

分担研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名
分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討

研究分担者	植松美幸	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	靱島由二	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	中岡竜介	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	瀬川勝智	国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部
研究協力者	中野達也	国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部

研究要旨

本年度は、中間水が存在する材料のひとつとされるPoly(2-methoxyethyl acrylate)を対象とし、材料表面近傍における水の存在について、分子動力的シミュレーションの結果から検討した。各材料の50重合体に対して、含まれる酸素原子から3[]以内に水分子を25個、50個、75個、100個と変化させて配置したときの水分子の酸素原子への吸着エネルギーを比較した。材料周りの水分子について、酸素原子へ強制的に水分子を吸着させた上で、周りを飽和状態の水分子で囲み、最初に吸着させた水分子と周りの水分子との交換の可能性について検討した。Poly(2-methoxyethyl acrylate)のエステル結合カルボニル酸素原子はメキシ基の酸素原子に比べて水分子の吸着エネルギーが大きく、水分子を取り込みやすいことが示された。さらに、材料に吸着させた水分子に対し、周りに飽和状態で水分子を配置した上でシミュレーションを行ったところ、エステル結合カルボニル酸素原子に吸着させた水分子は周りの水分子に比べて動きが拘束される傾向にあり、これによって不凍水を表現する可能性が示唆された。メキシ基の酸素原子に吸着させた水分子は周りの水分子と同じ動きであった。中間水は官能基への補足時間によって示すことができると考えられるが、その解析方法についてはさらなる検討を要する。

A. 研究目的

平成 22 年度より、生体適合性評価の結果を迅速に得る上での補完的役割として、指標の一部にシミュレーションを組み込むことを想定した研究を行っている。体内に埋込む医療機器は生体への高い適合性が求められるが、新規材料に対して開発段階でその予測ができれば、材料をより迅速に普及させることができると考える。評価指標のひとつとして、本研究ではコンピュータ上で構造を描画し、分子動力的シミュレーションによって材料の血液適合性を示し得る評価指標の開発に取り

組んできた^{[1]-[3]}。

高分子中の水は大きくわけて不凍水、中間水、自由水の 3 種類ある^[4]。これまで進めてきた中で一貫して採用してきた仮定は、新規材料を構築する上で、シミュレーションによる中間水の存在の確認を、血液適合性評価のひとつのツールにするということである。そのために、中間水はどのようにシミュレーション上で表現するのかについて論じてきた。これは、生体/材料界面における水分子の構造が生体適合性に大きな役割を果たすという考えに基づく。田中らのグループによって実験

的に中間水の存在することが確認されている材料は血液適合性がよいものであることが示されている^[5]。また、生体/材料界面における水分子の構造については、他にも実験によって確認されている^{[6]-[8]}。中間水の材料開発後に多くの試験を求められるのではなく、材料開発中に試行錯誤する上での参考としても役立つと考えている。

研究の目的は医用高分子表面近傍の水和状態に着目し、分子動力的シミュレーションによって中間水の存在可能性を示すことである。これまで創薬用のシミュレーションソフトウェアである Discovery Studio (Accelrys 社) を用いたシミュレーションから始め^[1-2]、平成 24 年度には材料シミュレーション用に特化した Materials Studio (旧 Accelrys、現在は Dassault Systems BIOVIA) に変更し、水分子の吸着エネルギーや拡散係数、動径分布関数などによる解析手法を検討してきた。また、実験値として NMR での解析を行った。これにより、PMEA : Poly(2-methoxyethyl acrylate) 中に中間水の存在がありそうであると予測され、その位置がメキシキ基周辺であると考えられた^[3]。平成 25 年度にはメキシキ基周辺の水分子の振る舞いについて、水分子の存在する個数を求め、メキシキ基と水分子との相対速度から中間水を示すことを試みた。水分子の相対速度はメキシキ基周辺に特化して異なるわけではなく、全体の水分子が同様の速度となっていた。これから、中間水を示すにはメキシキ基周辺に存在する水分子のとどまりやすさを補足時間として示すのがよいのではないかと提案した。

本年度の目的は、PMEA 中に存在する水分子の位置と動きを数値化することである。Adsorption Locator によって官能基への水の吸着力、水の持つエネルギーを示し、吸着させた水の離れやすさを比較することで、また、水分子の補足時間を示すことで、中間水の数値化を試みた。

B. 方法

1. 使用したシステム

高分子材料用シミュレーションソフトウェア Materials Studio の下記モジュール群

を用いて行った。

- Visualizer: 立体構造の表示
- Conformers: 最適構造の探索
- Compass: 力場計算
- Forcite Plus: 分子動力学計算
- Adsorption Locator: 吸着エネルギー計算対象とした材料
- PMEAL: Poly(2-methoxyethyl acrylate)

2. シミュレーションの手順

2.1 初期構造の決定

初期構造をいかに決定するかは重要であるが、動きやすい材料においては一意に求めることは難しい。計算上安定的な構造を与えるために Conformers を用いた構造決定を行った。力場は COMPASS II を用いた。

- 1) 3D Atomistic Document 上でモノメトリックな構造を作成する。Geometry Optimization で構造最適化を行った上で、Repeat Unit 設定のために Head と Tail を指定する。
- 2) Conformers Calculation を利用し、構造の探索を行い、エネルギーが最小となる構造を monomer として登録する。
- 3) Build Polymers の Homopolymer を利用し、登録した monomer をもとに isotactic の 50 量体の構造を作成する。これを Conformer にて構造探索を行い、エネルギーが最小となる構造を初期構造とする。

また、ここで 50 量体の構造決定において Conformer を用いずに、Geometry Optimization の後、Dynamics の NVT を用いて、T=298K とした条件の下で構造決定を行った結果も用いた。これは初期構造の違いが与える影響の違いを知るのが目的である。今回はいずれも isotactic のみの検討を行った。

図 1 : MEA の構造式。図 2 (a) Conformer で探索したエネルギー最小となる MEA、(b) a をもとにした 50 量体、図 3 (a) Conformer で探索したエネルギー最小となる MEA、(b) a をもとにした 50 量体、(c) b に Geometry Optimization と Dynamics をか

