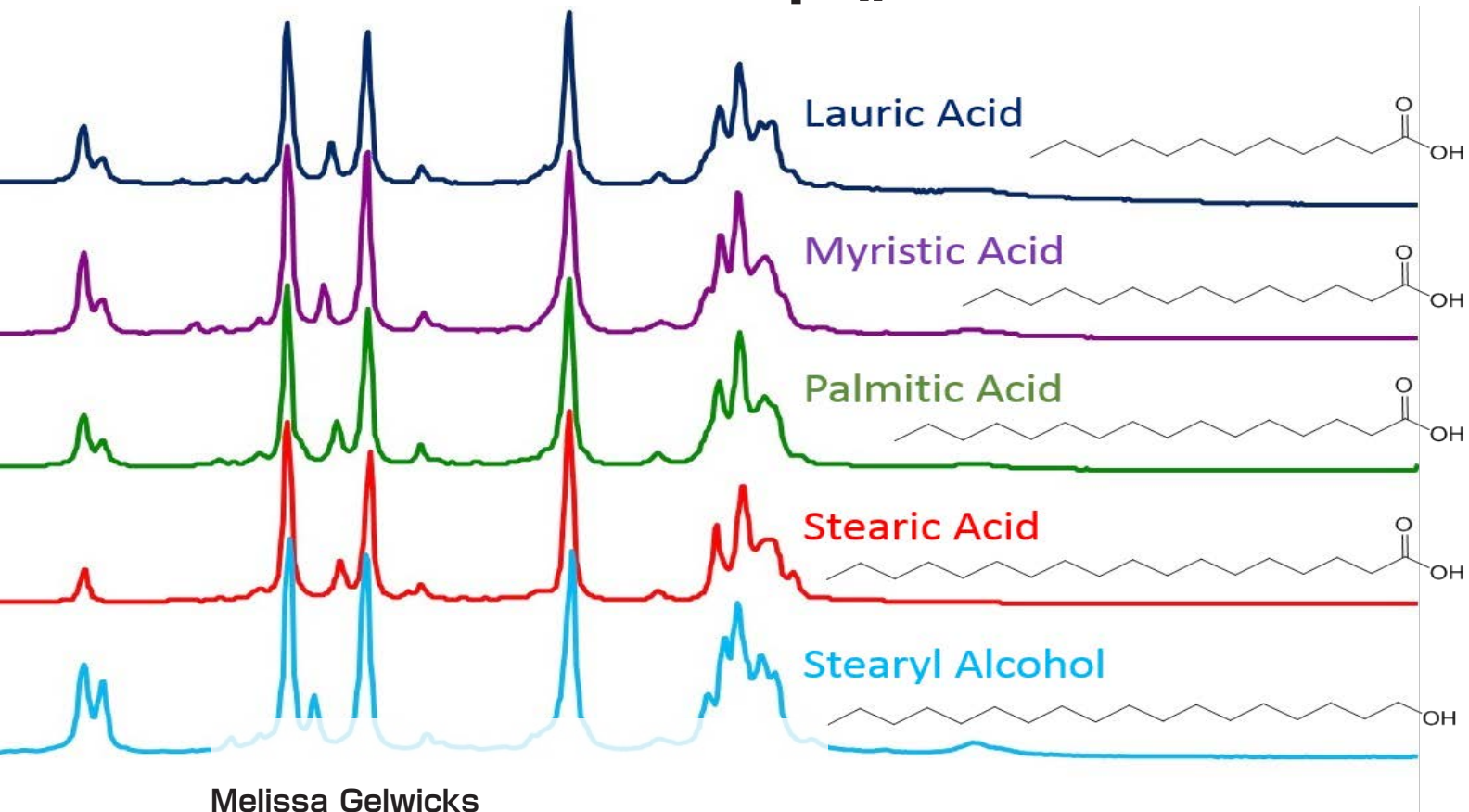


Mira P による同一性確認試験 -トレーニングセット、p 値について-



Melissa Gelwicks

このホワイトペーパーは、未知の物質を判別する同定試験と既知の物質が本当にその目的とする物質かどうかを確認する確認試験の違いに関するものです。このホワイトペーパーの最終的な目的は、いかにMira P が同一性確認試験に適しているか、いかに堅牢な確認試験用トレーニングセットを作成するかに焦点を合わせています。

