

様式博3

博士学位論文

題 目

医薬品製造プロセスモニタリングのための
近赤外分光分析技術の開発

担当指導教員名 森田 成昭 印

申請年月日 2020年12月16日

申請者専攻名 先端理工学専攻

氏名 西井 崇 印

大阪電気通信大学大学院

目次

1. 要旨	1
2. 序論	3
2.1. 近赤外(NIR)分光法と医薬品製造工程	3
2.1.1. NIR法の歴史	3
2.1.2. 医薬品製造における品質試験の現状	3
2.1.3. In-line分析の意義とPAT	4
2.1.4. PATツール	5
2.2. 開発されたNIR装置について	8
2.2.1. 原薬プロセスモニタリング用として開発されたNIR/IR一体型分析計	8
2.2.2. 経口固形剤の高速ハイパースペクトラルカメラ(Compovision)	9
2.3. 解析理論	11
2.3.1. スペクトル前処理	11
2.3.2. ケモメトリックス	14
2.4. 参考文献	24
3. NIR/IR一体型分析計を用いたアルコール発酵過程のエタノールのモニタリング	26
3.1. 緒言	26
3.1.1. アルコール発酵について	27
3.2. 材料及び方法	28
3.2.1. 試料および試薬	28
3.2.2. NIR/IR一体型分析計	28
3.2.3. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)	29
3.2.4. スペクトル解析ソフトおよび解析方法	30
3.2.5. 実験操作	30
3.3. 結果及び考察	31
3.3.1. エタノールとグルコースのバンドの帰属	31
3.3.2. アルコール発酵過程におけるバンドの挙動	33
3.3.3. 多変量解析を用いたアルコール発酵過程の解析	35
3.4. 結論	39
3.5. 参考文献	40
4. NIR/IR Moving-Window ヘテロ2次元相関法の開発と医薬用原薬製造を想定した反応プロセスへの応用	41
4.1. 緒言	41
4.2. NIR/IR Moving-Window ヘテロ2次元相関法の原理	42
4.3. 材料及び方法	45
4.3.1. 試料および試薬	45
4.3.2. 実験装置および解析ソフト	45

4.3.3. 実験操作	45
4.4. 結果及び考察	46
4.4.1. 混合糖でのアルコール発酵過程におけるバンドの挙動	46
4.4.2. HPLCによるグルコースとフルクトースの相対量の時間変化	47
4.4.3. 主成分分析(PCA)による解析結果	47
4.4.4. NIR・IRヘテロ2次元相関分光法を用いた解析	48
4.4.5. 時間分解NIR・IRヘテロ2次元相関分光法を用いた解析	49
4.5. 結論	51
4.6. 参考文献	51
5. 近赤外分光法を用いたフィルムコーティング被膜量の簡易定量法と生産立ち上げへの応用	52
5.1. 緒言	52
5.2. 材料及び方法	53
5.2.1. PCAを用いた簡易定量法	53
5.2.2. サンプル製造	54
5.2.3. 測定装置及び測定方法	54
5.3. 結果及び考察	54
5.4. 結論	56
5.5. 参考文献	57
6. ハイパースペクトラルイメージングによる錠剤全数の主薬含量及びフィルムコーティング被膜量の同時測定	58
6.1. 緒言	58
6.2. 材料及び方法	59
6.2.1. サンプル製造	59
6.2.2. NIRハイパースペクトラルイメージング(NIR-HSI)システム	60
6.2.3. データ分析	60
6.3. 結果及び考察	61
6.3.1. スペクトル解釈	61
6.3.2. API濃度のPLSRモデル	62
6.3.3. コーティング被膜量のPLSRモデル	63
6.3.4. API濃度及びコーティング被膜量のイメージング	64
6.4. 結論	66
6.5. 参考文献	67
7. 総括	68
8. 本研究の投稿論文、発表実績及び受賞歴	70
謝辞	74

略語一覽

ATR : Attenuated Total Reflection

CLS : Classical Least Square

CQA : Critical Quality Attribute

CV : Cross-Validation

FDA : Food and Drug Administration

GMP : Good Manufacturing Practice

HSI : Hyper Spectral Imaging

IR : Infrared

ILS : Inverse Least Square

LV : Latent Variables

MLR : Multiple Linear Regression

MSC : Multiplicative Scattering Correlation

NIR : Near-infrared

PAT : Process Analytical Technology

PCA : Principal Component Analysis

PCR : Principal Component Regression

PLSR : Partial Least Squares Regression

QbD : Quality-by-design

QRM : Quality Risk Management

RMSE : Root Mean Squared Error

RSD : Relative Standard Deviation

R^2 : Coefficient of Determination

SNV : Standard normal variate

UP : United States Pharmacopeia

UPLC : Ultra-Performance Liquid Chromatography

2DCOS : Two Dimensional Correlation Spectroscopy

1. 要旨

近年、医薬品規制調和国際会議の働きかけにより、新薬の開発と承認審査が世界的に共通のベースに基づいて行われるようになってきている。これを踏まえて、製剤開発や製造段階に至るまでを見通した品質保証システム（Total Quality System）の確立が望まれている。こうした国際化の中で、医薬品の品質保証を科学的根拠に基づいて柔軟に展開していくことが求められている。そこで、製造プロセスを設計、解析し管理するための有力な方法として Process Analytical Technology（PAT）が注目されている。医薬品の製造現場において、原料や中間体の品質パラメータや製品の機能特性を製造プロセスの進行中にタイムリーに計測することが望ましい。これより従来から汎用されてきた抜き取り検査では限界が生じることから、PAT のツールとして非破壊で非接触のまま測定可能な近赤外（Near-infrared：NIR）分光法等の活用が進められている。PAT は医薬品製造の原薬合成から製剤化まで活用されており、その測定対象は液体から粉体、錠剤まで多岐にわたることから、状況に合わせて適切な装置を導入する必要がある。加えて、NIR 分光によって得られるスペクトルデータは他の機器分析データと比べて、信号が重なりあった複雑な波形となる。よって、従来の解析手法では化学的意味を明確に示すことが困難となり、分析精度が不安定になるため、その吟味が求められる。よって、新しい NIR 装置をプロセスモニタリングに導入するためには、ハード（装置）面とソフト（解析手法）面の両方発展が不可欠になる。

そこで本研究の目的は新しく開発された NIR 分光装置とスペクトル解析法を組み合わせ、医薬品の反応プロセス及び製造プロセス中に非破壊・非接触かつ高精度で化学成分をモニタリング可能な PAT 手法の革新提案を行うこととした。

第 3 章では医薬品の原薬合成プロセスのモニタリングを想定し、世界で初めて開発された NIR と赤外（Infrared：IR）領域を同時に同じスケールで測定可能な NIR/IR 一体型分光計とバンド選択を行うデータ解析手法であるヘテロ 2 次元相関分光法（ヘテロ 2DCOS）を組み合わせることでアルコール発酵過程のエタノールの高精度な定量を行った。しかし、生成するエタノールの変化と消費される糖のスペクトルのバンド挙動が似通っており、NIR/IR ヘテロ 2DCOS でそれらの成分を明確に分離する事は困難であることが明らかとなった。そこで、第 4 章ではアルコール発酵過程における混合成分の独立した定量を目的として、新しいスペクトル分析法「NIR/IR Moving-Window ヘテロ 2 次元相関法」の開発を行った。本手法をさらに複雑なアルコール発酵過程のモニタリングに応用することで、その有用性について検証した。第 5 章では、経口固形製剤の錠剤フィルムコーティング工程において、簡易的にコーティング被膜量を半定量する技術を考案した。一般的に NIR 装置でコーティング被膜量を定量する場合、検量線を作成する必要があるが、簡易定量法では検量線の作成の必要が無くなる。本手法を実生産規模のプロセスパラメータの設定に応用させ、最適化に貢献可能か検証した。第 6 章では医薬品の最終製品の全量モニターを想定した高速ハイパースペクトラルカメラを用い、実際の医薬品製造速度で錠剤全数の主薬含量及びコーティング膜厚の測定が可能か検証を行った。本装置は従来のスポット移動型の NIR イメージング装置とは異なり、高速で広範囲測定が可能だが、スペクトルの波数分解能が低く、得られるデータ量はわ

ずかとなる。すなわち低品質なスペクトルデータであってもケモメトリックスを応用することで、化学情報を最大限に引き出すような解析手法を検討することが重要となる。

以上のように、本研究では原薬合成から錠剤化までの医薬品製造プロセスにおいて、新たに開発された NIR 装置を適用するプロセスに合わせて解析手法まで提案し最適化することで、従来得られなかった情報を引き出すことを可能にした。さらに、得られた情報から製品品質の重要因子を特定し、適切な制御方法を検討すると共に、製造工程にフィードバックすることで医薬品の品質向上に貢献できることを示した。

2.1. 近赤外(NIR)分光法と医薬品製造工程

2.1.1. NIR法の歴史

分子分光学の分野において、800 nm から 2500 nm (12500 から 4000 cm^{-1}) の領域は近赤外 (Near Infrared : NIR) 領域と呼ばれる¹⁾。最初に化合物の NIR スペクトルが Akley と Festing によって報告されたのは 1881 年のことであるから、NIR 分光学は長い歴史を持っている。NIR 分光学が 1 つの独立した分光学分野として確立されたのは 1970 年代前半、農産物の品質研究に従事していた農学者 (K. Norris) の研究が土台となっている^{2,3)}。Norris は重回帰分析法を用いることによって小麦粉の水分を定量することが可能であることに気付いた。これが NIR 法の再評価のきっかけとなり、NIR 法に重回帰分析法を組み合わせる NIR-重回帰分析法が食品、ポリマー、薬品、石油化学などの分野において非破壊分析法として次々と広がっていった⁴⁻⁶⁾。NIR 法の応用を飛躍的に発展させた重要な研究として、Jobsis による医学応用の研究である。彼は 1977 年にネコやヒトの頭、イヌの心臓に NIR 光を照射し、透過光を検出することに成功した¹⁾。

NIR 法を発展させたもう 1 つの原動力は、70 年代のケモメトリックス法の確立である。ケモメトリックス (chemometrics) とは化学 (chemistry) と計量学 (metrics) を合わせた造語で、「数学的手法や統計的手法を適用し、最適手順や最適実験計画の立案・考案を行うとともに、科学データから得られる情報を最適化する」と定義される⁷⁾。このケモメトリックス法を最初に取り入れた分光法が NIR 法である。スペクトルからの情報抽出に統計的方法を用いるというアイデアは、保守的な分光学者にはなかなか受け入れられなかったが、分光学者らの努力により 80 年代に一般の分光学者の間にも次第に受け入れられるようになった。現在ではケモメトリックス法を用いてスペクトルを解析するという NIR 分光学で確立した方法が、赤外 (Infrared : IR)、ラマン、テラヘルツ分光の分野においても盛んに応用されるようになってきた⁷⁻⁹⁾。

90 年代から医薬品製造においても NIR 法が活用されてきたが¹⁰⁾、2010 年以降、飛躍的にその需要が高まった理由として連続生産技術の導入が挙げられる¹¹⁾。これまで医薬品製造は単位操作をバッチ単位で繰り返すバッチ製造方式が中心であったが、連続生産方式を導入するためには各工程中の品質を連続的にモニタリングする必要が生じる¹²⁾。そのツールとして NIR 法は他の分析法よりも非常に有用なツールとされてきた。また、連続生産のみならずバッチ生産においても、製剤の重要品質に直結する製造パラメータを特定することは非常に重要視されており¹³⁾、NIR 法は重要なプロセス解析工学 (Process Analytical Technology : PAT) として確立されてきた¹⁴⁾。

2.1.2. 医薬品製造における品質試験の現状

近年、原料・資材の管理を含む製造工程における管理及び最終製品 (原薬又は製剤) の品質試験を相互補完的に行うことで、医薬品の品質を確保するという管理戦略に従った品質管理が実施されることが主流となりつつある¹⁵⁻¹⁷⁾。この管理戦略は品質リスクマネジメント (Quality Risk Management : QRM) に従って立てられるが、重要品質特性 (CQA: Critical Quality Attribute)、すなわち要求される製品品質を保証するために必要な特性又は性質であり、適切な限度内、範囲内、分布内であるべき物理学的、化学的、生物学的、微生物学的特性又は性質を特定することが必要である。次いでその CQA が定められた範囲や限度、分布内に入ることを規格試験、工程内試験や様々な方策を用いて保証することにより、最終的に医薬品品質が確保されることになる。他の要素としては、開発段階での医薬品の十分な特性解析 (規格及び試験

方法の多くは、これを基盤としている) や製造工程の評価、更にその検証、照査、原料・資材及び製造工程の管理等といった製造・品質管理が挙げられる。

規格及び試験方法は、試験項目や規定された方法で試験したときの規格値／適否の判定基準(数値で表した限度値又は範囲)を示したものとして定義される。代表的な規格試験として、米国薬局方(United States Pharmacopeia : UP)及び日本薬局方の規定では1バッチ(又はロット)において、通常100~300万錠製造される錠剤から、適宜サンプリングした10~30錠の試料を代表試料として採用し、含量を測定することで、工程における錠剤の含量均一性を保証している^{18,19)}。具体的な含量分析手法として、クロマトグラフィー法などによる破壊分析で含量を算出し、その標準偏差で含量均一性が保証されている。しかし、この手法ではバッチ全体の約0.001%のみを監視していることになる。統計学的には妥当な手法であるが、全体の含量を保証しているとは言いがたく、変動を検出することは困難である。また、クロマトグラフィー法を用いる場合、以下のような問題点もある。

- ① 超高速液体クロマトグラフィー(Ultra-Performance Liquid Chromatography : UPLC)の進歩により、分析時間は大幅に圧縮されたものの分析頻度を上げるためには機器の増設や、人員も必要になる等のコストが必要である。
- ② 溶媒などを使用する破壊分析であることから、at-lineによる工程中で分析監視することが困難である。

2.1.3. In-line 分析の意義と PAT

医薬品製造にあたり、従来のGMP(Good Manufacturing Practice)の思想では製造プロセスをバリデーションすることでプロセスが完成し、構築されたプロセスでは、手順通りに製造を進めれば、同じ品質のものが製造できるとされている¹⁵⁾。しかしながら、実際に生産を進めると同じ工程・手順でも、原料・機械・製造環境などの複合的な要因が品質に影響を及ぼすこともあり、同等の品質を担保するには高い技術力が要求される。このような課題に対してプロセスの改善又は頑健なプロセスをどのように構築するか追求すると、多くの場合はプロセスの科学的理解を深めることに終着する。プロセスで何が起きているのかを理解することができれば、品質に影響する製造パラメーターや管理項目を操作及び設定することが可能になる。プロセスの理解を助ける要因として中心をなすのがPATである。米国食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)よりPATに関するガイダンスがGuidance for industryとして発行され、“リアルタイムな計測により、医薬品の製造工程の設計、分析、管理を行い、最終的に製品の品質を保証するシステム”と定義している¹⁴⁾。当然ながら、PATは製造プラントの分析精度を上げるだけでなく、基礎段階、プロセス設計、生産段階のすべての開発過程で反応やプロセスの理解を進め、プロセスを改良することを最終目的としている。

現在の製造プロセス管理は使用される分析機器と製造ラインとの位置関係を基準に、①off-line、②at-line、③on-line、④in-lineに分類される²⁰⁾。

- ① **off-line 管理**：製造ラインからサンプリングされた検体が製造ラインから離れた分析室に送られ、その特性が分析される。分析結果によって、温度や圧力など製造プロセスの条件が制限される。このようにサンプリングされた検体を基にした品質管理法は、統計的品質管理と言われる。ただし、慣行の化学分析では分析結果が得られるまでに時間を要するため、その間の品質管理は不可能な状態である。また、品質管理には未だに熟練者の経験と勘に頼るところが残される。熟練者の数が年々減少し、さらに多品種少量生産が求められるようになってきている昨今、品質管理の課題が重要視されている。
- ② **at-line 管理**：分析機器を製造ラインの近くに置き、製造ラインからサンプリングされた検体を対象に分析が行われる。この段階では、サンプリングされた検体を分析機器へ移す過程については、人手による off-line 管理に比べ検体の運搬に要する時間を短縮できる。しかし、製造ラインの近くで分析を行うため、複雑な分析には向かない。
- ③ **on-line 管理**：自動サンプラーによってサンプリングされた検体は、自動的に分析機器に送られて自動分析される。at-line 管理に比べ、分析結果を得るまでの時間が大幅に短縮される。分析に提供された検体は破棄するか、再度ラインに戻す方法がとられる。ラインに戻すには非破壊分析である必要がある。on-line 管理の段階では、分析機器の出力を基にして閉ループによるプロセス制御も可能となる。
- ④ **in-line 管理**：製造ラインの中に組み込んだセンサーによって、製造ライン上の対象物の品質が直接分析される。サンプリングの作業を必要としないため、on-line より迅速な分析が可能となる。また、時定数の短い分析器の場合は、全数検査も可能となり、プロセスの精度を格段に向上することができるが、この場合は非破壊分析が必須となる。

2.1.4. PAT ツール

PAT ツールはリアルタイムな計測が求められており、in-line または on-line による分析が求められている。例えば、工程の途中途中でサンプリングをして分析を実施し、反応や、合成操作など問題ないか確認する。そこで中間体の規格を設け、適合しないものは、処理を中断することができ、このような工程内分析により、中間製品もしくは製品の段階で異常を検知することが可能になる。従来から温度計、圧力計、液面計などの物理特性や pH 計などの化学的特性から異常を検知する技術はあったが、それだけでは工程を理解する上では情報が少ないことが多い。先に述べた HPLC を例にとっても、サンプリングから測定結果が得るまでに、迅速に測定しても 30 分程度は要するため、タイムラグの間に工程が進行することでアクションを打つことが困難となる。一方、In-line 分析装置を用いると、反応や工程操作中連続的あるいは間欠的にオンタイムで工程分析が可能となり、異常が生じた場合はいち早くそれを検知することができるので、何かしら対応を打つことが期待できる。

PAT に用いられる各分析方法について比較したものを Table 1.1 に記載する。X線回折 (XRD)、HPLC、

質量分析 (MS) 等の破壊分析では高精度に測定できるものの、各分光分析と比較して in-line での分析には適さないと言える。紫外可視分光法 (UV-Vis) はモル吸光係数が高く、希釈操作が必要な点、固体測定が難しい点から実用は難しい。以上の点から NIR 法をはじめとした分光分析は In-line 分析の有効なツールであると考えられる。

Table 1.1 分析方法の比較

測定手法	測定	サンプル前処理	非破壊分析	非接触	測定精度	得られる情報
HPLC	off-line	必要	×	×	◎	分離した単一成分
UV	off-line	必要	×	×	◎	電子遷移
XRD	off-line	必要	×	×	○	結晶構造
MS	off-line	必要	×	×	◎	分子量
IR	in-line at-line	場合により必要	○	×	○	分子の基本振動
ラマン	in-line at-line	場合により必要	○	○	○	
NIR	in-line	不要	◎	◎	△	分子振動の倍音及び結合音
テラヘルツ	in-line	不要	◎	◎	△	分子間相互作用

さらに詳細な比較を行うため、各分光分析法の特徴を Table 1.2 に示した。IR 法は従来から医薬品の主に定性的な分析試験に使用されてきた²¹⁾。本研究にも採用しているが、原薬合成の反応液中に直接プローブを挿入することで IR スペクトルをリアルタイムに In situ 測定可能である²²⁾。反応の過程で、出発物質や反応物質、反応中間体、目的化合物、副生成物がどのように増減しているかをピーク強度の変化から解析可能となる。しかしながら、IR 法は遠隔測定できないため自由度やメンテナンス面に劣点がある。また、IR 法に使用する ATR (Attenuated Total Reflection) 技術はプリズムに接触した極表面 (数十 μm) の吸収を測定する方法であり、測定感度が低いことからキャンを繰り返して S/N 比を稼ぐ必要がある。

IR 法と比較される分光法としてラマン分光法がある。ラマン分光法は光ファイバーが使用可能、非接触サンプリングなどモニターに適した性質を持ち合わせている²³⁾。近年、検出器や光学素子の性能向上に伴い、透過ラマン分光システムやプロセスモニタリング用の広域フォーカスプローブを備えたラマン分光システムが開発され、今後の応用が期待されている^{24,25)}。ラマン分光は試料によりラマン散乱光の他に蛍光が検出され、分析感度が著しく低下してしまうことがあるが、これは励起波長の選択により回避できることがある。

テラヘルツ (THz) 分光法はで用いられる 0.1~10 THz (30 μm ~3mm) の周波数領域は NIR 法と同様に多くの物質で透過性が高く、かつ NIR 法と同様に化合物に特徴的な指紋スペクトルの取得が可能である。製剤研究における適用例としては、錠剤内部からの反射波が検出器に届く時間差からフィルムコーティング錠のコーティング被膜量を求める研究が報告されている²⁶⁾。また、THz 分光法は結晶多型を識別す

ることに適している。THz 帯は分子種が同じでも分子間の相互作用である水素結合などが異なる場合、スペクトルが変化するのでこれらを容易に識別することが可能となる²⁷⁾。しかしながら、測定時の安定性や、装置が汎用されておらず高価な点などで課題がある。

最後に NIR 法は、分子の基準振動を主に測定する IR 法と異なり、振動の倍音や結合音による吸収を測定する方法である。NIR 領域における光の吸収係数は IR 領域におけるそれよりも数桁小さいため、試料の奥深く (mm~cm 単位) まで透過する。さらに、試料を希釈する必要なく測定可能であるため、リアルタイム in-line モニタリングに適したツールであり、医薬品製造(特に経口固形製剤)の湿式造粒工程^{28,29)}、乾燥工程³⁰⁾の評価において有効であることが示されている。また、検出器の発展によりここ 10 年間で装置の小型化や、高速イメージング装置の開発などが積極的に進んでいる。しかしながら、解析方法としてはまだ一般化された方法が確立されておらず、装置やサンプルに合わせたスペクトル解析の選択が重要となり、運用面での技術的難易度は高いと言える。

Table 1.2 各分光分析法の特徴

各分光法	長所	短所
IR	<ul style="list-style-type: none"> ・基準振動に基づく ・高感度 	<ul style="list-style-type: none"> ・遠隔測定が困難(>5 m) ・水の影響が大きい ・サンプリングシステムが必要
ラマン	<ul style="list-style-type: none"> ・遠隔測定が可能(数百 m) ・水の影響を受けにくい ・サンプリングが容易 	<ul style="list-style-type: none"> ・定量法に制約がある ・感度に限界がある ・蛍光による妨害
NIR	<ul style="list-style-type: none"> ・透過性が高い ・遠隔測定が可能(数百 m) ・PLS モデリング ・サンプリングが容易 	<ul style="list-style-type: none"> ・定性分析が困難 ・水の影響が大きい
テラヘルツ	<ul style="list-style-type: none"> ・透過性が高い ・パルス測定可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・定性分析が困難 ・水の影響が大きい ・装置の価格 ・測定の安定性

2.2. 開発された NIR 装置について

2.2.1. 原薬プロセスモニタリング用として開発された NIR/IR 一体型分析計

現在、さまざまな分野で NIR 法が応用されているが、多くの場合 PLS 回帰等の統計的な解析によって検量線が作成される⁷⁾。しかしながら、検量線が持つ化学的根拠の検証や吸収バンドの帰属を十分に行っているとは必ずしも言えない。これが NIR 法は“ブラックボックス”と言われている由縁である。NIR 法を用いて構造化学的な研究を行う際はバンドの帰属や化学的意味を追求する必要性はあるが、定量分析を行うだけであれば統計的方法を用いるのみで問題ないかもしれない。しかし、検量線に採用した波長領域がどのような化学的意味を持つのかを明らかにすれば、その検量線が理論的な根拠を持つことになる。加えて、バンドの帰属を考慮して波長を選択することで、より合理的に精度の高い検量線を作成することが可能となる。しかし、複雑な NIR スペクトルのバンド帰属を行うことは必ずしも容易な作業ではない。NIR バンドの帰属を行う上で、絶対的な手法は未だ確立されていないが、現在までに以下の様な手法が報告されている^{1,20)}。

- ① NIR バンドの実測値をグループ振動数表と比較し、グループ振動を探す^{1,20)}。
- ② 類似分子の NIR スペクトルと比較を行う³¹⁾。
- ③ 温度や pH、溶媒など物質の状態を色々と変化させスペクトルを比較する。
- ④ 分子の特定の箇所にも重水素置換を行い官能基に変化を与える³¹⁾。
- ⑤ 量子化学計算を行う³²⁾。
- ⑥ NIR スペクトルとバンドの帰属が明瞭に行なわれた IR、ラマンスペクトルと比較を行う³²⁾。
- ⑦ 二次元相関分光法による相関解析を行う³³⁻³⁷⁾。

上記のように NIR バンドの帰属を行う手法が存在し、①で大まかな官能基の帰属を行うことができるものの、詳細な帰属までは困難な場合が多い。②、③、④は、反応プロセスの物質に対して、この作業を行ってバンドを帰属するには多くの時間と費用を要してしまう。⑤では、近年の計算ソフト及びハード面の向上によって精度の高い計算が可能になった。しかし、単純な分子での計算は可能であっても、分子間相互作用や複雑な分子に関しては、実測値と完全に一致するとは到底言えない。これらの点を考慮した場合、NIR スペクトルに観測されるバンドは IR 領域に観測されるバンドの倍音や結合音であることから、IR やラマンスペクトルと比較を行う⑥の手法がしばしば有効である。さらに、摂動に対するスペクトル変化に対して⑦の手法を用いることで、NIR スペクトルと IR スペクトル、ラマンスペクトルについて互いがどのような変化をするのかを調べ、比較することができる³³⁾⁻³⁷⁾。しかしながら、比較するためには同じサンプルに対して同じ摂動を加えた個別のスペクトルが必要となるが、吸収強度のレンジが大きく異なる各領域のスペクトルを同じスケールで測定する事は容易ではない。さらに、温度変化や濃度変化などの摂動を与える場合は、測定までの待機時間等で物性が変化してしまうことから、現在までに IR と NIR の両者を同時かつ正確に比較している報告は数少ない。この問題を解決するために、横河電

機株式会社と共同で開発した NIR/IR 一体型分析計を Figure1.1 に示す³⁸⁻⁴¹⁾。この分析計は、世界で初めて同じスケールの吸収強度で NIR スペクトルと IR スペクトルを同時に測定することを可能にした。これにより、NIR バンドの帰属が容易となり、一度検量線を構築さえすれば、以降は安定的にスペクトルが得られる NIR スペクトルのみでモニタリングすることができる。

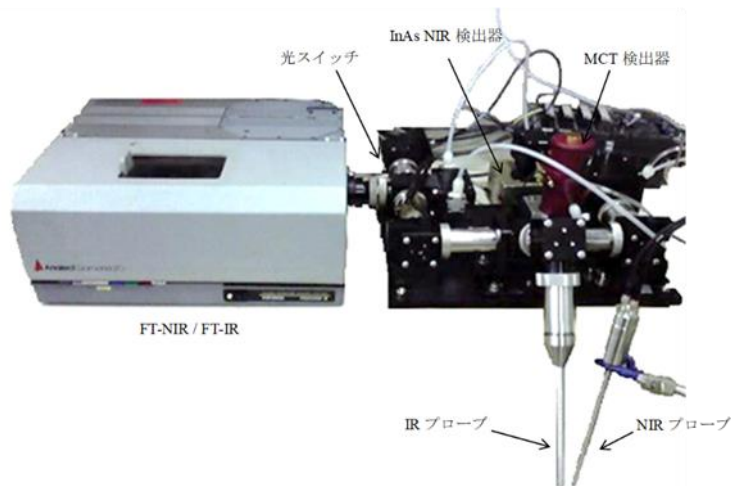


Figure1.1 NIR/IR 一体型分光計

本研究 (第 3 章及び第 4 章) では、本装置で得られた IR スペクトルと NIR スペクトルの情報をどのように最大限に引き出すか検証し、最適な解析方法を開発することを目的としている。そして、スペクトルをいかに解析するかを検証することで PAT の目的であるプロセスの理解 (Process Understanding) に貢献する。加えて、水素結合などの分子間相互作用によって起こるバンドピークのシフト量は、NIR スペクトルでの観測の方が、IR スペクトルでのそれより大きくなることが多い。この特徴を生かし、IR を用いて NIR バンドの帰属を行うだけでなく、IR スペクトルと NIR スペクトルを比較する事で基礎化学においても重要な知見が得られることが期待できる。

2.2.2. 経口固形製剤の高速ハイパースペクトラルカメラ(Compovision)

近年、経口固形製剤のモニタリング方法としてケミカルイメージングの進歩が目覚ましい。ケミカルイメージングは内部の成分情報を可視化できることが大きな特徴である。NIR イメージングの特徴を Figure1.2 に示す。サンプル測定範囲 X-Y をいくつかの区画空間に分割し、各点の NIR スペクトルを測定する方法である。これにより、試料にどのような化学成分が含まれているかという情報だけでなく、試料内のどの部分に特定の成分が分布しているのかという情報も得ることが可能となる。

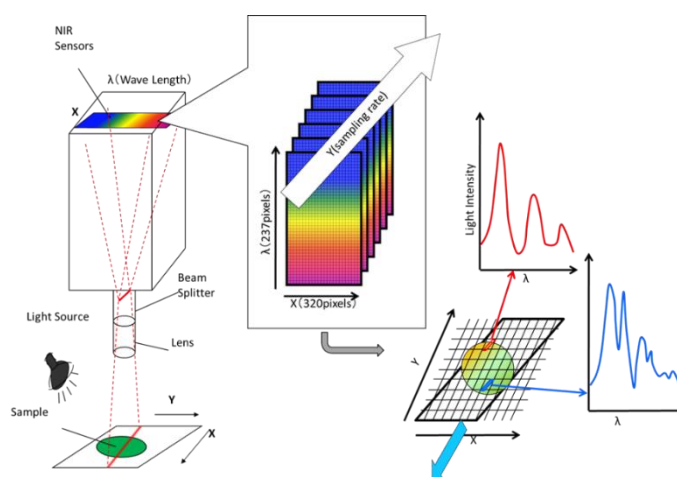


Figure1.2 NIR イメージングの特徴

現在まで、IR、NIR、ラマン、THz、NMR、XRF 分光等を用いた多くのイメージング装置が開発されている⁴²⁾が非破壊・非接触で迅速かつ安定した測定が可能な NIR イメージング装置は特に注目されており、製薬業界でも使用されている⁴³⁻⁴⁵⁾。従来の NIR イメージング装置は、

測定スポットを移動させ各スポットで測定したデータを画像として組み合わせる手法であり、局所領域 (0.1~1mm オーダー) を長時間 (数分~数十分) かけて測定する。時間変化しないサンプルを測定するには本手法でも十分であるが、時間変化するサンプルをイメージング測定することは困難である。このような課題に対し、村山らによってポータブル NIR イメージングデバイスである D-NIR が開発された^{46,47)}。D-NIR はマルチチャンネルディテクタにより直径 8 mm φ の錠剤であれば、1 錠 5 秒程度でイメージングすることを可能にし、錠剤内の成分濃度を高い定量的精度で推定可能にした。このように装置 (ハード) 面で開発が進み、従来測定が困難なサンプルの測定が可能になったものの、まだ分光イメージングに対するスペクトル解析 (ソフト) 面の開発について議論されている例は少ない。