けて安定させた構造)。

2.2 Adsorption Locator を用いた水分子の吸着力

不凍水、中間水、自由水としての存在の違いを、官能基に対する水分子の吸着力によって示し得るか検討する。PMEA、PMEMA とともに (A) エステル結合カルボニル酸素原子、(B) エステル結合酸素原子、(C) メトキシ基の酸素原子の 3 つの種類を有する。

PMEA においては、(A) 近傍に不凍水、(C) 近傍に中間水が存在すると考えられている。不凍水であれば、(A) にとどまり続けるであろうし、中間水であれば、(C) についたり離れたりする緩やかなつながりをもってとどまる様子がシミュレーションによって示されるであろうと予想した。

まず、材料中の酸素原子への吸着力の違いを比較することで、水分子の取り込みやすさを調べた。ここでは、(A) エステル結合カルボニル酸素原子、(C) メトキシ基の酸素原子について比較検討した。

- 1) Adsorption Locator によって材料中に含まれる酸素原子に対して、それぞれ 3[] 以内の距離となる位置に水分子を吸着させる。図 4 は図 2(b) で示した PMEA (Conformer で構造決定) 中のエステル結合カルボニル酸素原子をターゲットに設定したものの、図 5 は同様にメトキシ基の酸素原子をターゲットとして設定したものである。
- 2) 全エネルギーが最も低くなる時を選択し、酸素原子に水分子を吸着させるエネルギーを比較した。それぞれ 1 回の試行につき、10 パターンの計算から 1 サンプルを選択する。比較に用いるサンプル数は 6 とした。

さらに、力場設定を COMPASS II でなく、Universal にした場合についても比較検討した。汎用の力場であるが、COMPASS II との比較のために示す。

2.3 官能基周辺の水分子のとどまりやすさ

次に、材料中に水を取り込んだ状態を作り

出し、周りに水が存在し、平衡状態となったときでも、材料中に最初に取り込んだ水を取込み続けるかについて検討する。

強制的に水を吸着させた状態で、飽和状態となるよう水分子を配置させたときに、不凍水であれば、酸素原子から離れずに吸着してとどまり続けているであろうし、中間水であれば、緩やかにとどまり続けるであろうと予想した。

- 1) 2.2 で作成した材料の酸素原子へ水を吸着させた構造のうち、最もエネルギーが低くなった場合を対象として選択し、全体を囲む格子を作成する。この後、材料に対して十分に多い水分子で満たしたい。材料が直径 10[] 程度であるので、格子のサイズは $(x,y,z) = (40[], 120[], 40[])$ とした。
- 2) 事前に吸着させた水分子と周りに配置させた水分子を個別に扱うために、先に吸着させた水分子のみラベリングを行う。
- 3) 格子の中央に材料を配置し、Solvent Surface の機能で空き領域の体積を算出する。Packing 機能を使い、空き領域を全て水分子で満たすように配置する。図 6 は Connolly Surface で空き領域を算出した結果、図 7 は空き領域を水分子で満たした結果である。
- 4) 周りの水分子を含めて水分子のラベリングを行う。
- 5) Forcite Plus の Geometry Optimization で構造最適化をする。
- 6) Forcite Plus の NVT で温度一定時における分子動力的シミュレーションをする。
- 7) 事前に吸着させた水分子、全水分子のそれぞれについて、ターゲットとした酸素原子 (A) エステル結合カルボニル酸素原子、(C) メトキシ基の酸素原子に対する平均二乗変位を算出する。これによって、吸着させた水分子と周りの水分子との差異を比較する。
- 8) 出力されたフレームごとに材料中の酸素原子に対する水分子の radial distribution function を求め、官能基周辺の水のとどまりやすさを比較した。

力場は COMPASS II、温度は 298K で一定とし、温度制御は Nose-Hoover-Langevin (NHL)、Electrostatics terms は Particle-Particle and Particle-Mesh (PPPM)、van der Waals terms は Ewald として、0.25[psec] ごとに 1 フレームとして 50[psec] 分出力した。

2.4 官能基周辺の水分子の補足時間

H25 年度の結果をうけて、中間水を考える上では官能基周辺に存在する水分子の捕捉時間を考慮すべきであるとした。H25 年度に行ったシミュレーションの結果について、さらなる調査をした。

このモデルでは 50 量体の MEA に 6133 個の水分子を配置した分子動力的シミュレーションの結果の trajectory、201 フレーム分 (0.25[psec] 毎に 1 フレーム保存) を解析した。ここでは中間水がメトキシ基の酸素原子につくと想定して、50 個分の酸素原子に対して水分子の距離と捕捉時間とを算出した。

- 1) i 番目の水分子に対して、PMEA に含まれる 50 個の酸素原子の距離を算出、 j フレーム目における距離を d_{ij} とし、全フレーム分の値を求める。
- 2) 各フレームでどの酸素原子の近くに水分子が配置しているのか、酸素原子の順番を追って、最も近い距離にある水分子を選択し、距離の時間変化を保存する。
- 3) 各酸素原子の周りに存在する水分子の平均距離で酸素原子の順番をソートし、距離が小さい順に、時間に対する距離をグラフで示す。

以上によって、酸素原子に対して近接する水分子が補足される時間を算出した。

C. 実験結果と考察

(1) Adsorption Locator を用いた水分子の吸着力

MEA の 50 量体に対して、エステル結合カルボニル酸素原子、メトキシ基の酸素原子へ 25、50、75、100 個と数を変えて吸着させたときの結果について (a)、(b) として示す。

50 量体の初期構造は図 2、図 3 で示したが、図 2 (b) で作成した構造については水分子を 25 個吸着させようとした時点で失敗し、6 試行行ったが、いずれも 20 個未満までしか吸着させることができなかった。構造の捉え方は様々あると考えたが、Conformation のみでなく、Dynamics をかけてみた上での構造決定をした。しかしながら、この場合についても十分平衡状態といえる構造設定の根拠に乏しく、水分子の吸着力を考える上では図 2 (b) のように作成された 50 量体を対象に設定した。初期状態では Dynamics によらず、幾何学的な構造決定をした上で、周りの水分子との関係を考えるときに Dynamics による評価をする。