Metrohm White paper

はじめに

メトローム社の製薬向け携帯型ラマン(Mira P)は、化学、材料化学、医薬品の迅速な非破壊分析および確認試験用に設計された、ハンドヘルドのラマン分光計です。ラマン分光法は、サンプルのスペクトルを参照ライブラリと比較照合することで、未知の物質を特定する実績ある分析法です。Mira Pは、メトロームのラマン製品ラインの中でも、物質の確認試験を行うユニークな機能を持っています。

このホワイトペーパーでは、統計学的分析がどのように実験デザインと結びつき、この2つを使うことで、どのように堅牢な確認試験モデルが構築できるかを記述します。

未知の物質特定のためのHQI

Mira Pを用いた同定試験では、ピアソンの相関係数を用いてヒットクオリティインデックス(HQI)または R^2 (相関)を計算します。これは、未知の物質とライブラリ内のスペクトルの類似性を表す方法です。表示されたマッチスコアは0~1の値を取り、この値が大きいほど、スペクトルの類似性が高いことを示しています。Mira Pは設定された閾値(通常は0.85)以上のHQIスコアをもつ化合物のリストを表示します。この同定方法は、a)実施が容易で、b)すばやく、c)広範な化学物質ライブラリの利用に適しています。

このメソッドは広く利用されていて、アプリケーションによっては高い信頼性を得られますが、ラマン分光スペクトルが似通った分子間の微細な違いについては、適切な判別ができません。たとえば、図2は、4つの脂肪酸群と、これに類似するアルコールのスペクトルを示しています。これらの違いは主に、飽和炭素鎖の鎖長(図1)です。スペクトルの類似性は否定できず、化合物の類似性をそのまま反映しています。

