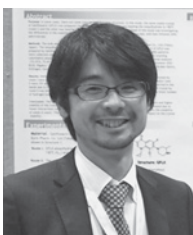


## 《若手研究者紹介》



## 近赤外分光法による医薬品製造工程のモニタリングと解析

服 部 祐 介\* Yusuke Hattori

武蔵野大学薬学部薬学研究所

## 1. はじめに

私の研究はレッドシフトする。分光学におけるピークの長波長シフトのことだが、これまでの筆者の研究は分光学が中心であり、その波長域は徐々にレッドシフトしている。分光法とは分析法であり、研究におけるツールである。しかし、筆者はその分光法に重きをおき、分光学で何ができるか？どこまでわかるか？について研究してきた。学生時代には、牛木秀治教授（東京農工大学）に師事し、蛍光（紫外・可視）の時間分解分光法を用いて、高分子やエマルションなどが形成する複雑な構造、その形態形成について“分布”という考え方を中心に、蛍光プローブ法<sup>1)</sup>でどこまで迫れるかについて研究してきた。高分子は低分子と違い、分布という概念と切っても切れない関係にあり、その高分子により形成される構造も分布の概念を必ずはらんでいる。低分子である蛍光プローブでそんな複雑なものが本当にわかるのか？複雑なゲルやエマルションの内部を蛍光プローブ分子がミクロの決死隊のごとく動き回り、その動きを見れば複雑な構造がわかるかもしれない。研究に魅力を感じたのはそれが始まりだった。

学位取得後は、近赤外励起ラマン分光を用いた生体試料の測定、主に正常、異常（病変）組織を分光学的に見分けるための基礎研究を行っていた。励起

波長は 785 nm. 少し長波長シフトした。ラマン分光や赤外分光は古くから医学応用が試みられてきた。その理由は、核酸やタンパク質などの生体分子の研究に用いられていたからだろう。このとき出会ったのが、佐藤英俊先生（当時は理化学研究所ユニットリーダー、現・関西学院大学准教授）と尾崎幸洋教授（関西学院大学）である。お二人ともラマン分光、赤外分光などの振動分光学と多変量解析・ケモメトリクスの専門家である。振動分光で得られるスペクトルに官能基に固有のピークが多く現れ、しかも分子間相互作用によってピークはシフトするため複雑である。学生時代の研究では複雑なものを理解するために“分布”という概念を用いたが、振動分光における複雑さは、ケモメトリクスによって解くことができる、という考え方を教えて頂いた。

その後、東京女子医科大学・先端生命研究所に博士研究員として移り、岡野光夫教授のもと“細胞シート”の研究に携わることになった。細胞シートは岡野先生が長年研究されてきた“温度応答性高分子”を修飾した培養皿をもちいて作られる。筆者が行ってきた研究は、細胞と温度応答性高分子との界面現象・相互作用についてである。最先端の研究所で研究に関わったことは非常に良い経験となった。ちなみに、ここでは和周波発生（Sum Frequency Generation）分光を用いた界面の分子振動による解析を行っていた。

そして現在は、近赤外分光を用いた医薬品製造のプロセス解析<sup>2)</sup>と製剤物性に関する分光学的研究<sup>3)</sup>がテーマである。すなわち、学生時代は紫外・可視蛍光分光、その後近赤外励起ラマン分光（785 nm）、現在は近赤外分光（1,000～2,000 nm）の領域を扱

\*2005年東京農工大学大学院博士後期課程修了。同年理化学研究所・協力研究員、2007年東京女子医科大学先端生命医科学研究所・博士研究員を経て、2010年武蔵野大学薬学部・薬学研究所・助教、2014年同大・製剤学研究室講師に就任。研究テーマ：分光学、製剤学。モットー：学問なき経験は経験なき学問に勝る。連絡先：〒202-8585 東京都西東京市新町 1-1-20  
E-mail: yhattori@musashino-u.ac.jp

っている。一般にスペクトルのレッドシフトは、環境の変化、外部との相互作用によって引き起こされる。筆者の場合も現在の所属である武蔵野大学薬学部・薬学研究所、製剤学研究室（大塚誠教授）に至るまで、多くの先輩、先生方との出会い（相互作用）がありシフトしてきたと感じている。

本稿では、学生時代から携わっている分光学、特に「近赤外分光」について基礎的な内容から、なぜ近赤外なのか、そして実際の医薬品製造工程のモニタリング、解析について紹介できればと思う。