図 8 は力場を COMPASS II に設定したときの箱ひげ図、図 9 は力場を Universal に設定したときの箱ひげ図である。

力場を Universal に設定したときは、全体のエネルギー、吸着エネルギーともにどちらの結果にも差がみられない。一方で、COMPASS II を用いたときはエステル結合カルボニル酸素原子の方が、メトキシ基の酸素原子に比べて水分子の吸着力が大きいことがわかる。

この結果から、力場の選択は重要であるという前提のもとで、エステル結合カルボニル酸素原子への水分子の吸着力が大きいことは、不凍水が存在すること、また、メトキシ基の酸素原子にはより緩やかな吸着になっていることの手掛かりとなると示唆される。

(2) 官能基周辺の水分子のとどまりやすさ

図 7 に示すように対象材料の周りに十分な水分子を配置したときの分子動力的シミュレーションによって検討した。

ここで、エステル結合カルボニル酸素原子をターゲットにしたときの周りの水分子の個数は 6133 個 (占有領域: 10020.03 [Å³]、空き領域: 181979.97 [Å³]、表面積: 9819.09 [Å²])、メトキシ基の酸素原子をターゲットにしたときの周りの水分子の個数は 6138 個 (占有領域: 9890.05 [Å³]、空き領域: 182109.95 [Å³]、表面積: 9758.85 [Å²]) であった。

MEA の 50 量体中の 2 種類の酸素原子に吸着させた水分子と周りの水分子について、そ

れぞれ平均二乗変位を算出したものを図 10 に示す。

50psec 分の結果のうち、エネルギーが一定となったと考えられる点(14 フレーム目)から 400 フレーム目までについて示した。ここで最初に見つけた 186 フレーム分が安定状態にあるとして、26 フレーム目から 160 フレーム分、66 フレーム目から 120 フレーム分、106 フレーム目から 80 フレーム分、146 フレーム目から 40 フレーム分を取り出して、同時に表示した。

赤色はエステル結合カルボニル酸素原子、青色はメトキシ基の酸素原子、実線は最初に吸着させた 50 個の水分子、破線は全水分子である。全水分子についてはいずれの酸素原子に対してもほぼ一定の傾きであり、 $3.4[\text{ }^2/\text{ps}]$ となった。

メトキシ基の酸素原子周辺の水分子の動きについては周りの水分子と変わらない動きで存在しているが、エステル結合カルボニル酸素原子への水分子の動きは周りの水分子よりも動きが小さい。これはより強い吸着を有するためであると考えられる。

図 11 は最初に酸素原子に水分子を吸着させた状態のときの水分子の動径分布関数である。0.5[]ごとにプロットした。3[]付近に水分子を多く含むのがわかる。

図 12 では周りの水分子を含めて NVT を行ったときの時間推移である。図 10 の結果からメトキシ基周辺の水分子は周りの水分子と変わらない動きをしていることがわかったが、10[psec]までにはメトキシ基からの距離によらず、水分子の存在する確率が同程度になっていく。これより、強制的に吸着させた水分子があっても、早い段階で周りに配置した水分子との交換がなされ、拡散していくものと考えられる。一方で、エステル結合カルボニル酸素原子については、メトキシ基の酸素原子をターゲットにした場合よりも長くとどまっている。

以上、官能基に強制的に水分子を配置させ、周りの水分子が多く存在したときに平衡状態となると、最初に吸着させておいた水分子は外に出て行くか否か、図 10 の平均二乗変位の

傾きの差、図 12 の動径分布関数の時間推移とを踏まえて考える。

不凍水が存在すると考えられているエステル結合カルボニル酸素原子については、吸着力がより強く、周りの水分子に対しても動きが小さく、拡散しづらい。中間水が存在すると考えられているメトキシ基の酸素原子については、周りの水分子と同化してしまう可能性がある。本方法は周辺に存在する水分子が不凍水であるか、他の水であるかの違いにつながる指標として使える可能性はあるが、中間水とバルク水との違いを示す指標とするには難しそうであると考えられた。そのため、中間水を示すには他の方法での取組みが求められる。

(3)材料中の官能基近傍の水分子とバルク水との違い

メトキシ基に対する周りの水分子の距離の時間推移を図 13 に示す。全フレームの平均距離が小さいものから 50 番目ごとに取り出し、1 つのグラフに 4 つの水分子の結果を示している。左から右に向かって 1 段目から 5 段目にかけて距離が大きくなっている。材料近くでとどまる傾向にある水分子は左上に、バルクとなって存在している水分子は右下に示される。

さらに図 14 ではメトキシ基に対する周りの水分子の平均距離が小さくなる 1 番目から 100 番目の水分子について順に示した。この結果から遠くから水分子が近づいてきてとどまり、離れていく様子も見られる。水分子の捕捉時間を捉えることで中間水を示しうる可能性が見出せた。

補足時間を示すことで中間水として水分子がとどまる可能性を示すことを試みたが、相対距離を算出したときにどの値が閾値となるのかについての示し方についてはまだ方法が提案できていない。メトキシ基の酸素原子も水分子中の酸素原子も運動しているので、値の変動も大きく、波形にスムージングをかけてノイズ除去も試みたが、決め手に欠けている。距離の時間微分によって、水分子が一時的に存在するのか、とどまる状態にあるのか

ということを示し得ると考えており、とどまる状態がみられたところで、時間積分をすることによって、メトキシ基に対してどれぐらいの距離に水分子が存在しているのか把握できると考えている。今後は中間水が見られなまいといわれる材料との比較を行いながら、検討を進めていきたい。

D. 結論

医用高分子表面近傍の水和状態に着目し、分子動力的シミュレーションを行った。

MEA の 50 量体内にある 2 種類の酸素原子について、水分子の吸着力の強さと離れやすさ、とどまりやすさについて比較検討した。これより、不凍水の存在を示すのにより指標となる可能性が示唆されたが、中間水を示すには別の方法が求められると考えられた。

中間水の振る舞いを示すために、官能基に捕捉された時間を算出し、水分子毎に示すことで水の分類を行った。近くにとどまり続ける水分子と遠くに存在しつづける水分子とがあり、これが中間水の特徴を示すためのきっかけと考えられた。中間水の特定のためには他の材料との比較などを含めて、より詳細な検討が求められる。