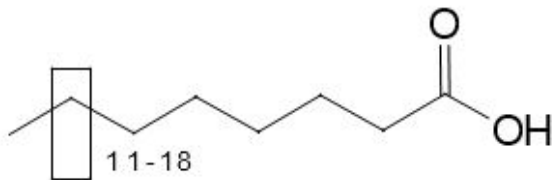


図1. 以下にサンプルで挙げた脂肪酸の構造

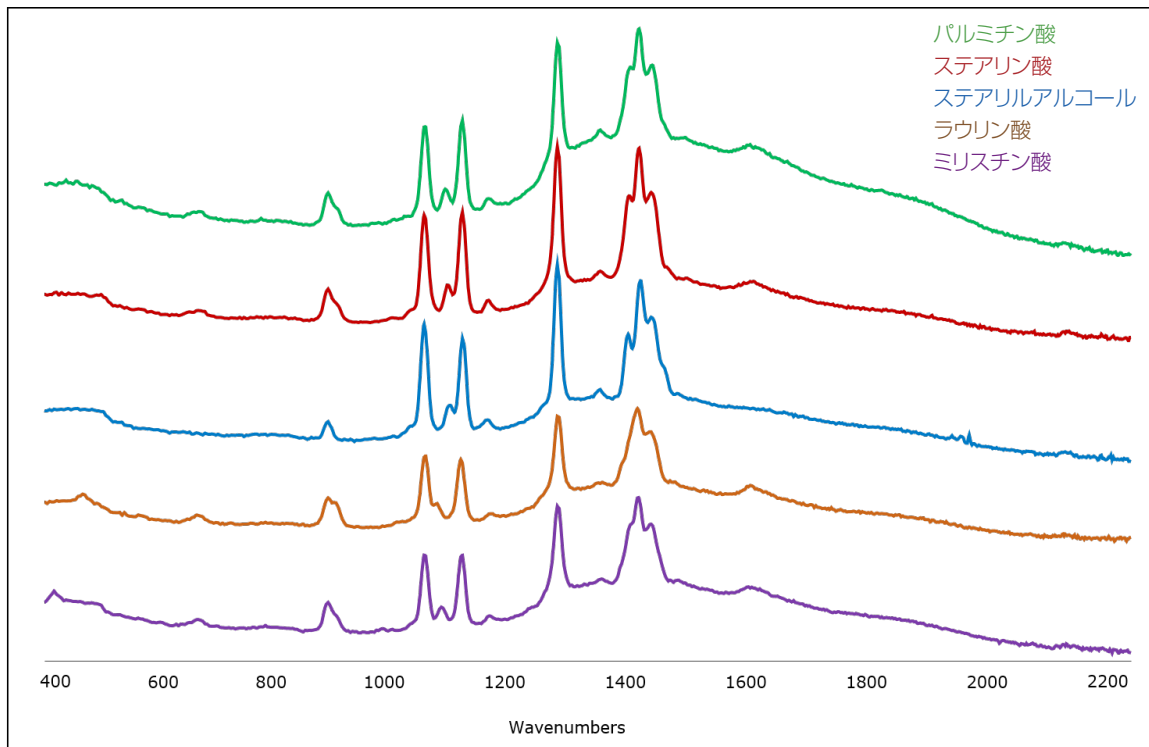


図2. 非常に類似性の高い脂肪酸とステアリルアルコールのラマンスペクトル

Metrohm White paper

HQI 値

HQI は、参照物質とサンプルのスペクトルの相関関係を表したもので、非常に類似性の高い物質については、誤判別する可能性があります。言い換えると、HQI では、偽陽性が分析結果になる可能性があります。表 1 の値は、図 2 に示した各分子のラマンスペクトルの HQI を表したもので、分子間の類似性を反映していません。

表 1. 各種脂肪酸とステアリルアルコールの HQI マッチスコア

	Library Match (HQI)				
	ラウリン酸	ミリスチン酸	パルミチン酸	ステアリン酸	ステアリルアルコール
ラウリン酸	1.00	0.98	0.95	0.95	0.88
ミリスチン酸	0.98	1.00	0.98	0.96	0.91
パルミチン酸	0.96	0.98	1.00	0.98	0.94
ステアリン酸	0.94	0.96	0.97	1.00	0.96
ステアリルアルコール	0.87	0.91	0.93	0.97	1.00

この種の各物質を他の物質と比較すると、報告される HQI 値はすべて、規定の 0.85 を上回ります。その結果、これらの物質間はうまく判別することができません。

p 値によるサンプルの確認試験

確認試験メソッドではこの問題を解決できなければなりません。スペクトル間の類似性をベースにする同定試験のテクニックとは異なり、確認試験メソッドはスペクトルの細かな違いを映し出します。このメソッドは主成分分析 (PCA) をベースにしています。統計学的分析方法で、複雑なデータセットを、そのデータを最もよく表す基本要素「主成分」にデータ圧縮します²。このメソッドは、相関関係の高いスペクトルを、直交する変数の小さなセットに変え、散布図またはスコアプロットとして可視化します。したがって、図 1 に示したスペクトルは、類似性よりもむしろ、化合物間の違いを表現する方法でモデル化することになります。(図 3):

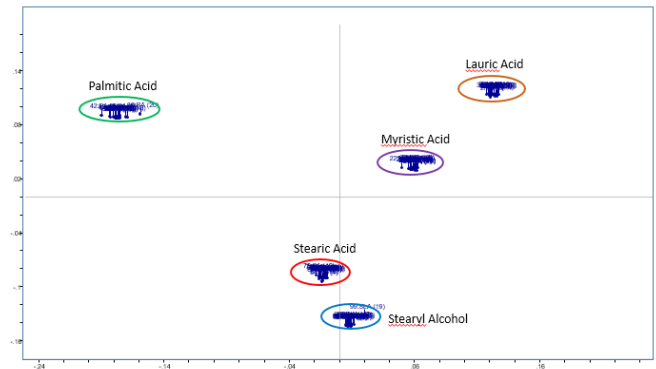


図 3. 各種脂肪酸とステアリルアルコールの PCA スコアプロット図

PCA スコアプロットは、設定された信頼区間を用いた参照モデルとなり、これと照合することで、その後のサンプルが測定されます³。各サンプルのスペクトルが PCA モデルに反映されることにより、信頼区間によって定義されたモデルの限界にどれくらいうまくフィットするかがわかります。