## 2. 近赤外分光とは

近赤外分光の説明に入る前に、赤外(中赤外)、ラマン分光についても触れたいと思う。薬剤学において、中赤外、ラマン分光は非常になじみ深い分光学的手法である。その主な用途としては、化合物の同定である。世の中には星の数ほど、あるいはそれ以上の化合物が存在するが、同じ中赤外スペクトルを示す化合物は必ず1つであり、2つと存在しない。それは化合物の持つ共有結合の“振動”による光の吸収を見ているためである。ラマン分光も同じ理由から化合物に固有のスペクトルを示す。特に、中赤外、ラマン分光で得られる  $1,000\sim 2,000\text{ cm}^{-1}$  を分子の指紋領域といい、各分子に特徴的なスペクトルを示す。

中赤外、近赤外、ラマン分光のことを総じて“振動分光”と呼ぶが、これらは、H, O, C, N 原子による共有結合を特徴的に捉えることができる。そして、これらの原子は水素結合の受容体、供与体になりやすく、分子内外での水素結合に関与している。振動分光の特徴は分子の同定だけでなく、水素結合による共有結合の振動エネルギーの変化をピークシフトとして捉えることができる点である。このことは、振動分光が結晶多形の同定に用いられていることから、非常に良く知られた事実である。

では近赤外分光とは何か？ 一般的に図1に示すように、可視光より長い  $800\sim 2,500\text{ nm}$  ( $4,000\sim 12,000\text{ cm}^{-1}$ ) の波長領域における光の吸収スペクトルのことを近赤外スペクトルと呼ぶが、中赤外との境界はなんだろうか？ 中赤外分光では、調和振動近似のもと、分子の振動を基準振動として取り扱う。古典力学的に2原子分子は、2つの原子が質量をもつ質点と見なし、その2つの質点が共有結合という

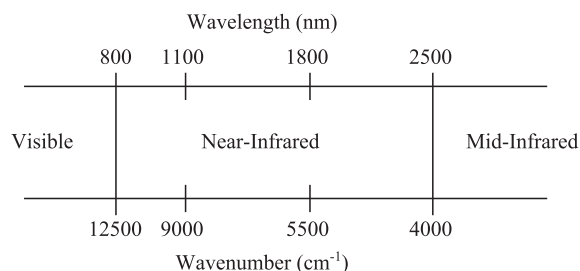


図1 可視・近赤外・中赤外の波長(波数)領域

バネで結ばれたモデルとして考えることができる。共有結合の強さはバネ定数  $k$  で表され、そのバネの基準振動数  $\nu$  は、

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

で表される。振動数はバネ定数の平方根に比例し、原子の換算質量  $\mu$  の平方根に反比例することがわかる。つまり、分子の伸縮振動数は、共有結合が強くなればなるほど、原子の質量が軽くなればなるほど高くなる。分子の振動はこの基準振動の重ね合わせで表すことができる。

量子力学的にこの振動を取り扱おうと、赤外光を分子が吸収し、エネルギー準位  $m$  から  $n$  に遷移する場合、 $n = m + 1$  の遷移のみ許容される。これは調和振動子モデルを仮定しているためであり、実際にポテンシャルエネルギー曲線の底付近だけ見れば正しいモデルであるが、より大きな振幅を扱う場合は正しくない。近赤外分光ではその調和振動子モデルでは表せない“非調和性”の結果得られる  $n = m + 2$  (第1倍音)、 $n = m + 3$  (第2倍音) などの倍音や結合音といったグループ振動を扱う。

したがって、中赤外と近赤外と境界としては、O-H 伸縮振動の基準振動がある  $2,600\sim 2,700\text{ nm}$  ( $3,800\sim 3,700\text{ cm}^{-1}$ ) 以上を中赤外、C-H 伸縮振動と変角振動の結合音や O-H 伸縮振動と変角振動の結合音が現れる  $2,500\text{ nm}$  以下の波長域を近赤外とし、区別するようになった。

近赤外分光では、この非調和性の大きい振動が特徴的に現れる。その非調和性の大きさは非調和定数と呼ばれる定数の値から推定することができる。非調和定数は、質量の軽い原子を含むときに大きくなるため、水素原子を含む振動(OH, CH, NH など) を特徴的に捉えることができ、反対に、非調和性の

小さな振動は近赤外では観測されなくなるため、スペクトルが比較的簡単になる。

### 3. なぜ近赤外か？

近赤外分光が振動の倍音や結合音を見ており、水素原子を含む振動を特徴的に観測することができることがわかった上で、実際にどのような利点があるか考えてみよう。まず、倍音、結合音の強度は基本音に比べるとはるかに弱い。そして第1、第2、第3倍音の振動数は基本音の振動数のおよそ2、3、4倍になる。これらのことから以下のような利点が挙げられる<sup>4)</sup>。

