

メタボローム分析において 気をつけること

馬場 健史

1 はじめに

近年の次世代シーケンサーや質量分析などの分析装置、技術のめざましい発展により、DNA、mRNA、タンパク質、代謝物の包括的な解析が行えるようになり、それぞれの総体（オーム）を解析するオミクス（オーム解析）が盛んに実施されている。従来の対象を限定した「仮説検証型アプローチ」とは異なり、オーム解析は総体を解析することにより全体像を把握できることから、データ駆動型の「非仮説的アプローチ」が可能である。これにより、代謝、シグナル伝達、遺伝子調節など、生体内の複雑な相互作用を系統的に解析することで、生命現象全体の動的な理解が可能になる。さらに、病因解明、個別化医療、創薬ターゲットの探索、薬効・毒性の精密解析、食品の品質評価、作物の品質改良、環境、生態系の変化の解析などに貢献することが期待されている。本稿ではオーム分析の中でもっと幅広い性質の成

分を分析対象とし、多種の前処理や分析の手法が用いられており、コンタミネーション、キャリーオーバーの問題が多く発生している「メタボローム分析」について記載する。

代謝物の包括的な解析を目的とするメタボローム解析（メタボロミクス）は、一般的な代謝物分析とは大きく異なる。メタボローム分析は、使用する分析方法でできるだけ多くの成分を一度に分析する多成分の一斉分析になる。そのため、どの成分にフォーカスして分析条件を設定するかによって得られる結果が変わってくることから、分析条件の最適化が容易でなく、分析系の開発者ごとに分析条件が異なり多数の分析系が存在している。また、一つの分析系ですべての解析対象をカバーすることができないため、複数の分析系を使用する必要がある。異なる分析系で同質のデータ取得が困難なため、複数分析系で取得されたメタボロームデータの統合解析が未だ進んでいないのが現状である。また、できるだけ多くの

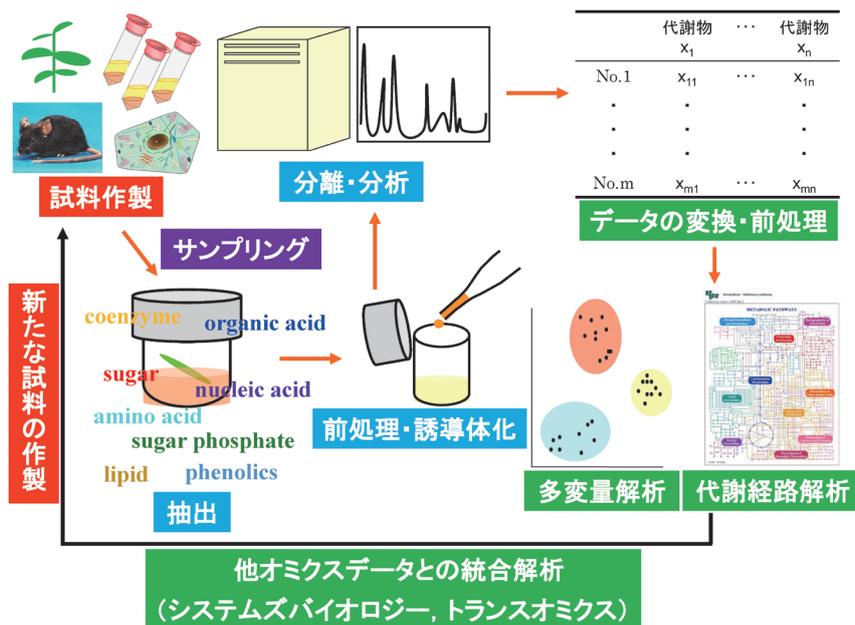


図1 メタボロミクスのプロセス

成分を分析することを目的とするため前処理は基本的に行わないため、多成分が混在するいわゆる汚い試料の分析になる。そのため、共溶出が恒常的に発生し、質量分析におけるマトリックス効果等の問題が頻発する。また、高濃度、低濃度成分の同時分析による飽和・感度不足についても問題となる。分析装置への汚染（キャリアオーバー）が頻発し、どのように再現性を確保するのかについても重要な課題である。さらに、データ解析においても、多成分の一斉分析であるため非常に複雑になる。分析装置から得られる生データから、データ解析用のマトリックスデータへの変換が必要であり、その際の成分の同定は時間と労力がかかる大変な工程である。微量成分については、しばしば、偽陽性、偽陰性が問題になる。また、解析者の個人差が発生するため、データ解析の再現性をどのように確保するかについて注意を払う必要がある。