信頼区間

信頼区間はホテリングのT²楕円で定義されます。上と下に示した図の楕円で、各グループ内でどこまでの偏差を許容できるかを決定する非常に重要なものです⁴。たとえば、信頼区間90%と95%の楕円を散布図に反映させたものが、図4です。いずれも、データセットを非常によく表していますが、両者はモデルの許容レベルが異なります。Aの例、つまり信頼度95%は、トレーニングセットとして許容できるサンプルはより少なくなります。モデルは測定結果の確度において、信頼度がより高くなることを意味します。一方のB、つまり信頼度90%は、より変動の大きいサンプル(中心からの距離=マハラノビス距離)が、モデルの代表として確認試験のリファレンスになることを示しています。

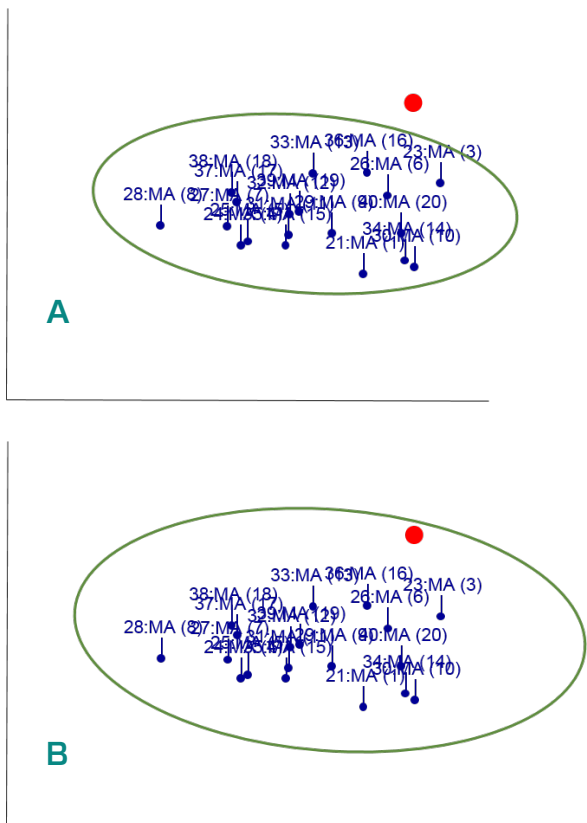


図4. ホテリングのT²楕円で表される信頼度、A= 95%、B= 90%

仮説検定とp値

サンプルのスペクトルをモデル空間に投影すると、その結果がp値、すなわち、ある信頼度において、モデルの限界内にサンプルがどれくらいよくフィットするかを示す値になります⁴。言い換えると、p値は、統計的仮説検定を実施した場合の、結果の重要度を表すものということです。PCA分析およびラマン分光スペクトルによる確認試験では、帰無仮説(H₀)は「測定されたスペクトルが、モデル構築に使用するトレーニングセットに属する」という意味になります。p値が小さければ(<0.05)、H₀に反する証拠が強固で、したがって、帰無仮説は成立せず、そのサンプルはモデルに属することができません。その反対に、p値が大きければ、それは合格で、そのサンプルはモデルの母集団に属し、p値が大きければ大きいほど、高い信頼度で許容されます。PCAおよびそれに続くp値は、HQIによる分析と比較して、各種脂肪酸に関してまったく異なる結果を映しだします。表2は、各脂肪酸が明確に判別できることを示しています。

表2. 各種脂肪酸とステアリルアルコールのp値および確認試験結果

	トレーニングセット				
	ラウリン酸	ミリスチン酸	パルミチン酸	ステアリン酸	ステアリルアルコール
ラウリン酸	合格 0.127	不合格 0.00	不合格 0.00	不合格 0.00	不合格 0.00
ミリスチン酸	不合格 0.00	合格 0.494	不合格 0.00	不合格 0.00	不合格 0.00
パルミチン酸	不合格 0.00	不合格 0.00	合格 0.331	不合格 0.00	不合格 0.00
ステアリン酸	不合格 0.00	不合格 0.00	不合格 0.00	合格 0.365	不合格 0.00
ステアリルアルコール	不合格 0.00	不合格 0.00	不合格 0.00	不合格 0.00	合格 0.628

Metrohm White paper

トレーニングセットを用いたモデル構築

PCA モデルの有効性は、モデル母集団に代表される非常に関連性の高いスペクトルのライブラリであると言えるので、トレーニングセットに完全に依存します。Mira プラマン分光計と MiraCal ソフトウェアを用いて、ユーザーは、ある物質について一定の許容差異をもつスペクトルを20以上集めて、トレーニングセットを構築します。