近年、新たな手法として注目されているのが住友電気(株)によって開発された NIR-ハイパースペクトラルイメージング(HSI)システム(製品名:Compovision) である(Figure1.3)⁴⁸⁻⁵⁰⁾。Compovision は 2 次元配列のマルチチャンネルディテクタを有しており、マルチチャンネルディテクタの Y 軸方向には分光スペクトル情報を知り当て、マルチチャンネルディテクタの X 軸方向には撮影対象のラインの空間情報が割り当てられる。これにより、スポット測定する従来法ではなくラインスキャンを可能にすることで、幅 10~27 cm 程度のサンプルステージを毎秒数 cm の速度でスキャン測定可能となった。加えて、nm オーダーの厚さを持つ異なる種類の半導体が交互に積層した量子井戸構造から成る NIR カメラ用センサー材料を新たに開発したことで 1000~2350 nm の長波長領域まで網羅した測定を可能にしている。しかしながら、高速性に優れる一方、スポット型と比較して測定が安定せず、素子間のばらつき補正など高度な処理が必要となり、スペクトル品質が著しく低下する。

本研究では、医薬品の製造速度である 4000 錠/分以上でイメージングすることを試みた。これにより製造ラインのモニタリングはもちろん、原因が不明だった製造工程の不具合の究明することが期待できる。しかしながら、高速測定により得られた大量のスペクトルは波長方向のデータ量は極端に少なく、従来の解析方法をそのまま転用した場合、予測精度に懸念がある。分解能が低いスペクトルデータでも高精度に予測するには、ケモメトリックスを用いて解析を工夫する必要がある。

本研究によって、この課題(ソフト面)を達成できれば、高速 NIR イメージングの on-line プロセスモニタリングを浸透させることが期待できる。今後、医薬品製造で全数検査を可能にすることで製造ロット内及びロット間の傾向を把握することが可能となり、それは PAT の掲げる“工程の理解”に繋がる。

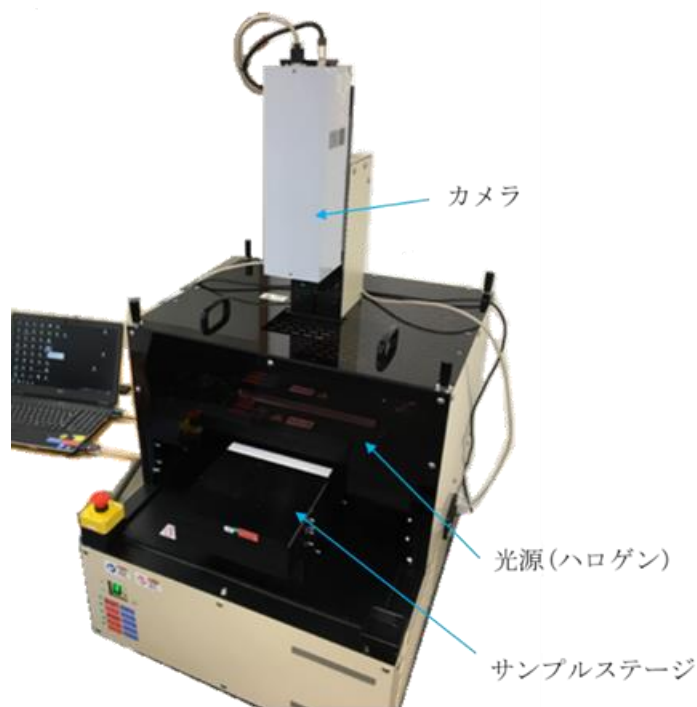


Figure1.3 NIR-HSI システム

2.3. 解析理論

ケモメトリックスにおいて重要な点は「スペクトルのような多変量データから得られる化学情報量をいかに最大化するか」である。現在、スペクトル解析法は多数用いられているが、前述したように最善の方法は測定装置や対象によって異なる。また、スペクトルの前処理と解析を組み合わせた場合、その前処理によって結果は大きく異なってしまうため解析パターンが無数に生まれる。つまり、ケモメトリックスによるスペクトル解析の最大の問題点は、解析方法に任意性が残ることである。ここでは本研究で用いたスペクトル前処理と解析法を記載する。

2.3.1 スペクトル前処理

一般的にスペクトルデータは、分光装置の特性や様々な環境要因による外乱の影響を受けるため、データの前処理を必要とすることが多い。その前処理にはいくつかの方法が存在し、その良し悪しによって解析結果に大きな影響を与えることがしばしば発生する。ここでは本研究で使用したスペクトルデータに関する代表的な前処理について整理する。

・ Kubelka-Munk 変換

Kubelka-Munk 変換は、光が比較的均質な散乱物質を透過するとき以下の(1)式が成り立つことを基に、見かけの反射率 R を(真の吸光度と散乱係数) K/S に変換し、乗算的な散乱効果を補正している¹⁾。

$$K/S = (1 - R)^2/2R \quad \dots (1)$$

・ スムージング(Savitzky-Golay 法)

測定データは必ずノイズを含んでおり、その S/N 比が多変量解析に大きな影響を与える。このノイズには装置の特性による回避できないノイズも含まれるため、S/N 向上のためには前処理が必要不可欠になる。ランダムノイズを軽減するには十分に測定の積算回数を増やすことが効果的だが、それでも軽減できないものに対してはスムージングという手法がよく用いられる。特にスムージングの方法として Savitzky-Golay 法が用いられることが多く、その原理は移動平均法と多項式近似を併用している。^{1,51)}

移動平均法の演算原理は、ある測定ポイントにおける真の値を前後点数の平均値から見積もる手法である。多項式適合法では測定ポイント近傍でスペクトルが多項式曲線で表現できると仮定し、最小二乗法近似を用いて実測スペクトルと多項式曲線を組み合わせて真の値を決定する。本研究ではスペクトル波数 x_i と吸光度 y_i があるとき、その値を中心として近傍を含めた $2m+1$ 点が2次の多項式で記述できると仮定し、補正している。一般的に平均する前後のポイント数が広ければ、ノイズの低減効果は大きくなる。しかし移動平均法によるスムージング処理の問題点は、ポイント数を大きくして効果を上げれば上げるほどバンドの波形がひずむ点である。必要以上のポイント数の増加はスペクトルの形状をゆがめることにつながるため、状況に合わせたスムージングポイント数 m の決定を慎重に行わなければならない。

・差スペクトル

2つの試料 a 、 b の吸光度 A_a 、 A_b の差、 $\Delta A (=A_b - A_a)$ のスペクトルのことを差スペクトルという。差スペクトルは吸収スペクトルのわずかな差や変化を検出するのに有効である。特に差スペクトルは水溶液系における溶媒スペクトルの除去や時間変化スペクトルによるわずかなスペクトルの変動の検出に役立つ。ただし、差スペクトルの計算では測定の S/N 比が十分に良いことが前提となるため、スムージング処理を併用する場合がある。

・微分処理

微分スペクトルとは吸光度 A や光の散乱強度 E の波数 λ による微分値 ($d^n A/d\lambda^n$ $n=1, 2$, 微分値) を波数の関数として表したものである。微分処理には2つの目的があり、1つは重なり合うピークの分離、もう1つはベースライン変動の軽減である。Figure1.4 に2つのバンド (ガウス関数) が重なり合ったスペクトルの1次微分、2次微分、3次微分処理したスペクトルを示す。1次微分 (点線) では、原スペクトルのピークトップの波長位置で $y=0$ と交差していることが確認出来る。2次微分では原スペクトルの2つのピークトップが下向きに現れている。ここで注目したいのは破線が示す様に、1次微分のゼロクロスに対して2次微分の下向きのピークトップと3次微分のゼロクロスの点に差が生じていることである。これは1次微分では単純に傾き0になる点 (見かけ上のピークトップ) を示していることに対し、2次微分や3次微分では重なり合う前のバンドのピークトップの位置を示していることが分かる。よって、2次微分や3次微分を行う方がバンドの分離やピークトップを算出する上で有効であることを示している⁵²⁾。

Figure1.5 にスペクトルに加算的な要因を加えたものと線形的な要因を加えた“いわゆるベースラインシフトした”スペクトルに対して、1次微分、2次微分処理を行ったものを示す。1次微分処理を行うことで、加算的に加わるベースラインシフトを除去す

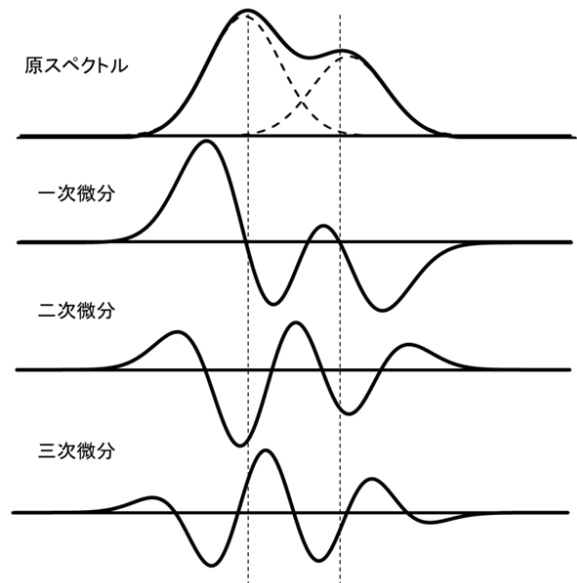


Figure1.4 2つのバンド (ガウス関数) が重なり合ったスペクトルの1次微分、2次微分、3次微分処理したスペクトル

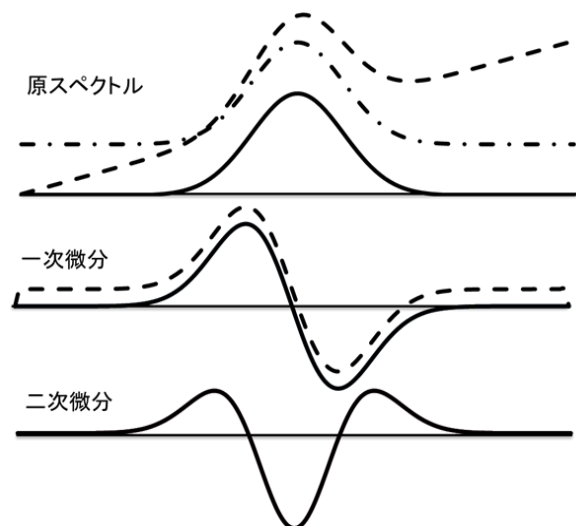


Figure1.5 加算的及び線形的な要因を加えたスペクトルに対して、1次微分、2次微分処理を行ったスペクトル

ることができる⁵²⁾。

2次微分のピーク強度は原スペクトルにおけるピーク強度に比例するため、それを使って定量分析を行うことができる。また、線型的に増加するベースラインシフトも除去することができる。しかし、2次微分では一般的にスペクトルに含まれるノイズ情報に影響されやすくなるため、スムージングによる平滑化処理が必要となる。本研究で使用する平滑化の手法として Savitzky-Golay 法を採用している。先に述べたように、最適なスムージングポイント数 m を決定するにはスペクトルの波形を吟味し、適宜変更する必要がある。

・ Multiplicative Scattering Correlation (MSC、乗法的散乱補正)

MSC は Martens *et al.*²⁹⁾ によって開発されたベースライン補正法である。この手法はスペクトル内に含まれる加法的要因 (オフセット) と乗法的要因 (増幅) を補正する場合に用いられる。MSC を用いることによって、スペクトルやサンプルの特性によって生じる光路長の変化、オフセット、干渉等の効果を低減することが可能になる。MSC の基本的な原理は単回帰にあり、複数のスペクトル A_n (行ベクトル) から構成される観測スペクトルのセットを A_{nm} (行単位がスペクトル) とし、 m チャンネルからなる平均スペクトルを M_m とすると、補正式は(2)になる。

$$A_{nm} = a_n + b \times M_m + R_{nm} \quad \dots(2)$$

元のスペクトルを平均スペクトル M_m とそれに加わる乗法的因子 b と加法的因子 a_n に分けることでスペクトルを補正することができる。MSC は散乱因子がベースライン変動を大きく支配している場合に有効に働くが、化学情報が変動に影響している場合には、その情報を消すことになる。このような危険が想定される場合には、化学情報への依存が少ない波長領域のみを使って MSC 変換を行い、検量線に適用する方法がとられる。

・ Standard Normal Variate (SNV:標準規格化)

SNV は Barnes *et al.*⁵³⁾ によって提案された変換である。スペクトル $y(\nu)$ を N 本測定して得られたデータセットを $y(\nu, p)$ とする。 p 番目のスペクトルにおいて、スペクトル変数 ν の数を M とすると、スペクトル強度の平均値は (3) 式となり標準偏差は (4) 式となる。

$$\bar{y}(p) = \frac{1}{M} \sum_{i=\nu_{min}}^{\nu_{max}} y(i, p) \quad \dots(3)$$

$$\sigma(p) = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=\nu_{min}}^{\nu_{max}} (y(i, p) - \bar{y}(p))^2} \quad \dots(4)$$

求められたスペクトル強度の平均値と標準偏差を用い、(5) 式によって SNV 変換を行う。

$$y_{\text{snv}}(\nu, p) = \frac{y(\nu, p) - \bar{y}(p)}{\sigma(p)} \quad \dots (5)$$

前項の MSC ではサンプル群を用いた計算を行うため、変換式は使用するサンプル群に依存しており、未知サンプルではうまく適合しない場合もある。これに対し、SNV ではサンプル(1つのスペクトル)ごとに計算を行うためそのような心配はない。一般的に、MSC と SNV は縦軸のスケールが異なるものの、よく似た結果を示す場合が多い。

2.3.2. ケモメトリックス

・ケモメトリックスの意義

吸収分光法を使って定量分析を行う場合、スペクトルのバンド強度 (吸光度) を試料の濃度と関連づけた Lambert-beer の法則を用いるのが基本である。この法則は、古典電磁気学の基礎であるマクスウェル方程式から厳密に導出可能で、物理的に意味が明確な信頼できるものである。しかし Lambert-beer の法則は単一の波数位置での解析を前提とし、また、濃度変化に伴ってスペクトル形状が変わらずに吸光度だけが変化する、いわゆる“単一化学種”を前提としている。

IR や NIR では 1つのスペクトルに多数の振動モードが現れることが多い⁷⁾。試料を構成する化学成分の比が異なる複数の試料を測定する場合、成分比の違いを反映してスペクトルの形状が変わるため“単一波長で分離が困難”等の実用上の問題が多い。そこで、スペクトルを多次元空間上の 1点として考えることで、スペクトルの変化を説明する情報のみの新しい次元に縮小が可能となる。この概念を応用したものがいわゆる主成分分析 (Principal Component Analysis : PCA) であり、PCA を導入した回帰法が主成分回帰 (PCR) や Partial Least Squares Regression (PLSR)である。これらの関係性を Figure1.6 に示し、PCA、PCR、PLSR に至るまでの流れを説明する。

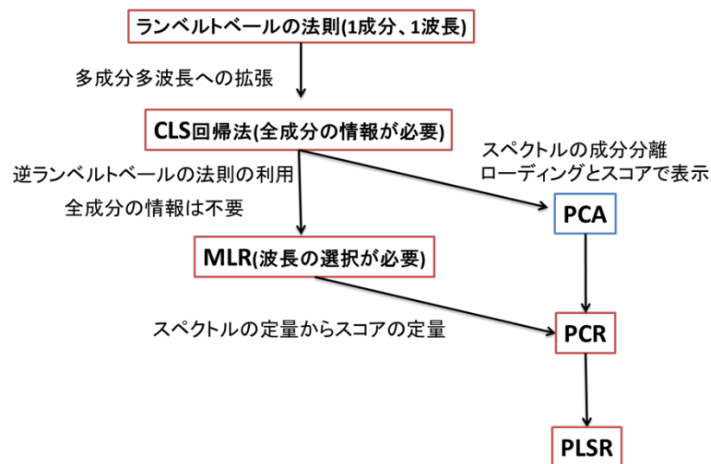


Figure1.6 回帰モデルの種類とその関連性

・スペクトルを多次元空間でのベクトルで表記

分光スペクトルは本来波長に対して連続的であるが、コンピューターに格納する際に、M 点の波数で離散化することになる。仮に 3 点(x、y、z) の波数位置で測定したスペクトルを 3 次元上転写した例を Figure1.7 に示す。このイメージを 3 次元から M 次元へ拡張すれば、1 本のスペクトルは M 次元空間上の 1 点として以下の (6) 式のように表わすことができる。

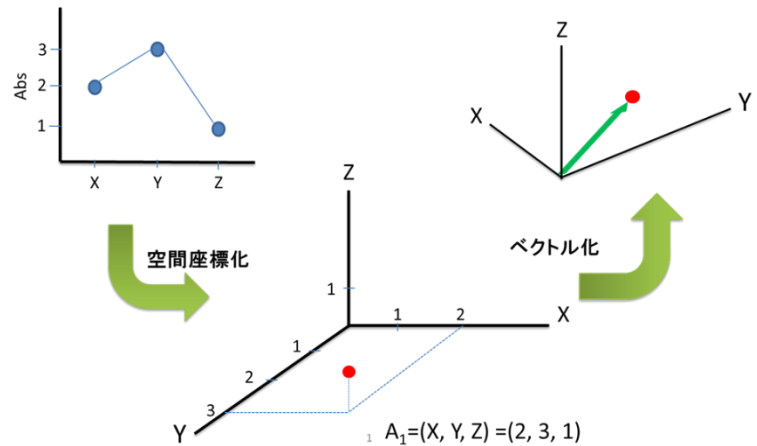


Figure1.7 3 点(x, y, z) の波数位置で測定したスペクトルを 3 次元で考えた場合

$$A = (A_1, A_2, A_3 \dots A_{M-1}, A_M) \quad \dots (6)$$

このとき、 a は吸光度、添え字は各波数位置を示す。このようにスペクトルを多次元空間上のベクトル量で考えるのがケモメトリックスの本質である。

・GLS (Classical Least Square) 回帰

Lambert-Beer 則は(7)式で表される。

$$A = cl\varepsilon \quad \dots (7)$$

このとき、 c は濃度、 l は光路長、 ε はモル吸光係数である。化学種 a および b からなる 2 成分系の混合試料を考え、それぞれの純物質のスペクトルを ε の代わりに行ベクトル k_a, k_b とする。これら 2 つの化学種が化学的な相互作用なしに混ざり合うと、混合物のスペクトルは重ね合わせの原理が適用できるため、2 つの純成分スペクトルにそれぞれの濃度 (c_a および c_b) を重みとしてかけて足し合わせた結果となる。これらを線形結合として数式で表現すると、行列を使うことで (8)式のように効率よく表現できる。

$$A = (c_a \ c_b) \begin{pmatrix} k_a \\ k_b \end{pmatrix} \quad \dots (8)$$

さらに、濃度の混合比だけを変えて測定試料を N 種類に増やした N 本のスペクトル ($A_1 \sim A_N$) は次の (7) 式のようにまとめて書くことができる。

$$\begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \\ \vdots \\ A_N \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} c_{a1} & c_{b1} \\ c_{a2} & c_{b2} \\ \vdots & \vdots \\ c_{aN} & c_{bN} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} k_a \\ k_b \end{pmatrix} \Leftrightarrow A = CK \quad \dots (9)$$

(9) 式はスペクトルを多次元空間上の 1 点として考えることができるので、2 本のベクトル (k_a, k_b) の張る平面内に点が収まることを示している。つまり、多次元空間の次元数にかかわらず、点の広がりを含

める次元が構成成分数に対応している。

また、(9) 式まで一般化することで、純成分化学種を増やしても行列のサイズを変更するだけで同様の式で表せることになる。しかし、実際にはノイズ等の影響がスペクトルに加わるため厳密には上記の式は成り立たないことがわかる。そこでこれらの影響を残余項行列 R にまとめ、次の (10) 式として表わす。

$$A = CK + R \quad \dots (10)$$

それぞれの化学種の純スペクトルからなる行列 K を (10) 式および吸光度と濃度の情報を用いて求めることが可能となり、未知濃度 C_u を測定することが可能となる。ただし、成分数の見積もりを誤ると検量線の精度が大幅に低下する特徴がある。

・ ILS (Inverse Least Square) 回帰

CLS 回帰法では系に含まれる成分数が正しく見積もれた場合にのみ高い精度で検量することが可能となった。しかし、化学種の間には相互作用があったり予期せぬ化学種が生じたりする場合それらの情報も濃度情報 C として含める必要がある。つまり、計算に利用した行列 C の列数が実際の成分数より少ない場合は、分析精度が低下することから、CLS 回帰法によるスペクトル定量が困難となる。つまり、情報が豊富なスペクトルを成分数が不確かな濃度情報でモデル化することで検量精度が低下するということになる。

そこで、モデル化のターゲットを、情報量の不足した C から情報量が豊富な A に変えて (11) 式のようにモデル化したのが ILS 回帰法または重回帰分析 (Multiple Linear Regression : MLR) である。

$$C = AP_{ILS} + R \quad \dots (11)$$

ここで P_{ILS} は相関係数とし、CLS 回帰法(8)式で K を計算した要領で P_{ILS} を算出すればよい。しかし、この計算を行うには、正方行列にする必要性があり、それはスペクトルの測定点数 M とサンプル数 N を等しくする必要があるが、スペクトルデータは多くの場合、 $N < M$ となり横長の行列である。これでは逆行列計算ができず、いわゆる特異解の問題に直面する。この問題を解決するには行列 A を ($N \geq M$) にする。つまり、波長点数を大幅に間引く事となる。ILS 回帰法は CLS 回帰法に較べて成分数の見積もりの誤差には強いが、スペクトルの情報すべてを解析に生かすことができなくなるため、多変量解析の利点を損なっている。また、波長点数の間引き方にも任意性が入ることが問題となる。しかしながら、後に述べる PLSR 等に比べると、比較的単純な計算手法であり、NIR 法では非常に利用頻度が高く、解析の対象によっては PCR 法よりも高い検量精度の場合がある。

・主成分分析 (Principal Component Analysis)

波長点数の間引き方に任意性が入るという ILS 回帰の問題を解決する方法の 1 つに主成分分析法 (PCA) がある。PCA はスペクトルを多次元空間の点とした考え方を線形代数の手法で整理したもので、CLS 回帰法の拡張概念とみなすと分かりやすい。CLS 回帰法の (10) 式は列ベクトル(c_j)と行ベクトル(k_j)の積の和($\sum_{j=1}^r c_j k_j$)に書き直すことができ、(12)式になる。

$$\begin{aligned}
 A &= CK + R \\
 &= \begin{pmatrix} c_{11} & c_{21} & \cdots & c_{r1} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{1N} & c_{2N} & \cdots & c_{rN} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} k_{11} & \cdots & k_{1M} \\ k_{21} & \cdots & k_{2M} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ k_{r1} & \cdots & k_{rM} \end{pmatrix} + R \\
 &= \begin{pmatrix} c_{11} \\ \vdots \\ c_{1N} \end{pmatrix} (k_{11} \cdots k_{1M}) + \begin{pmatrix} c_{21} \\ \vdots \\ c_{2N} \end{pmatrix} (k_{21} \cdots k_{2M}) + \dots + \begin{pmatrix} c_{r1} \\ \vdots \\ c_{rN} \end{pmatrix} (k_{r1} \cdots k_{rM}) + R \\
 &= \sum_{j=1}^r c_j k_j + R \qquad \dots (12)
 \end{aligned}$$

このように化学的に意味のあるベクトル c_j と k_j で A を展開するのが CLS である。ここで意味のあるベクトルを用いた行列の展開は、中身が分かりやすい反面、展開項の数 r は想定した化学種に合わせるため、想定外の化学種(会合体や水和物など)を考慮できない。その結果 CLS は成分数の見積もりが悪く検量精度が低下する。そこで、 A 行列を直交ベクトルで展開することを考えたのが PCA である。

$$A = \sum_{j=1}^r t_j p_j \qquad \dots (13)$$

(13) 式は (12) 式の文字変数を変えただけの様だが、以下の 3 つの点が異なる。

- 1 p_j は直交ベクトルである。
- 2 t_j と p_j には、特異的な場合を除いて化学的な意味はない。
- 3 総和記号の上限は成分数ではなく、試料数 N である。

CLS の A 行列は多次元空間上の複数の点を表している。この点の広がりを効率よく表しているのが新しい軸である直交ベクトルの p_j であり、これをローディングベクトル(以下、ローディングと記載)という。ローディングは、 $A^T A$ について固有値と固有ベクトルを解くことで得られる。

一方、展開係数にあたる t_j には、空間内の N 個の点を新しい軸 p_j から見た N 個の位置情報として格納している。これをスコアベクトル(以下、スコアと記載)という。スコアはローディングの射影量であり、内積を計算すれば求められる。

固有ベクトル p_j と共に算出される固有値 λ_j には j 番目の固有ベクトルで捉える N 点の広がりの程度を

意味する。固有値はスペクトルの量的変動の程度を表し、意味を持たないノイズ成分などは固有値が小さくなる。そこで、固有値が急激に小さくなる手前の項、つまり化学的に意味のある項を b 番目までとすると、次の (14) 式のように表すことができる。

$$A = \sum_{j=1}^b t_j p_j + R \quad \dots(14)$$

この最初の b 項を基本因子といい、残りの R 項をノイズ因子という。よって、 b 次元空間でスペクトル全体の変化を解釈することになる。この中でローディングベクトルを 2 つだけ選び出して平面を作ること、スペクトルの形や類似性や相違を視覚的に理解するのに PCA は用いられる。

本論文の各章でスコアとローディングの解釈について説明し、次項に記載する PCR 及び PLSR にも用いられることから、具体的な解釈の方法について Figure1.8 に記載する。なお、3 次元以上は図示することが困難なため、あくまでイメージであることに注意しなければならない。

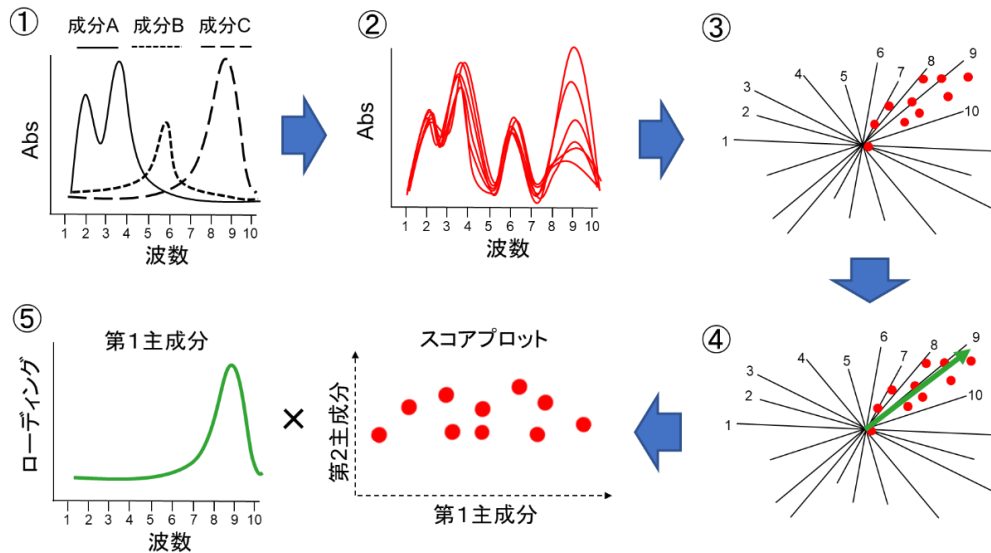


Figure1.8 スコアとローディングの解釈

- ① 3 種類の成分 A,B,C の純スペクトルを示す。実際、スペクトル測定点数は数百～数千点になることが多いが、ここでは 10 点と仮定している。
- ② 3 種類の成分が様々な割合で混合された混合物のスペクトルを複数測定する。ここでは成分 C の濃度を特徴的に変化させている。
- ③ Figure1.7 と同様、測定した混合物のスペクトルデータを多次元空間(10 次元)の 1 点としてプロットすることができる。波数と次元は一致していることから、複数測定した混合物スペクトルの吸光度変化が大きい波数と対応する次元でプロットが分散する傾向となる。
- ④ 多次元空間中でプロットの分散が最大になるように軸(ベクトル)を作成する。これが第一主成分のローディング p_1 となる。
- ⑤ 10 次元空間のローディング p_1 は 2 次元のスペクトル形状に変換すると、混合物の特徴的なスペク

トル変化を反映した形状に図示することができる。前述したようにローディング p_j とスコア t_j を掛け合わせたものが元のスペクトルになることから、ローディング p_1 に対応するスコア t_1 を横軸に記載すると比較が容易になる。ローディング p_1 のスペクトル形状と成分 C の純スペクトルの形状が一致していることから、スコア t_1 の変化量は成分 C の変化量を意味することとなる。つまり、ローディングの形状と目的物質のスペクトル形状を比較することによって、スコアの分布状態の化学的意味を説明することができる。

・PCR (Principal Component Regression) 法

ILS 回帰法を運用するためには、スペクトル行列 A を正方または縦長にする必要があったが、スペクトルに含まれる量的な情報と等価な意味をもつ PCA のスコアを (11) 式の A に入れても良い。また、スコアベクトルは多次元空間上の点の位置情報を収めたものなので、点の数 N と同じ数の次元を持つ。よって、 A をスコア行列と入れ替えることで、ILS の特異解の問題を回避でき、かつ量的情報を完全に生かすことが可能となる。

ILS の行列 A を PCA のスコア T に置き換えるだけなので、次の (15) 式にまとめられる。

$$A = \sum_{j=1}^b t_j p_j + R_{PCA} \equiv TP + R_{PCA}$$

$$C = TP_{ILS} + R \quad \dots (15)$$

ただし、PCA で利用する固有値計算は、直交ベクトルを規格化するという過程を含むため、実際は微弱なノイズでさえ大きく拡大されてしまい検量精度が低下する事がある。このためランダムノイズの多いスペクトルに PCR 法は不向きである。

・PLSR (Partial Least Squares Regression)

PLSR はケモメトリックスにおいて最もよく使われる回帰分析法の 1 つであり、変数（例えば波数、波長）間に相関を持つスペクトルデータから検量線を作成する際に有効な手法である。通常、説明変数間に相関があると、用いる説明変数の組み合わせによっては回帰精度が著しく低下する。これを避けるために PLSR では説明変数を互いに無相関な LV (Latent Variables) に変換し、この LV を用いて回帰を行う。