メタボロミクスの重要プロセスは、試料調製、機器分析、データ解析の三つになる（図1）。前述のとおり多様なメタボローム分析系が存在し、解析対象に合わせたサンプル調製方法、分析方法、データ解析方法の選択が必要である。本稿では、今回の入門講座の企画の主題である「分析におけるコンタミネーション・キャリアオーバー対策」を中心に、メタボローム分析において気をつけることについて、試料調製、機器分析、データ解析ごとに解説する。

2 試料調製における注意点

メタボローム分析においては、できるだけ多くの成分の一斉分析を目的とするため、分析対象成分が決まっている場合のような前処理は基本的には行わず、溶媒抽出したものをそのまま分析に供することが多い。そのため、分析におけるコンタミネーション、キャリアオーバーが頻発する。最近では、多検体の連続分析が必要な場合、ランタイムを延ばすために、溶媒分画や固相抽出などによる前処理により夾雑成分きょうざつせいぶんを除去することが試みられている。本項では「コンタミネーション・キャリアオーバー対策」に関係ない部分もあるが、メタボローム分析の試料調製における注意点、高品質のメタボロームデータを取得するためのポイントについて解説する。

メタボローム分析における試料調製は、メタボロームデータの品質を大きく左右する工程といっても過言ではない。目的とする結果を得るための高品質のデータを取得するために最も重要なのが、高品質の試料を準備することである。まず、個体差の少ないサンプルを準備すること、すなわち、飼育、栽培、培養等における試料調製の均一化、再現性の確保である。また、解析する対象生物に適したサンプリングの方法と時期（タイミング）も代謝物の変動に大きな影響を与えることから重要にな

る。次に、サンプリングの後の酵素不活性化処理（クエンチング）が非常に重要になる。代謝反応は秒単位で起こることから、サンプリングの後代謝変動が起こらないように即時に凍結または有機溶媒等による酵素の不活性化処理が必要である。また、抽出効率の再現性確保のために、均一な試料の破碎も重要になる。次の抽出、前処理において、分析対象の代謝物に適した手法の選択を慎重に行う必要がある。その際、選択する分析方法によって手法の選択が大きく変わってくるので注意が必要である。また、代謝物はそれぞれの含有量が大きく異なることから、解析する生物試料、分析対象代謝物に応じたサンプル量をキャリアオーバー、再現性等を確認しながら設定する必要がある。そのため、いきなり本分析を行うのではなく、予備実験を十分に行い諸条件の検討を行うことを強くお勧めする。

試料の破碎、抽出、前処理などについて、市販の装置が利用できるようになってきているので、再現性を向上させるために是非有効活用いただきたい。また、最近では、ロボットを用いた試料調製の自動化についても試みられているので、それらが一般化されることによりスループット、再現性が向上し、高品質のビッグデータの取得ができるようになることが期待される。

3 機器分析における注意点

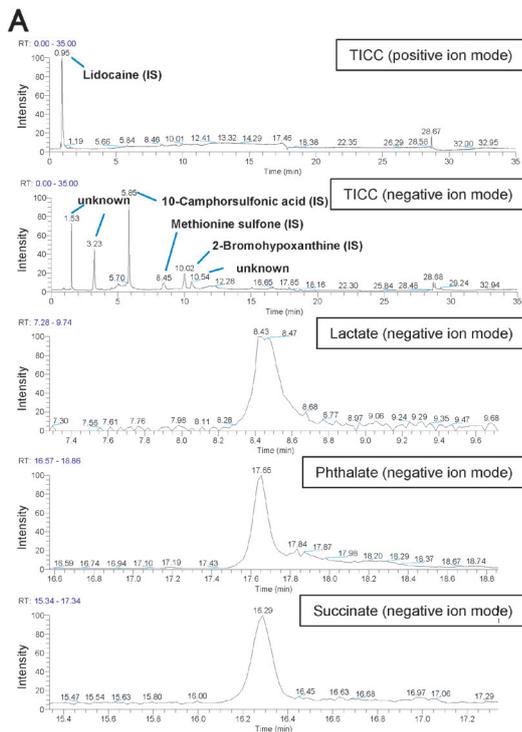
次に、メタボローム分析の機器分析における注意点、高品質のメタボロームデータを取得するためのポイントについて「コンタミネーション・キャリアオーバー対策」に関係ない部分も含めて解説する。