E. 参考文献

- (1) 植松美幸, 中野達也: 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討, 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 平成 22 年度 総括・分担研究報告書 95-103 2011 年
- (2) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 瀬川勝智, 中野達也: 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討, 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 平成 23 年度 総括・分担研究報告書 103-110 2012 年
- (3) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 瀬川勝智, 中野達也: 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討, 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料

の新規評価方法の開発に関する研究 平成 24 年度 総括・分担研究報告書 151-168 2013 年

- (4) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 瀬川勝智, 中野達也: 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討, 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 平成 25 年度 総括・分担研究報告書 96-103 2014 年
- (5) Jhon, M. S.; Andrade, J. D. J. Biomed. Mater. Res. 7, 509 (1973).
- (6) M. Tanaka et al. Polym. Int. 49, 1709 (2000).
- (7) S. Morita, M. Tanaka, Y. Ozaki, Langmuir, 23, 3750 (2007).
- (8) G. F. Li et al., J. Am. Chem. Soc., 126, 12198(2004).
- (9) Y. Miwa et al., Polymer, 50, 6091(2009).

F. 業績

- (1) M. Uematsu, Y. Haishima, R. Nakaoka, T. Nakano, K. Segawa and S. Niimi : Developing a Biocompatibility Evaluation System Utilizing Molecular Dynamics Simulation of Hydration on Surface of Biomaterials, The 54th Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, Nagoya, May 2015 (accepted)
- (2) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾: 分子動力的シミュレーションによる PMEA 分子に存在する水の挙動解析, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 (2014.11) (東京)

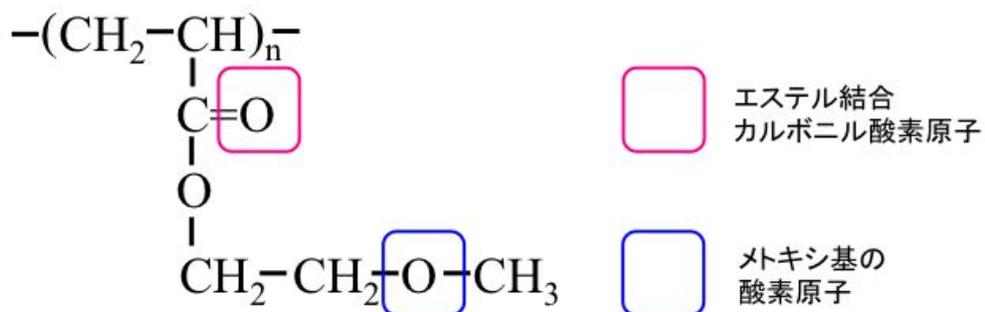
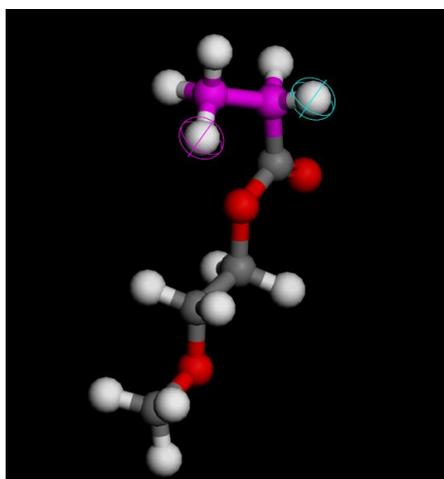
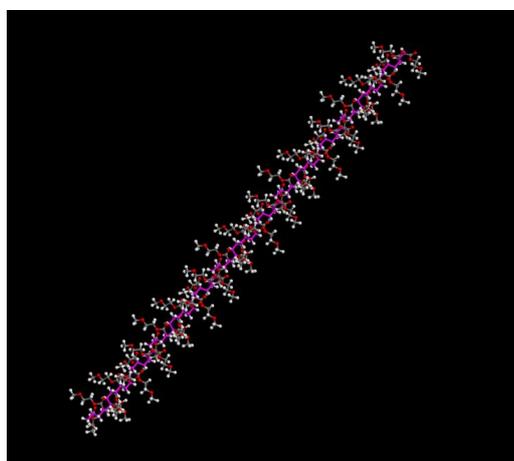