- i) 試料を希釈せず、そのまま測定が可能
- ii) 水素結合など相互作用によるバンドシフトが大きく、ピークを分離しやすい。

基本音による強度は非常に強く、ATR法以外の赤外分光では、試料による吸収が飽和してしまうため、粉末であればKBrなど全く赤外吸収を持たない物質で希釈する必要がある。また、水の赤外吸収も非常に大きいため、水分を含む試料の測定は難しい。一方、近赤外ではこのような処理は必要とせず、そのまま試料の測定が可能であり、多少水分を含んだ試料でも測定できる。

水素結合の有無による振動数シフトは赤外分光でも当然起こる。倍音を扱う近赤外では、その振動数が基本音の2、3、4倍になると同様、シフト幅も2、3、4倍になると考えれば、水素結合によるピークシフトの分離が容易になる。

ここで近赤外分光における問題点についても考えてみよう。近赤外分光では、倍音、結合音を扱うためピークの同定が難しく、試料に含まれる成分数が増えれば増えるほどスペクトルが複雑になる。そのため、近赤外スペクトルを用いて定量分析を行う場合、単純にランベルト・ベール則を適用することはできない。近赤外分光の発展を遅らせた原因は、この複雑さであり、これを解決し近赤外分光を急激に発展させたのが、統計的手法である多変量解析であった。

### 4. 医薬品製造工程の近赤外モニタリングと解析

筆者自身、武蔵野大学に赴任するまで、薬剤学、製剤学に関わったことは一度もなく、さらに粉体を研究対象にしたこともない(これまでの研究対象は、

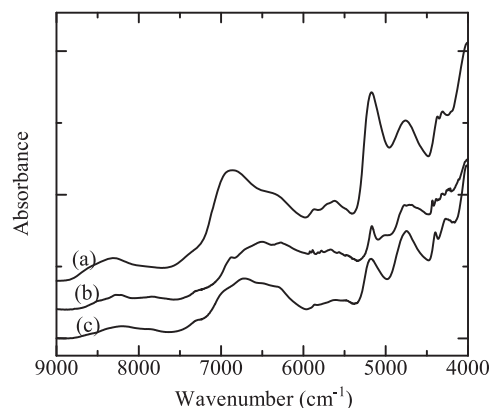


図2 パレイショデンブレン (a), 乳糖一水和物 (b), 結晶セルロース (c) 粉末の拡散反射近赤外スペクトル。

水溶液系, 生体, 固液界面であった)。共通していると言えば、“分光学的手法”, そして、研究の方向性・興味, “分光データからいかに多くの情報を引き出すか”である。研究対象はさまざまに移り変わったが、ベースにある方法論は同じであり、筆者自身の研究における興味は、現象をどのように測定し、解析して表現するか? である。

さて、医薬品の製造工程のモニタリングと解析についてであるが、その目的は言うまでもなく、品質の保証である。これまでは、製造工程中にサンプリングを行い、評価してきた。しかし、消費者に対して安心と安全を提供するメーカーとしては、全量検査によりすべての製品の品質を保証することが望ましい。そのような風潮のなか、製造工程のリアルタイムモニタリングとフィードバックによる管理こそが品質保証であり、理にかなっていると言える。

医薬品, 特にここでは固形製剤について述べるが、その製造にはいくつかの工程が存在する。イ) 原料となる粉末の粉碎と篩過, ロ) 混合, ハ) 練合, 造粒, 乾燥, ニ) 滑沢剤混合, ホ) 圧縮成形, ヘ) コーティング, などである。モニタリングを行う際、まず、その工程において品質にクリティカルに影響を及ぼすパラメータを特定する必要がある。前述の工程におけるそのパラメータは、イ) 粒径, ロ) 均一性, ハ) 粒径, 水分量, ニ) 均一性, 過混合状態, ホ) 硬度, 質量, ヘ) 膜厚, などが挙げられる。特に近赤外分光法がその威力を発揮するのは、定量分析, つまり混合均一性と水分含量の測定である。そこで、混合均一性について紹介したいと思う。