メタボローム分析の機器分析において最も重要なことは、分析する試料、そして分析対象となる化合物に応じて適した分析方法を選ぶことである。そのために、使用する分析方法・分析条件で、どのような化合物が、どのように分析できるかを十分に理解した上で好適な手法を選択することが重要である。分析手法の選択においては、標準品混合物や予備試料で実際にどのようなデータが取れるか、データの品質や再現性も含めて確認することをお勧めする。まずは濃度の低いサンプルを用いて予備実験を実施していただきたい。いきなり濃度の高いサンプルを注入するのは装置の汚染につながるため厳禁である。特にキャリアオーバーについては、注意深く確認しキャリアオーバーが発生している場合は、試料の注入量、オートサンプラーの洗浄溶媒、洗浄回数等について検討し、低減のための対策を実施する必要がある。メタボローム分析においては低濃度の成分も含めて同時に検出しようとするために高濃度の試料を注入する機会が多いことから、すべての化合物についてキャリアオーバーを完全に防ぐことが難しい場合がある。その場合は、分析対象化合物ごとにキャリアオーバーがどの程度発生しているか把握し、許容範囲を設定して、実分析に臨むこ

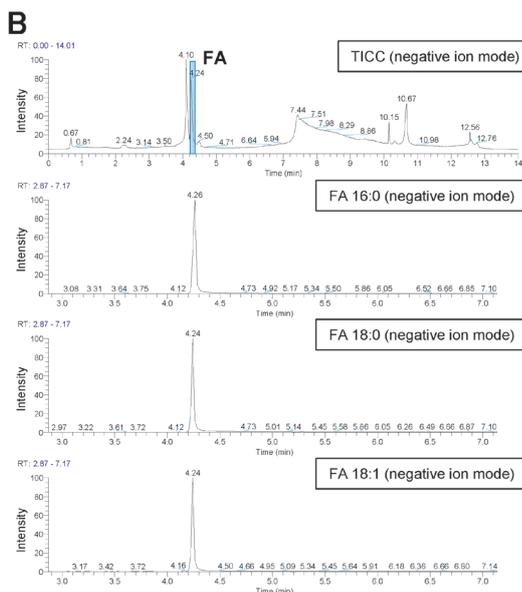
とになる。さらに、実際に分析を行う前に、使用する装置の状態（溶媒、カラムも含めて）に問題がないか、標準品混合物や quality control (QC) サンプル等を用いて必ず確認をしていただきたい。データを取り終えた後に装置の不具合のため目的とするデータが取得できていなかったことを知ることは非常に悲しいことである。

実際に分析を行う際に、プロシージャブランク試料（測定試料を添加せずに抽出、前処理操作を行った試料）も必ず作製して分析することをお勧めする。分析装置だけでなく、器具、試薬、溶媒、空气中に浮遊する粉塵、微粒子に由来する成分も多数検出されることから、それ

らの特定に有用である（図2）。また、内生成分の有機酸や脂肪酸等がプロシージャブランク試料からも検出されることから、定量値算出の際にそれらの存在量を把握しておくことは必要である。分析途中でデータを確認しながら分析を進めることは、問題があれば途中で分析を停止して原因を解決後に再分析することができ、貴重な試料を無駄にしないためにも重要な点である。確認するポイントとしては、ポンプ圧、内部標準物質の感度、各化合物の保持時間やピーク形状、異性体の分離、キャリアオーバーなどになるが、何度か分析を実施することにより、変化が起こりやすい化合物を把握できるように



No.	Hydrophilic metabolites	Sample peak area		Procedure BLK / Human plasma (%)
		Procedure BLK	Human plasma	
1	3-Aminoisobutanoate	9.E+07	7.E+07	137
2	Citramalate	7.E+07	8.E+07	97
3	N-Methylethanolamine	6.E+07	5.E+07	130
4	p-Toluenesulfonate	5.E+07	3.E+07	154
5	Lactate	2.E+07	7.E+08	2.8
6	FA 8:0	1.E+07	2.E+07	64
7	Phthalate	1.E+07	1.E+07	92
8	p-Aminohippurate	9.E+06	7.E+06	131
9	3-Methyladipate	7.E+06	7.E+06	109
10	FA 6:0	3.E+06	3.E+06	87
11	FA 7:0	3.E+06	3.E+06	74
12	Butyrate	2.E+06	5.E+06	42
13	Succinate	2.E+06	2.E+06	119
14	Urocanate	2.E+06	2.E+06	113
15	Oxalate	2.E+06	3.E+06	70
16	Sebacate	2.E+06	2.E+06	97
17	Propionate	1.E+06	5.E+06	26
18	2-Propylglutarate	9.E+05	7.E+05	132