図 1 MEA の分子構造式



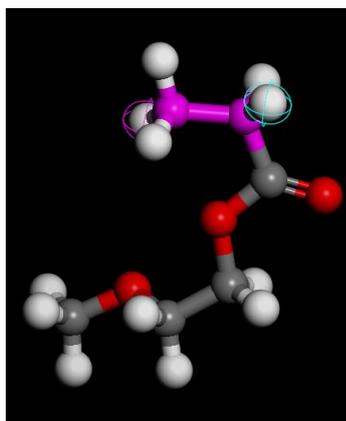
(a) エネルギー最小の MEA

青：Head、赤：Tail



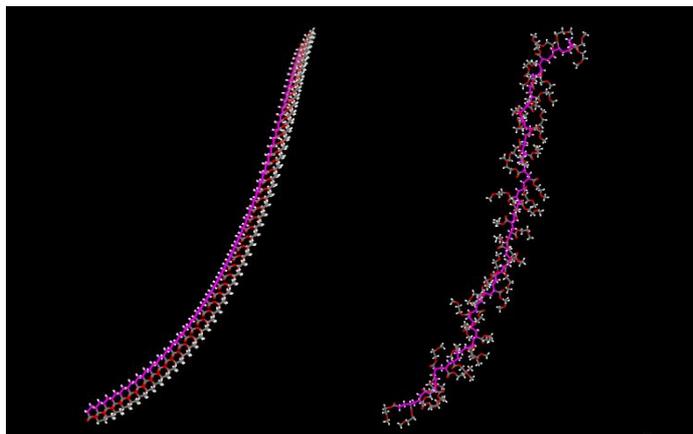
(b) a の 50 量体

図 2 MEA の 50 量体の作成



(a) エネルギー最小の MEA

青：Head、赤：Tail



(b) a の 50 量体

(c) b に構造最適化と
Dynamics (NVT) をかけた

図 3 MEA の 50 量体の作成

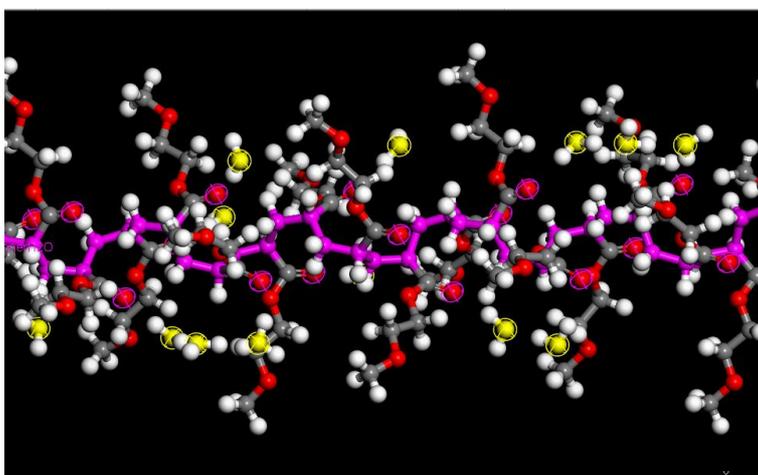


図 4 MEA の 50 量体のエステル結合カルボニル酸素原子に 50 個の水分子を吸着

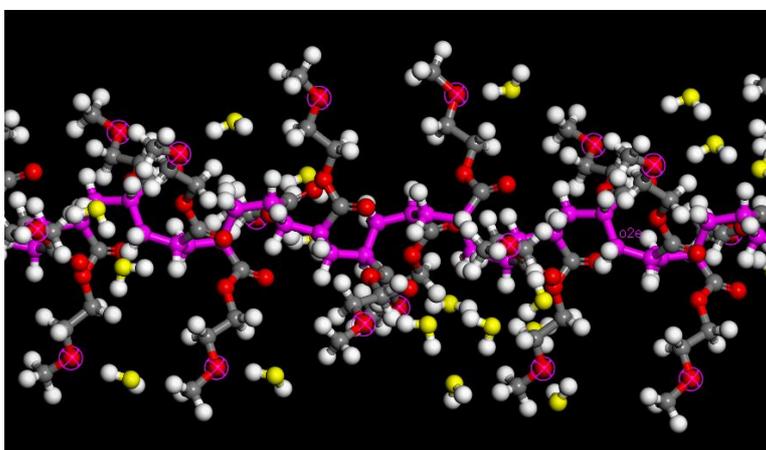


図 5 MEA の 50 量体のメトキシ基の酸素原子に 50 個の水分子を吸着

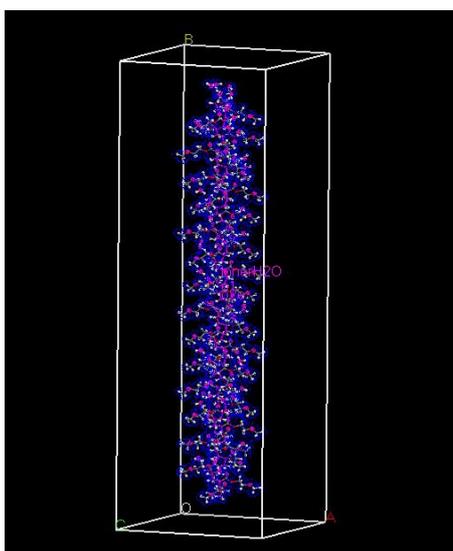


図 6 格子内に 50 量体の MEA を配置

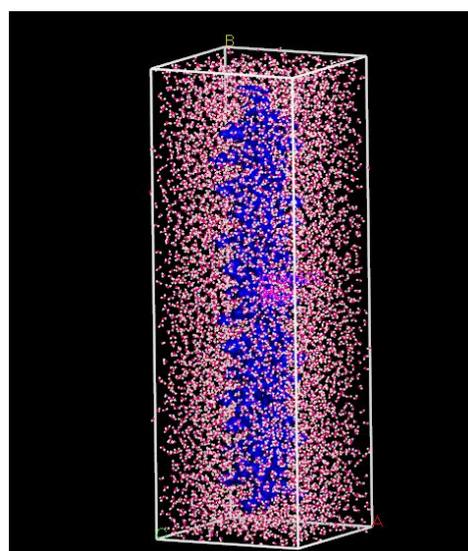
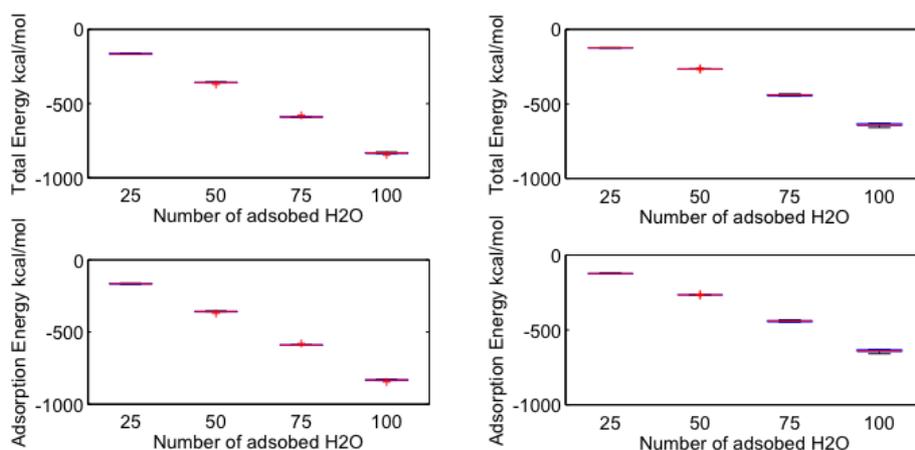