固形製剤に含まれる主薬以外の成分としては、乳

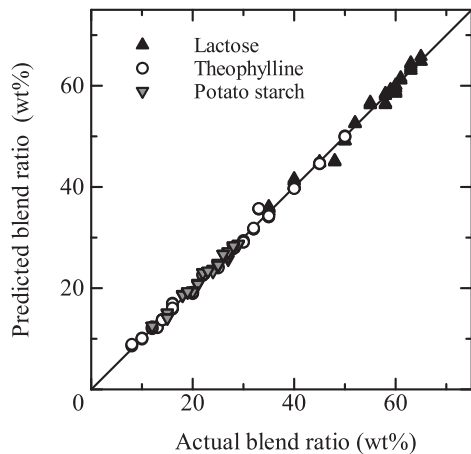


図3 無水乳糖, バレイショデンプン, テオフィリンのそれぞれの近赤外スペクトルを用いたPLS回帰分析による検量線。相関係数( $R^2$ )はそれぞれ0.996, 0.996, 0.998.

糖, 結晶セルロース, デンプンなどが多い。いずれも糖を骨格にする二糖, あるいは多糖類であり, 炭素骨格と水酸基がほとんどである。にもかかわらずその図2に示す近赤外スペクトルを見てみると明らかに異なっており, スペクトルから物質を同定することができる。しかしこれらを混合してしまうと, それぞれの定量は格段に困難になる。それを可能にしたのがケモメトリクスであり, 近年では Partial Least Squares (PLS) 回帰分析が良く用いられる。PLS 回帰分析では, スペクトルの全波長域あるいは一部の波長域を用いて回帰を行う。この特徴は, スペクトル群を説明変量, 成分の濃度を目的変量とし, それぞれに主成分分析による直行分解を行うことにある。詳しい説明は避けるが, PLS 回帰分析では, 選択性の低いオーバーラップしたピークでも定量が可能, また直行分解により共線性を回避できるなどの利点がある。

V字型混合機と無線型近赤外分光器 (Lancir II, Bruker Optics) をもちいて混合工程のモニタリングを行った例を示そう<sup>2)</sup>。ここでは, 直打用無水乳糖 (27 wt%), バレイショデンプン (63 wt%), テオフィリン (10 wt%) の混合を行った。一般的には, 主薬の均一性のみが注目されるが, 近赤外分光の特徴は上述したように添加剤である乳糖, デンプンも見分けることができる点である。図3はあらかじめ既知の組成比で調整した混合粉末を用いて作成した検量モデルである。このように, 主薬だけでなくデンプンや乳糖の検量モデルも作成することがで

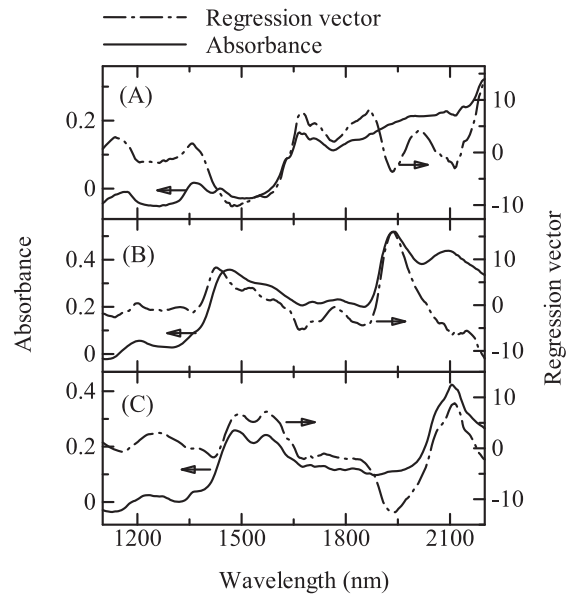


図4 テオフィリン (A), バレイショデンプン (B), 無水乳糖 (C) の近赤外スペクトルと PLS 回帰分析によるそれぞれの検量モデルの回帰ベクトル。

きる。しかしここで大事なことは, これらの検量モデルが近赤外スペクトルにおけるどのピークに基づいて作成されているか, である。それを確認するには, 回帰ベクトルやローディングベクトルを詳しく見る必要がある。

回帰ベクトル, ローディングベクトルは, 目的変量を説明する変量群 (スペクトル) においてどの変量 (波長, 波数) が最も強く影響しているか, を示している。したがって, テオフィリンの検量モデルに寄与している説明変量が, テオフィリンに特徴的な吸収ピークと一致していれば, その検量モデルの信頼性は高いと言える。