CLS 回帰法、ILS 回帰法、および PCR 法はスペクトルの信号ノイズ成分までも濃度で説明しようとして、逆に濃度調製の誤差をスペクトルで表現しようとしていたりしていた。しかし、本来、スペクトル測定と濃度調製の誤差は全く独立なものであり、濃度調製の誤差がスペクトルに反映されるというのは誤っている。この問題点を回避する方法として PLSR が用いられる。PLSR では (16),(17)式のように目的成分 C (ここでは濃度とする) と吸光度 A を別々のスコアとローディングを用いて表している。

$$A = t_1 p_1 + t_2 p_2 + t_3 p_3 + \dots R_A \quad \dots (16)$$

$$C = u_1q_1 + u_2q_2 + u_3q_3 + \dots R_C \quad \dots(17)$$

PCR で使用するローディングは主成分の分散が最大になるように主成分を抽出するが、PLSR はスペクトル A だけでなく濃度 C まで独立にモデル化することで、それぞれのノイズをモデル化することである。これにより、濃度調製の誤差がスペクトルには影響しないことになる。また、式は PCA と同じ形をしているが主成分と目的変数との共分散が最大になるように主成分を抽出するため、PLSR には厳密な直交性はない。このため、PLSR ではローディングを回帰係数(regression coefficients)と記載する。

PLSR では濃度とスペクトルを結ぶ部分は

$$C = t_1q_1 + R_C \quad \dots(18)$$

となっており濃度をモデル化のターゲットにしている点で PCR と共通している。

PLSR をする際、最終的な回帰モデルに含まれるスコアの数を決める必要があり、一般に用いられる方法としてクロスバリデーション (Cross-Validation: CV) がある。CV とはモデルの安定性を調べる手法のひとつである。データセットを G 個のグループに分割して $G-1$ 個のグループを用いてモデルの構築を行い、残った 1 個のグループを用いてモデルの評価を行う。この操作をすべてのグループが 1 個ずつ評価データとして用いられるように繰り返す手法である。本論文では Leave-one-out で CV をおこなっており、Leave-one-out とはデータセットのすべてのサンプルについて、そのサンプルを取り除いてモデル構築を行い評価する方法である。そのためサンプルサイズ N のデータセットでは、 N 回の繰り返しを行うことになる。

また、予測した LV 数を決める方法として PRESS 値の算出する (19) 式が用いられている。 \hat{y}_i^k は i 番目の個体を除いて推定された k 成分モデルにおける i 番目の個体の予測値を示し、PRESS が最小となるように成分数(すなわち LV 数)を決める。なお、第 4 章では成分数が既知であることからオーバーフィッティングを回避するために予め指定している。

$$PRESS_{(k)} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i^k)^2 \quad \dots(19)$$

成分数を決定した後、その成分数で実際に検量線を作成するが、検量線の評価に用いる手法として、実測値 y_i と検量線の予測値 \hat{y}_i^k の誤差の二乗平均平方根(Root Mean Squared Error : RMSE)を検量線の精度を示す指標を用いる。また、RMSE と相補的な関係として決定係数 R^2 (寄与率)があり、1 に近いほど精度が高い。また、データセットが同じであれば、 R^2 が大きいほど RMSE は小さいという関係がある

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad \dots(20)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad \dots(21)$$

PLSR の長所をまとめると以下の様になる。

1. データの直交分解による共線性の回避
2. 波長選択が不要 (全ての波長を使用)
3. 選択性の低いオーバーラッピングも定量可能 (類似スペクトルにも使用可能)
4. ILS に比べると、よりノイズに強い定量化が可能 (予測性能が高い)
5. 複数の目的変数を同時に扱える。

ただし、PLSR は複数の目的変数の変化が同じ割合(濃度)で変化した場合、計算上それらは同一成分として表現してしまうことに注意しなければならない。モデルを構築する際、目的変数を自由に変更可能な場合は問題ないが、第 3 及び 4 章で扱うような生化学反応では複数の目的変数を分離して抽出することが困難な場合がある。

・ 2次元相関分光法(Two Dimensional Correlation Spectroscopy : 2DCOS)の原理

Figure1.9 に示す様に、何らかの外部摂動 t を与えながら逐次測定したスペクトル $y(\nu)$ を $y(\nu, t)$ とする。摂動 t を t_1, t_2, \dots, t_m と変化させてスペクトルを測定すると、Figure1.10 のように一連のスペクトルが得られる。図中の ν_i, ν_j で信号の強度は、摂動の変化に伴って増加もしくは減少しており、これら 2つの波数の動的変化が、互いに何らかの相関を持っていることが分かる。このように 1 組の波数間の相関を調べるのは比較的簡単であるが、実際にはスペクトルのすべての波数の組み合わせについてその相関を調べる必要がある。このような場合、一連のスペクトルを縦軸と横軸に並べ、各波数 ν 間の相関をプロットすれば、すべての波数間の相関が Figure1.10 の様に図示できる。図の解釈については次項に記載するが、本研究ではポジティブな相関を赤色(又は色無し等高線)、ネガティブな相関を青色(又は色有等高線)として表現している。

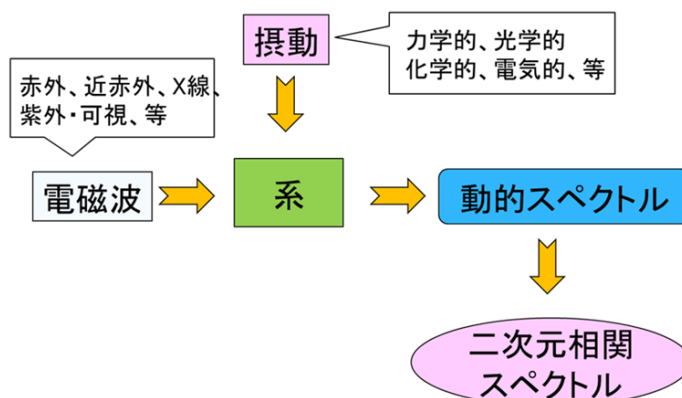


Figure1.9 2次元相関分光法の原理

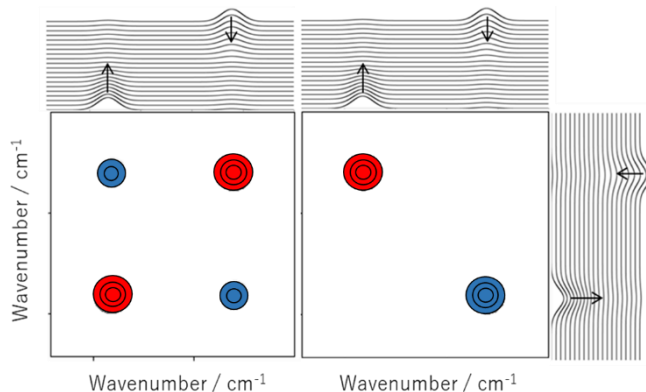


Figure1.10 2次元相関分光法の同時相関スペクトル(左)と異時相関スペクトル(右)

2DCOS では、「同時相関」と「異時相関」と呼ばれる 2 種類の相関が用いられる。相関マップから波数間の同時・異時相関を調べることで、波数間のスペクトル変化の違いを明らかにすることができる。この仕組みを利用して、与えられた摂動に対して系がどのように応答するかを詳しく調べる方法が 2DCOS である。

同時・異時相関スペクトルは次のような式で導かれる。まず摂動 t_j を変化 ($j=1,2, \dots,m$) させて観測されたスペクトルを $y(\nu, t_j)$ とする。各波数の吸光度について平均値 $\bar{y}(\nu)$ を計算し、その値を $y(\nu, t_j)$ から引いたものを動的スペクトルとする。したがって、動的スペクトルは

$$\bar{y}_j(\nu) = y(\nu, t_j) - \bar{y}(\nu) \quad \dots(22)$$

となる。同時相関スペクトル $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ は次のように与えられる。

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \bar{y}_j(\nu_1) \cdot \bar{y}_j(\nu_2) \quad \dots(23)$$

同時相関とは ν_1, ν_2 における、摂動に対する応答の直接的な相関を表している。例えば、摂動が加えられた際、 $\bar{y}_j(\nu_1)$ と $\bar{y}_j(\nu_2)$ が共に増加もしくは減少すれば、 ν_1, ν_2 の間には正の同時相関が得られる。また、 $\bar{y}_j(\nu_1)$ と $\bar{y}_j(\nu_2)$ のうち一方が増加し、他方が減少した場合、同時相関は負の値になる。したがって、同時相関スペクトルを調べることで、変化の方向の違いを明らかにすることができる。

一方、異時相関スペクトル $\Psi(\nu_1, \nu_2)$ は次式で与えられる。

$$\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \bar{y}_j(\nu_1) \cdot \sum_{k=1}^m N_{jk} \bar{y}_k(\nu_2) \quad \dots(24)$$

ここで、 N_{jk} は以下の式で定義されるヒルベルト-野田変換を意味する。

$$N_{ji} = \begin{cases} 0 & j = k \text{ なら} \\ 1/\pi(k-j) & \text{それ以外} \end{cases} \quad \dots(25)$$

異時相関とは、 ν_2 において観測されたスペクトル強度 $\bar{y}_j(\nu_2)$ に 90° の位相遅れを与えた後に、 $\bar{y}_j(\nu_1)$ との相関を計算して現れる相関である。これは正弦波では位相が 90° 異なる 2 つの信号間の相関は 0 となる。即ち、摂動が加えられた際、 ν_1, ν_2 におけるスペクトル強度の変化が互いに完全に同期していたとすれば、 $\bar{y}_j(\nu_2)$ に 90° の位相遅れを与えられたものと、 $\bar{y}_j(\nu_1)$ との間には相関は発生しない。言い換えれば、もしこのような相関が発生したとすると、 ν_1 と ν_2 の間には摂動に対する応答に遅れが存在することを意味する。

したがって、異時相関スペクトルを調べることにより、各波数間の変化の順序を明らかにすることができる。通常、信号に 90° の位相遅れを与えるためにはヒルベルト変換が用いられる。(25) 式のヒルベルト-野田変換とは、このような位相遅れを、周期関数だけでなくあらゆる強度変化に与えるために野田によって提案された変換方法である。Figure1.11 に示す様に、この手法は摂動が同じであれば IR と NIR などの異なるスペクトル領域についても同じ解釈が可能となる⁵⁴⁾⁻⁵⁸⁾。先に述べた様に NIR 領域のバンドの帰属を行う上で IR と同じ摂動を加えたスペクトルに対し、IR で帰属されたバンドとの二次元相関スペクトルを見ることによって、バンドの帰属を行うことができる。

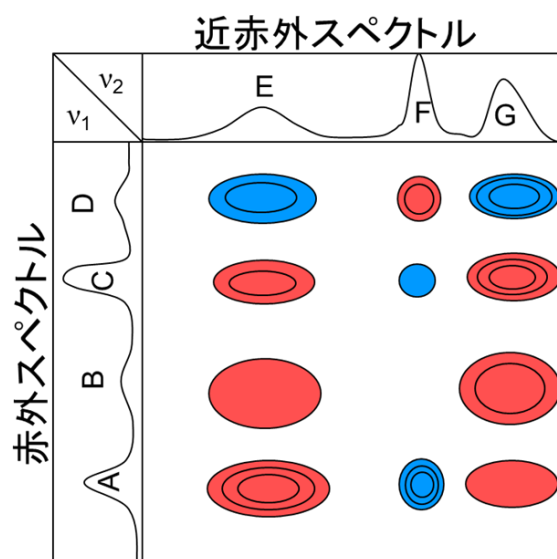


Figure1.11 NIR/IR ヘテロ 2次元相関分光法の原理

・ 2DCOS の解釈の方法と得られる情報

Figure1.10 の左側の同時相関スペクトルは、ある振動数 ν_1 と ν_2 におけるバンドピーク強度が摂動変化に対して同じ変化するか否かを示す。対角線上には $\nu_1 = \nu_2$ と対応する自己相関ピークが現れる。このピークが強ければ強い程、摂動に対するスペクトル変化が大きいことを意味する。一方交差相関ピークと呼ばれる非対角線上に合われるピークは、2つのバンドが摂動に対して共に強度が強くなるか弱くなるかであれば交差相関ピークは正になる。もし、一方が強く、一方が弱くなる場合は負の値となる。Figure1.9 の場合は、交差相関ピークが負であり、後者の関係であることが理解できる。交差相関は吸収強度が大きく変化するからと言って大きなピークとして現れるわけではないので、一次元では重なっていたバンドが二次元では分離できる可能性がある。Figure1.10 の右側の異時相関スペクトルは同時相関と相補的な関係がある。異時相関スペクトルには同時相関とは異なり、自己相関ピークは存在せず、交差相関ピークのみが存在する。交差相関ピークは、摂動に依存する 2 つバンドの強度が異なるタイミングで変化する場合のみ現れる。右のバンドよりも左のバンドの方が遅れて変化しているため、ピークとして現れている。よって、摂動に対してそれぞれのバンドが早く変化するか遅く変化するかを決定する事が可能となる。この情報を用いると 2DCOS によって以下のような知見が得られる。

- ① 通常の 1 次元のスペクトル上では重なりあっているバンドを 2 次元相関スペクトル上で分離できる可能性がある。
- ② 帰属が明らかな他のバンドとの相関から、バンドの帰属ができる可能性がある。
- ③ あるバンドと他のバンドとの相関から、両者のバンドが摂動に対する強度変化にズレを持つか否か議論することができる。

2. 4. 参考文献

- 1) 尾崎幸洋著 “近赤外分光法”, 講談社 (2015)
- 2) P. Williams and K. Norris.” Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries”, American Association of Cereal Chemist (1987)
- 3) K. H. Norris, *Agric. Eng.*, 45, 370 (1964)
- 4) 岩元睦夫, 河野澄夫, 魚住純 “近赤外分光法入門”, 幸書房 (1994)
- 5) 尾崎幸洋, 池羽田晶文, 近赤外分光I概論, *分光研究*, 53-1, 43-53 (2004)
- 6) 尾崎幸洋著 “近赤外分光”, *アイピーシー* (1998)
- 7) 長谷川健 “スペクトル定量分析” 講談社 (2005)
- 8) 尾崎幸洋 “分光学入門” 産業図書株式会社 (1997)
- 9) 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄著 “化学者のための多変量解析”, 講談社 (2002)
- 10) S.J. Doherty, C.N. Ketteler. “On-line Applications in the Pharmaceutical Industry”. Oxford, 9, 329-361. (2005)
- 11) 竹内洋文著 “固形製剤とバイオ原薬の連続生産” CMC 出版 (2019)
- 12) G.M. Troup and C. Georgakis. *Computer and Chemical Engineering.*, 51, 157–171. (2013)
- 13) J. Rantanen and J. Khinast. *J. Pharm. Sci.*, 104(11), 3612–3638. (2015)
- 14) FDA, Draft Guidance for Industry, “PAT-A Framework for Innovative Manufacturing and Quality Assurance, Draft Guidance” FDA, Rockville, MD (2003)
- 15) ICH harmonized tripartite guideline, Pharmaceutical development Q8 (R2), (2009)
- 16) ICH harmonized tripartite guideline, Quality risk management Q9, (2005)
- 17) ICH harmonized tripartite guideline, Pharmaceutical quality system Q10, (2005)
- 18) 第 17 改正日本薬局方, 一般試験法 6.02 製剤均一性試験法 (2016)
- 19) USP Pharmacopeial Forum, Vol.35 No3 (2010)
- 20) 尾崎幸洋著, 河田聡 “近赤外分光法”, 学会出版センター (1996)
- 21) 垂水利泰, *薬剤学*, 77 (2), 81-85 (2017)
- 22) X. Sun and D. B. Collum, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 2459-2463. (2000)
- 23) E.D.Lipp and R.L.Grosse, *Applied Spectroscopy.*, 52, 42-46. (1998)
- 24) Terada H et al., *Int. J. Pharm.*, 565, 325-332 (2019)
- 25) Takeshima R et al., *Int. J. Pharm.*, 530(1), 256-262 (2017)
- 26) J. A. Zeitler, Y. Shen, C. Baker, P. F. Taday, M. Pepper, T. Rades, *J. Pharm. Sci.*, 96, 330–340 (2007).
- 27) Ajito K, JY Kim, Ueno Y, HJ Song, Ueda K, W Limwikrant, Yamamoto K and Moribe K, *J. Electrochem. Soc.*, 9, 161. (2014)
- 28) Shikata F et al., *Drug Develop. and Ind. Pharm.*, 44(5), 713-722 (2018)
- 29) Shikata F et al., *RSC Adv.*, 7(61), 38307-38317 (2017)
- 30) Otsuka M et al., *RSC Adv.*, 4(34), 17461-17468 (2014)

- 31) 岩本令吉 “近赤外スペクトル法”, 講談社 (2008).
- 32) Gonjo T, Futami Y, Morisawa Y, M. J. Wojcik, and Ozaki Y. *J. Phys. Chem., A*, 115 (35), 9845–9853 (2011)
- 33) M.A. Czarnecki, Y. Liu, Ozaki Y, Suzuki M, and Iwahashi M. *Appl. Spectrosc.*, 47(12), 2162-2168 (1993)
- 34) I. Noda, *Appl. Spectrosc*, 47, 1329. (1993)
- 35) I. Noda, *Anal. Sci.*, 23, 139. (2007)
- 36) 野田勇夫, 尾崎幸洋, *分光研究*, 第44巻 第5号 総説(1995)
- 37) 森田成昭, 新澤英之, 尾崎幸洋, *分光研究*, 第60巻 第6号 総説(2011)
- 38) Watari M, *Opt. Rev.*, 17(3), 317-322. (2010)
- 39) Nishii T, Genkawa T, Watari M, Ozaki Y, *Ana Sci*, 28(12), 1165–1170 (2012)
- 40) Genkawa, T., Watari, M., Nishii, T., Ozaki, Y. *Appl. Spectrosc.* 66(7), 773–781 (2012)
- 41) Nishii T, Morita S, Genkawa T, Watari M, Ishikawa D, Ozaki Y. *Appl. Spectrosc.* 69(6), 665–670 (2015)
- 42) Ad Gerich, Jane Dubois, and Linada H.Kidder “Raman, Infrared, and Near-Infrared Chemical Imaging”. Slobodan Šašić, Ozaki Y, editor. WILEY, Part3.11, 205. (2010)
- 43) Ewing, A.V., Kazarian, S.G., *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 197, 10–29. (2018)
- 44) P.R Wahl, I. Pucher, O. Scheibelhofer, M. Kerschhaggl, S. Sacher, J.G Khinast, *Int. J. Pharm.*, 518 (2017)
- 45) B. Boldrini, W. Kessler, K. Rebner, R.W Kessler, *J. Near Infrared Spectrosc.*, 20 (2012)
- 46) Murayama K, Genkawa T, Ishikawa D, Komiyama M, Ozaki Y, *Rev. Sci. Instrum.*, 84 (2013)
- 47) Ishikawa D, Murayama K, Genkawa T, Awa K, Komiyama M, Ozaki Y, *NIR news*, 23 (2012)
- 48) Ishikawa H, Takahashi T, Mizuno F, Suzuki T, Yamada E, Ozaki Y, Ishikawa D, “compovision” *SEI Tech. Rev.*, 76, 94-97. (2013)
- 49) Ishikawa D, Shinzawa H, Genkawa T, S.G. Kazarian and Ozaki Y, *Anal. Sci.* 30, 143-150 (2014)
- 50) Ishikawa D, Nishii T, Mizuno F, S.G. Kazarian, Ozaki Y. *NIR news*, 24, 6–11 (2013).
- 51) Savitzky, A., Golay, M.J.E., *Anal. Chem.*, 36, 1627–1639 (1964)
- 52) 新澤英之, *製剤機械技術学会誌*, 24(1), 20-24 (2015)
- 53) Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J., *Appl. Spectrosc.*, 43, 772–777 (1989)
- 54) I. Noda, *Appl. Spectrosc.*, 47, 1329. (1993)
- 55) I. Noda, *Anal. Sci.*, 23, 139 (2007)
- 56) 野田勇夫, 尾崎幸洋, *分光研究*, 第44巻 第5号 総説 (1995)
- 57) 森田成昭, 新澤英之, 尾崎幸洋, *分光研究*, 第60巻 第6号 総説 (2011)
- 58) 新澤英之, 森田成昭, 尾崎幸洋, *分光研究*, 第61巻 第3号 総説 (2012)

3. NIR/IR 一体型分析計を用いたアルコール発酵過程のエタノールのモニタリング

3.1. 緒言

近赤外分光法(NIR 法)は、近年ハードとソフトの両面において目覚ましい進歩を遂げている。特にソフト面においては多変量解析やケモメトリックスといった統計的手法を手軽に計算できるようになったことが挙げられる。これにより化学工業・高分子・製薬の分野にも NIR 法が応用され、判別、成分分析、反応追跡、物理的性質の測定など、さまざまに用いられるようになった¹⁻⁷⁾。

NIR 法の応用が活発に行われている現在でも、構築された検量線が持つ化学的意味や NIR バンドの帰属を十分に理解した上で利用されているとは必ずしも言えない。構造化学的な研究を行う場合などは、NIR バンドの帰属や化学的意味を熟知する必要性は言うまでもないが、定量分析を行うのみは必ずしもバンドの帰属が必要ないかもしれない。しかし、検量線に採用した波数がどのような化学的意味を持つのか明らかにすれば、理論的な根拠を持った頑健性の高い検量線になる。また、バンドの帰属を考えた上で波数を選ぶことができれば、より合理的に検量線を構築することが可能となる¹⁾。しかし、序論でも述べたが、複雑な NIR スペクトルのバンド帰属を行うことは必ずしも容易な作業ではない。NIR のバンドの帰属を行う絶対的手法は未だ確立されてはいないが、現在まで様々な手法が報告されている。一つは基本的な分子を系統的に扱い、分光学や物理化学による古典的なスペクトル解析を行う方法である^{8,9)}。別の方面では理論的に倍音や結合音を扱った研究もある^{10,11)}。その中でも注目されているのとして Noda らが提唱した一般化された二次元相関分光法 (2DCOS) によるアプローチである¹¹⁻¹⁶⁾。NIR スペクトルに観測されるバンドは IR に観測される分子の基本振動の倍音や結合音なので、NIR スペクトルを解析するためには、それと IR・ラマンスペクトルと比較を行うことがしばしば重要になる。2DCOS を用いることで、NIR スペクトルと IR・ラマンスペクトルを互いがどのような変化をしようかを比較し調査することができる。しかしながら、比較するためには同じサンプルに対して同じ摂動を加えた動的スペクトルが必要となり、吸収強度の異なるそれぞれの領域のスペクトルを同じスケールで同時測定する事はハード面で困難とされた¹⁾。

この問題を解決するために、世界で初めて関西学院大学の尾崎幸洋研究室と横河電機株式会社共同で原薬プロセスのモニタリングを目的とした NIR/IR 一体型分析計が開発された¹⁷⁻¹⁹⁾。この装置によって、同じスケールの吸収強度で NIR と IR スペクトルを同時に測定することが可能となり、同時に得られた NIR と IR スペクトルを比較することでバンドの帰属をより正確に行うことが期待できる。本研究では NIR/IR 一体型分析計で得られたスペクトルに 2DCOS を適用し、IR バンドを参照しながら NIR バンドの帰属を行った。帰属された領域のみ選択した検量線と選択しなかった検量線を比較し、同時測定により予測精度だけでなく化学的に意味のある信頼性の高い検量線を構築する有意性を検証した。

この章では NIR/IR 一体型分析計を用いて医薬品製造工程のも用いられている発酵過程の中でも、比較的単純な系であるアルコール発酵過程のモニタリングを行った¹⁸⁾。アルコール発酵のような生化学反応では NIR と IR のスペクトルを同時に測定しなければオンラインでの比較は困難となり、この装置以外での

同時測定は困難と考えられる。NIR と IR スペクトルを解析およびモニタリングするにあたって、アルコール発酵過程のスペクトル変化の基礎的な知見を得ることは非常に重要となる。アルコールの発酵過程内でスペクトルに変化をもたらす物質は水、エタノール、グルコースである。それらの分子構造中にはいずれも親水基 (OH 基) を持ち、エタノールとグルコースは疎水基 (CH 基) を持っていることから、分子間相互作用が起こると言われている²⁰⁾。よって、検量線を作製するにあたって知見を得るために各種濃度変化の実験も併せて行った。

3.1.1. アルコール発酵について

アルコール発酵とは、グルコース、フルクトース、ショ糖などの糖を分解し、エタノールと二酸化炭素を生成することでエネルギーを得る代謝プロセスであり、酸素を必要としない嫌氣的反応である^{21,22)}。

アルコール発酵全体の反応は化学式(1)で示すように、1分子の単糖(グルコース及びフルクトース)からエタノールと二酸化炭素が2分子生成される。この反応は下記に示すように三つの段階に分けられる。



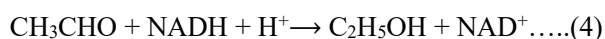
まず、第一段階では化学式(2)に示すように、1分子の単糖が解糖系の複数の酵素によって2分子のピルビン酸に分解される。この反応は、同時に、正味2分子のADP(アデノシン二リン酸)をATP(アデノシン三リン酸)に、2分子のNAD⁺(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)をNADH(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)に変換する。単糖であるグルコース及びフルクトースは、ワイン用のブドウに含まれる主要な糖であり、酵母はグルコースを優先的に分解することが知られている。これは解糖系でフルクトースが何段かの酵素反応を経てグルコースの代謝中間体と同一の物質に変化するが、その速度がグルコースから代謝中間体に至るまでの変化速度より遅いためである。^{23,24)}



第二段階からアルコール発酵特有の反応になる。化学式(3)が示すように1分子のピルビン酸から1分子の二酸化炭素が取り除かれ、アセトアルデヒドが生成される。



その後、化学式(4)が示すようにアセトアルデヒドは還元型NADHの電子によって速やかに還元されエタノールとなる。



本研究においては、直径約2mmの固定化酵母を使用するため、本装置で酵母内部まで透過測定していない。よって、酵母内の反応である化学式(2)~(4)は計測されず、反応は化学式(1)に集約される。ただし、酵母内に取り込まれる糖と生成されるエタノールに時間差が発生する場合、糖とエタノールの生成量から予測することが期待できる。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 試料および試薬

濃度変化の実験にはエタノール (和光純薬株式会社製 純度 99.5 %)と D(+)-グルコース (和光純薬株式会社製 純度 99.0 %) を電気抵抗 18.0 M) 以上で処理した超純水で希釈した。

100 mL の超純水に 1.50 g のアルギン酸ナトリウム(和光純薬株式会社製)を加え加熱溶解させた後、常温まで冷まし 50.00 g の生イースト (株式会社カネカ製) を加え攪拌した。また、200 mL の超純水に 4.00 g の無水塩化カルシウム (和光純薬株式会社製) を加えた溶液を作成し、そこに生イーストの溶液を一滴ずつ滴下しながら直径約 2 mm の固定化酵母を作製した。

アルコール発酵液は超純水で D(+)-グルコース (和光純薬株式会社製 純度 99.0 %) 20 w/v%, イーストエキス(和光純薬株式会社製) 1 w/v%, ペプトン(和光純薬株式会社製) 2 w/v%の割合で調製した。イーストエキス及びペプトンはアルコール発酵の促進に利用した。

3.2.2. NIR/IR 一体型分析計

Figure3.1 に NIR/IR 一体型分析計のシステム構成図を示す。開発した分析計は NIR プローブと IR プローブの 2 つのプローブを搭載しており、プローブへの光路を切り替えることで NIR と IR の両方のスペクトルを取得可能である。オンライン測定を可能とする NIR および IR それぞれの挿入型プローブについても新たに開発している。製造プラントへの設置を考慮して外部振動に強い FT 型の分光器を採用した。この分析計は NIR/IR 二波数領域分光計、分析計の制御装置、スペクトル解析システム、そしてスペクトルのデータベースシステムから構成される。分析計の制御装置を通じて、分光計の駆動、スペクトルデータのデータベース化、スペクトルの解析、そしてプロセスの状態に関する情報のプロセス制御システムへのフィードバックを行うことが可能である。この他にスペクトル前処理機能や検量線作成機能、予測値のリアルタイム表示機能を搭載している。

「装置の構成」 NIR/IR 一体型分析計は FT 型の NIR/IR 分光器 (DS-20, Hamilton Sundstrand)、光路切り替え装置、透過型 NIR 挿入プローブ、InAs 型 NIR 検出器、ATR 型 IR 挿入プローブ(Axiom Analytical Inc.)、MCT 型 IR 検出器、システム制御ボックス、そして PC から構成される。NIR および IR 検出器はそれぞれペルチェ装置と液体窒素で冷却されている。また、Figure3.1 では省略されているが、乾燥空気を流すガスラインが制御ボックスに繋がっており、装置内で分岐されたガスラインは一方が分光器内の水蒸気と CO₂ のパージに使われ、もう一方は光路切替装置の動力として使われる。

「光源」 10000-1200 cm⁻¹ をカバーする光源として、ハロゲンランプと積分球型ランプ室の壁面から出る黒体放射を利用した複合光源を採用した。また、IR 検出器に効率よく赤外光を入射させるため、近赤外域カットフィルターを使用した。黒体放射によって 2000-1200 cm⁻¹ の光強度が強められる。

「NIR/IR 分光器」分光器には、外部振動に強く波数の再現性が高い FT 分光器である Transept 型の分光器を採用した。Transept 型分光器は光学エッジの走査によって光路差を生み出す方式で、今回使用した分光

器の波数範囲は 12000-1200 cm^{-1} である。

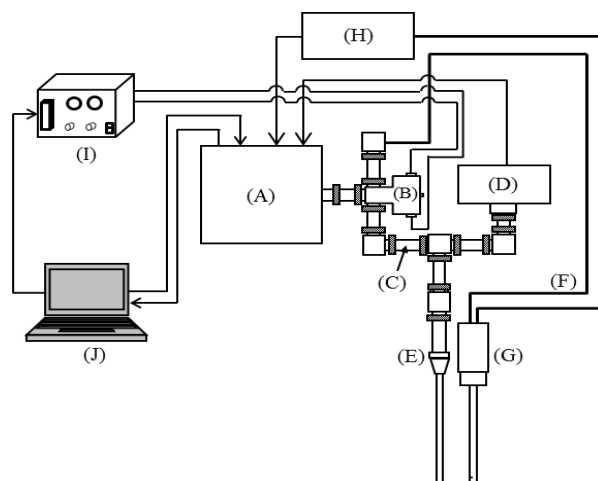


Figure3.1 NIR/IR 一体型分析計の概略図 (A)FT 変換型の NIR/MIR 干渉計 (DS-20, Hamilton Sundstrand)、(B)光路切り替え装置、(C)光路挿入型、(D)MIR 検出器、(E)ATR 型 MIR プローブ(Axiom Analytical Inc.)、(F)光ファイバー、(G)NIR プローブ、(H)InAs 型 NIR 検出器、(I)MCT 型システム制御ボックス、そして(J)PC

