡iMScopeでは、今回ご紹介した表示解析ソフト「Imaging MS Solution解析」だけでなく、MSイメージングの分析を簡便に行うための「Imaging MS Solution分析」も併せて提供されます。最大250×250ピクセルの分析を約3時間で行うことができる分析条件が設定可能な本システムは、最大データ量での解析を行った後でさえ、お客様にストレスのないデータ解析を実現させます。

顕微鏡と質量分析計を併せ持つiMScopeによるMSイメージング専用ソフトウェア「Imaging MS Solution」は、解析対象の観察から、質量分析、統計解析まで、お客様の「知りたい」を広くサポートします。

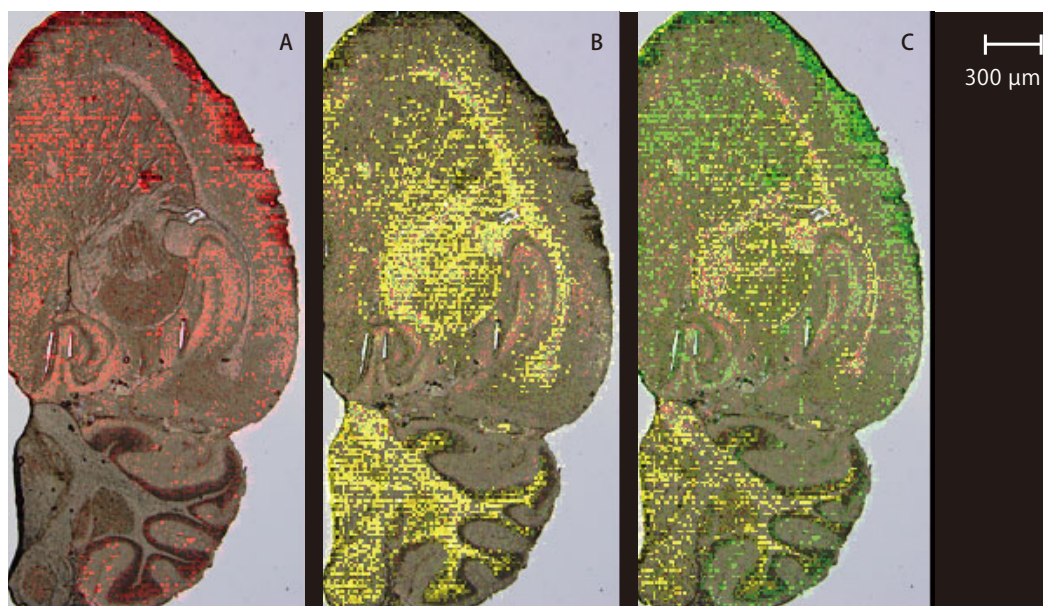


Fig. 7 光学画像との重ね合わせ表示
A: m/z 772.49, B: m/z 848.61, C: m/z 928.53

iMScopeは、医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。治療診断目的にはご使用になれません。研究用途にのみ使用可能です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行: 2013年4月
© Shimadzu Corporation, 2013