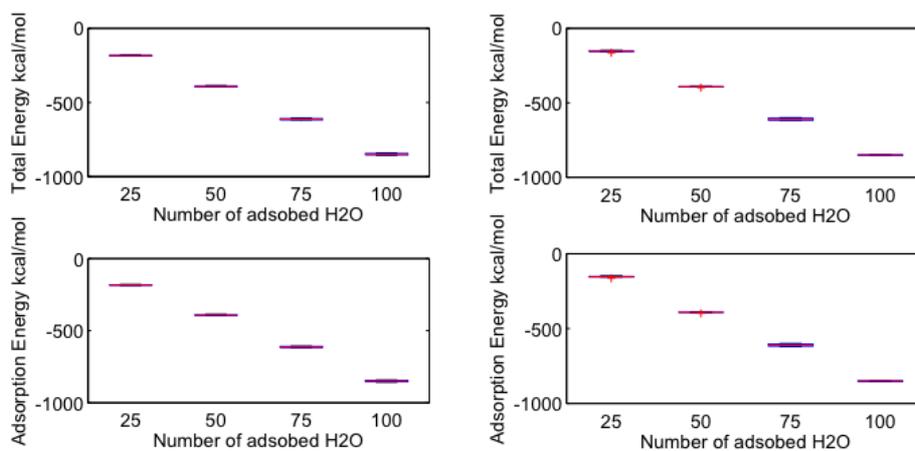
図 7 格子内の空き領域に水分子を配置



(a) エステル結合カルボニル酸素原子

(b) メトキシ基の酸素原子

図 8 MEA の 50 量体のエステル結合カルボニル酸素原子に 50 個の水分子を吸着させたときの全体のエネルギーと吸着エネルギーに関する箱ひげ図 (力場は COMPASS II)



(a) エステル結合カルボニル酸素原子

(b) メトキシ基の酸素原子

図 9 MEA の 50 量体のメトキシ基の酸素原子に 50 個の水分子を吸着させたときの全体のエネルギーと吸着エネルギーに関する箱ひげ図 (力場は Universal)

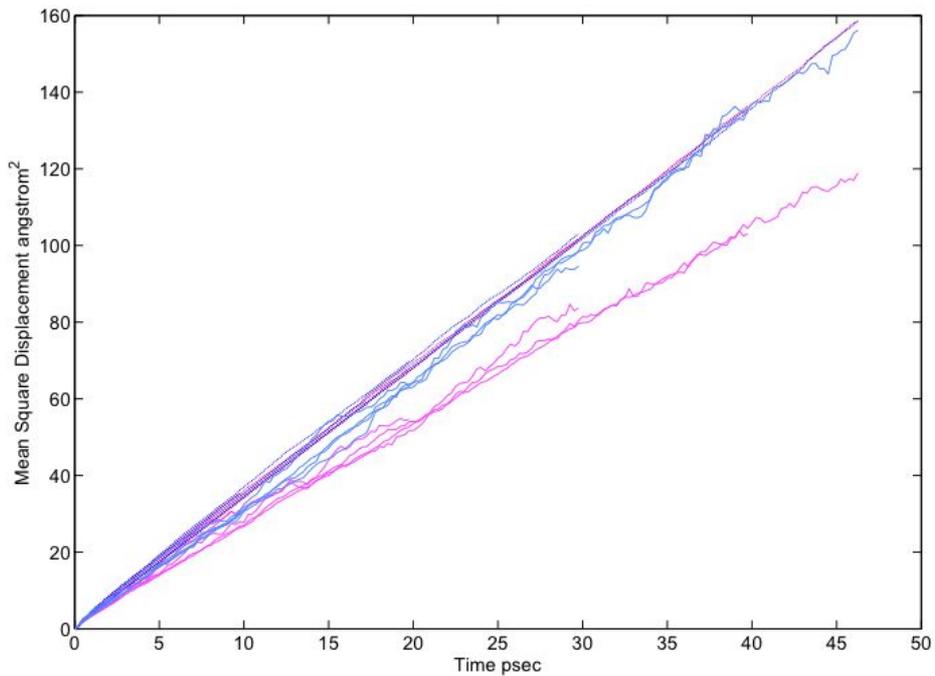


図 10 MEA の 50 量体の 2 種類の酸素原子に対する水分子の平均 2 乗変位
 (赤：エステル結合カルボニル酸素原子、青：メトキシ基の酸素原子、
 実線：最初に吸着させた 50 個の水分子、破線：全水分子)

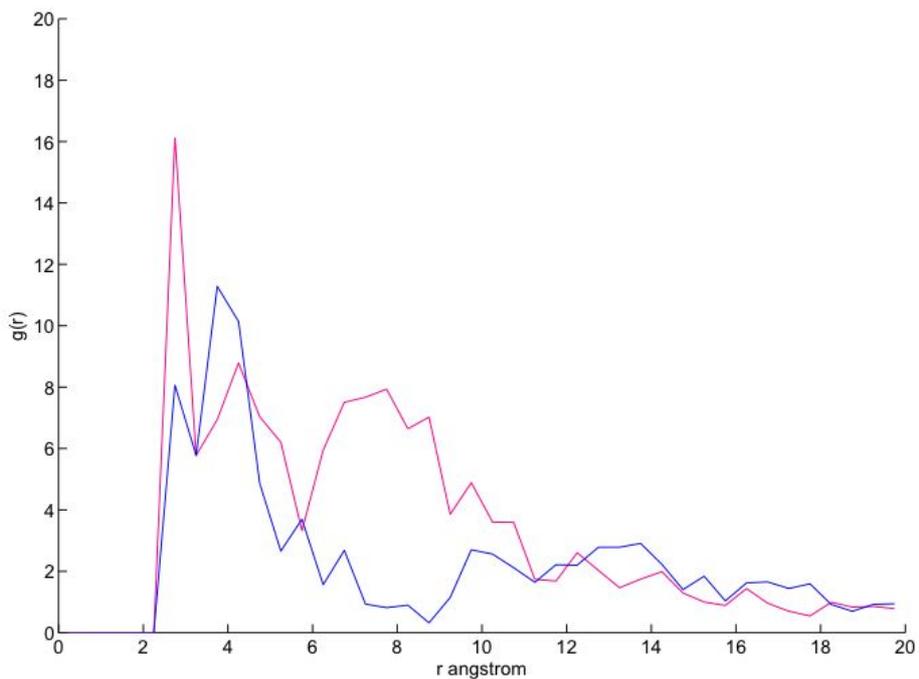


図 11 MEA の 50 量体の 2 種類の酸素原子に 50 個の水分子を吸着させたときの
 動径分布関数 (赤：エステル結合カルボニル酸素原子、青：メトキシ基の酸素原子)