「NIR プローブと IR プローブ」 Figure3.2 に NIR プローブと IR プローブの概略 Figure を示す。これらのプローブはオンライン測定用に新たに開発されたものである。NIR プローブは透過型の挿入プローブであり、結合音に由来する吸収バンドを測定するために光路長は 1 mm に設定されている。プローブ本体の材質は Hastelloy C、窓材はサファイアである。IR プローブには ATR 型の挿入プローブを用いた。ATR 法を採用することで水の IR バンドを容易に観察できる。ATR-IR プローブ本体の材質は SUS316、Internal Reflection Element (IRE) はジンクセレンである。NIR 側の光路には石英ファイバー、IR 側の光路はミラーチューブを用いている。

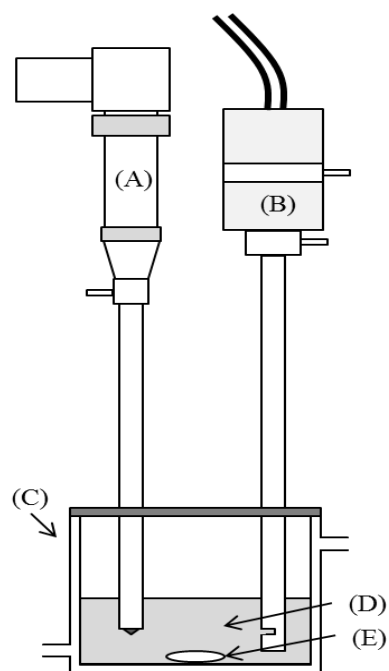


Figure3.2 NIR プローブと IR プローブの概略図 (A) NIR プローブ、(B)IR プローブ、(C) ガラス製の二層式ビーカー、(E)スターラー、(D)反応溶液

3.2.3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

NIR/IR 一体型分析計で推定されたエタノール濃度に対する参照データとしてとして、高速液体クロマトグラフィーによる測定値を用いた。高速液体クロマトグラフは JASCO 製の RI-1531 と示差屈折率検

出器を組み合わせたものを用いた。カラムは COSMOSIL 5C₁₈-PAQ Packed Column (250 mm × φ4.6 mm) を使用し、25 °C の 0.05 % (4.4 × 10⁻⁶ N) trifluoroacetic (TFA) 酸性水溶液の展開溶媒を流速 1.0 ml min⁻¹ の条件で測定を行った。

3.2.4. スペクトル解析ソフトおよび解析方法

スペクトルデータの取り出しは PAT 用のソフトウェア Symbion-Dx(Symbion 社)を基に NIR/IR 一体型分析計用に開発されたソフトウェアを用いて行った。スペクトルの解析には The Unscrambler ver. 9.2 (CAMO ASN, Norway) を用いた。吸光度が 2.0 以上を示した領域の吸光度はすべて 2.0 に置換した。スペクトルの前処理に用いた 2 次微分は Savitzky-Golay 法のスムージング 15 ポイントで行った。検量線は PLSR により構築した。2 次元相関解析は 2DShige (大阪電気通信大学 森田成昭教授により製作) を用いた。トレーニングセットは 43 サンプル、評価方法はフルクロスバリデーション法を採用した。テストセットとして 30 サンプルを用いて発酵溶液の濃度予測を決定係数 (R²) 及び RMSEP を求めた。

3.2.5. 実験操作

・エタノールとグルコース水溶液の濃度変化

新しく開発された NIR/IR 一体型分析計は分光器やプローブの設計など一般的に研究で用いられる分光器と構造が異なることから、比較を行うため他の分光器で各種濃度変化の測定を行った。超純水を溶媒としエタノール水溶液は 10~100 w/v% まで 10 w/v% ごとに 10 サンプル調整を行った。超純水を溶媒としグルコース水溶液は 5, 10, 20, 30, 40, 50 w/v% の 5 サンプル調整を行った。測定は Perkin Elmer 社製 Spectrum One NTS を使用し NIR スペクトルの測定を行った。測定条件はセル長 1 mm、分解能が 4 cm⁻¹、積算回数 32 回、室温 (24 °C) で行った。同様に IR スペクトルを Smiths Scientific 社製の顕微 IR 装置 IlluminatIR で測定した。測定条件は一回反射型 ATR、分解能が 4 cm⁻¹、積算回数 128 回、室温 (24 °C) で行った。

・アルコール発酵試験

トレーニングセット用の発酵試験として 20 w/v% のグルコース、1 w/v% のイーストエキス、2 w/v% のペプトンを加え発酵液 200 mL を調製した。発酵液をガラス製の二層式ビーカーに入れ、ジャケット内を灌流する水の温度を変えることでサンプル温度を調節した。スペクトルのバックグラウンドを 30 °C の空気で取った後、固定化した酵母を 40 mL (約 21 g) をビーカーに入れ、一分間攪拌させた後、30 °C に保って攪拌しながら測定を行った。スペクトルの測定条件は走査回数 32 回、分解能 8 cm⁻¹ とし、NIR/IR スペクトルを約 3 分毎に 600 分間取得した。また発酵中に発酵液をランダムに 43 サンプル採取し、直ちに HPLC で測定を行った。また、テストセットとして予測精度を求めるために、新たに発酵試験を行った。発酵溶液や固定化酵母の作製法及び測定条件はトレーニングセット同じであるが、この時投入する酵母を 80 mL (約 42 g) にして発酵試験を行っている。また、発酵液から 30 サンプルを採取し HPLC 測定を行った。

3.3. 結果と考察

3.3.1. エタノールとグルコースのバンドの帰属

アルコール発酵過程における NIR および IR スペクトルを解析するにあたって、発酵に伴って濃度が増加するエタノールおよびグルコースのバンドについてその帰属と濃度変化に伴う挙動を整理した。

・エタノールの濃度変化に伴うバンドの挙動

Figure3.1～Figure3.3 に、エタノール水溶液（濃度：0～100 w/v%）の伸縮振動領域（2650～3650 cm^{-1} ）、結合音領域（4200～4900 cm^{-1} ）、倍音領域（5600～6300 cm^{-1} ）における原スペクトルと 2 次微分スペクトルを示す。伸縮振動領域（2650～3650 cm^{-1} ）ではエタノール分子は $-\text{CH}_2$ と $-\text{CH}_3$ を持ち、それぞれの対称及び逆対称伸縮が現れた。またエタノール濃度が高くなるにしたがって最も顕著に表れる $-\text{CH}_3$ の逆対称伸縮のバンドは 2988 から 2979 cm^{-1} に線形的にシフトしている。一般的に高波数

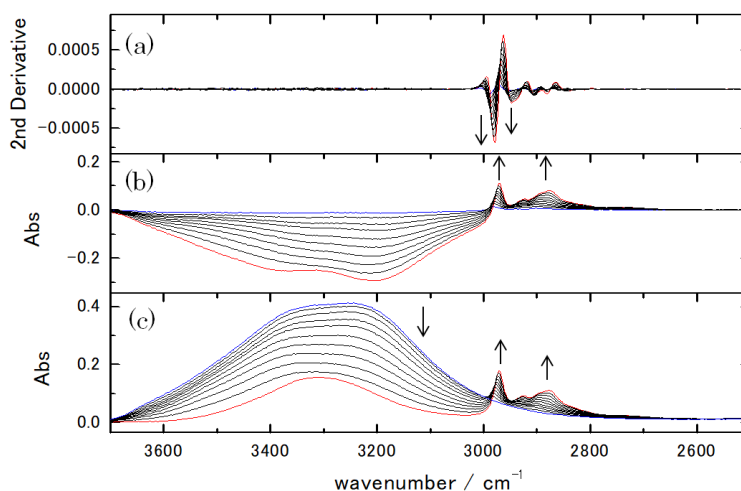


Figure3.1 伸縮振動領域のエタノール 0–100 %の濃度変化スペクトル(a)2 次微分スペクトル(b)差スペクトル(c)原スペクトル

シフトは、CH 結合距離の収縮に対応している²⁰⁾。その収縮に関与する可能性として混合溶液中において、分子間および分子内相互作用が考えられるのは、水とアルコールの混合溶液中ではアルコール内の分子内で CH と OH が水素結合する場合と、水の OH とアルコールの CH の分子間水素結合の場合が考えられる。また、原スペクトルから OH の伸縮振動のバンドは 3300 cm^{-1} 付近に観測されていた。しかし、この OH バンドは水の OH バンドと重なるため、希薄な条件ではそれぞれを分離して検出する事は困難であると示唆された。この様に帰属されている IR の領域でも、水溶液系や分子間結合を持つ系では帰属を行うことが困難である。

次に NIR 領域においては、結合音領域でエタノール濃度が高くなるにしたがって 4416 から 4413 cm^{-1} と 4346 から 4333 cm^{-1} に低波数シフトする $-\text{CH}_2$ 及び $-\text{CH}_3$ の結合音の吸収バンドが、4811 cm^{-1} 付近に OH の大きな吸収バンドが観測された。第一倍音領域でも 5953 から 5940 cm^{-1} 、5907 から 5900 cm^{-1} および 5777 から 5762 cm^{-1} 低波数シフトする CH_2 及び CH_3 の第一倍音および

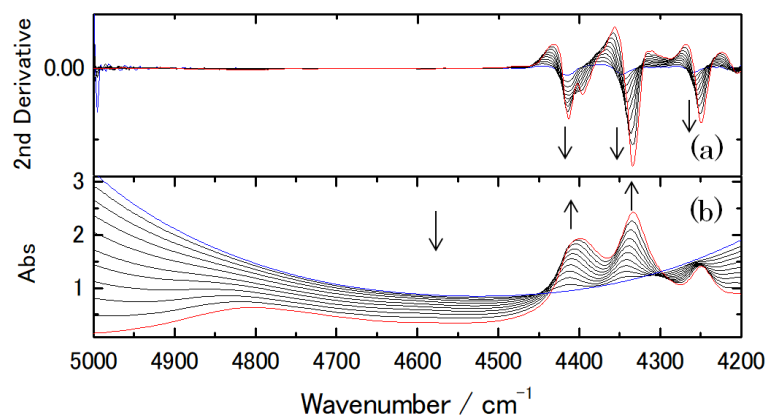


Figure3.2 結合音領域のエタノール 0–100 %の濃度変化スペクトル(a)2 次微分スペクトル(b)原スペクトル

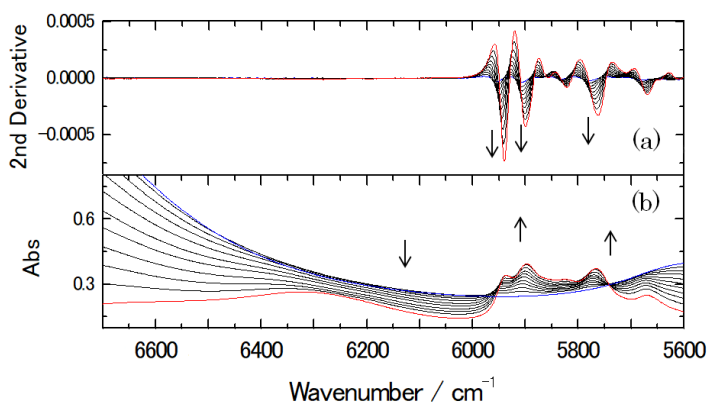


Figure3.3 倍音領域のエタノール 0-100%の濃度変化スペクトル(a)2次微分スペクトル(b)原スペクトル

結合音の吸収が見られ、6330 cm^{-1} 付近に OH のブロードな吸収が確認出来た。アルコール発酵によって生成されるエタノールの濃度は 10 w/v%程度であり、このような濃度条件では CH バンドのシフト量は小さく、検量モデルの精度に影響を及ぼさないと考えられる。また、エタノール OH バンドに関しては、水の OH バンドと大きく重なっているため、アルコール発酵過程の希釈な条件で検出することは難しいことが示唆された。

・グルコースの濃度変化に伴うバンドの挙動

Figure3.4~Figure3.6 に、グルコースの 5-50 w/v%の濃度変化における CH と OH の伸縮振動領域 (2700~3700 cm^{-1})、結合音領域 (4200~4900 cm^{-1})、および第一倍音領域 (5600~6300 cm^{-1}) の原スペクトルと差スペクトルおよび 2 次微分スペクトルを示す。エタノールの場合とは異なり、濃度変化に伴う CH バンドのシフトは見られなかった。また、アルコール発酵におけるグルコースの初期濃度を 20 w/v%とすると、エタノールの CH バンドの吸収強度と比較してかなり小さいことが理解できる。伸縮振動領域では 2 次微分によって 2930 cm^{-1} と 2871 cm^{-1} に CH バンドの吸収と、2 次微分では観測されにくい 3100 にブロード OH バンドが観測された。同様に結合音領域では 4308 cm^{-1} に CH の結合音の吸収が見られ、4831-4478 cm^{-1} 付近にかけてブロードな OH の吸収が確認出来た。第一倍音領域でも 5916 cm^{-1} に CH の第一倍音の吸収が見られ、6500-5600 cm^{-1} 付近に OH のブロードな吸収が確認出来た。

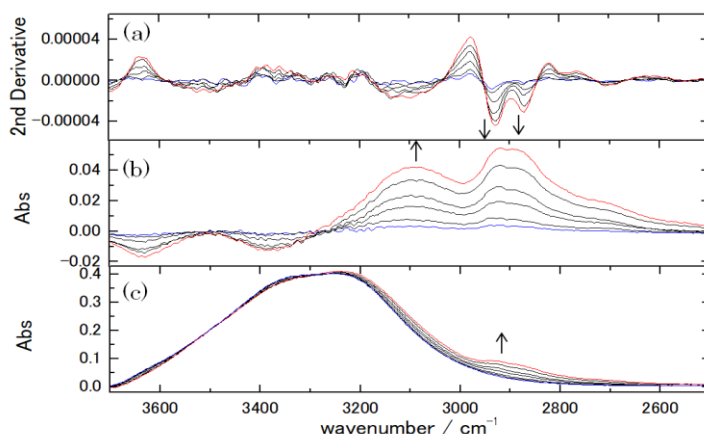


Figure3.4 伸縮振動域のグルコース 0-50%の濃度変化スペクトル(a)2次微分スペクトル(b)差スペクトル(c)原スペクトル

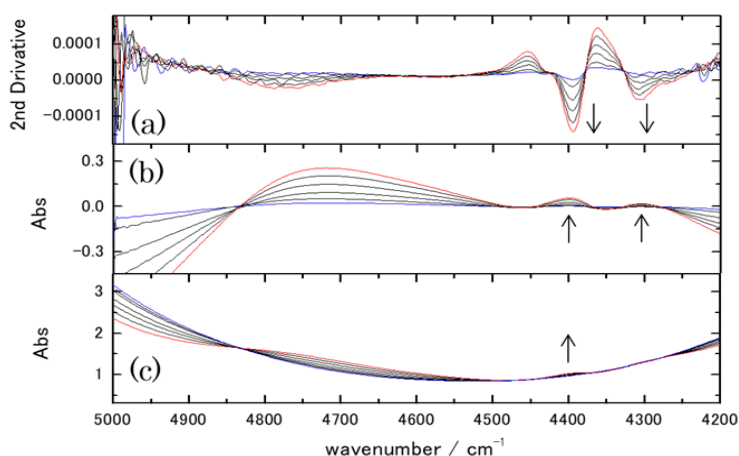


Figure3.5 第一倍音領域のグルコース 0-50%の濃度変化スペクトル(a)2次微分スペクトル(b)差スペクトル(c)原スペクトル

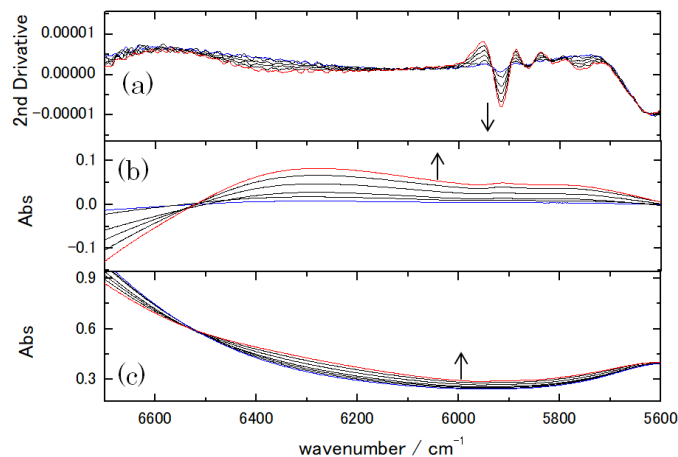


Figure3.6. 第一倍音領域のグルコース 0-50%の濃度変化スペクトル(a)2次微分スペクトル(b)差スペクトル(c)原スペクトル

3.3.2. アルコール発酵過程におけるバンドの挙動

Figure3.7 と Figure3.8 に NIR/IR 一体型分析計によって得られたアルコール発酵過程の 10000-4200 cm^{-1} 領域と 3500-2800 cm^{-1} 領域のスペクトルを示す。発酵液の約 80%は水であることから、発酵液のスペクトルは水のスペクトルと類似している。7200-6300 cm^{-1} と 5300-4700 cm^{-1} に現れるバンドは水の結合音と倍音とに帰属されている¹⁾。また、NIR 領域の広い範囲を測定したことによって、高波数側ほどベースラインが上昇していることが確認できた。これは発酵に伴って増加する副産物の散乱が影響をしていると源川らが報告している¹⁹⁾。

このスペクトル内での主な変化としては、グルコースの持つ OH 及び CH の減少とエタノールの持つ CH と OH の吸収の増大が考えられる。詳しい解析を行うために、特に変化が大きかった領域を選択し、MSC 処理、差スペクトル、2次微分スペクトルを行うことでバンドの挙動の整理と帰属を行った。

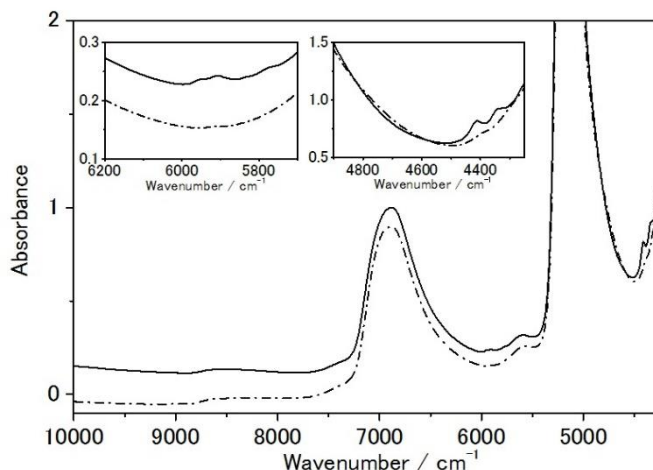


Figure3.7 NIR/IR 一体型分析計で測定されたアルコール発酵前(破線)と後(実線)の NIR スペクトル

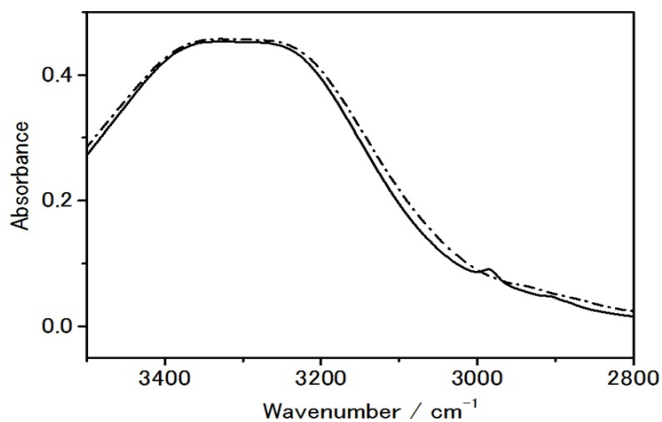


Figure3.8 NIR/IR 一体型分析計で測定されたアルコール発酵前(破線)と後(実線)の伸縮振動音領域のスペクトル

・伸縮振動音領域のスペクトル変化

Figure3.9 に発酵過程の前後で特に大きくスペクトルに変化が表れた IR の伸縮振動音領域 3500-2700 cm^{-1} の MSC 処理したスペクトル、差スペクトル、2 次微分スペクトルを示す。アルコール発酵液の殆どは水で構成されており、MSC 処理のみでは明確に変化を分けることができない。そこで 2 次微分処理を行うことによって、前に述べたグルコースとエタノール濃度変化のスペクトル同様 2935 cm^{-1} にグルコースの CH 由来のバンドが確認出来た。そして発酵に伴ってグルコースの CH バンド 2935 cm^{-1} が徐々に減少し、反対に 2985 cm^{-1} にエタノールの CH によるバンドの増加が現れた。また、アルコール発酵が進むにつれて 3010~3250 cm^{-1} のグルコースの OH バンドの吸収強度が減少することが差スペクトルから確認された。

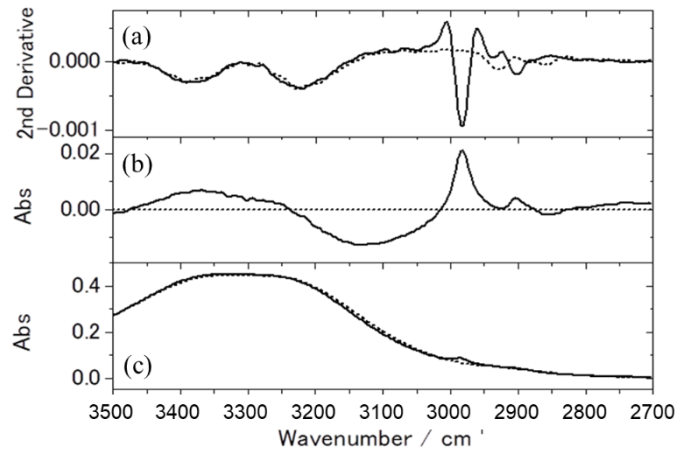


Figure3.9 IR の伸縮振動音領域(3500-2700 cm^{-1})における(a)2 次微分スペクトル(b)差スペクトル(c)MSC スペクトル

・結合音領域のスペクトル変化

Figure3.10 に発酵過程の前後で特に大きくスペクトルに変化が表れた NIR の結合音領域 4900-4250 cm^{-1} の MSC 処理したスペクトル、差スペクトル、2 次微分スペクトルを示す。2 次微分スペクトルより、発酵開始直後は 4410 cm^{-1} に吸収バンドが認められたが、発酵に伴ってこのピークが消え 4410 cm^{-1} と 4380 cm^{-1} にバンドが現れた。また、4800~4450 cm^{-1} にかけてブロードなバンドの減少が認められた。これらのスペクトル変化はグルコースの CH および OH の減少と、エタノールの CH の増加によるものと考えられる。

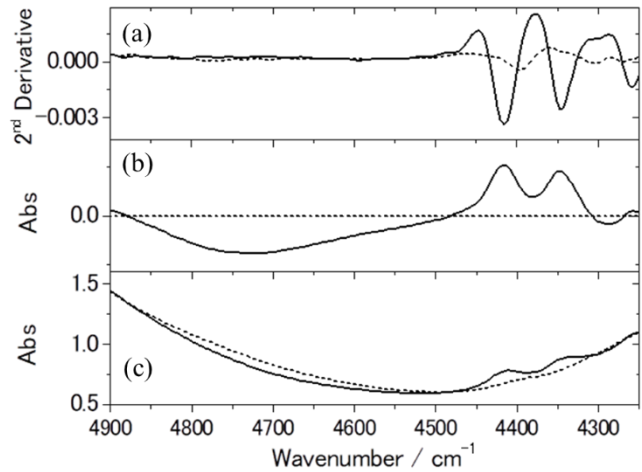


Figure3.10 結合音領域 (4900-4250 cm^{-1})における(a)2 次微分スペクトル(b)差スペクトル(c)MSC スペクトル

・第一倍音領域のスペクトル変化

Figure3.11 に発酵過程の前後で特に大きくスペクトルに変化が表れた NIR の第一倍音領域 6300-5600 cm^{-1} の MSC 処理したスペクトル、差スペクトル、2 次微分スペクトルを示す。発酵開始時は 5914 cm^{-1} に

グルコースの CH と考えられるバンドが認められたが、発酵に伴ってこのバンドが消え 5951 cm^{-1} と 5906 cm^{-1} および 5777 cm^{-1} にエタノールのバンドと考えられるバンドが現れた。また、差スペクトルから $6270\sim 5970\text{ cm}^{-1}$ にかけてブロードなバンドの減少が認められた。これらのスペクトル変化はグルコースの CH および OH の減少と、エタノールの CH の増加によるものと考えられる。また、結合音領域と比較すると水のバンドの影響は少ないが、強度が小さくスペクトルの形状が複雑になっている。

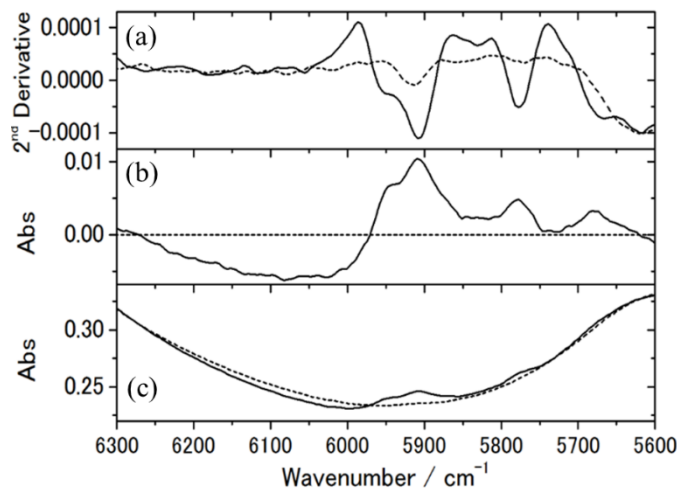


Figure3.11 第一倍音領域($6300\text{-}5600\text{ cm}^{-1}$)における (a)2次微分スペクトル(b)差スペクトル(c)MSC スペクトル

3.3.3. 多変量解析を用いたアルコール発酵過程の解析

・アルコール発酵過程のエタノールの検量線の作成

まず、波数選択をせず NIR スペクトル全体を用いて、PLSR によるエタノール検量線の作成を行った。Figure3.12 に $10000\text{-}4200\text{ cm}^{-1}$ を用いて作成したエタノール検量線の第 1 潜在変数(LV1)のスコアと回帰係数を示す。その結果、LV 2 の時 $R^2=0.982$ は、 $\text{RMSEP}=4.9\text{ gL}^{-1}$ となった。また Figure3.12(b)の回帰係数において、高波数側ほど線形的にローディング値が大きくなっている。高波数側程線形的に上昇しているため散乱の影響が現れることが確認できる。これから副生成物の生成によるベースラインシフトと発酵におけるエタノールのスペクトル変化が酷似しているため LV1 に散乱の情報が現れたと考えられる。よって散乱の中にエタノールとグルコースの濃度変化の情報も含まれるので濃度情報が大きく欠損してしまうことが示唆される。よって、散乱の情報を減らし第 1 潜在変数にエタノール濃度変化の情報のみを表現できる方がより精度が高いと考えられる。

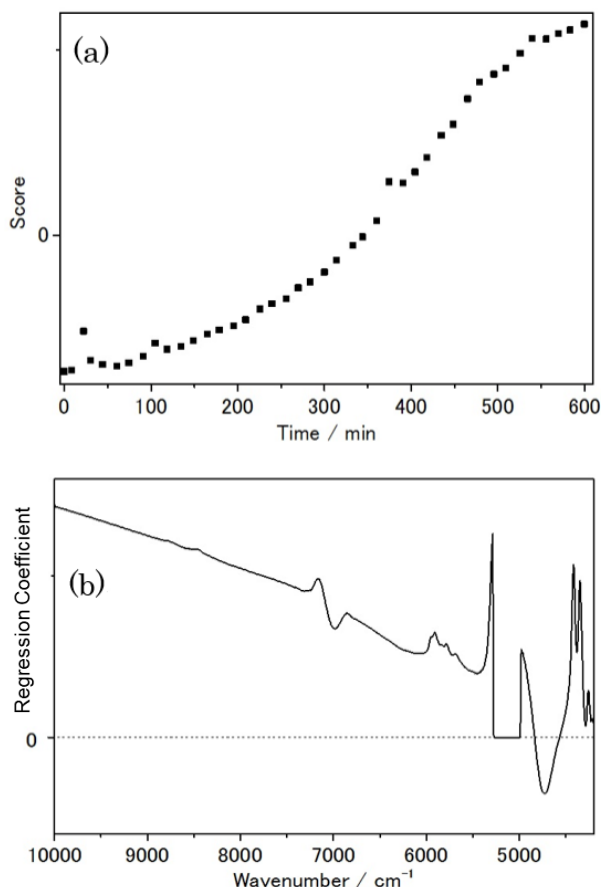


Figure3.12 アルコール発酵過程の NIR スペクトル $10000\text{-}4200\text{ cm}^{-1}$ を用いて作成したエタノール検量線の LV1 の(a)スコアと(b)回帰係数

次に、散乱の影響を軽減するためにアルコール発酵過程の水の結合音の領域を除いた全体のスペクトル(9966-5400, 4900-4227 cm^{-1})に2次微分処理を行った。Figure3.13に検量線を作成したときのLV1の回帰係数とスコアを示す。この結果、LV1の時 $R^2=0.997$ は、 $\text{RMSEP}=1.7 \text{ gL}^{-1}$ となった。Figure3.13(b)の回帰係数からも2次微分処理を行うことによってスペクトルに加わった散乱による全体的な傾き除去することができ、結合音 4900-4250 cm^{-1} と第一倍音領域 6200-5700 cm^{-1} のエタノールのスペクトル変化および7200-6300 cm^{-1} の水バンドの情報を強く反映していることが確認できた。しかし、水の吸収が現れる領域はエタノールのOHの情報を反映していると考えられるが、エタノールのOHバンド 4811 と 6330 cm^{-1} 付近と水のOHバンドが現れる 7200-6300 cm^{-1} と 5300-4700 cm^{-1} とのオーバーラップが激しいので検量線としては採用にふさわしくはない。したがって、全体の回帰係数の寄与が少ない高波数側の領域を検量線から除外し、エタノールのCH由来の結合音と第一倍音のバンドのみでPLS回帰による検量線を作成した。

結合音と第一倍音領域の2次微分スペクトル用い

て作成したエタノール検量線のLV1回帰係数とエタノールの二次微分スペクトルをFigure3.14に、伸縮振動音領域のみで作製した検量線のLV1スコアと回帰係数をFigure3.15に示す。Figure3.14に示した回帰係数において、結合音と第一倍音領域のLV1回帰係数はエタノールの吸収と良い一致を示していることから、LV1回帰係数は、エタノールの濃度変化を捉えていると判断ができる。またFigure3.15から、IRの伸縮振動音領域においても同様に、LV1の回帰係数はエタノールの吸収波数と良い一致を示している。また、スコアプロットからもエタノール濃度の増加と良い一致を示していることからIRとNIRそれぞれの領域はで同じ変化を予測していることが確認された。