No.	Hydrophilic metabolites	Sample peak area		Procedure BLK / Mouse Liver (%)
		Procedure BLK	Mouse Liver	
1	FA 16:0	1.E+08	1.E+09	11
2	FA 18:0	9.E+07	3.E+08	31
3	FA 14:0	1.E+07	8.E+07	13
4	FA 18:1	5.E+06	1.E+09	0.46
5	FA 18:2	3.E+06	7.E+08	0.35
6	FA 16:1	2.E+06	1.E+08	1.8
7	FA 22:0	6.E+05	1.E+06	65
8	FA 24:0	5.E+05	1.E+06	46
9	FA 20:1	3.E+05	7.E+07	0.40
10	FA 22:1	2.E+05	3.E+06	7.5
11	FA 18:3	2.E+05	5.E+07	0.38

図2 プロシージャブランク試料で検出される化合物
A: 親水性代謝物分析系; B: リビドーム分析系

なるため、それらを指標として、判断基準を設定することをお勧めする。

分析機器によって異なるが、クロマトグラフのサンプル導入部、質量分析計のイオン化部など汚染部位の定期的なメンテナンスは必ず実施していただきたい。そのため分析した試料、分析数を記録し、装置のメンテナンス、消耗品等の交換目安を決定することをお勧めする。ただし、分析する試料によって装置の汚染状況は異なるので、従来通りのデータの品質が担保できない場合には速やかにメンテナンスを実施いただきたい。すなわち、取得データの品質を常に確認しながら分析を行うことが重要である。

4 データ解析における注意点

最後に、メタボローム分析データの解析における注意点、高品質のメタボロームデータを取得するためのポイントについて「コンタミネーション・キャリアオーバー対策」に関係ない部分も含めて解説する。

メタボローム分析データの解析において最も重要であるのは、クロマトグラム、マススペクトルなど生データを常に見る癖をつけることである。メタボローム分析で

は、非常に多くの成分を一斉に解析することになる。装置付属のソフトウェアから排出されたデータをそのまま使用しがちであるが、多数の異性体、同重体が混在し共溶出が頻発するメタボローム分析のデータは、時間と手間を要するがそれぞれの化合物の保持時間、ピーク形状、異性体分離について問題がないか目視により確認することが重要である。目視での確認をすることにより、自らが取得したデータが信頼のおけるものか、その品質を理解した上でその後のデータ解析を行うことができる。精度の高い面積値算出のためにクロマトピークの確認、修正も手作業になり大変であるが実施することをお勧めする。化合物アノテーションの際においても、ソフトウェアに頼らず、マススペクトルやクロマトグラフィにおける溶出時間などの生データの情報などを十分確認して総合的に判断することが重要である。このほか、プロシージャブランク試料のデータを確認し、キャリアオーバーを含む装置由来の成分だけでなく、器具、溶媒や環境由来の成分の情報についても加味してデータ解析を進めていただきたい(図2)。ベースラインの取り方、ピークの認識の閾値など個人差が出てくる部分があるので、再現性のある一貫した解析作業の基準の設定

表1 メタボローム分析におけるコンタミネーション、キャリアオーバー対策

<p>【試料調製】</p> <ul style="list-style-type: none"> ➢分析対象に適した抽出、前処理方法の選択が重要！ •様々な抽出、前処理方法があるので、実試料を用いた予備検討により抽出効率、再現性などを確認して最適な手法を選択する。 ➢試料量の最適化が重要！ •多すぎるとコンタミネーション、キャリアオーバーが発生、少なすぎると検出できない。 •実試料を用いた予備検討を行い、対象成分の分析に適したサンプル量を決定する。
<p>【機器分析】</p> <ul style="list-style-type: none"> ➢分析対象に適した分析方法の選択が重要！ •多数の分析手法があるので、実試料を用いた予備検討を実施し分析対象成分に適した分析方法を選択する(試料調製法の選択と最適化と並行して行う)。 ➢キャリアオーバーのチェックも予備検討で事前に実施！ •実試料を用いた予備検討で、キャリアオーバーを確認しながら試料の注入量やオートサンプラーの洗浄溶媒、洗浄回数等の最適化を実施する。 •キャリアオーバーがどうしても避けられない場合は、分析対象成分ごとにキャリアオーバーがどの程度起きているか把握し、許容範囲を設定する。 ➢プロシージャブランク試料の分析は必須！ •測定試料を添加せずに抽出、前処理操作を行った試料を必ず分析し、コンタミネーション成分(器具、溶媒由来成分)を把握する。 ➢分析装置の定期的なメンテナンスを実施！ •分析した試料、注入量、分析数を必ず記録するとともに、装置の状態を常にモニタリングする。 •装置の状態を指標に(分析する試料も加味して)、カラム等の消耗品の交換を含め装置のメンテナンスの目安を決めて装置を運用する。
<p>【データ解析】</p> <ul style="list-style-type: none"> ➢コンタミネーション成分を加味したデータ解析が必要！ •キャリアオーバーを含む装置由来の成分だけでなく、器具、溶媒や環境由来の成分の混在についても理解した上で、定量値算出の際に減算するなどコンタミネーション成分を加味したデータ解析を実施する。 ➢キャリアオーバーの成分への対応も必要！ •どうしても避けられないキャリアオーバーが発生する場合は、分析対象成分ごとに許容範囲、定量値算出の際の対応策を検討した上でデータ解析を実施する。