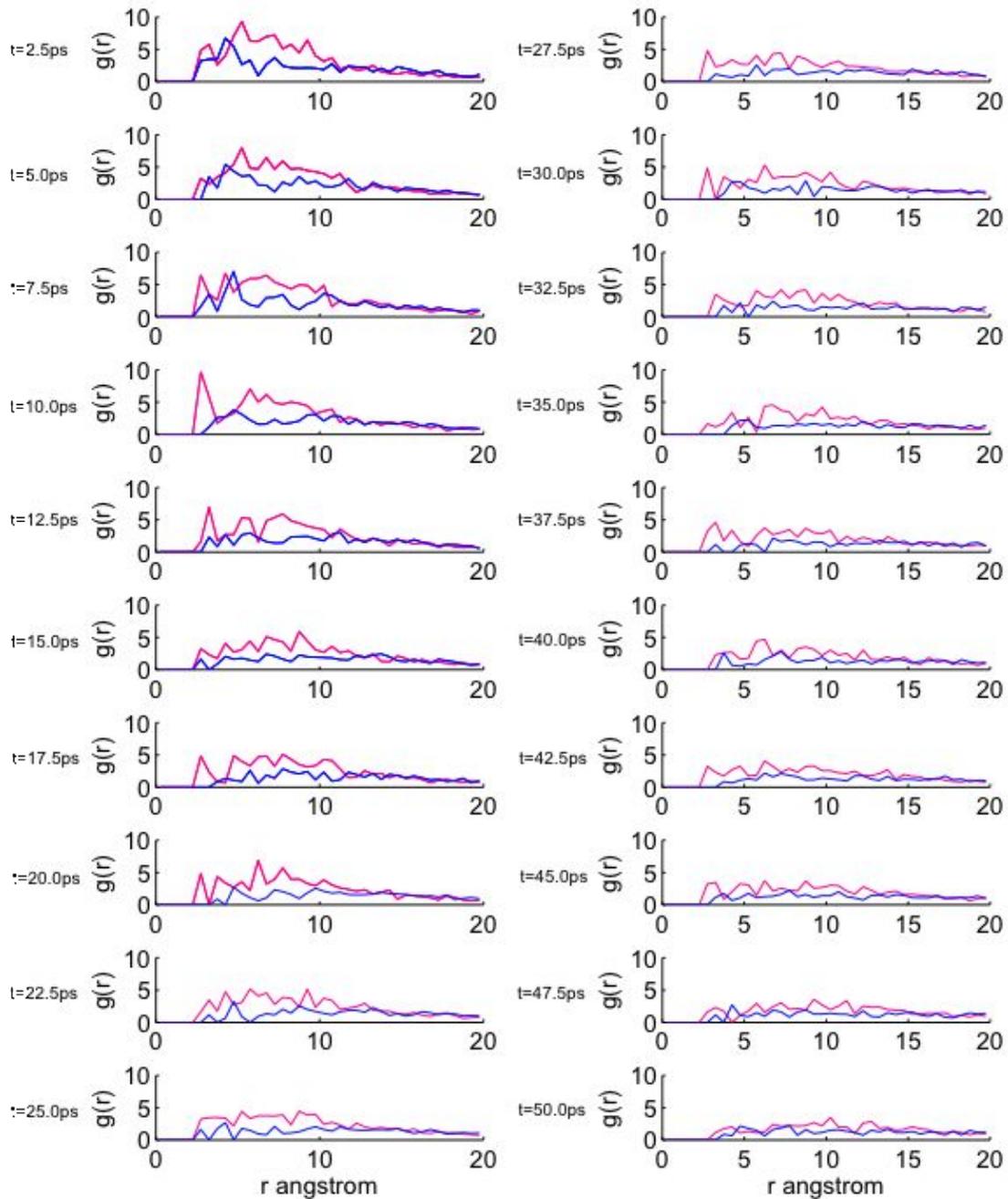


図 12 MEA の 50 量体の酸素原子に 50 個の水分子を吸着させた後、周りを水分子で囲み、分子動力学シミュレーションを行ったときの 2.5psec から 50.0psec までの時間経過
 (赤：エステル結合カルボニル酸素原子に吸着させた水分子、
 青：メトキシ基の酸素原子に吸着させた水分子)