検量線精度を比較するため、 R^2 とRMSEPを示したものをTble3.1に示す。Tble3.1より発酵過程のエタノールの検量線を結合音(4900-4250 cm^{-1})、倍音(6200-5700 cm^{-1})、伸縮振動音(3500-2700 cm^{-1})領域を選択し、二次微分処理を行ったものとNIR領域全体(9966-5400,4900-4270)を用いて検量線を作成したものは、ほぼ同じ結果が得られた。検量線に採用する波数領域を広くすることで、理論的に意味のない波数領

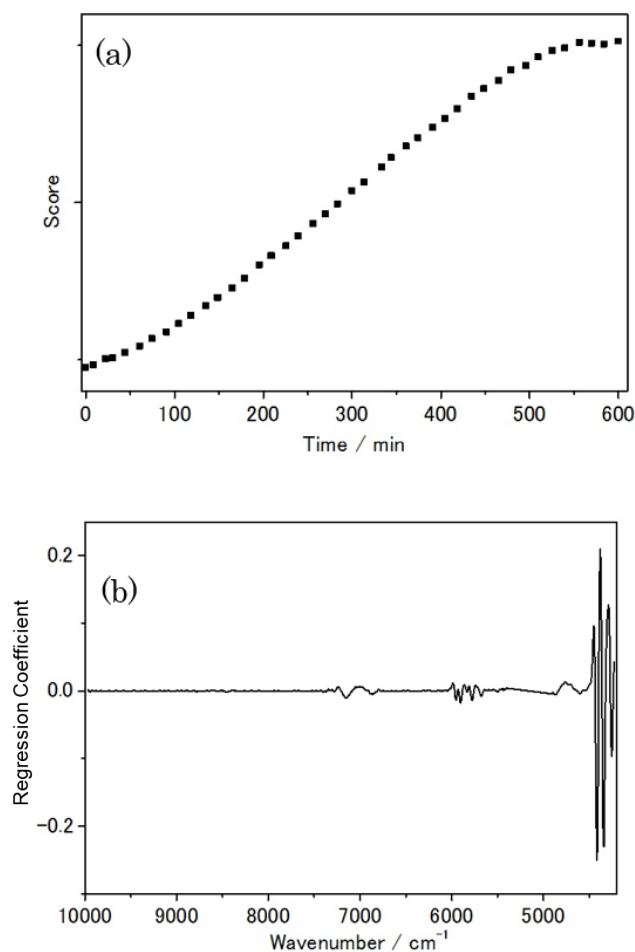


Figure3.13 アルコール発酵過程の 9966-5400, 4900-4227 cm^{-1} の2次微分スペクトル用いて作成したエタノール検量線のLV1の(a)スコアと(b)回帰係数

域を含むためモデルが不安定になることが示唆される²⁵⁻²⁷⁾。つまり、検量線の波数領域を限定しても予測精度が下がらないということは、頑健性の高い検量線であることを示している。しかし、これはあくまで任意に選択した領域であって、選択した領域内に他の成分のバンドがあるか否かの判断はできていない。つまり、理論的根拠に基づいてさらに領域を限定することができる可能性が残っている。

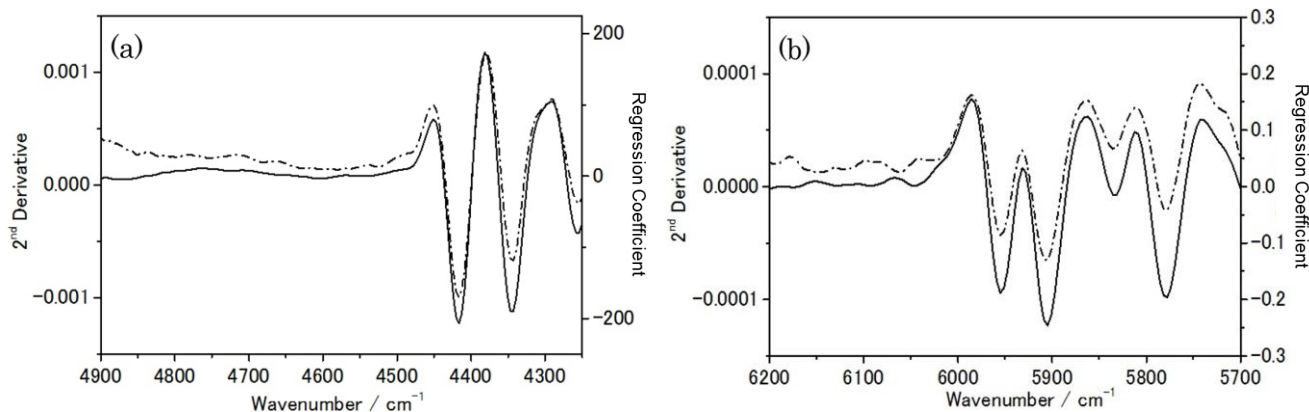


Figure3.14 アルコール発酵過程の(a)結合音 4900-4250 cm^{-1} と(b)第一倍音領域 6200-5700 cm^{-1} の2次微分スペクトル用いて作成したエタノール検量線のLV1 回帰係数(実線)エタノールの2次微分スペクトル

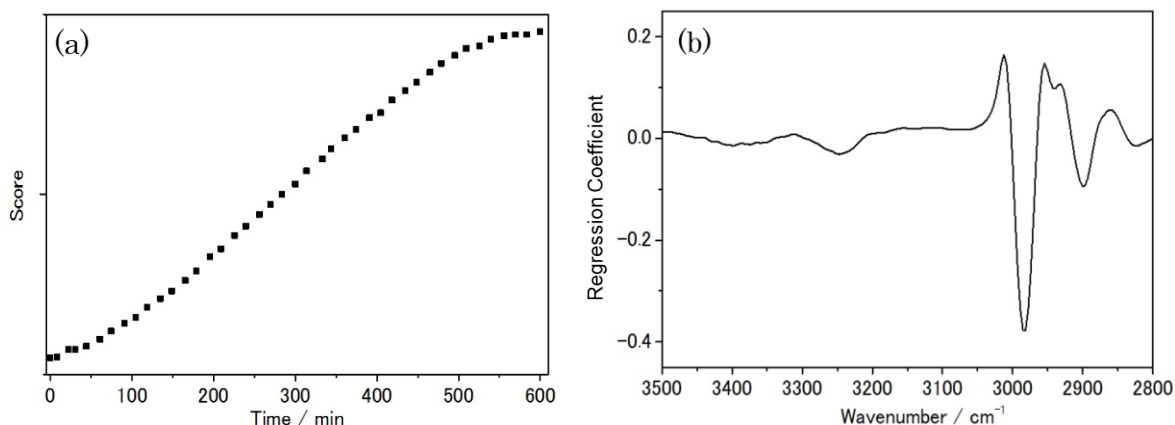


Figure3.15 アルコール発酵過程の伸縮振動音領域 3500-2700 cm^{-1} の2次微分スペクトル用いて作成したエタノール検量線のLV1 の(a)スコア と(b)回帰係数

Table3.1 各領域 でのアルコール発酵過程のエタノールの検量線

Model	PLS	PLS	PLS	PLS	PLS	PLS	PLS
Pretratment	-	2 nd Deri	2 nd Deri	2 nd Deri	2 nd Deri	2 nd Deri	2 nd Deri
Spectral region (cm^{-1})	10000-4200	9966-5400, 4900-4227	4900-4250	6300-5700	3500-2800	4450-4300	5985-5870, 5812-5742
Number of LVs	2	1	1	1	1	1	1
R ²	0.982	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997
RMSEP (g L^{-1})	4.9	1.7	1.7	2.2	1.7	1.7	2.2

・ NIR・IR ヘテロ 2次元相関分光法を用いた検量線の波数範囲の決定

Figure3.16 に、NIR 領域 (4900-4250 cm^{-1} , 6200-5700 cm^{-1}) と IR 領域 (3500-2700 cm^{-1}) のヘテロ 2DCOS を示す。Figure3.16 が示す様に正に強い相関があるものは同じ物質による吸収と判断することができる¹²⁻¹⁶⁾。Figure3.16(a)の結合音領域に現れる 4340 cm^{-1} と 4416 cm^{-1} のエタノールの CH 由来のバンドは IR で帰属されているエタノールの CH_3 の逆対称伸縮振動のバンド (2985 cm^{-1}) と強い相関を示している。同様に 4850 - 4500 cm^{-1} は IR 領域で帰属されたグルコースの OH バンド (3100 cm^{-1}) と強い相関を示していることが確認出来た。また、負の交差相関のバンドはそれぞれエタノールとグルコースの持つバンドが逆向きの反応をしていることが確認出来る¹²⁻¹⁶⁾。Figure3.16(b)の第一倍音領域 5985-5870, cm^{-1} 5812-5742 cm^{-1} は IR で帰属されているエタノールの CH_3 の逆対称伸縮振動のバンド (2985 cm^{-1}) と強い相関を示している。同様に 6800-5990 cm^{-1} は IR 領域で帰属されたグルコースの OH バンド (3100 cm^{-1}) と強い相関を示していることが確認出来た。また、負の交差相関ピークそれぞれエタノールとグルコースの持つバンドが逆向きの反応をしていることが確認でき、基質と生成物が現れる波数領域を分離することを可能にした。このように NIR・IR - ヘテロ 2DCOS を行

うことで効率的にエタノールのバンドとグルコースのバンドを分離し、帰属を行うことが可能となることが示された。この結果から、エタノールの検量線を作製するためには結合音領域では 4850 - 4500 cm^{-1} を選択し、第一倍音領域では 5985-5870, cm^{-1} 5812-5742 cm^{-1} を採用することが有効だと判断できる。この領域を用いて検量線を作製し、 R^2 と RMSEP を計算した結果を Tble3.1 に示す。それぞれ波数を限定した場合でも波数を選択していない場合(4900-4250 cm^{-1})で検量線を構築した際と同等の精度が示された。つまり、波数を限定しても精度が低下しないことから、化学的意味を持った波数を採用していると考えられる。この手法を用いることで、グルコースなどの他成分の領域を選択的に外すことが出来、エタノールバンドと相関が高い

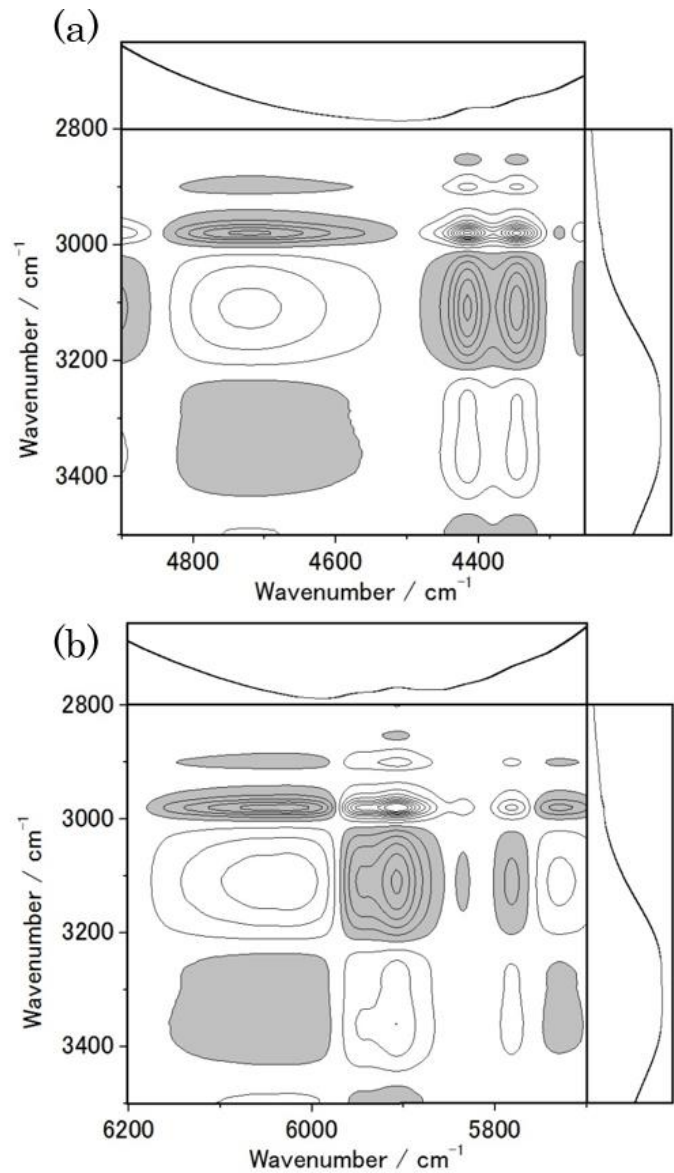


Figure3.16 NIR 領域(a)4900-4250 cm^{-1} ,(b) 6200-5700 cm^{-1} と IR 領域 3500-2700 cm^{-1} のヘテロ 2DCOS の同時相関スペクトル

NIR 領域の波数を選択することで、効率的かつ理論的に検量線を作成することが可能になる。さらに、異時相関スペクトルに現れる交差相関ピークについて検討する事で、摂動に対する反応に時間差が存在するバンドは他の成分に帰属することが可能となる。

3.4. 結論

世界で初めて開発された NIR スペクトルの広範囲と IR スペクトルを同時測定可能な NIR/IR 一体型分析計でアルコール発酵過程の同時測定を行い、同じスケールの NIR と IR スペクトルをオンラインで測定可能にした。得られたスペクトルに対して 2 次微分処理を行い、PLSR を用いて検量線作製する事で、発酵に伴う副生成物の散乱の影響を除去できたが、理論的に妥当ではない領域も検量線に寄与している結果となった。よって、精度が高い検量線を作成するためには、検量線に選択する合理的な波数を任意で選択しなければならないという問題として残った。そこで検量線に用いる領域を帰属された IR バンドの変化と NIR のバンドのヘテロ 2 次元相関分光法によって適切な波数を選択が可能となった。これによって検量線の精度を低下させることなく、化学的根拠を持った波数の選択を可能にした。この手法を用いて適切な波数の選択を行えば、検量線を得るための煩雑な作業と妥当性検証が同時に解消される。また、今後反応プロセスにおいて測定波数が限定された安価な NIR 分光器でも代用可能になることが期待できる。

3.5. 参考文献

- 1) 尾崎幸洋著 “近赤外分光法”, 講談社 (2015)
- 2) P. Williams and K. Norris.” Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries”, American Association of Cereal Chemist (1987)
- 3) 岩元睦夫, 河野澄夫, 魚住純 “近赤外分光法入門”, 幸書房 (1994)
- 4) Ozaki Y, Amari T. “Near-Infrared Spectroscopy in Chemical Process Analysis”, Spectroscopy in Process Analysis. Sheffield, Chap. 3, 53-95 (2000)
- 5) H.W. Siesler. “Application to Industrial Process Control”, Near-Infrared Spectroscopy-Principles, Wiley-VCH, Chap. 11, 247-268 (2002)
- 6) Ozaki Y, *Anal. Sci.*, 28, 545 (2012)
- 7) S.J. Doherty, C.N. Ketteler. “On-line Applications in the Pharmaceutical Industry”, Process Analytical Technology. Oxford, Chap. 9, 329-361. (2005)
- 8) M.A. Czarnecki, Y. Liu, Y. Ozaki, M. Suzuki, and M. Iwahashi. *Appl. Spectrosc.*, 47(12), 2162-2168 (1993)
- 9) 岩本令吉 “近赤外スペクトル法”, 講談社 (2008).
- 10) Gonjo T, Futami Y, Morisawa Y, M. J. Wojcik, and Ozaki Y. *J. Phys. Chem., A*, 115 (35), 9845-9853 (2011)
- 11) J. Wang, M.G. Sowa, M.K. Ahmed, and H.H. Mantsch, *J. Phys. Chem*, 98, 4748 (1994)
- 12) Noda I, *Appl. Spectrosc*, 47, 1329. (1993)
- 13) Noda I, *Anal. Sci.*, 23, 139. (2007)
- 14) 野田勇夫, 尾崎幸洋, *分光研究*, 第44巻 第5号 総説 (1995)
- 15) 森田成昭, 新澤英之, 尾崎幸洋, *分光研究*, 第60巻 第6号 総説 (2011)
- 16) 新澤英之, 森田成昭, 尾崎幸洋, *分光研究*, 第61巻 第3号 総説 (2012)
- 17) Watari M, *Opt. Rev.*, 17(3), 317-322 (2010)
- 18) Nishii T, Genkawa T, Watari M, Ozaki Y, *Anal. Sci.*, 28(12), 1165-1170 (2012)
- 19) Genkawa, T., Watari, M., Nishii, T., Ozaki, Y. *Appl. Spectrosc.* 66(7), 773-781 (2012)
- 20) 三上由帆, 関西学院大学大学院理工学研究科博士過程前期課程, 修士論文 (2005)
- 21) 北條正司, 能勢晶 “酒と熟成の化学”, 光琳 (2009)
- 22) Lehninger, A.L.”生命とエネルギーの化学”, 化学同人, p53 (1973)
- 23) J. Robinson (ed) "The Oxford Companion to Wine" Third Edition, Oxford University (2006)
- 24) N.J. Berthels, R.R. Cordero Otero, F.F. Bauer, J.M. Thevelein, I.S. Pretorius, *FEMS Yeast Research.*, 4, 683 (2004)
- 25) 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄著 “化学者のための多変量解析”, 講談社 (2002)
- 26) 長谷川健 “スペクトル定量分析” 講談社(2005)
- 27) 長谷川健, 尾崎幸洋, *BUNSEKI KAGAKU*, 54(1), 1-26 (2005)

4. NIR/IR Moving-Window ヘテロ 2 次元相関法の開発と

医薬品の原薬製造を想定した反応プロセスへの応用

4.1. 緒言

第3章では、NIR/IR一体型分析計を用いてアルコール発酵過程のNIR・IRスペクトル同時測定を行い、NIR/IRヘテロ2DCOSを行うことでアルコール発酵系のアルコールとグルコースのバンドの帰属を行った。そして帰属された領域を効率的に選択し、さらに2次微分を行うことで、高精度でかつ信頼性の高い検量線を作製することに成功した¹⁾。

しかし、この手法では明瞭なバンドの帰属ができていない点と、エタノールとグルコースを分離したモニタリングが困難という問題点が残った。この問題点として一つは2次微分処理である。2次微分はベースライン変動の影響を除去し、CHのバンドのような微小なバンドが明瞭に検出できるが、その反面、水溶液中のグルコースのOHバンドのようなブロードなバンドに対しては情報を消している可能性がある。また、PCAやPLSRのようなケモメトリックスの手法では、スペクトルの変化が異なる物質由来であったとしても、その変化が近い場合、同一の物質によるものだと判別してしまうという問題がある。不運にも第3章のようなアルコール発酵過程ではグルコースの消費速度とエタノール生成速度に明瞭な差は現れないことから、PLSRでグルコースとエタノールを分離した検量モデルを作製することは難しいという結果を得た。つまり、生化学反応や、物性変化過程などの任意的に目的変数を変化させることができない系に対しては、PLSRやPCRなどの手法だけを用いると、問題が生じる場合がある。また、2次元相関解析やケモメトリックス解析は、複数のスペクトルを用いて行われるが、時間分解測定やハイフネータッド測定によって得られるデータセットの解析は、その中に多量のデータが取り込まれるため、処理しきれず十分な情報が得られないことが挙げられる。

そこで、2次元相関分光法においてもMoving-Windowのアイデアが提案された。即ち、測定されたデータセット（吸光度、発光強度、散乱強度等）を、スペクトル変数（波数、波長、散乱ベクトルの大きさ等）と摂動変数（時間、温度、濃度等）で表される2次元配列（行列）に格納し、その部分行列（Window）内のデータで数値解析を行いながら、部分行列を走査（Moving）させるという方法である。この計算方法は従来からある移動平均計算や数値微分計算に似ている。これまでにケモメトリックスの分野では、スペクトル変数方向、摂動変数方向及び両方向への走査に基づくMoving-Windowの応用が提案されてきた²⁾³⁾。2次元相関分光法の分野では、2000年にThomasとRichardsonがMoving-Window2次元相関（MW2D）法を提案している⁴⁾。これらはいずれも、摂動方向に部分行列を走査することによって相関スペクトルを計算する。一般化2次元相関法では、相関マップがスペクトル変数－スペクトル変数（波数－波数）平面にプロットされるのに対し、MW2DCOS、PC MW2DCOSでは、相関マップがスペクトル変数－摂動変数平面にプロットされるのが特徴である。このためどのバンドが（スペクトル変数）、いつ（摂動変数）、どのように変化したのか（相関係数）を視覚的に捉えることができる。また、NIRとIRでPCMW2Dを行うことでIRの帰属からNIRの帰属を得ることができると報告されている⁵⁾。そこで筆者はこの手法応用し、新しく開発されたNIR/IR一体型分析計を組み合わせればバンドの帰属が行われているIRのバンドに対してNIRのバンドの変化を時間単位で比較する事を可能にした新しい解析法「Moving-Window Two-dimensional

heterospectral (MW2DHetero) COS」を考案した¹¹⁾。この新しい解析法を用いることで、これまで困難であった時間差を持つ成分のプロセス中の反応を分離してモニタリングし、反応中の化学現象を裏付可能にすることから実用的にも画期的な手法であると示唆される。さらにこの研究成果はモニタリングだけでなく、時間(摂動)単位でのバンドの分離を可能にすることから、最初に述べた複雑なNIRスペクトルの帰属に示唆を与え、分光分析化学の基礎的研究にも貢献できるものである。

本章ではこの新しい解析法「MW2DHeteroCOS」の原理と実験系に応用した例について述べる。NIR/IR MW2DHeteroCOSによってアルコール発酵系における、糖の消費とアルコールの生成速度のような近しい挙動をする系を分離することが可能になれば、PCAやPLSRのようなケモメトリックスの手法では検出できないような新しい情報を近赤外スペクトルから引き出すことが可能となる。Berthelsら⁶⁾が述べるようにエタノールの生成に対してグルコースとフルクトースの消費速度に時間差があるならば、差異をMW2DHeteroCOSによって検出する事が可能になるはずである。

4.2. NIR/IR Moving-Window ヘテロ 2次元相関法の原理

Moving-Window2DCOS (MW2DCOS) は、ある摂動変数 p_j に対して、 $J = j - m$ から $J = j + m$ までの $2m + 1$ 本のスペクトルを部分行列として扱い、摂動方向への走査に基づく Moving-Window を行ってスペクトルの本数分の 2次元相関マップを作製する。この部分行列内のデータに対して一般化 2次元相関スペクトルを計算する事でスペクトル本数 $-2m$ 個のマップを作製できる(Figure4.1)。

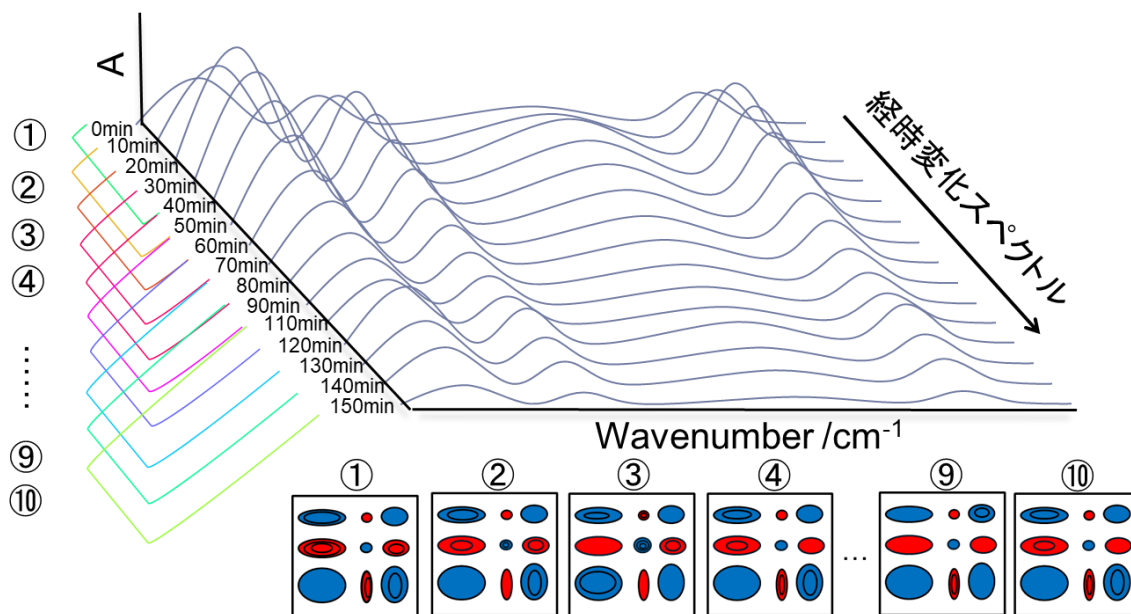


Figure4.1 Moving-Window を用いた二次元相関マップの作成

MW2D 法では同時相関マップの対角線上の相関値を抽出する。これを式であらわすと以下の(1)式ようになる。

$$\Omega_{A,j}(v, p_j) = \frac{1}{2m} \sum_{J=j-m}^{j+m} \hat{y}_J^2(v, p_j) \quad \dots (1)$$

ここで、 $\tilde{y}_j(v, p_j) = y_j(v, p_j) - \bar{y}(v)$ は動的スペクトルであり、部分行列内における平均スペクトル $\bar{y}(v)$ により mean centering を行って得る。 v と p は、それぞれ、スペクトル変数と摂動変数であり、下添え字の j と J は、それぞれ、全行列内での位置と部分行列内での位置をあらわすインデックスである。

MW2DCOS は、部分行列内で、同時相関スペクトルにおける対角線上のスライススペクトルを抽出する。ここで、対角線上ではなく、あるスペクトル変数におけるスライススペクトルを抽出すると MW2DCOS でも同時相関スペクトルと異時相関スペクトルを計算することができ、以下の(2)(3)式で表される。

$$\Omega_{\phi,j}(v, p_j) = \frac{1}{2m} \sum_{J=j-m}^{j+m} \tilde{y}_j(v, p_j) \cdot \tilde{y}_j(v_c, p_J) \quad \dots (2)$$

$$\Omega_{\psi,j}(v, p_j) = \frac{1}{2m} \sum_{J=j-m}^{j+m} \tilde{y}_j(v, p_j) \cdot \sum_{K=j-m}^{j+m} M_{JK} \cdot \tilde{y}_j(v_c, p_K) \quad \dots (3)$$

ここで、 M_{JK} はヒルベルト-野田変換行列、 v_c はスライスを行うスペクトル変換である。しかしこの場合、スライスするスペクトル変数、すなわち、どのバンドに着目して解析するのか事前に決めなければならないという欠点がある⁷⁸⁾。

そこで登場したのが Perturbation-Correlation Moving-Window2DCOS(PCMW2DCOS)である。

PCMW2DCOS スペクトルは以下(4)(5)式のようにして計算される。

$$\Pi_{\phi,j}(v, p_j) = \frac{1}{2m} \sum_{J=j-m}^{j+m} \tilde{y}_j(v, p_j) \cdot \tilde{p}_J \quad \dots (4)$$

$$\Pi_{\psi,j}(v, p_j) = \frac{1}{2m} \sum_{J=j-m}^{j+m} \tilde{y}_j(v, p_j) \cdot \sum_{K=j-m}^{j+m} M_{JK} \cdot \tilde{p}_K \quad \dots (5)$$

ここで、 $\tilde{p}_J = p_j - \bar{p}_j$ は、部分行列内で mean centering を行った摂動変数である。スライススペクトルに基づく MW2D 相関が、スペクトルとスペクトルの相関であるのに対し、PCMW2DCOS が、スペクトルと摂動の相関であることがわかる。このときの摂動は、時間や温度といった線形関数でもよいし、同じ試料を用いて測定したクロマトグラムや熱量測定データ、あるいは、同じデータセットに対し主成分分析を行った時のスコアのような非線形関数であってもよい。PCMW2DCOS では、基準となる摂動変化に対する同時相関と異時相関が決まるので、それに対する位相角を求めることもできる⁹⁾。

PCMW2DCOS において、摂動が線形関数の場合、同時相関はスペクトル変化と線形関数の相関であり、異時相関はスペクトル変化と線形関数のヒルベルト変換との相関である。線形増加関数のヒルベルト変換は上凸の放物線状の関数となる。このため、同時相関と異時相関は、それぞれ、摂動方向のスペクトル変化の傾きと曲率を与えることになる。森田らは、摂動が線形増加関数の場合に、以下の関係が成り立つことを導き出した⁹⁾¹⁰⁾。

$$\Pi_{\phi}(v, p) \sim \left[\frac{\partial y(v, p)}{\partial p} \right]_v \quad \dots (6)$$

$$\Pi_{\psi}(v, p) \sim - \left[\frac{\partial^2 y(v, p)}{\partial p^2} \right]_v \quad \dots (7)$$

これらのことから、容易に解釈が可能となった。ただし注意が必要なのは、このルールは線形増加摂動に限った場合であり、非線形摂動の場合は、一般化2次元相関法と同様の解釈が必要となる。

筆者はこの解釈を容易にさせるために新しい解析手法「Moving-Window Two-dimensional heterospectral (MW2DHetero) COS」を考案した。この解析手法は PCMW2DCOS を行う上で摂動にあたる部分に NIR/IR 一体型分析計で同時に測定された IR のバンドを採用する事を基本としている。帰属された IR バンドの波数のスペクトル変化を摂動にすることによって、NIR の領域のスペクトル変化が同じ時間、同じ変化をするか否かというシンプルでかつ明瞭な解釈に変換可能になる。つまり、Figure 4.2 に示すように、ある IR バンドの波数に着目し、NIR の領域でスライススペクトルを抽出することでそれらのバンド間の相関が高ければ高い程、着目した IR バンドと同じ変化をしていることになる。その相関は、時間単位で相関を計算するため、ある個所では相関が高いが、ある個所では相関が低くなるということも十分に考えられる。

また、筆者は2次元相関分光法における同時相関スペクトルが、統計で言うところの分散・共分散の考えと一致すると考え、摂動として用いた IR バンドの波数と NIR スペクトルの各波数の標準偏差で割ることで相関係数 R 及び決定係数 R² を求めることを提案した。これによって、分散・共分散の値がスペクトルの変化量に依存するという難点を克服した。その結果、完全に変化が一致している場合を 1 として変化量が異なるバンドでも同じスケールで比較することが可能となる。