図4は検量モデルの回帰係数ベクトル (RV) と各成分の近赤外スペクトルを示している。それぞれの成分のスペクトルにみられる固有のピークと RV におけるピークが一致していることから, 回帰検量モデルは各成分の特徴的なピークにより表されていると言える。PLS は重回帰分析と比べ, 一般的にノイズやベースライン変動など外的要因, データの共線性に対して頑強である。

実際に検量モデルを用いて混合工程をモニタリングした結果を図5に示す。従来の均一性評価であれば, 主薬であるテオフィリンの定量から均一性を評価するが, 図5のように添加剤である乳糖とデンプンの均一性の推移も評価できる。さらに乳糖, デンプン, テオフィリンを比較すると, それぞれ異なる

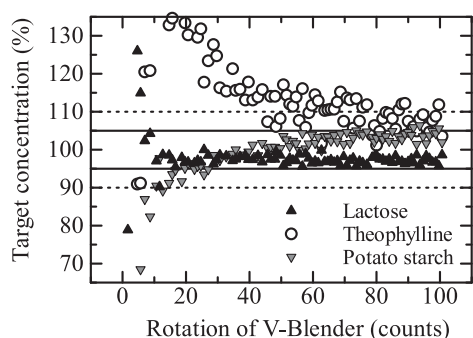


図5 V字型混合器・無線型近赤外分光器を用いた混合プロセスの定量的モニタリング

プロファイルであることがわかる。乳糖（無水）はおよそ30回転ほどで仕込みの濃度（63%）に達しているのに対して、デンプンは65回転ほどを要している。これはそれぞれの流動性の違いによるものと考えられ、流動性の良い無水乳糖は均一になるまで非常に早いことがわかる。また、テオフィリンは含量が少ないことから、均一になるまで時間を要したと考えられる。添加剤の均一性は、これまで定量的に評価されていないが、硬度や崩壊性など錠剤物性に及ぼす影響は大きい。近赤外分光を用いることで、主薬だけでなく添加剤の定量から均一性のモニタリングまで可能であり、有効に活用されることが望ましい。

## 5. ま と め

今回は、混合均一性の近赤外分光法ケモメトリクスによる定量的モニタリングについて紹介したが、混合均一性のモニタリングであれば必ずしも検量モデルを作成し定量する必要はない。モデルをたてず、混合に伴うスペクトルの変化から均一性を定性的に評価することも可能である<sup>2)</sup>。しかし、定性的な評価法が正確に混合プロセスを捉えていることを示すためには、定量的な解析から現象を説明する必要がある。また、近赤外分光法は顆粒や錠剤の均一性、

造粒、乾燥工程における水分量のモニタリング<sup>5)</sup>にも有効である。

近赤外光は人体などに対して安全であり、かつ分光器の小型化、安価な装置の開発により、近赤外分光法がさまざまな産業分野だけでなく、個人レベルにも普及し身近な存在になりつつある。それは、近赤外を不用意に扱い、誤った情報、認識が氾濫する危険性をはらんでいる。そのような状況を避けるためには、近赤外分光とケモメトリクスの性質を理解し、データを的確に読み取り、情報を正しく抽出できなければならない。それが、近赤外分光をはじめとする分光学的手法の今後の発展に欠かせないと考えている。そして今後、テラヘルツ分光など、より長波長スペクトルへのシフトも期待される。しかし、テラヘルツ分光は当時の近赤外分光同様、スペクトルの解釈、解析法が十分に確立されていない。テラヘルツスペクトルが教えてくれる情報は非常に興味深い。それらをどのように引き出すかが今後の課題である。

## 引用文献

- 1) 堀江一之, 牛木秀治, 渡辺敏行, “光機能分子の科学 分子フォトンクス”, 講談社サイエンティフィック, 東京, 2004, pp. 65–102.
- 2) Y. Hattori, Y. Tajiri, M. Otsuka, Tablet characteristics prediction by powder blending process analysis based on near infrared spectroscopy, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **21**, 1–9 (2013).
- 3) Y. Hattori, M. Otsuka, Time-resolved near-infrared spectroscopic study of the dissolution of crystalline lactose, *Euro. J. Pharm. Sci.*, **47**, 884–889 (2012).
- 4) 尾崎幸洋, 河田 聡, “日本分光学会 測定法シリーズ 32 近赤外分光法”, 学会出版センター, 東京, 2008, pp. 11–53.
- 5) M. Otsuka, A. Koyama, Y. Hattori, Real-time release monitoring for water content and mean particle size of granules in lab-sized fluid-bed granulator by near-infrared spectroscopy, *RSC Adv.*, **4**, 17461–17468 (2014).