変動のタイプ

トレーニングセット内の変動は、サンプルの特性を正確に代表する堅牢なモデル構築のために必要です。その変動が決定性を決めるものとして定義されます。サンプルあるいは分光計の特性に起因する既知の変動があった場合、その変動が確率的に、様々な状況下において、モデルの精度に影響しないよう、考慮に入れて実験的ファクターを組み込まなければなりません⁵。

変動の原因

サンプルを代表するモデルを構築するためには、決定論的変動をトレーニングセットに組み込んでおかなければなりません。たとえば、ユーザーは、複数のソースから入手したサンプルを用いてトレーニングセットを作るかもしれません。レーザーの出力や温度、積算時間、スキャン回数など、装置の測定パラメータを実験に盛り込むのであれば、トレーニングセットはこれらのパラメータを盛り込んで構築されなければなりません。これらのパラメータは、操作手順(Operating Procedure)として保存され、その後の測定で使用されることにより、モデルの一貫性を保ちます。また、トレーニングセットは何日かかけて構築し、その間に何度もOFF/ONのサイクルを繰り返して、装置の変動をモデルに組み込ませる必要があります。

サンプルの確認試験に影響を及ぼす可能性のある、不規則な変動も修正できるモデルを構築するには、確率的分動を組み込んでおかなければなりません。これらは「現場条件」というもので、外光、周囲温度、容器の材質、サンプルの不均一性、さらには、おそらく容器の厚みの変動などがこれに当たります。報告されているp値の信頼度を向上させる、確か連続したトレーニングセットを完成させるには、これらも考慮しなければなりません。考えられる変動の原因をまとめたものが、表3になります。

表3. 考えられる変動のタイプ

変動のタイプ	変数
決定論的変動	サンプルの供給元
	アタッチメント
	レーザー出力
	レーザー温度
	積算時間
	ORSのON/OFF
確率的変動	スキャン回数/平均回数
	外光
	サンプル温度
	容器の材質
	容器の厚み
	サンプルの不均一性
	コンタミン

Metrohm White paper

堅牢なトレーニングセットのための編集

念のために記載しておく、堅牢なトレーニングセットはスペクトル間の変動が取り込まれており、本質的に、サンプルの物質固有の特徴を表すものでなければならないということです。この2つを満たすために、トレーニングセットでは、スペクトルの目視確認

と、それに続く慎重な編集作業で、Mira P を用いた確認試験の精度を向上させることができます。健全な数のサンプルを代表するスペクトルを十分残すよう注意を払われていれば、明らかに他と異なるスペクトルをトレーニングセット内から除去することができます。