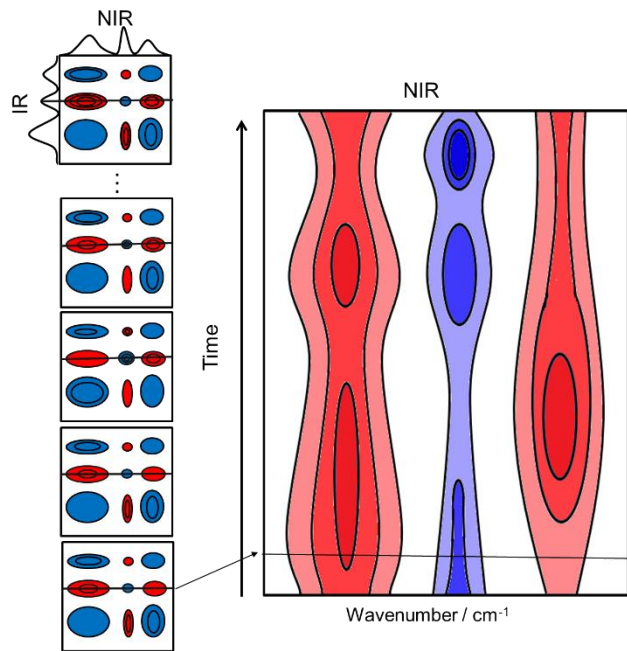


Figure 4.2 NIR/IR MW2DHeteroCOS のイメージ

4.3. 材料及び方法

4.3.1. 試料および試薬

発酵液は D(+)-グルコース(和光純薬株式会社製 純度 99.0 %)10 w/v%, D(-)-フルクトース(和光純薬株式会社製 純度 99 %) 10 w/v%, 1 のイーストエキス(和光純薬株式会社製) w/v%, ペプトン(和光純薬株式会社製) 2 w/v%の割合になるよう超純水で調製を行った。固定化酵母は第 3 章で述べた方法で作製を行った。

4.3.2. 実験装置および解析ソフト

・高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

NIR/IR 一体型分析計で推定されたグルコースとフルクトースに濃度の参照データとしてとして、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた。HPLC は JASCO 製の RI-1531 と示差屈折率検出器を組み合わせたものを用いている。カラムは Amide Column 150 mm (250 mm × 4.6 mm)を 45 °C に設定したカラムオープン内で使用した。移動相はアセトニトリル 80 %、水 19.95 %およびトリフルオロ酢酸(TFA)0.05 %の酸性水溶液を用い流速 1.0 ml/min で測定を行った。リテンションタイムは 13 分とした。これによってグルコースとフルクトースを分離し、溶液内に含まれるそれぞれの糖の相対量を算出した。

・スペクトル解析ソフト

PAT 用のソフトウェア Symbion-Dx (Symbion 社)を基に NIR/IR 用に開発されたソフトウェアを用いて行った。2 次微分や MSC 等のスペクトル前処理には The Unscrambler ver. 9.2 (CAMO ASN, Norway) を用いた。吸光度が 2.0 以上を示した領域の吸光度はすべて 2.0 に置換した。スペクトルの前処理に用いた 2 次微分は Savitzky-Golay 微分の 15 ポイントで行った。2 次元相関解析は計算に用いた領域のスペクトルを用いて MSC 処理を行い 2DShige (大阪電気通信大学 森田成昭教授によって作製) を用いて計算を行った。

4.3.3. 実験操作

・混合糖のアルコール発酵試験

発酵液に 200 mL の固定化酵母をガラス製の 2 層式ビーカーに入れ、ジャケット内を灌流する水の温度を変えることでサンプル温度を調節した。スペクトル測定は横河電機(株)と共同で開発した NIR/IR 一体型分析計によって行った。バックグラウンドを 30 °C の空気を取った後、固定化した酵母 40 mL (約 21 g) をビーカーに入れ、1 分間攪拌させた後、30 °C に保って攪拌しながら測定を行った。スペクトルの測定条件は走査回数 32 回、分解能 8 cm⁻¹ とし、NIR/MIR スペクトルを約 3 分毎に 400 分間取得した。また発酵中に発酵液を約 15 分間隔でサンプル採取し、直ちに HPLC で測定を行った。

4.4. 結果と考察

4.4.1. 混合糖でのアルコール発酵過程におけるバンドの挙動

NIR/IR 一体型分析計によって得られた混合糖でのアルコール発酵過程の主なスペクトル変化としては、グルコースの持つ OH 及び CH の減少とエタノールの持つ CH と OH の吸収の増大が考えられる。Figure3-1 と Figure3-2 に特に変化が大きかった IR の基準振動領域(3500-2700 cm^{-1})と NIR の結合音領域(4900-4250 cm^{-1})において発酵前後で MSC 処理したスペクトル、差スペクトル、2 次微分スペクトルを示す。

・基準振動領域のスペクトル変化

発酵液のグルコースの半分が構造の似たフルクトースに変るのみで、第 3 章で述べたアルコール発酵過程のスペクトル変化と近い結果が得られた。Figure4.3 の 2 次微分スペクトルから 2935 cm^{-1} にグルコースとフルクトースの CH によるピークが確認出来た。そして徐々に減少し反対に 2985 cm^{-1} にエタノールの CH_2 逆対称伸縮バンドが観測された。そして差スペクトルからアルコール発酵が進むにつれて 3010~3250 cm^{-1} のブロードなグルコースとフルクトースの OH バンドの減少が確認された。

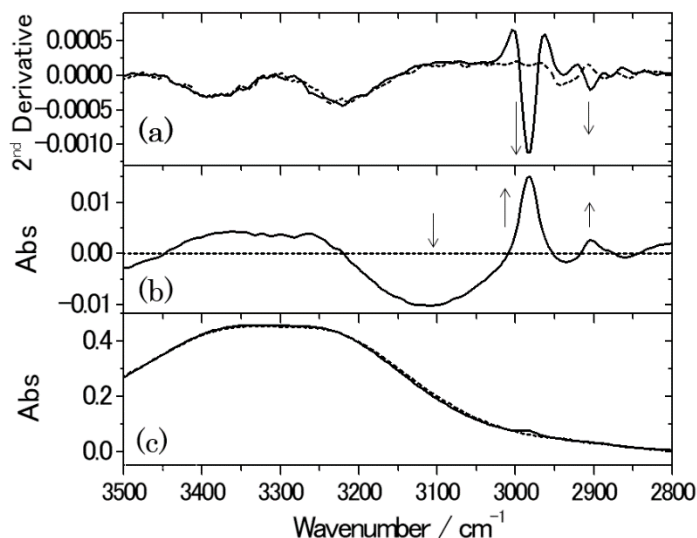


Figure4.3 発酵開始(破線)と 400 分後(実線)における IR の伸縮振動音領域(3500-2700 cm^{-1})における (a)二次微分スペクトル (b)差スペクトル(c)MSC スペクトル

・結合音領域のスペクトル変化

Figure4.4 より発酵開始時は 4401 と 4433 cm^{-1} にピークが認められたが、発酵に伴ってこのピークが消え 4416 cm^{-1} と 4346 cm^{-1} にピークが現れた。また、差スペクトルから 4850~4500 cm^{-1} にかけてブロードなピークの減少が認められた。これらのスペクトル変化はグルコースとフルクトースの CH および OH の減少と、エタノールの CH の増加によるものと考えられる。

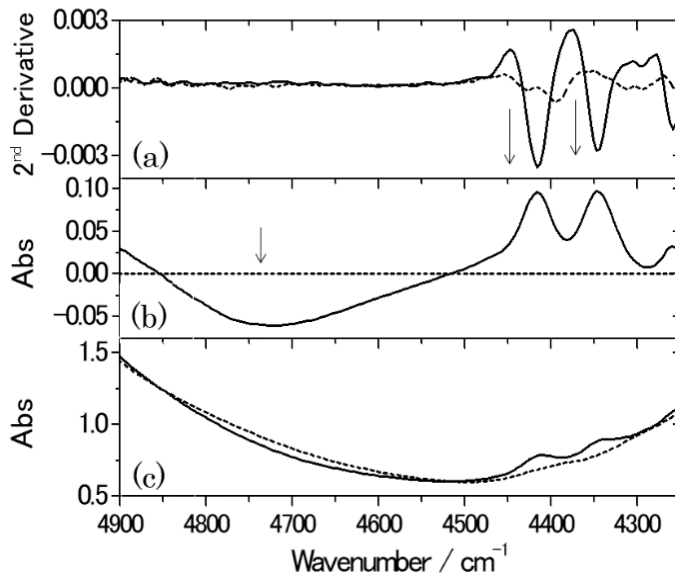


Figure4.4 発酵開始(破線)と 600 分後(実線)における結合音領域 (4900-4250 cm^{-1})における (a)二次微分スペクトル(b)差スペクトル(c)MSC スペクトル

4.4.2. HPLCによるグルコースとフルクトースの相対量の時間変化

Figure4.5 に HPLC によって測定されたアルコール発酵過程で消費されるグルコースとフルクトースの相対量の時間変化を示す。グルコースとフルクトースの混合糖でアルコール発酵を行った場合 50 分付近までは同様の変化を示したが、それ以降は異なる変化を示している。特に 50 分以降のグルコース濃度はほぼ直線的に減少していることに対してフルクトースは約 150 分まであまり減少せず、150 分付近で再び減少している。この結果は Berthels ら⁶⁾が述べた結果を完全に支持するものとなった。

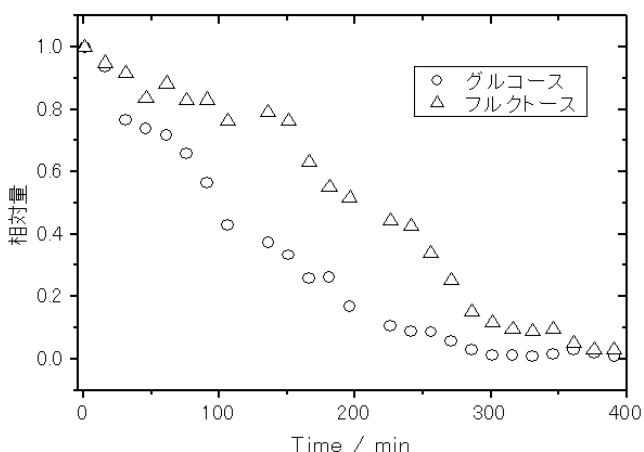


Figure4.5 HPLC によって測定されたグルコースとフルクトースのアルコール発酵時間に対する相対量

4.4.3. 主成分分析 (PCA) による解析結果

主成分分析 (PCA) を用いれば、アルコール発酵過程におけるスペクトルの変化の成分数が予期できる。仮に PCA によって HPLC で導かれたグルコースとフルクトースの変化の有意差を見積もることができれば、その結果から PCR で検量する事も可能である。Figure4.6 と Figure4.7 に NIR 領域の $4800\sim 4250\text{ cm}^{-1}$ に対して PCA を行った結果のローディングとスコアを示す。ローディングの第 1 主成分(PC1)はエタノールの形状と酷似しており、PC1 のスコアも時間ごとに増加していることからエタノールの変化を反映していると考えられる。さらに PC2 の寄与率は 0.1% 以下となり、スコアは特に有意な意味を示す結果とはならなかった。このことから PCA 解析ではこの系の成分数は 1 つだけと示され、エタノールの生成と糖の減少の変化を分離する事は困難であることが示された。

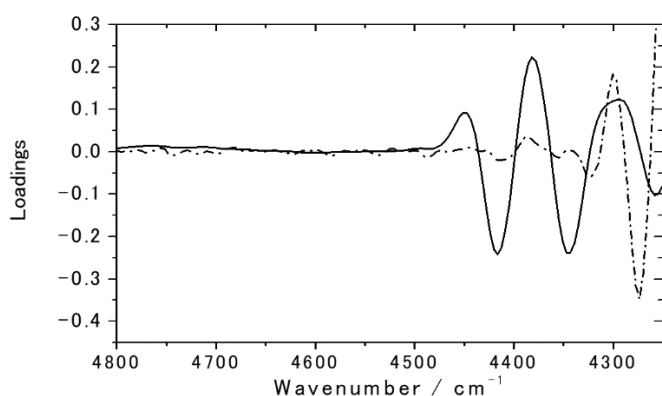


Figure4.6 NIR 領域の $4800\sim 4250\text{ cm}^{-1}$ に対して PCA の PC1(実線)と PC2(破線)のローディング

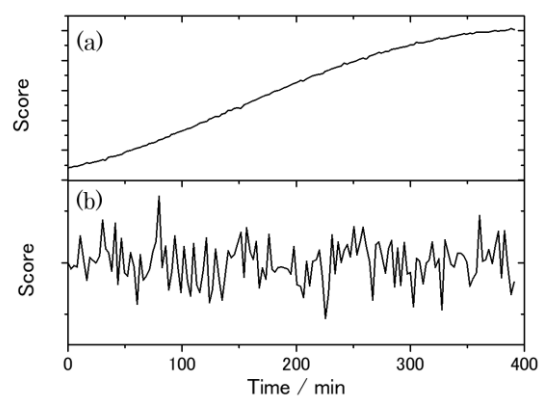


Figure4.7 NIR 領域の $4800\sim 4250\text{ cm}^{-1}$ に対して PCA に PC1 (a)と PC2(b)のスコアプロット

4.4.4. NIR・IR ヘテロ 2次元相関分光法を用いた解析

Figure4.8 にアルコール発酵過程全てのスペクトルデータを用いた NIR 領域($4900\text{-}4250\text{ cm}^{-1}$, $6200\text{-}5700\text{ cm}^{-1}$)と IR 領域($3500\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$)のヘテロ 2DCOS を示す。Figure4.8(a)から、IR 領域のエタノールの CH_3 の非対称伸縮振動のバンド (2985 cm^{-1}) に対して NIR 領域の 4410 cm^{-1} と 4380 cm^{-1} が強い正の相関を示し、これらの NIR バンドはエタノールに帰属された。同様にグルコースとフルクトースの糖による OH バンド ($3010\text{~}3250\text{ cm}^{-1}$) に対し、NIR 領域の $4800\text{~}4550\text{ cm}^{-1}$ のバンドが強い正の相関を示したことから、これらのバンドは糖に帰属された。負の交差相関のバンドからエタノールと糖の持つバンドが対照的な反応であることが示された。また、Figure4.8(b)からエタノールの CH_3 の非対称伸縮振動のバンド (2985 cm^{-1}) に対して異時相関スペクトルでは糖とエタノールのバンド変化に時間差があることを支持するが、発酵プロセスのどの段階で時間差が生じているかまで判断することは困難であった。

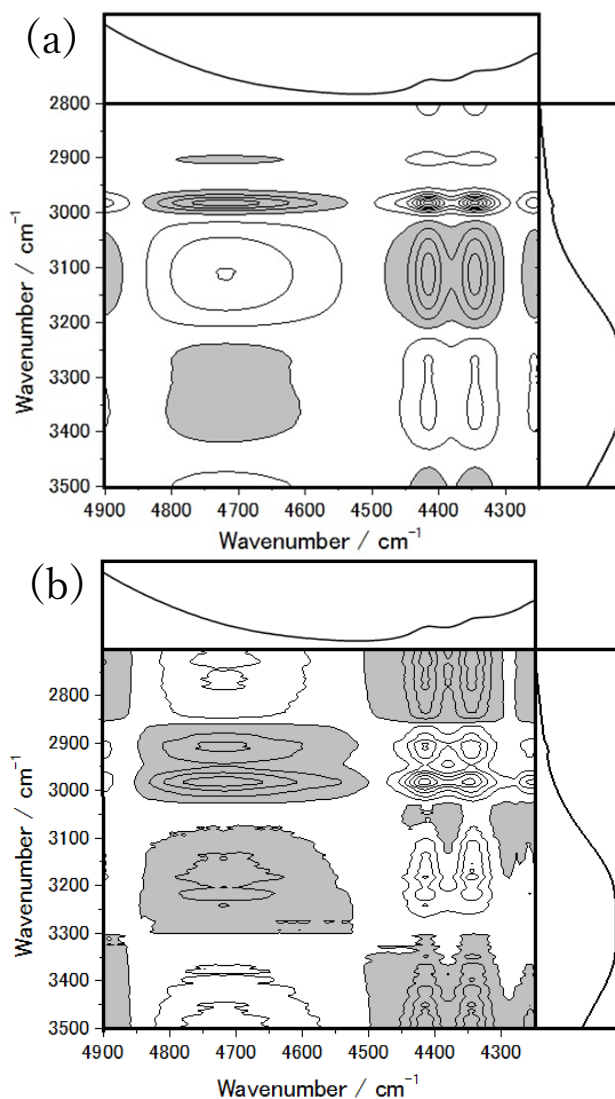


Figure4.8 NIR 領域 $4900\text{-}4250\text{ cm}^{-1}$ と IR 領域 $3500\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ のヘテロ 2DCOS の(a)同時相関スペクトルと(b)異時相関スペクト

4.4.5. NIR/IR MW2DHeteroCOS を用いた解析

先に述べたように、開発した NIR/IR MW2DHeteroCOS による解析を行った。IR 領域で特徴的な変化を示したエタノールの CH_3 の非対称伸縮振動バンド (2985 cm^{-1}) の変化を対象に、NIR の結合音領域($4250\text{--}4900\text{ cm}^{-1}$)で NIR/IR MW2DHeteroCOS を行った結果を Figure4.9 に示す。NIR 領域のエタノールバンド (4416 cm^{-1} 付近)に関しては 180 分付近をピークに等間隔な等高線型を示した。これはエタノール×エタノールの共分散行列なのでスペクトルの変化量(反応速度)が最大となる箇所で相関が増加することを示している。NIR/IR MW2DHeteroCOS を解析する上でエタノール×エタノールの相関に対し、エタノール×糖($4800\text{--}4550\text{ cm}^{-1}$)の相関を比較する事が重要となる。つまり、エタノール×エタノールの相関とエタノール×糖の等高線の形状が同じであれば、同じ変化(反応速度)をしていることを意味する。エタノール×糖の相関を確認すると 50 から 150 分付近にかけて糖の OH バンド($4800\text{--}4550\text{ cm}^{-1}$)との相関が一時的に低下していることが確認出来でき、エタノールの生成と糖全体の消費速度が異なることを示している。Figure4.5 で示した様に 50 から 150 分付近は HPLC で測定したグルコースとフルクトースの消費速度に差異があり、NIR/IR MW2DHeteroCOS はこれらの情報を反映していると考えられる。また、300 分付近では糖の相関がエタノールよりも先に低下しており、基質である糖の消費がエタノール生成より先に終了していることも示している。

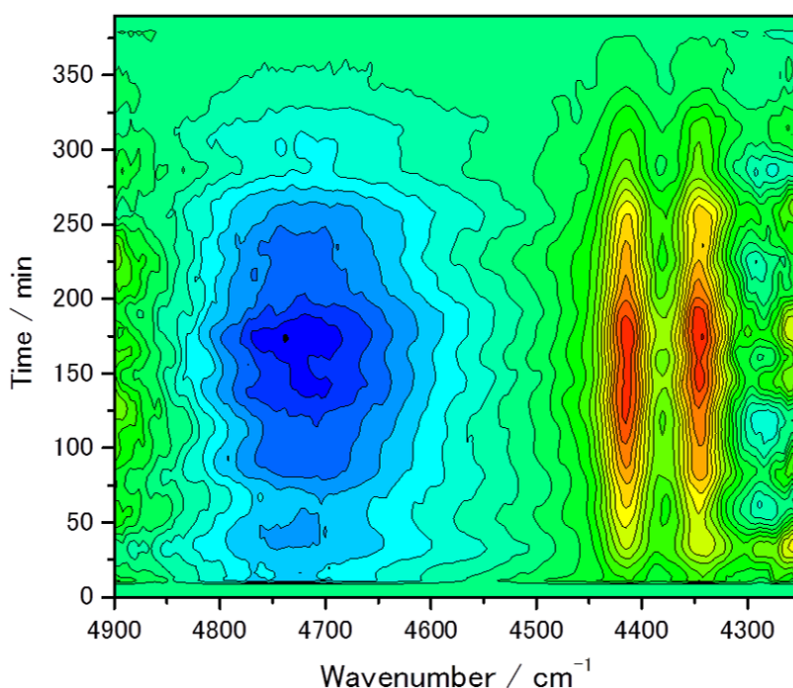


Figure4.9 エタノールのバンド (2985 cm^{-1})と NIR 領域($4900\text{--}4250\text{ cm}^{-1}$)の NIR/IR MW2DHeteroCOS

しかし、NIR/IR MW2DHeteroCOS で得られた相関図だけでは、エタノールと糖の変化に差異があるという結果の優位性を判断することに限界があることから、数値化して比較するために決定係数 R^2 の算出を行った。これにより、IR のエタノール(2985 cm^{-1}) に対する変化が完全に一致している場合を 1 として表現が可能となる。ここで、NIR 領域のエタノール及び糖の変化を代表する波数を 4416 cm^{-1} 及び 4724 cm^{-1} として計算する。エタノール (2985 cm^{-1})×エタノール (4416 cm^{-1}) とエタノール (2985 cm^{-1})×糖(4724 cm^{-1}) の R^2 を Figure4.10 に示す。エタノール×エタノールでは理論上同じ変化をしているので、反応が進行している間は常に 1 に近い値であった。しかし、エタノール×糖では 50 から 150 分付近にかけて相関が低下していることから、エタノールの生成速度は糖全体の消費速度とは異なる反応速度で変化していることを支持し、HPLC を反映する結果となった。なお、グルコース単体のアルコール発酵ではどのような挙動を示すか検証するため、第 3 章のアルコール発酵プロセスに対し、第 4 章と同様に R^2 の比較を行

った結果を Figure4.11 に示す。エタノール×エタノールとエタノール×グルコースのそれぞれの R^2 は概ね 1 を推移し、Figure4.10 と異なる挙動であった。つまり、グルコース単体ではエタノールの生成速度とグルコースの消費速度に大きな差異は無いことが考えられ、グルコースとフルクトースを同時に反応させることで反応速度に変化を与えるという結果を支持した。

なお、本研究では酵母内を直接測定していないため、グルコースとフルクトースがどのような経路で時間差が生じてエタノールに変換されるかを確認することは出来なかった。しかしながら、オンライン測定によってグルコースとフルクトースで酵母の分解速度が異なる結果を支持したことは重要であると考え、開発した NIR/IR MW2DHeteroCOS が時間差を持つ化学反応系の解析に対して有効な手法であることを示した。

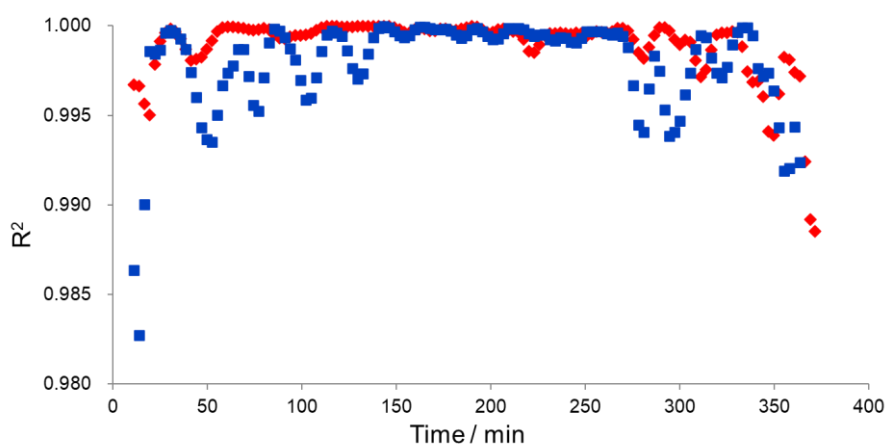


Figure4.10 エタノール(2985 cm^{-1})×エタノール(4416 cm^{-1})(赤プロット)とエタノール(2985 cm^{-1})×糖(4724 cm^{-1})(青プロット)の発酵時間に対する決定係数 R^2

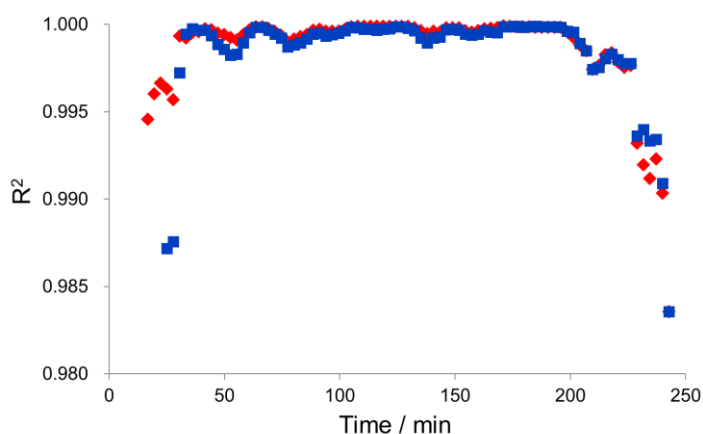


Figure4.11 エタノール(2985 cm^{-1})×エタノール(4416 cm^{-1})(赤プロット)とエタノール(2985 cm^{-1})×グルコース(4724 cm^{-1})(青プロット)の発酵時間に対する決定係数 R^2

4.5. 結論

グルコースとフルクトースを混合した糖を用いてアルコール発酵試験を行うと、HPLC で異なる変化をしているものの、それぞれの変化を一般的な PCA や PLSR のような多変量解析手法で分離する事は難しいという結果となった。そこで、ヘテロ 2DCOS と Moving-Window の手法を組み合わせた NIR/IR MW2DHeteroCOS の開発を行い、アルコール発酵過程に適用させた。帰属されている IR のエタノールバンドの変化を基準にすることで、グルコース及びフルクトースを含む糖の消費速度とエタノールの生成速度に差があることを示した。

これにより反応挙動が類似しているプロセス中の変化を裏付けが可能となり、実用的にも画期的な手法であると考えられる。それは従来 HPLC 等でしか分離できなかった反応でも NIR によるオンライン測定にシフトさせる可能性を示した。この研究成果は反応モニタリングへの利用という実用的な使用だけでなく、時間 (摂動) 単位でのバンドの分離を可能にすることから、複雑な NIR スペクトルの帰属等、今後の分光分析学の基礎研究への貢献が期待できる。

4.6. 参考文献

- 1) Nishii T, Genkawa T, Watari M, Ozaki Y, *Ana Sci*, 28(12), 1165–1170 (2012)
- 2) 新澤英之, 森田成昭, 尾崎幸洋 *分光研究* 第 61 卷 第 3 号 総説 (2012)
- 3) Morita S, Shinzawa H, Noda I, and Ozaki Y, *Appl.Spectrosc.*, 60, 398 (2006)
- 4) M. Thomas and H. H. Richardson. *Vib. Spectrosc.*, **24**, 137 (2000)
- 5) Watanabe A, Morita S, and Ozaki Y, *Appl.Spectrosc.*, **60**, 611 (2006)
- 6) N.J. Berthels, R.R. Cordero Otero, F.F. Bauer, J.M. Thevelein, I.S. Pretorius, *FEMS Yeast Research.*, 4, 683 (2004)
- 7) Noda I and Ozaki Y “Two-dimensional Correlation Spectroscopy” John Wiley and Sons, Ltd., Chap. 1, 1-14 (2004)
- 8) 野田勇夫, 尾崎幸洋, *分光研究*, 第 44 卷 第 5 号 総説 (1995)
- 9) Morita S, Tanaka M, Noda I and Ozaki Y, *Appl. Spectrosc.*, **61**, 867-872 (2007)
- 10) 森田成昭, 新澤英之, 尾崎幸洋, *分光研究*, 第 60 卷 第 6 号 総説 (2011)
- 11) Nishii T, Morita S, Genkawa T, Watari M, Ishikawa D, Ozaki Y. *Appl. Spectrosc.*, 69(6), 665–670 (2015)

5. NIR法を用いたフィルムコーティング被膜量の簡易定量法と生産立ち上げへの応用

5.1. 緒言

厚生労働省発行の平成30年薬事工業生産動態統計年報では、医薬品剤型分類別生産金額6.9兆円の内、約57%が経口固形製剤であり（生産金額：約3.9兆円）、その内の約79%（生産金額：約3.1兆円）を錠剤が占めている¹⁾。錠剤の製造工程は一般に前混合、造粒、乾燥、整粒、滑沢混合、打錠およびフィルムコーティング等の単位操作から構築されている²⁾。その中でフィルムコーティングの役割は、製剤の機能性の付与、有効成分に起因する苦みや臭いのマスキング、薬剤の安定性向上、外観及び識別性の向上等、多種の目的がある。製剤機能性の付与のうち、腸溶性コーティングや徐放性コーティング等、薬物の放出制御を行う機能性コーティングにおいては、所期の錠剤特性を発揮するために均質かつ完全なフィルム層を形成することが必要となる^{2,3)}。実際、コーティング量が薄すぎたり厚すぎたりすると、素錠部が外部の影響を受けやすくなることや、APIの溶出が低下したりするので、タブレットの効果が変化する²⁾。

このことから、製品を営業生産へ移行するにあたり、コーティング被膜量を適切にコントロールした製造条件を設定することは、溶出性及び安定性等の製品品質が変化するリスクを低減させ、恒常的な品質の確保に繋がる。そのため、コーティング製造条件は被膜量を把握しながら溶出試験等の品質試験で得られた情報も加味して設定することが重要である。

医薬品製造におけるコーティング被膜量のモニタリング方法としては、サンプリングした錠剤の平均質量の増加量から被膜量を予測することが一般的であったが、近年、フィルムコーティング工程へのPAT (Process Analytical Technology) の適用により、インラインによる高次のコーティング被膜量管理が可能となった^{4,9)}。しかしながら、インラインによるモニタリングは平均的なコーティング被膜量をモニタリングすることを目的としており、錠剤個々の不均質性まで把握するには限界がある。また、コーティング被膜量は、一般的に素錠質量に対して2~5%程度と少なく、打錠工程中に生じた素錠の質量のばらつきを加味した場合、錠剤個々のコーティング被膜量を錠剤質量から計算することは困難である。一方、コーティング錠の切断面から直接計測することは可能であるが、数十 μm のフィルム層を誤差なく測定するには熟練した技術が必要であり、また仮に錠剤を誤差なく切断できたとしても、破壊測定となり溶出試験等の別試験に用いることができなくなることから、コーティング被膜量と別試験との相関を確認することができない。以上のことより、コーティング被膜量を非破壊測定することは有用であり、近赤外 (NIR) をはじめ、ラマン、テラヘルツ等の分光分析が用いられている^{10,11)}。

NIRによるコーティング被膜量の定量は、教師あり機械学習であるPLSR (Partial Least Squares Regression) を用いた分析が一般的であり、種々報告されている^{12,13)}が、PLSRによる検量線作成は、基準データとして別法で測定したコーティング被膜量を取得する必要があり非効率である。本研究では、効率のかつ円滑な技術検討を可能にすることを目的に、非破壊でコーティング被膜量の定量を行い、基準データを不要とする主成分分析 (Principal Component Analysis : PCA) による簡易定量法を考案した¹⁴⁾。また、品目Aのコーティング機変更に伴う製造条件の設定に本手法を応用し、コーティング機を現行機から新

型機へ変更する際に、効率化のためにスプレー噴霧時間を大幅に短縮した場合の被膜量を、簡易定量法により測定し、現行機および新型機で製造された錠剤のコーティング被膜量同等性について検証した。

5.2. 材料及び方法

5.2.1. PCA を用いた簡易定量法

PCA は多変量データの次元を削減し、変数間の関係を把握しやすくする多変量解析手法である¹⁵⁻¹⁹⁾。NIR スペクトルは主成分と呼ばれる新しい変数の線形結合を作り出すことで、少数の主成分を用いてデータの特徴を効率的に表現することが可能となる。PCA により、コーティング前後の関係を示す次元を抽出し、スコアの情報と製造時に得られる錠剤質量のデータを組み合わせることで、コーティング被膜量を半定量することが可能となる。PCA を用いたコーティング被膜量の簡易定量法の概略図を Figure5.1 に示す。