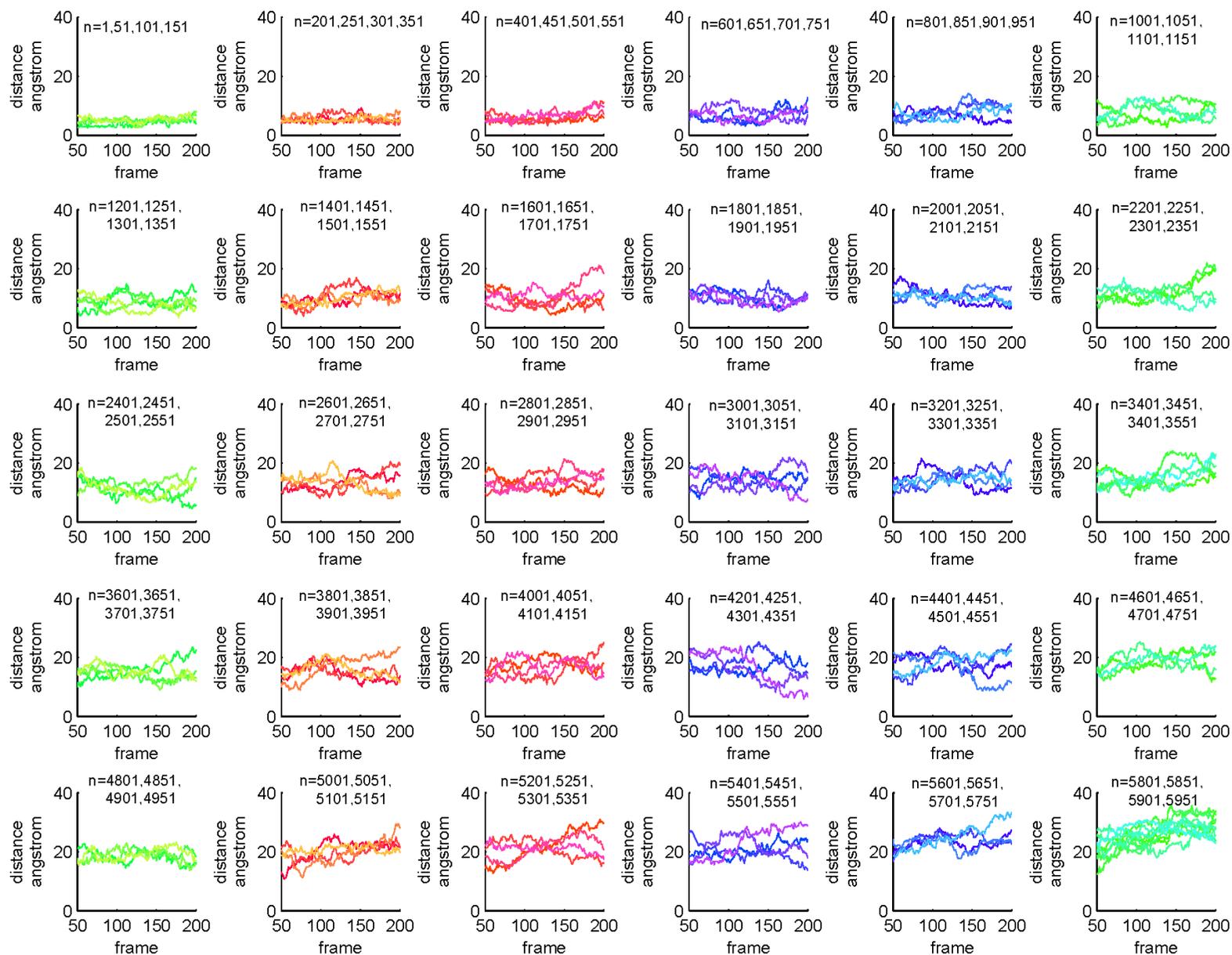


図 13 MEA の 50 量体に 6133 個の水分子を配置して分子動力的シミュレーションを行い、平衡状態となったときについて、各水分子と MEA 内のメトキシ基の酸素原子とが最近接距離となる距離を表示した結果（水分子とメトキシ基との距離の平均値で水分子を並び替えて番号を付与した。1 番目から 200 番ごとに 5951 番目までの結果を示した。）

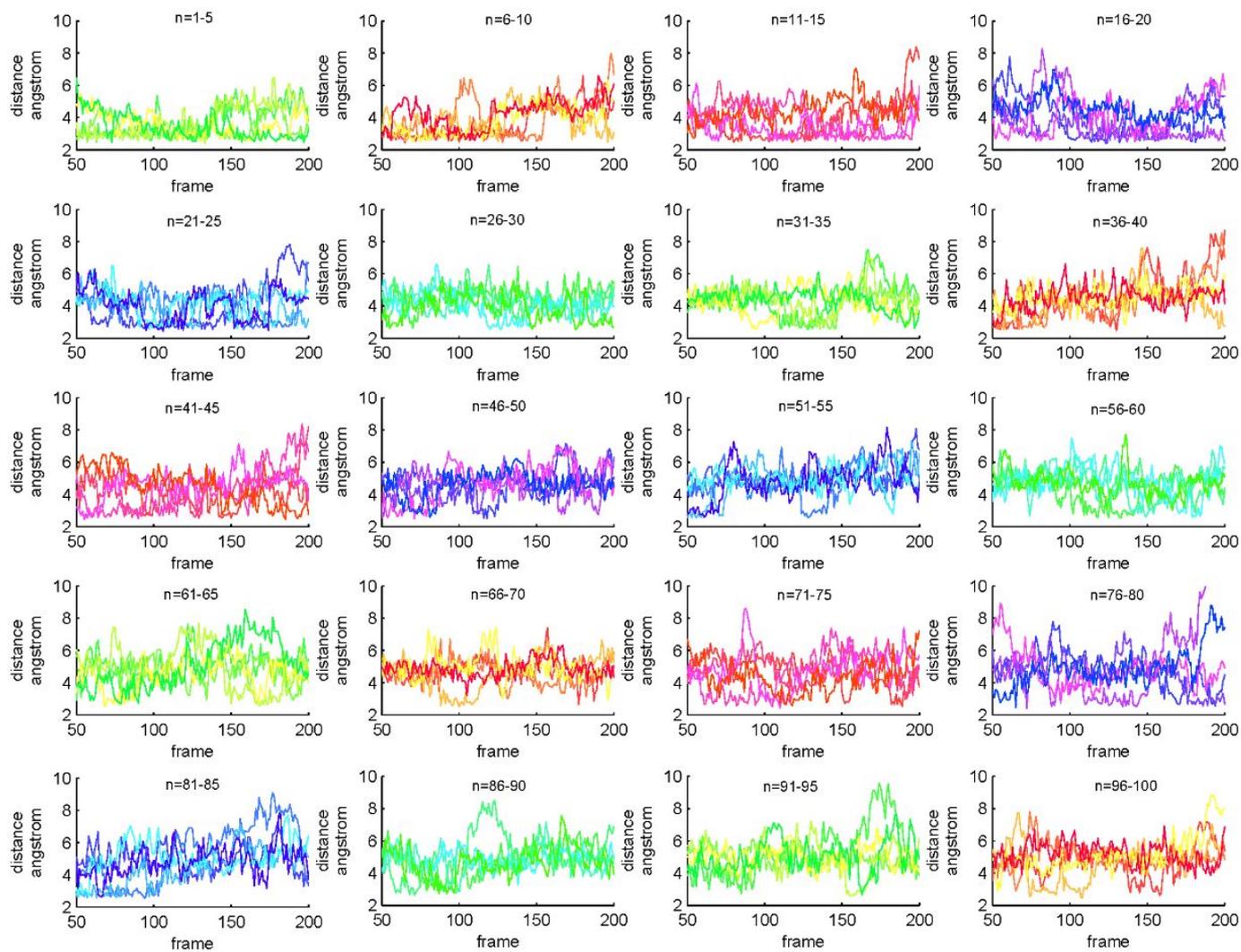


図 14MEA の 50 量体に 6133 個の水分子を配置して分子動力的シミュレーションを行い、平衡状態になったときについて、各水分子と MEA 内のメトキシ基の酸素原子とが最近接距離となる距離を表示した結果 (1 番目から 100 番目までの結果を示した)