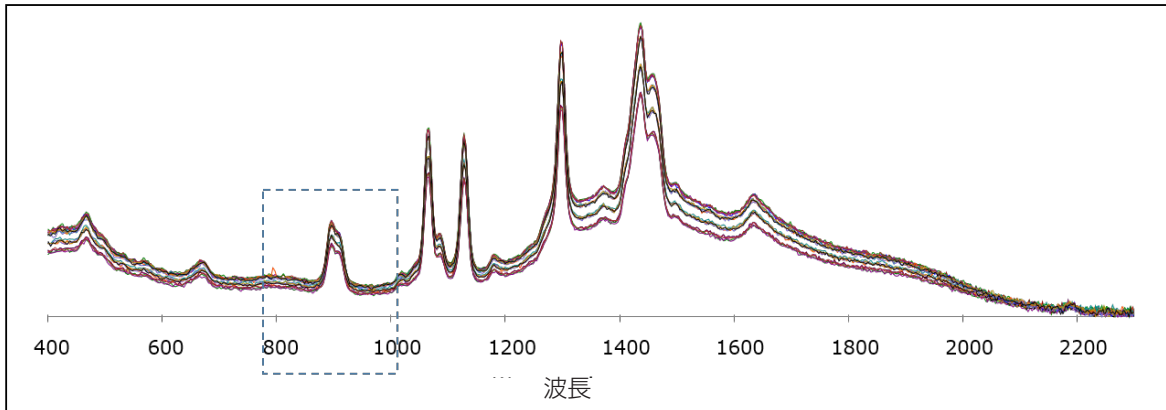


図5. 20件のラウリン酸のラマンスペクトル

一例を挙げると、図5は、ラウリン酸のトレーニングセットに組み込んだスペクトルのサンプリングで、表1 および2に記載のデータ収集のために用いられたものです。全60のスペクトルから20のスペクトルを抜粋し表示しています。許容可能な強度の変動幅(ピーク高さ)がわかります。これは、一連の実験を行うと遭遇する自然な変動を表しています。この図の強調した部分をよく詳しく見てみると、これらのスペクトルがどのようにトレーニングセットに影響を及ぼしているか、他にも理由があることがわかります。

図6の縦の点線は、ピークの横軸が全スペクトルで一定であることを示しています。ラマンスペクトルにおいては、この固有のピークこそが感度の高い確認試験を可能にするので、これはPCAモデルに組み込まれる重要な情報となります。それとは対照的に、矢印は、サンプリングで遭遇する許容可能な変動であり、堅牢なトレーニングセットのために残してあるものです。

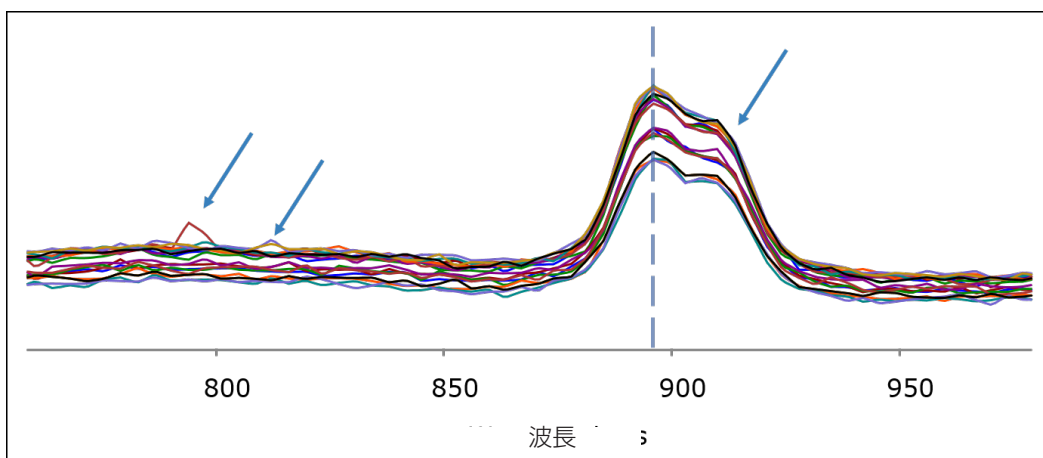


図6. ラウリン酸のラマンスペクトルの拡大図

結論

本論では、Mira Pハンドヘルドドラマン分光計の同定試験 (Identification)メソッドと確認試験(Verification)メソッドを対比させて論じました。これらは判別分析としては目的が異なります。同定試験は、未知のサンプルの測定の場合に用い、確認試験は既知のサンプルの確認に用います。本論には、確認試験メソッドの確度を向上させる、確かなトレーニングセットを作るためのユーザー向けガイドラインも組み込んでおきました。

参考文献

- [1] Bakeev, Katherine A. and Robert V. Chimenti, "Pros and cons of using correlation versus multivariate algorithms for material identification via handheld spectroscopy" Eur Pharm Rev, 2013. http://www.europeanpharmaceuticalreview.com/wp-content/uploads/Bakeev- Web-Article_proof.pdf.
- [2] Dahiru, Tukur, "p-value, a true test of statistical significance? A cautionary note" Ann of Ibadan Postgrad Med, 2008.(6)1, pps 21-26.
- [3] Varmuza, Kurt and Peter Filzmoser, Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics (2009). CRC Press, Boca Raton, Fl. pps: 321.
- [4] O'Connell, Marie-Louise, et al., "Qualitative Analysis Using Raman Spectroscopy and Chemometrics: A Comprehensive Model System for Narcotics Analysis" Applied Spectroscopy, 2010. (64)10, pps, 1109-1121.
- [5] Papoulis, A., & Pillai, U.(2001). Probability, random variables and stochastic processes. (4 th ed.)New York