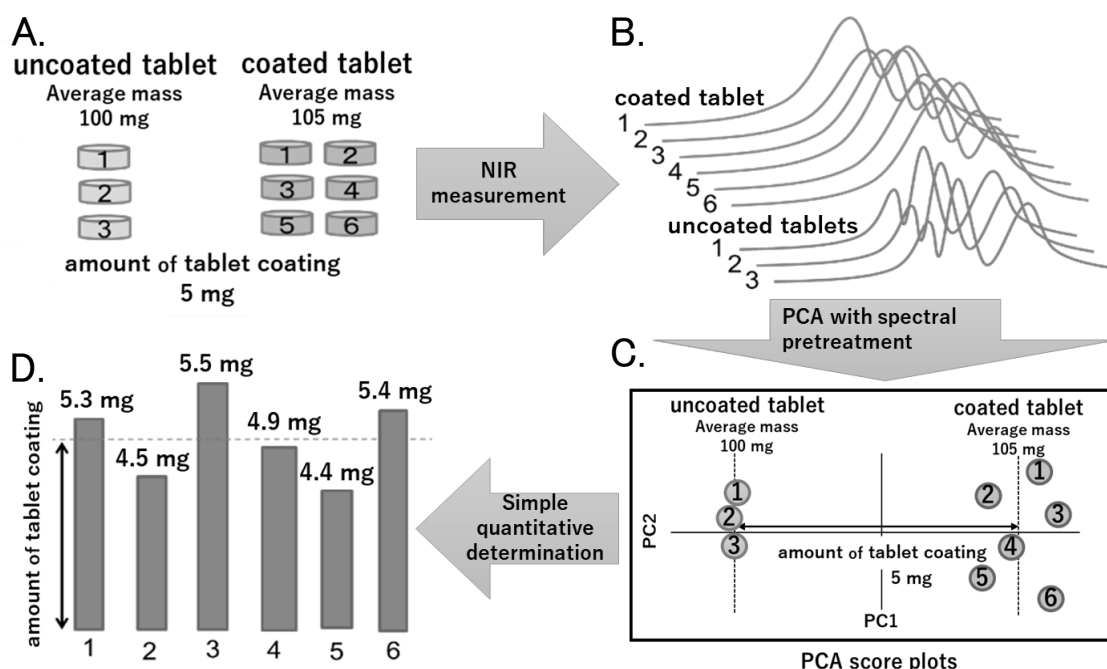


Figure5.1 PCA を用いたコーティング被膜量の簡易定量法の概略図

A. 製造実績からコーティング錠及び素錠の平均質量が既知の錠剤を準備する。このとき、素錠はコーティング錠よりも多く準備する必要は無い。B. 各錠剤の NIR スペクトル測定を行う。C. スペクトル前処理後に PCA を行い、第 1 主成分のスコアがコーティング錠と素錠で分離されていることを確認する。その際、第 1 主成分のローディングベクトルはコーティング錠と素錠の差スペクトルに対応していることを確認する。D. コーティング被膜の平均質量は製造実績から既知である為、コーティング錠と素錠のスコアの平均距離を平均質量と置換することが可能である。これにより、各コーティング錠のスコア平均値は、各錠剤のコーティング被膜量のばらつきとして簡易的に半定量することが可能となる。

5.2.2. サンプル製造

コーティング錠は、現行機と新型機でそれぞれ 200 kg(170 万錠)スケールで製造した。コーティング被膜量測定用のコーティング錠はコーティング工程の終了時にパン内部から無作為に 20 錠を採取し、素錠はコーティング実施前に採取した。なお、現行機に用いる素錠は実薬を、新型機は疑似薬を用い、実薬の処方成分は質量濃度 17 w/w%原薬(モデル化合物 A)の他に、賦形剤としてマンニトール及びコーンスターチ等で構成した。一方、疑似薬はマンニトール等で構成した。打錠は直径 7 mm の 10.5R 杵を用い、錠剤質量 120 mg/錠で行った。フィルムコーティングは実薬及び疑似薬共にヒドロキシプロピルメチルセルロース 6.3 w/w%、酸化チタン 6.3 w/w%、ポリエチレングリコール 0.6 w/w%、及び三二酸化鉄 0.1 w/w%以下を用いた固形分量 10 w/w%の水系コーティングとして噴霧した。

5.2.3. 測定装置及び測定方法

錠剤の NIR スペクトル測定には BÜCHI 社の NIR Flex N-400 を用い、拡散反射法によって測定範囲：9000-4000 cm^{-1} 、分解能：12 cm^{-1} 、積算回数：8 回で行った。スペクトル解析には CAMO 社の The Unscrambler X ソフトウェアを使用した。

5.3. 結果及び考察

素錠とコーティング錠及びフィルムコーティング基剤の原スペクトルを Figure5.2 に示す。素錠の吸光度はコーティング錠のそれと比較して大きくなっている。これはコーティング基剤の吸収は小さく、コーティング錠は素錠に被覆されているコーティング基剤により、素錠部に到達する NIR 光が減少するためである。スペクトルの前処理として標準正規化 (Standard Normal Variate :SNV) 処理を行った。SNV は各波数のスペクトル強度を標準化することで、多重散乱の影響を低減することができる²⁰⁾。なお、一次微分及び二次微分を実施した場合でも、ベースライン変動の低減及び微小な吸収ピークの強調が期待できる^{21,22)}。素錠とコーティング錠の原スペクトルは、コーティング被膜の有無でスペクトル強度が十分変化していることから、二次微分による吸収ピークの強調は不要と判断し、前処理は SNV 処理のみを採用した。

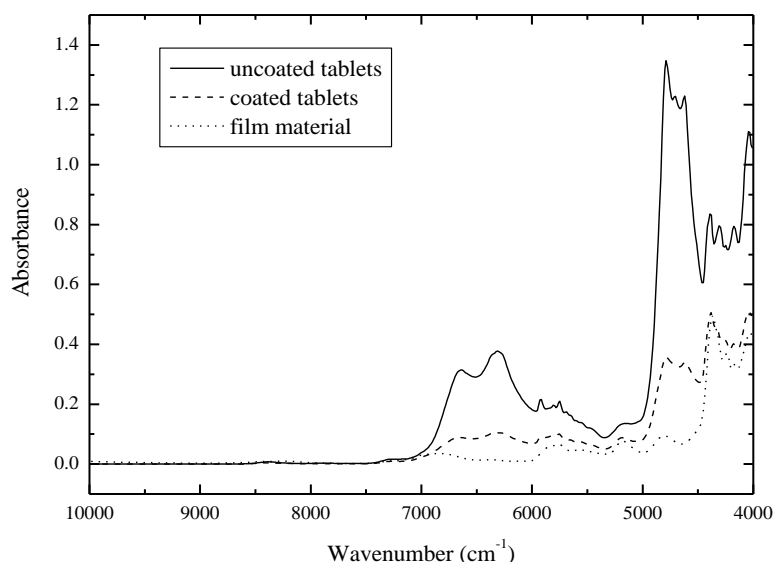


Figure5.2 NIR 領域における素錠、コーティング錠、フィルム基材の原スペクトル

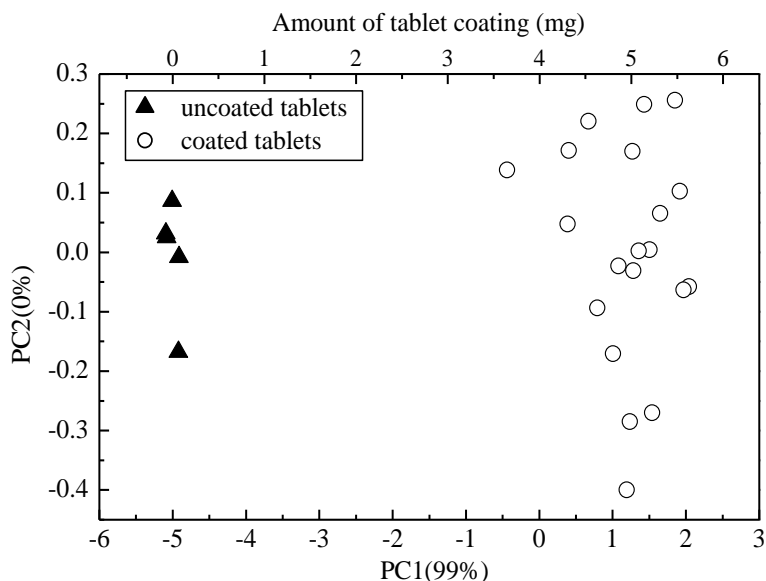


Figure5.3 素錠とコーティング錠でPCAを行ったときの第1主成分(横軸)と第2主成分(縦軸)のスコアプロット

グプロット及びコーティング錠と素錠の差スペクトルを Figure5.4 に示す。第1主成分のローディングプロットは、コーティング錠と素錠の差スペクトルの形状と一致していることが確認された。コーティング錠と素錠の差スペクトルは素錠に被覆されたコーティング基剤を示している。つまり、第1主成分のスコアはコーティング被膜量を投影しており、第1主成分のスコアを用いて定量することは化学的に根拠があることを示している。そこで、第1主成分のスコアからコーティング被膜量の半定量を試みた。第1主成分の素錠のスコアの平均とコーティング錠のスコアの平均距離は実際にコーティングによって増加した被膜の質量(製造実績値で 5.0 mg/錠)と仮定できる。これより、コーティング錠のスコア平均値と素錠のスコア平均値の差を 5.0 mgに変換した軸を作成することで、コーティング被膜量を簡易的に定量(半定量)することが可能となる (Figure5.3 上軸)。

上記の方法により、現行機及び新型機のコーティング錠それぞれについて簡易定量を行った。現行機及び新型機のコーティング被膜量のばらつきを比較した結果を Table 5.1 に示す。コーティング被膜量の相対標準偏差 (Relative Standard Deviation : RSD) は、現行機 8.3 %及び新型機 8.1 %とその差は僅かであることから、ばらつきは同等であることが確認された。一般的に、新型機へ製造を変更し、スプレー液噴霧時間を短縮させた場合、コーティング被膜量のばらつきは増大することが示唆される。しかしながら、本

Figure5.1 の手順に従い、新型コーティング機で製造したコーティング錠 20 錠と素錠 5 錠の各スペクトルに対して SNV 処理し、PCA を行った。第1主成分と第2主成分のスコアプロットを Figure5.3 に示す。第1主成分の寄与率は 99%であることから、スペクトル変化は第1主成分に集約される結果となった。また、第1主成分のスコアの分布はコーティング錠と素錠で明瞭に分離された。コーティング錠と素錠間で被膜量以外の別の因子(例として水分など)が変化する場合、主成分に表示される可能性がある。そこで、第1主成分のローディン

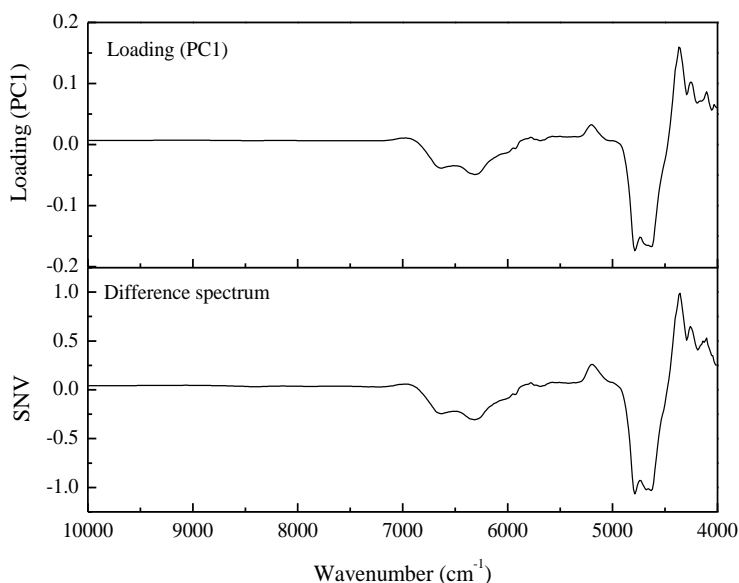


Figure5.4 第1主成分のローディングプロット及びコーティング錠と素錠の差スペクトル

手法により用いた新型機ではコーティング被膜量のばらつきが増加するリスクは小さいことが示された。このようにコーティング被膜量を評価することで、新型機の性能を最大限に活かすことができ、従来のスプレー噴霧時間を 60 %まで短縮させる条件設定に寄与した。

さらに、錠剤コーティングの条件設定には疑似薬を用いることが多く、従来法である PLSR では素錠成分を実薬成分に変更するとモデルを再構築する必要が生じる。しかし、本手法は疑似薬及び実薬の両者において、同じ手法でコーティング被膜量を比較することが可能であることから、迅速な技術検討に貢献することが期待できる。

Table 5.1 現行機及び新型機のコーティング被膜量のばらつき

Machine type	Current	New
Coating time (h)	7.0	4.3
Ave (mg)	5.0	4.9
SD (mg)	0.4	0.4
RSD (%)	8.3	8.1

SD: Standard deviation

本研究で考案した簡易定量法をまとめると、以下の利点が挙げられる。

- ・ 検量モデルを必要としない
- ・ 疑似薬(プラセボ)と実薬を同様に比較可能
- ・ 基準データが不要
- ・ 異常検出が可能

また、非破壊分析である本手法は、状況に応じて溶出試験等の品質試験と組み合わせることで、より多くの情報を得ることが期待できる。

なお、本手法は迅速かつ簡易的に半定量が可能である一方、基準データが無いことから、分析精度が算出できないことに注意する必要がある。よって、本手法は検討段階や異常・逸脱等のトラブル発生時の指標とし、予備的あるいは補助的な試験という位置づけが望ましい。また、本手法は 1 層コーティングを想定しているが、多重層コーティングの場合、他層の膜厚ばらつきが計算に加味されることから、定量精度の向上には測定したいコーティング層が有する吸収波数のみを選択する必要がある。

5.4. 結論

NIR 法を用いたコーティング被膜量の簡易定量法を考案し、営業生産への移行に応用した。その結果、実薬と疑似薬のいずれのコーティング被膜量のばらつきにおいても迅速かつ簡便に評価可能であった。得られた情報から、コーティング装置の特性を捉えることが可能となり、効率的な製造パラメータ設定と、円滑な営業生産への移行に貢献した。

固形製剤の連続生産システムにおけるリアルタイムモニタリング (PAT) では、PCA を用いる事例もあり、提案した簡易定量法と組み合わせることで、より多くの情報を得ることが期待できる。また、本手法

の概念は錠剤のフィルムコーティング工程だけではなく、顆粒コーティング工程の被覆量や、混合工程の混合均一性等のモニタリングにも応用可能であると考えられる。

5.5. 参考文献

- 1) 厚生労働省 平成 30 年度医薬品剤型分類別生産金額
<https://www.mhlw.go.jp/topics/yakuji/2018/nenpo/19.html>
- 2) 池松康之, *PHARM TECH JAPAN*, 34(7),75-82 (2018)
- 3) Ansel HC, Allen LV Jr, Popovich NG, Capsules and tablets. Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 179-228 (1999)
- 4) 荒井宏明, *計装*, 58, 13-17 (2015)
- 5) 荒井宏明, *製剤機械技術学会誌*, 25 (5), 41-45 (2016)
- 6) T.De Beer, Burggraeve, M.Fonteyne, L.Saerens, J.P.Remon, C.Vervaet, *Int J Pharm.* 417(1-2), 32-47 (2011)
- 7) C.-V. Möltgen, T. Pucherta, J.C. Menezes, D. Lochmann, G. Reicha, *Talanta.*, 92, 26-37(2012)
- 8) José D. Pérez-Ramos, W. P. Findlay, G. Peck, K. R. Morris, *AAPS PharmSciTech.*, 6 (1), E127-E136 (2005)
- 9) Claire Gendre. *Eur J Pharm Sci.*, 43(4), 244-250 (2011)
- 10) S. Romero-Torres, J.D. Perez-Ramos, K.R. Morris, E.R. Grant. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38, 270-274 (2005)
- 11) Anthony J. Fitzgerald, Bryan E. Cole, Philip F. Taday. *J Pharm Sci.*, 94(1), 177-183 (2005)
- 12) M. Andersson, M. Josefson, F.W. Langkilde, K.G. Wahlund, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 20, 27-37 (1999)
- 13) Johannes J. Moes, Marco M. Ruijken, Erik Gout, Henderik W. Frijlink, Michael I. Ugwoke, *Int J Pharm.*, 357, 108-118 (2008)
- 14) 西井 崇, 松崎 勝洋, 森田 成昭, *製剤機械技術学会誌*, 28(5) 470-474 (2019)
- 15) 加納学, *製剤機械技術学会誌*, 24(1), 13-19 (2015)
- 16) 加納学, *製剤機械技術学会誌*, 24(4), 369-375 (2015)
- 17) 長谷川健 “スペクトル定量分析” 講談社サイエンティフィック (2005)
- 18) 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄, “化学者のための多変量解析” 講談社サイエンティフィック(2003)
- 19) 尾崎幸洋著 “近赤外分光法” 講談社サイエンティフィック(2015)
- 20) Barnes,R., Dhanoa,M., Lister,S.J., *Appl. Spectrosc.*, 43, 772-777 (1989)
- 21) 新澤英之, *製剤機械技術学会誌*, 24 (5), 20-24 (2015)
- 22) A. Savitky, M.J.E. Golay, *Anal. Chem.*, 36, 1627-1639 (1964)

6. ハイパースペクトラルイメージングによる

錠剤全数の主薬含量及びフィルムコーティング被膜量の同時測定

6.1. 緒言

第5章では、錠剤のコーティング被膜量を簡易的に定量することを可能にした。これにより生産立ち上げ時に、品質を造り込むことを助け、製造パラメータの設定に有効であることが示されたり。しかしながら、1ロット数百万錠スケールを in-line で全数モニタリングすることは目的としていない。また、1錠ごとコーティング被膜量ばらつきをモニターすることは重要であるが、1錠の錠剤内部でどの様にコーティング被膜量が分布しているかの情報は品質規格に適合するための有益な情報に繋がる。また、錠剤には有効成分 (Active Pharmaceutical Ingredient: API) 以外にも数種類の賦形剤が添加されていることから、錠剤の含量均一性をモニタリングすることはコーティング被膜量と同様に重要であり、NIR をはじめラマン、テラヘルツ分光法を含むさまざまな分光法が薬物サンプルの品質モニタリングに適用されている²⁻⁵⁾。

近年、NIR ケミカルイメージング (NIR-CI) 技術が医薬品開発と製造プロセスの品質管理における有効なツールとして活用されている⁶⁻¹¹⁾。従来の NIR 技術では錠剤面の平均スペクトルのみを提供したが、NIR-CI は画像内のピクセルごとに1つのスペクトルを提供するので、錠剤面全体の情報を得ることができる。Palou ら¹²⁾は、NIR-CI を用いて錠剤内に含まれる原薬、賦形剤及びコーティング被膜量の分布状態の可視化に成功した。しかしながら、1錠の測定に数分程度を要するため off-line 又は at-line での測定を想定しており、実際に錠剤全数の測定を実施するには 3000 錠/min 以上が求められる。そこで本研究は、直径 7mmφ の錠剤を 4000 錠/min の速度で測定可能なラインスキャン型 NIR ハイパースペクトルイメージング(NIR-HSI)システム (製品名:Compovision) を採用した。第1章にも記載したがラインスキャン型は1つのスペクトルの情報量が少ないことからケモメトリックスを用いた解析が重要となる。これまで Kandpal ら¹³⁾は同様の機器を使用し、実生産速度で素錠の API 濃度の均一性を評価可能であることを示しているが、実際に生産へ応用させるには多種の賦形剤が配合された複雑な実験系で検証する必要がある。

本研究では実生産を想定し、世界で初めてフィルムコーティング錠の API 含量とコーティング被膜量の錠剤表面分布を製造ラインでの採用可能な速度で定量分析を行うことを目的とした¹⁴⁾。API 含量とコーティング被膜量の2成分を同時に定量的に分析できれば、品質管理された錠剤が製造されるだけでなく、API とコーティング被膜量の分布状態を把握することで、製品品質に影響を与える因子の特定に役立つと考えられる。さらに、得られた情報を Quality by Design 理論¹⁵⁾に基づくプロセスの改善の観点からパラメータにフィードバックすることで、高品質な医薬品の提供に貢献すると考えられる。

6.2. 材料および方法

6.2.1. サンプル製造

サルポグレラート塩酸塩 (API Corporation) を API として使用した。1錠質量中 40 w/w% の割合 (市販製品に対応) で塩酸サルポグレラートを添加したものを、含量 100% と規定した。賦形剤として結晶セルロース (CEOLUS®PH-102, 旭化成)、乳糖水和物 (Pharmatose®100M, DMV-fonterra Excipients GmbH & Co.KG) 滑沢剤としてステアリン酸マグネシウム (標準グレード, 太平化学産業) を使用した。コーティング水溶液にはヒドロキシプロピルメチルセルロース (TC-5®, 信越化学工業)、ポリエチレングリコール (Macrogol 6000, 三洋化学工業)、酸化チタン (TIPAQUE®A-100, 石原産業) 及びタルク (ML115, 富士タルク工業) を使用した。

Table6.1 に示す 5 つの異なる素錠 (API 含有量 80~120%) を調整するため、各成分を十分に混合し、直径 7 mm, 重量 125 mg, 錠厚 3.05 mm, 曲率半径 (R) 10mm を目標に単発打錠した。なお、結晶セルロース (以下 MCC) と乳糖水和物の混合比は API の含有量と相関しないようにランダムに調製した。質量変化からコーティング被膜量を算出できるように、各素錠表面に番号を記入し秤量した。コーティング装置 (HC-FZ-Labo-30, フロイント産業) を用い、1.0 kg スケールでコーティングを実施した。水系フィルムコーティング液はヒプロメロース (6.5 w/w%), ポリエチレングリコール (1.25 w/w%), 酸化チタン (1.25 w/w%) 及びタルク (1.00 w/w%) の割合で調整した。制御可能なプロセスパラメーター条件は噴霧空気圧 0.12 MPa、スプレー速度 3.9 mL / min、吸気温度 70°C、吸気空気量 0.6 m³ / min、ドラム回転数 20 rpm に設定した。コーティング中に適宜サンプリングすることでコーティング被膜量が 8 段階異なるフィルムコーティング錠を調製した。これにより、API 含有量 80~120% の範囲とコーティング被膜量 0~7.0mg の範囲を有する 121 錠を製した。

Table6.1 素錠の組成割合

API content	API % (w/w)	excipient % (w/w)		lubricant % (w/w)
	Sarpogrelate hydrochloride	MCC	lactose	St-Mg
80%	32	50	16	2
90%	36	15	47	2
100%	40	30	28	2
110%	44	20	34	2
120%	48	35	15	2

6.2.2. NIR ハイパースペクトラルイメージング (NIR-HSI) システム

NIR-HSI システム (製品名:Compovision) の基本構成を Figure6.2 に、装置情報を Table6.2 に示す^{16,17)}。なお、本研究での測定速度は 4000 錠/分であるが、画像のピクセルサイズを大きくすることで錠剤数を増加することは可能である。

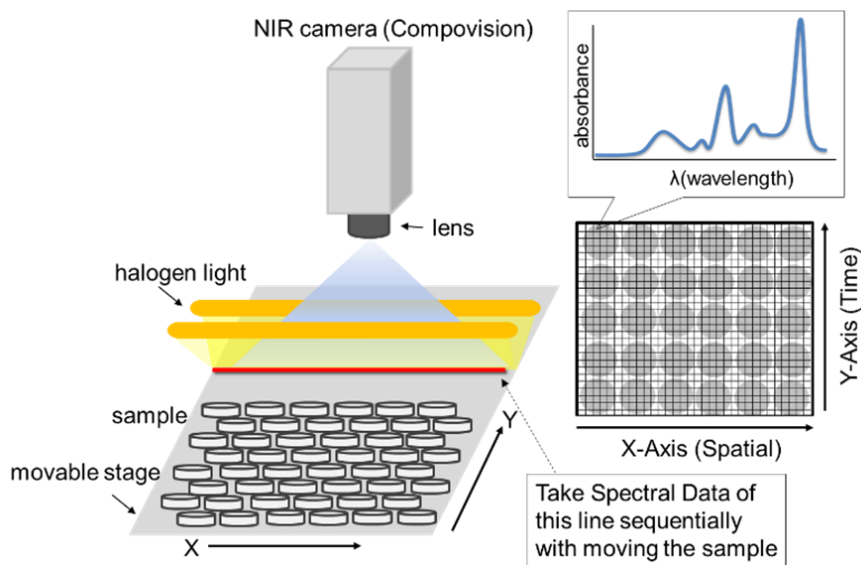


Figure6.2 NIR-HSI システムシステムの概略図

Table6.2 装置情報

Item	Specification	Setting
Detective wavelength range [nm]	1000 - 2350	
	[cm ⁻¹]	4255 - 10000
Pixel (spatial)	320	
Pixel (wavelength)	256	
Frame rate [fps]	100 - 320	320
X-Axis area [mm]	110-270	115
Pixel size [μm]	344-844	359

6.2.3. データ分析

Figure6.3 に示すように、1つの錠剤から得られるスペクトルは約 21×19 ピクセルとなる。本研究では錠剤中央にある 11×11 ピクセル(121 スペクトル)の平均スペクトルによって、データ分析のモデル構築を行った。標準偏差 (SD) は、同じ API 含有量に調製された 8 錠 (Figure6.7 Y 軸) のばらつきから算出した。各 API 含量の平均値は、8 錠の合計 968(121×8 錠)スペクトルを使用して計算した。すべてのスペクトルは、 $-\log_{10}(R/R_0)$ の反射率の吸光度を示す。ここで R と R₀ は各サンプルとリファレンスからの拡散反射強度である。得られた

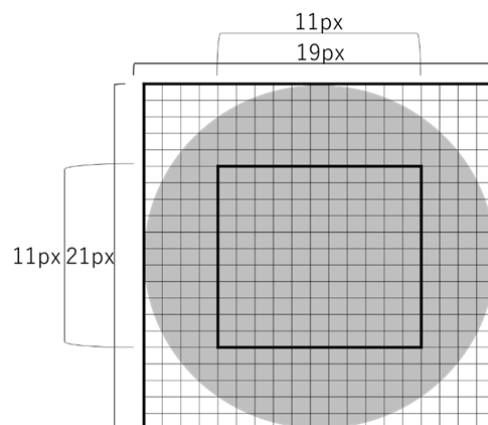


Figure6.3 錠剤中のピクセル分割

スペクトルは、Camo 社 (Trondheim, Norway) のソフトウェア UnscramblerX (Ver10.3)を使用して分析した。得られたスペクトルは、標準正規変量 (SNV) と 2 次微分による前処理を実施した^{18,19)}。なお、2 次微分は 11 点の Savitzky-Golay スムージングと 2 次多項式を用いて計算した。キャリブレーションモデルの構築は PLSR を用いた。その際、潜在変数 (Latent variable : LV)数はオーバーフィッティングによる予測精度向上を回避するため、API 濃度、フィルム被覆率及び賦形剤濃度の最大 3 として計算を行った。

6.3. 結果及び考察

6.3.1. スペクトル解釈

API 濃度及びコーティング被膜量の異なる錠剤の平均スペクトル、SNV スペクトル及び二次微分スペクトルを Figure6.4 に示す。平均スペクトルは 4250~7000 cm^{-1} 付近で大きく変化していることが確認できる。この領域の吸収は主に第一倍音及び結合音に該当する。SNV 前処理の適用後、これらの効果は大きく除去され、ピークは増強された。2 次微分処理を適用することで API 固有の 5942 及び 5670 cm^{-1} の吸収が強調された。しかしながら、スペクトルは同じ API 濃度でもスペクトル強度が変化していることが確認できる。これは API 濃度だけでなく、賦形剤とコーティング被膜量の情報もスペクトルに含まれることを示唆している。したがって、ケモメトリックスを使用して各成分の波形を分析し、計算を実行する必要がある。

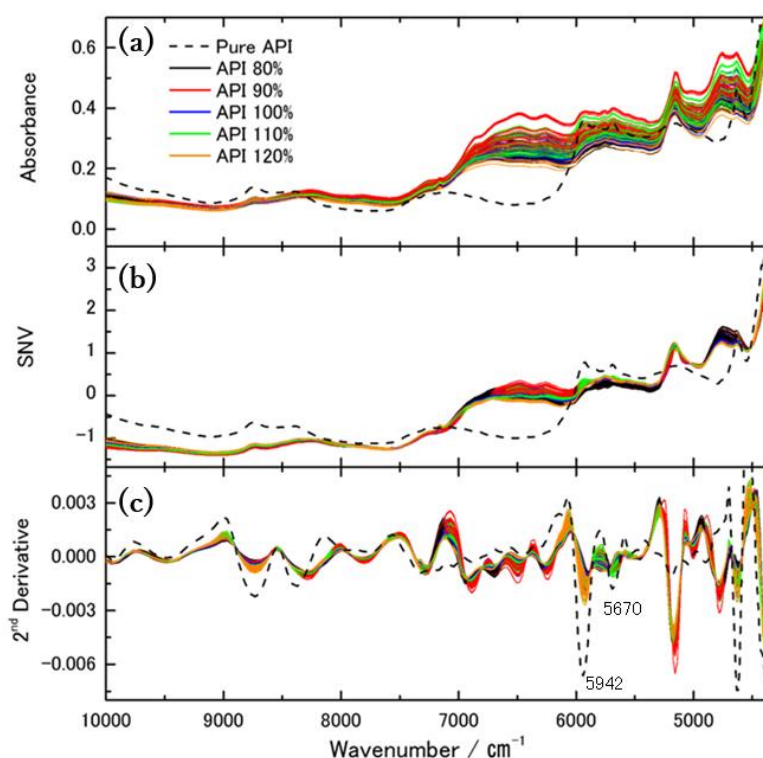


Figure6.4 錠剤の NIR スペクトル:(a) 平均スペクトル (b) SNV 処理スペクトル (c)2 次微分処理スペクトル

6.3.2. API 濃度の PLSR モデル

様々の前処理方法と波数領域を組み合わせた PLSR モデルの予測結果を Table6.3 に示す。API 濃度の PLSR モデルは前処理なしで全波長領域 (4353-10000 cm^{-1})では、決定係数 R^2 及び RMSECV (Root Mean Squared Error with Cross-Validation) が 0.865 及び 5.27%であった。前処理は SNV、2次微分、SNVと2次微分の組合せの3種類で行った結果、全波長域における効果的な前処理は、SNVとSNVおよび2次微分の組合せであった。これよりスペクトルのノイズ成分はSNV前処理により除去されたと考えられる。波長領域 5395~6188 cm^{-1} で2次微分前処理の予測精度が向上したのは、2次微分前処理によりAPIが持つ