が必要になる。また、変数変換、データベース ID の整理など解析目的に適したデータの整理も重要である。また、データプロセッシング、変換方法についても解析目的に適した解析手法、ソフトウェアの選択も解析結果に影響を与えることから慎重に検討が必要である。

コンタミネーション、キャリアオーバーの影響を受けるメタボローム分析においては、データ解析においても、それらの影響を十分認識した上で実施することが重要になる。

5 ま と め

コンタミネーション、キャリアオーバーの影響を避けることが難しいメタボローム分析においては、機器分析だけでなく、試料調製やデータ解析においてもいろいろと注意をしなければならない。多成分の一斉分析、それも分析対象を定めないノンターゲット分析においては、どの成分が夾雑化合物か、それらをどのように判別するかは困難を極める。また、キャリアオーバーについても、どこまでを許容するか判断が難しい。いずれにしても、実試料を分析する前に、十分な予備検討を行い、試料量の決定を含む試料調製、機器分析、データ解析におけるそれぞれの手法、プロセスの管理、チェックポイント、判断指標を精査しておくことが、高品質のメタボロームデータを取得し目的とする結果を得るために重要

である。メタボローム分析は、分析対象が広くまた多数であるために標準となる手法が構築されることはなかなか難しい。それぞれの実施者が取得データの品質、再現性に基づいて、目的とするデータが取得できているかを確認しながら最適な手法を選択し、運用していくことが必要である。そのためにも、実施者がメタボローム分析の技術およびその特徴をよく理解することが重要である。メタボロミクスの各種技術が詳細なプロトコールとともに解説されている良書「メタボロミクス実践ガイド」があるので、是非参考にさせていただきたい¹⁾。本稿により、高品質のデータを取得できるメタボロミクスユーザーが増えることを期待する。

文 献

- 1) 馬場健史, 平山明由, 松田史生, 津川裕司編: “メタボロミクス実践ガイド”, 実験医学別冊, (2021), (羊土社).



馬場 健史 (BAMBA Takeshi)

九州大学生体防御医学研究所 (〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1). 大阪大学大学院工学研究科博士後期課程単位取得退学, 博士 (工学). 《現在の研究テーマ》メタボロミクスの技術開発と応用. 《主な著書》“メタボロミクス実践ガイド”, (羊土社). 《趣味》テニス, お酒, 麻雀.
E-mail : bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

『ぶんせき』再録集 vol. 1 出版のお知らせ

ぶんせき誌の過去記事の有効利用の一環として、『ぶんせき』再録集 vol. 1 が出版されました。2011 年から 2020 年まで、10 年間分の〈ミニファイル〉の記事が詰まっています。

下記 10 章からなり、それぞれ 12 から 14 の話題が集められています。

1. 実験器具に用いられる素材の特徴, 2. 分析がかかわる資格, 3. 顕微鏡と画像データ処理, 4. 最新の web 文献検索データベース, 5. ポータブル型分析装置, 6. 分析化学と材料物性, 7. 分析化学者のための多変量解析入門, 8. 土壌分析, 9. サンプリング, 10. 前処理に必要な器具や装置の正しい使用法。

本書はアマゾンオンデマンド出版サービスを利用して出版した書籍ですので、書店には並びません。アマゾンサイトからのネット注文のみとなりますので、ご注意ください。詳しくは「ぶんせき」誌ホームページをご確認ください。