5942 cm^{-1} 及び 5670 cm^{-1} 吸収が増強されたためと考えられる。予測精度はSNVと2次微分の前処理の組合せにより R^2 と RMSECV が 0.942 と 3.48%に改善した。

Figure6.5にLV1の係数プロットとAPI及び添加剤の二次微分スペクトルの比較を示す。回帰係数プロットはPLSRの出力であり、サンプル錠剤の化学的性質に関する有用な情報を提供する²⁰⁾。波数バンドを決定するために使用されるLV1の回帰係数プロットはAPIの二次微分スペクトルと一致し、これよりPLSRモデルが

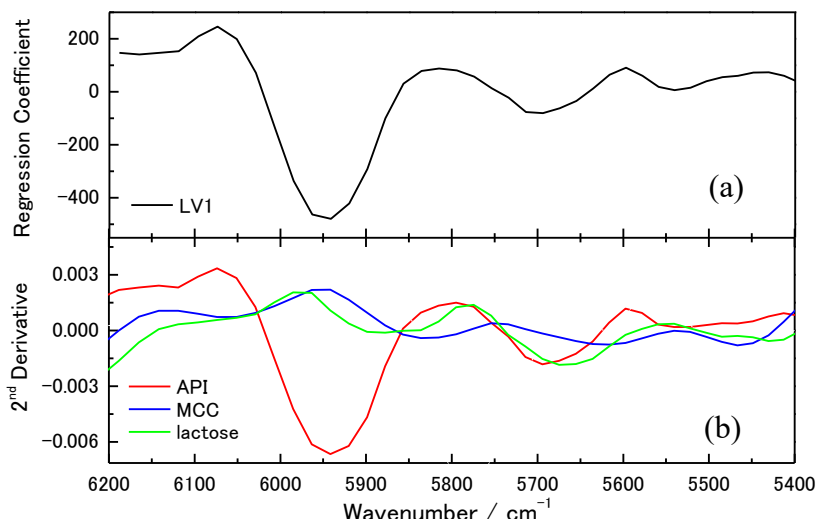


Figure6.5 (a)API 濃度の PLS 回帰係数 (b) API と各添加物の 2次微分スペクトル

APIの化学情報を反映していることを示した。以上より、イメージングに採用するAPI濃度のPLSRモデルは、APIの吸収波長とSNVと2次微分前処理の組合せで最良の結果が得られた。このキャリブレーションモデルはHPLCやUVのような代替法として使用するには十分正確ではないが、傾向を予測するために使用することは可能であると考えられる。

Table6.3 PLSR モデルの予測結果

Target parameter	$1/\lambda$ (cm^{-1})	processing	LV	R^2	RMSECV
Concentration of API	4353 - 10000	none	3	0.865	5.27 %
		SNV	3	0.938	3.57 %
		2 nd derivative	3	0.875	5.08 %
		SNV→2 nd derivative	3	0.941	3.52 %
	5395 - 6188	SNV	3	0.885	4.86 %
		2 nd derivative	3	0.895	4.66 %
Amount of tablet coating	4353 - 10000	SNV→2 nd derivative	3	0.942	3.48 %
		none	3	0.884	0.64 mg
		SNV	3	0.931	0.49 mg
		2 nd derivative	3	0.887	0.63 mg
	4507 - 7700	SNV→2 nd derivative	3	0.935	0.48 mg
		SNV	3	0.939	0.46 mg
		2 nd derivative	3	0.897	0.60 mg
		SNV→2 nd derivative	3	0.939	0.47mg

6.3.3. コーティング被膜量のPLSRモデル

種々の前処理方法および波長領域に対する PLSR モデルの予測結果を Table6.3 に示す。コーティング被膜量の PLSR モデルは波長選択と前処理無しの場合、 R^2 と RMSECV は 0.884 と 0.64%であった。スペクトル前処理に SNV を選択することにより PLSR モデルの予測精度が向上し、特にスペクトルが大きく変化する波長領域 $4507\sim 7700\text{cm}^{-1}$ を採用することにより予測精度がさらに向上する結果であった。また PLSR の予測精度は SNV 及び SNV+2 次微

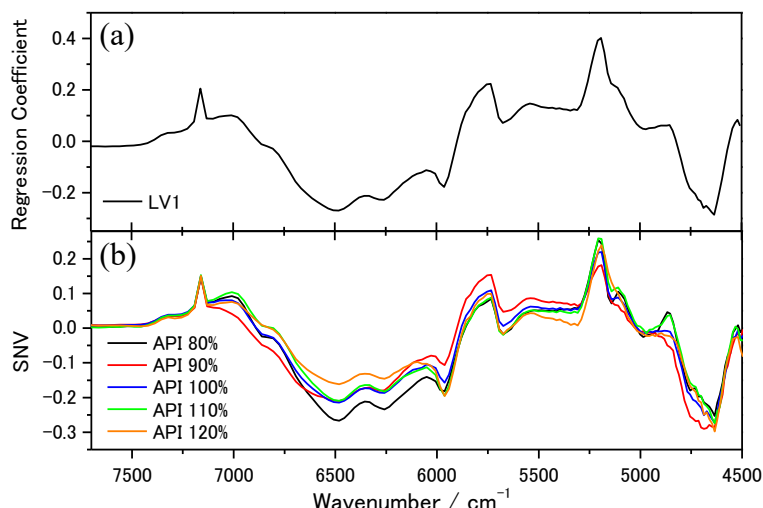


Figure6.6 (a) コーティング被膜量の PLS 回帰係数 (b) フィルムコーティング錠と素錠の差スペクトル

分の組み合わせでも同等であったため、前処理には SNV 処理のみを採用した。Figure6.6 に PLS モデルの LV1 回帰係数プロット及びフィルムコーティング錠と素錠の差スペクトルを示す。差スペクトルの形状は LV1 係数プロットと一致していることから、差スペクトルはコーティング基材の化学情報を示しており、構築した PLSR モデルがコーティングの定量的情報を反映していると判断した。

以上より、コーティング被膜量の PLSR モデルは前処理として SNV を選択し、さらにスペクトル変動の大きい領域を抽出することで最適化することが可能であった。なお、最適な PLS モデルを構築するための前処理と波長領域は API 濃度とコーティング被膜量でそれぞれ異なる点から、化学的根拠を持った検量モデルを構築する重要性が示された。

6.3.4. API 濃度及びコーティング被膜量のイメージング

異なる API 濃度およびコーティング被膜量の錠剤に対し、構築した PLSR モデルでイメージングした画像を Figure6.7 に示す。錠剤の配置として API 濃度が X 軸方向に変化し、コーティング被膜量が Y 軸方向に変化するように配置されている。Figure6.7b が示すように、イメージングによって予測された API 含有量は、実際の API 含有量の増加量を反映しており、コーティング被膜量の影響を受けていないことが示された。この結果より、それぞれが独立した情報をイメージングしていることが示された。ただし、API 含量が同じ割合で調製された 8 つの錠剤 (Figure6.7b Y 軸) であってもカラースケールに変化が認められた。これは同じ割合で調製した錠剤でも錠剤内及び錠剤間の API 濃度に違いがあることを示している。各錠剤間のばらつきを数値するため、同含量 8 錠の API 含量の平均値及び標準偏差 (SD) を算出した (Figure6.8)。API 含量の平均値は調製した API 含量と概ね一致していることから、イメージングによる予測は妥当であると考えられる。しかし、API 含量の SD (エラーバー) は API 含量によって異なる傾向を示し、特に API 含量 80%に調製した場合は SD が大きい結果となった。錠剤内部の成分が完全に均

質である場合、1錠あたりのAPI含量に差が無いはずである。この原因について NIR-HSI システムは、拡散反射光を検出しており、潜り込み深さは数百 μm 程度と想定されることから錠剤表面のデータを測定していることが考えられる。錠剤表面に無限にスライスした場合、錠剤内部が均一であれば、どこでスライスしてもすべて同じ組成になるが実際には異なる結果を示した。これより錠剤が完全にブレンドされていないことで錠剤表面と内側の組成が異なっていることを反映したと考えられる。この情報は混合顆粒の状態を理解するのに役立つ場合がある。今回、API 含量 80%で調製された錠剤は、他の量よりも MCC の割合が高く調製されており、これが混合性に影響を与えることで不均一性を増加させたという考察が可能となる。さらに、API 含量の不均一性が錠剤間または錠剤内のどちらであるかを知ることで、不均一性の原因となる製造プロセスを特定することが期待できる。例えば、錠剤間の含有量に不均一性がある場合、輸送中または錠剤化中に生成された粒子の分離を疑うことができ、錠剤内部に不均一性を示している場合、粒子サイズや混合均一性等の影響であることを予想することができる。

コーティング被膜量の画像化 (Figure 6.7 c) においても、API 濃度に依存せずにコーティング被膜量が増加することが示された。コーティング被膜量を推定することは有用であったが、錠剤の境界付近はコーティング被膜量が極端に増加傾向を示した。これは錠剤エッジ部で光散乱したことでスペクトルが変化したと考えられ、背景の削除や画像処理の手順およびスペクトル分析方法を改善する必要性を示唆した。今回の調査では、錠剤表面のコーティング被膜量の分布状態に特筆する変化は認められなかった。ただし、錠剤が均一にコーティングされていないことがイメージングによって示された場合は、コーティング機内の錠剤の流動状態やスプレーの異常を検査する必要性を協議する必要がある。なお、本研究では、コーティング被膜量と錠剤特性の関係は検証されていないが、NIR-HSI システムによるコーティング状態の画像化により、錠剤の物理的特性と関連付けて評価可能であることが示された。

以上より、NIR-HSI システムによって、錠剤全数の API 濃度、錠剤の最終製品に添加されたコーティングの量の推定を可能にし、錠剤成分の不均一性の原因究明に貢献することが示された。これより、本手法を採用することで製造プロセスの理解を助け、情報が生産パラメータにフィードバックされた場合は迅速なトラブルシューティングとプロセス改善を行うことに応用が期待できる。さらに、データを蓄積することで、「Quality by Design」の観点に基づくプロセスの継続的な改善が可能になる。

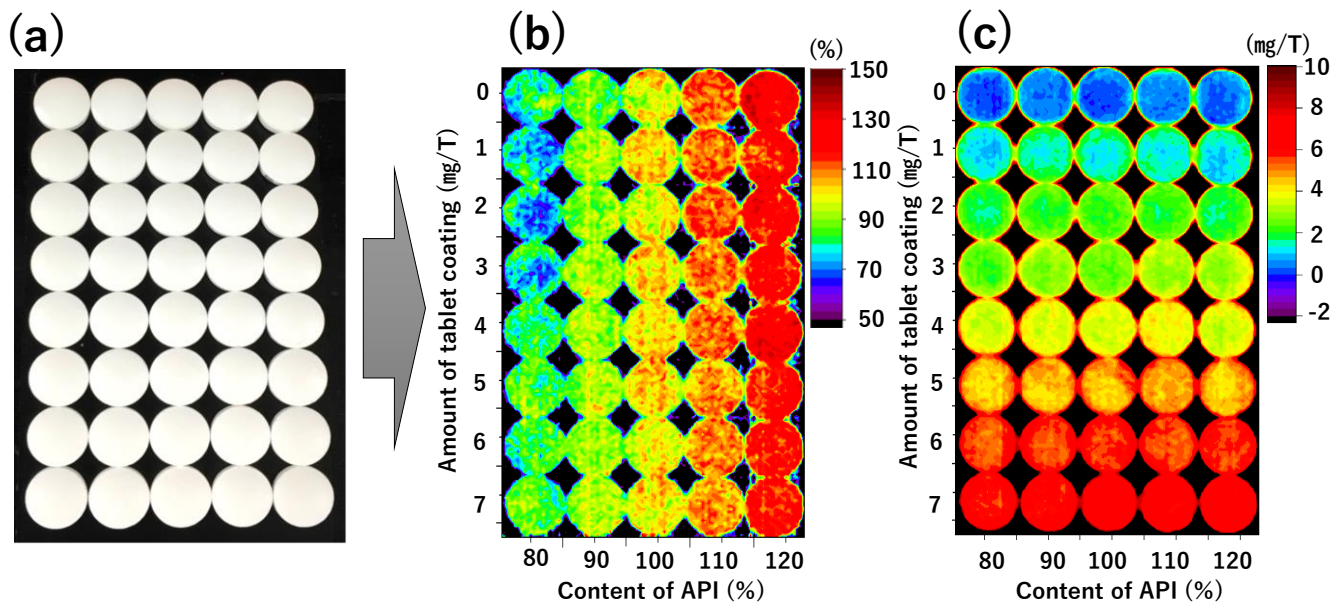


Figure6.7 NIR-HSI システムシステムで予測した錠剤イメージング(a)可視画像 (b) API 含量 (c)コーティング被膜量

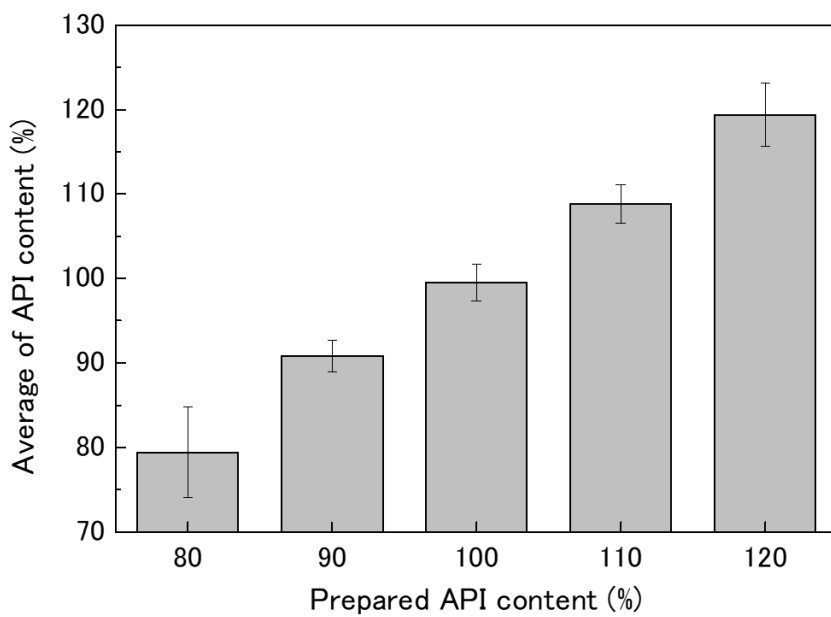


Figure6.8 各含量 8 錠の API 平均含量と標準偏差(エラーバー)

6.4. 結論

本研究では、経口固形製剤の製造速度 4000 錠/min に対応した NIR-HSI システム (製品名: Compovision) を用い、フィルムコーティング錠の API 及びコーティング被膜量の濃度分布を評価した。API 濃度及びコーティング被膜量が異なる錠剤を 4255~10000 cm^{-1} 領域で測定し、得られたスペクトルを用いて PLSR による API 含量及びコーティング被膜量の検量モデルを構築した。検量線の予測精度はケモメトリックス及び波長選択を組み合わせることによって、両方 0.9 以上の R^2 値を示したが、HPLC や UV の代替法として使用するには十分な精度ではなく、あくまで傾向予測に使用することが望ましいと考えられる。PLSR によって構築された検量線から予測されたイメージングは、API 含量とコーティング被膜量を独立して推定可能にし、同じ含有量で調製された場合でも錠剤間で API 濃度が異なることを検出した。NIR-HSI システムによって得られる錠剤間及び錠剤内部の間の濃度情報は、製造時のトラブル原因を調査するのに役立つ、製造プロセスの継続的な改善に貢献することが期待できる結果であった。これらの利点より、NIR-HIS システムを用いた医薬品製造プロセスのオンライン分析の可能性が示された。

6. 5. 参考文献

- 1) 西井 崇, 松崎 勝洋, 森田 成昭, *製剤機械技術学会誌*, 28(5) 470-474 (2019)
- 2) M.P. Freitas, A. Sabadin, L.M. Silva, F.M. Giannotti, D.A. do Couto, E. Tonhi, R.S. Medeiros, G.L. Coco, V.F.T. Russo, J.A., Martins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39, 17-21 (2005)
- 3) P. Pawar, Y. Wang, G. Keyvan, G. Callegari, A. Cuitino, F. Muzzio., 2016. *Int. J. Pharm.*, 512 (96-107)
- 4) Hattori Y, Sugata M, Kamata H, Nagata M, Nagato T, Hasegawa K, Otsuka M, *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 46, 111-121 (2018)
- 5) L. M. Kandpal, B. K. Cho, J. Tewari and N. Gopinathan., *Sens. Actuators, B*, 260, 213-222 (2018)
- 6) N. Pavurala, X. Xu and Y.S.R. Krishnaiah., *Int. J. Pharm.* 523, 281-290 (2017)
- 7) C. Ravn, E. Skibsted, R. Bro, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 48, 554-561(2008)
- 8) J. Cruz, M. Blanco., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56, 408-412 (2011)
- 9) L.M. Kandpal, E. Park, J. Tewari, B.-K. Cho., *J. Biosyst. Eng.* 40, 394-408 (2015)
- 10) Murayama K, Ishikawa D, Genkawa T and Ozaki Y, *Appl. Spectrosc.* 72, 551-561 (2018)
- 11) C. Pei, H. Lin, D. Markl, Y.-C. Shen, J.A. Zeitler, J.A. Elliott., *Chem. Eng. Sci.* 192, 34-45 (2018)
- 12) A. Palou, J. Cruz, M. Blanco, J. Tom As, J. De Los Ríos, M. Alcal., *J. Pharm. Anal.* 2, 90-97 (2012)
- 13) L.M. Kandpal, J. Tewari, N. Gopinathan, P. Boulas, B.-K. Cho., *Anal. Chem.* 88, 11055-11061 (2016)
- 14) Nishii T, Matsuzaki K, Morita S. *International Journal of Pharmaceutics*, 590(30). Published on line (2020)
- 15) Yu LX., Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. *Pharm Res.* 25, 781-91(2008)
- 16) Ishikawa H, Takahashi T, Mizuno F, Suzuki T, Yamada E, Ozaki Y, Ishikawa D, *SEI Tech. Rev.* 76, 94-97 (2013)
- 17) Ishikawa D, Shinzawa H, Genkawa T, S.G. Kazarian and Ozaki Y, *Anal. Sci.* 30, 143-150 (2014)
- 18) Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J., *Appl. Spectrosc.* 43, 772-777 (1989)
- 19) Savitzky, A., Golay, M.J.E., *Anal. Chem.* 36, 1627-1639 (1964)
- 20) V.H. da Silva, J.L. Soares-Sobrinho, C.F. Pereira, Å. Rinnan., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 134, 20-28 (2019)

7. 総括

本研究は新しく開発されたNIR分光装置とスペクトル解析法を組み合わせ、医薬品の反応プロセス及び生産プロセス中に非破壊・非接触かつ高精度でモニタリング可能なNIR分光分析手法の開発を行った。

第3章では医薬品の原薬合成プロセスのモニタリングを想定し、世界で初めて開発されたNIR/IR一体型分光計でアルコール発酵系の高精度なエタノール定量を行った。その結果、NIR単独で検量線を構築するよりも、帰属されたIRバンドの変化とNIRのバンドのヘテロ2次元相関分光法により選択された波長を採用することで、検量線の精度を低下させることなく、化学的根拠を持った検量線作成を可能にした。この手法を用いて適切な波数選択を行えば、検量線を得るための煩雑な作業と妥当性検証が同時に解消される。しかしながら、エタノールの検量線は作成できたものの、NIR/IRヘテロ2DCOSでは生成するエタノールと消費される糖の速度が類似しており、糖の変化を明確に分離してモニタリングすることは困難であった。そこで、第4章ではアルコール発酵過程における混合成分の独立した定量を目的とし「NIR/IR Moving-Windowヘテロ2次元相関法」の開発を行った。IR領域のバンドの変化を基準とし、糖の消費速度を時間分解して二次元マップ上に展開することで複数の糖を分離して抽出することが可能となった。本手法によって、主成分分析等では分離が困難であった反応挙動が似ている成分の変化をモニタリング可能となり、プロセスの科学的根拠を裏付け可能となることから画期的な手法であった。本手法により、反応プロセスモニタリングにおけるNIR法の活用の幅は広がったと考えられる。

第5章では医薬品の経口固形製剤の商業生産において、錠剤のフィルムコーティングという単位操作で発生する課題に対し、コーティング被膜量の簡易定量法を考案した。その結果、従来コーティング被膜量の定量には検量線を作成する必要があるが、本手法によって半定量的にコーティング被膜量を捉えることにより、簡略化することを可能にした。本手法を実際の生産の生産ラインの立ち上げに応用した結果、実薬と疑似薬のいずれのコーティング被膜量のばらつきも迅速かつ簡便に評価可能となった。得られた情報はPATの概念であるプロセスの理解を補助し、効率的な製造パラメータ設定と、円滑な営業生産への移行に貢献した。

第6章では、経口固形製剤の製造速度4000錠/minに対応したNIR-ハイパースペクトラルイメージングを用い、フィルムコーティング錠のAPI含量及びフィルムコーティング被膜量の濃度分布を同時に画像化した。PLSRによって予測された錠剤のAPI含量及びコーティング被膜量の検量精度は、ケモメトリックス分析及び波長選択を組み合わせることによって0.9以上の R^2 値を示した。この精度はHPLCやUVのような代替法として使用するには十分ではないものの、イメージングによりサンプル内の錠剤の含量の分布状態から各賦形剤の混合性まで考察することを可能にした。また、製造ロット間及びロット内のAPI濃度及びコーティング被膜量の濃度情報を取得可能にしたことで、各製造プロセスへのフィードバックが可能となり、より安定生産への貢献が期待できる結果となった。

以上より、医薬品製造工程の全体としては一部であるものの、原薬製造から経口固形製剤の製造までのモニタリング方法について最適な解析方法を構築した。ただし、本研究で開発した解析手法は測定対象

によって発生するNIRスペクトル強度やベースライン変化、必要とする情報により適宜変更が必要であることに注意しなければならない。しかしながら、適切に活用することによって、PATの概念である詳細な工程理解を助け、最適な製造工程管理にも応用可能であることを証明した。これにより、医薬品業界で導入が進むと考えられる連続製造法においても基盤技術となり、高品質な医薬品の効率的な製造・開発に貢献するものとする。加えて、本研究によって、近赤外分光法でこれまでブラックボックスとされていたバンドの帰属や、検量線の持つ化学的根拠の説明を可能にしたことは近赤外分光法の発展に寄与したと考えられる。

8. 本研究の投稿論文、発表実績及び受賞歴

・筆頭著書論文

- ・ Nishii T, Genkawa T, Watari M, Ozaki Y. *Analytical Sciences*, 2012. 28(12) : 1165–1170.

Title : Selection of the NIR Region for a Regression Model of the Ethanol Concentration in Fermentation Process by an Online NIR and Mid-IR Dual-Region Spectrometer and 2D Heterospectral Correlation Spectroscopy

- ・ Nishii T, Morita S, Genkawa T, Watari M, Ishikawa D, Ozaki Y. *Applied Spectroscopy*. 2015; 69(6) : 665–670.

Title : Moving-Window Two-Dimensional Heterospectral (MW2DHetero) Correlation Analysis and its Application for the Process Monitoring of Alcoholic Fermentation

- ・ 西井 崇, 松崎 勝洋, 森田 成昭, *製剤機械技術学会誌*, 2019. Vol.28(5) : 470-474.

題名 : 近赤外分光法を用いたフィルムコーティング被膜量の簡易定量法と生産立ち上げへの応用

- ・ Nishii T, Matsuzaki K, Morita S. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 590(30). Published on line.

Title : Real-time determination and visualization of two independent quantities during a manufacturing process of pharmaceutical tablets by near-infrared hyperspectral imaging combined with multivariate analysis

・共同著書論文

- ・ Ishikawa D, Nishii T, Mizuno F, Sato H, Sergei G. K., Ozaki Y. *Applied Spectroscopy*. 2013. 67 : 1441–1446.

Title : Potential of a newly developed high-speed near-infrared (NIR) camera (Compovision) in polymer industrial analyses : monitoring crystallinity and crystal evolution of polylactic acid (PLA) and concentration of PLA in PLA/Poly-(R)-3-hydroxybutyrate (PHB) blends.

- ・ Genkawa T, Watari M, Nishii T, Ozaki Y, *Applied Spectroscopy*. 2012. 66(7) : 773–781.

Title : Development of a Near-Infrared/Mid-Infrared Dual-Region Spectrometer for Online Process Analysis.

- ・ Genkawa T, Watari M, Nishii T, Suzuki M, Ozaki Y. *Applied Spectroscopy*. 2013. 67 : 724.

Title : Two-dimensional heterospectral correlation analysis of water and liquid oleic acid using an online near-infrared/mid-infrared dual-region spectrometer.

- ・ Ishigaki M, Nishii T, Puangchit P, Yasui Y, Huck C.W., Ozaki Y. *J. Biophotonics*. 2018, 11.

Title : Noninvasive, high-speed, near-infrared imaging of the biomolecular distribution and molecular mechanism of embryonic development in fertilized fish eggs.

・ 総説

- ・ Ishikawa D, Nishii T, Mizuno F, Kazarian S. G., Ozaki Y. *NIR news* 24, 6–11 (2013).

Title : Development of a high-speed monitoring near infrared hyperspectral camera (Compovision) for wide area imaging and its applications.

・ 発表実績

- ・ 西井 崇, 源川拓磨, 渡 正博, 佐藤 光恵, 今田 三樹子, 尾崎 幸洋, 第 26 回近赤外フォーラム, 一般ポスター, (茨城 2010)

題名 : アルコール発酵過程の近赤外・赤外スペクトル解析

- ・ Nishii T, Genkawa T, Watari M, Satou M, Konta M and Ozaki Y, ICASS 2011, Poster Session (Kyoto 2011)

Title : Near-infrared and infrared spectral analysis of alcohol fermentation process by using chemometrics and two dimensional correlation spectroscopy

- ・ 西井 崇, 源川 拓磨, 渡 正博, 尾崎 幸洋, 日本分析化学会近畿支部第五回夏季セミナー「ぶんせき秘帖～巻ノ五～」, ポスター (大阪 2011)

題名 : 近赤外・赤外一体型分析計による生化学反応過程のモニタリング解析

- ・ 西井 崇, 源川 拓磨, 渡 正博, 佐藤 光恵, 今田 三樹子, 尾崎幸洋, 日本分析化学会第 60 年会, 若手講演 (愛知 2011)

題名 : アルコール発酵過程での近赤外・赤外同時測定によるオンライン・ヘテロ 2 次元相関分光法の提案

- ・ Nishii T, Genkawa T, Watari M and Ozaki Y, FACSS 2011, Poster session (Reno 2011)

Title : A PLS calibration model for ethanol concentration in alcoholic fermentation developed by a near-infrared and mid-infrared dual-wavelength spectrometer

- ・ 西井 崇, 源川 拓磨, 渡 正博, 尾崎 幸洋, 第 27 回近赤外フォーラム, 一般ポスター (茨城 2011)

題名 : 近赤外・赤外二次元相関分光法による反応プロセスの解析

- ・ 西井 崇, 源川 拓磨, 渡 正博, 尾崎幸洋, 第 72 回日本分析化学討論会, 若手ポスター (鹿児島 2012)

題名 : 近赤外・赤外ヘテロ-Moving Window-二次元相関分光法によるアルコール発酵過程のモニタリング

・西井 崇, 源川 拓磨, 渡 正博, 森田 成昭, 尾崎 幸洋, 日本分析化学会第 61 年会, 若手講演

(石川 2012)

題名: アルコール発酵過程での近赤外・赤外同時測定によるオンライン・ヘテロ 2 次元相関分光法の提案

・西井 崇, 源川 拓磨, 渡 正博, 石川 大太郎, 森田 成昭, 尾崎幸洋, 第 28 回近赤外フォーラム, 一般ポスター (沖縄 2013)

題名: 時間分解近赤外/赤外ヘテロ 2 次元相関法の開発と反応プロセスへの適用

・西井 崇, 松崎 勝洋, 森田成昭, 第 33 回近赤外フォーラム, ポスター (茨城 2017)

題名: NIR 法を用いたフィルムコーティング錠の被膜量測定と生産ラインへの応用

・西井 崇, 松崎 勝洋, 森田成昭, 日本分析化学会第 67 年会, 一般講演 (宮城 2018)

題名: ハイパースペクトラルカメラによる錠剤全数の主役含量及びコーティング膜厚の同時測定とその評価

・西井 崇, 松崎 勝洋, 森田 成昭, 第 34 回近赤外フォーラム, ポスター (北海道 2018)

題名: 錠剤の主薬含量及びコーティング被膜量の全数イメージング及びその評価

・受賞歴および認定証

受賞名: Poster Presentation Award

学会名: IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011(ICAS2011)

発行元: 公益社団法人日本分析化学会

受賞名: 若手優秀賞

学会名: 日本分析化学会近畿支部第五回夏季セミナー「ぶんせき秘帖～巻ノ五～」

発行元: 公益社団法人日本分析化学会近畿支部

受賞名: 若手講演賞

学会名: 日本分析化学会第 60 年会

発行元: 公益社団法人日本分析化学会

受賞名: 櫻島賞【若手ポスター賞】

学会名: 日本分析化学会第 72 回分析化学討論会

発行元: 公益社団法人日本分析化学

受賞名：JCNIRS Student Travel Award

学会名：第 28 回近赤外フォーラム

発行元：近赤外研究会

受賞名：仁田記念賞

発行元：関西学院大学

受賞名：最優秀ポスター賞

学会名：第 33 回近赤外フォーラム

発行元：近赤外研究会

認定証：大学院第一種奨学金全額返金免除

発行元：独立行政法人日本学生支援機構

謝辞

本研究を行うにあたり、2010年4月から3年間に渡り関西学院大学理工学部化学科において尾崎幸洋教授、2013年以降は大阪電気通信大学大学院工学研究科の森田成昭教授のご指導の下で行われたものであり、その間多くの方々にご協力をいただきました。ここに慎んで感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました関西学院大学理工学部化学科 尾崎幸洋名誉教授、大阪電気通信大学大学院工学研究科 森田成昭教授、川口雅之教授、及び齊藤安貴子教授に心から感謝致します。

筑波という遠く離れたところでありながら、様々な場面において多くのご指導、ご教示を賜り、一人の人間として大きく成長させて頂きました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 源川拓磨主任研究員に心から感謝致します。

世界初の分光分析装置「NIR/IR一体型分光計」の開発を行い、私に研究のきっかけを与え、実の父親の様に熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました株式会社エス・ティ・ジャパン 渡正博博士に心から感謝を致します。

NIRイメージングについて多くのご教示を賜り、日々の研究生活におきましても多くのご指導を頂きました福島大学 石川大太郎准教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、多大なる理解を持って頂いた共和薬品工業株式会社及び田辺三菱製薬工場株式会社の関係者に深く御礼申し上げます。

最後に、暖かく見守って頂いた家族に心から感謝致します。