

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)
分担研究報告書：平成 24-26 年度 (3 カ年分)

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	薮島由二	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

要旨

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ことが背景にある。新規材料に対して、長期的な埋込みによる生体適合性の評価をすることを考えると、実際の応用までに時間を要するが、材料開発段階でその予測ができれば、材料をより迅速に患者へ普及させることができると考える。その評価指標のひとつとして、本研究ではコンピュータシミュレーションによる評価指標の開発に取り組んできた。本研究では、比較的血液適合性が高いといわれる高分子材料である PMEА (Poly(2-methoxyethyl acrylate)) を対象にどのような条件でシミュレーションを行い、どのような解析によって値を示すことで、不凍水、中間水、バルク水の説明ができる指標となるのか、検討した。

背景・目的

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。

【平成 24 年度】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た。一方で、中間水の存在をすでに知られている DSC 分析他の手段で調べるために、NMR で PMEА の計測を試みた。

【平成 25 年度】平成 24 年度の NMR での解析結果を受けて、PMEА 中のメキシ基周辺に中間水が存在する可能性が認められた。これから、メキシ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。

【平成 26 年度】不凍水、中間水、バルク水の差異を示すために、PMEА 中に存在する水分子について、位置、吸着力、変位を数値化した。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、高

分子内への水の取込み力を調べ、また、水分子の補足時間を示すことで緩やかに存在する水分子の存在について示すことを試みた。

方法

【平成 24 年度】中間水の存在を示すための指標として、分子動学的シミュレーションによって算出させる数値のうち、拡散係数、動径分布関数、吸着エネルギーを用いることで、材料周りの水分子の振る舞いを示す。

6wt%のPMEAを基準として、PMEAと水の比率を算出した。バルクのPMEAの密度が約 1.2g/cm^3 であることから、重合数は50とし、約30の立方体セルに3本鎖を配置し、水分子を60個配置した。周期境界条件を設定し、温度が300Kのもとで分子動学的シミュレーションを行った。トータルエネルギーが安定したときの200ps分のtrajectoryを取り出し、材料中の官能基に対する水分子の配置について動径分布関数を求めた。

PMEAの酸素原子に対する水の吸着エネルギーについて Adsorption Locator モジュールを用いて (Accelrys 社) シミュレーションした。50量体のPMEAの1本鎖に対して、20個の水を配置する。ここで、酸素原子は(A)メトキシ基の酸素原子、(B)エステル結合カルボニル酸素原子、(C)エステル結合酸素原子の3つの種類がある。全酸素原子に対して、水を配置させる場合に対して、それぞれの酸素原子に限定的に水を配置させる場合の吸着エネルギー比較を行う。これにより、どこの酸素原子に配置するのが最も安定的となるのか探索した。

固体NMRにてPMEAの計測を行い、材料中に取り込まれている水の存在とその位置推定を行った。(1) ^1H -NMR、(2) ^{13}C -NMR / J-DEPT45、(3) ^1H - ^{13}C J-HETCOR、(4) ^1H - ^{13}C J-HETCORのスライスデータ、(5) ^{13}C -CPMAS、(6) CP-HETCOR、(7) CP-HETCORのスライスデータ、(8) NOESYの結果からPMEA中の水の存在とその位置について可能性を探った。

【平成 25 年度】NMRの結果からPMEAのメトキシ基近傍に存在する水が中間水であるという予測のもと、isotacticとsyndiotacticの構造の違いでメトキシ基周りの水に違いが出るのか検討した。PMEAは水に溶ける材料ではないため、周りに多くの水が存在しないモデルがよいだろうと想定し、0のPMEAに対して、100個の水分子を与えたCell構造を作成してシミュレーションを行った。密度が 1.22g/cm^3 に対して、1辺23.06であった。Forcite Plusを用いて、Annealingを300Kから500Kで5サイクル行い、Dynamicsを行った。ここでDynamicsはNVTで50,000ステップ(50ps)、NVEで100,000ステップ(100ps)行った。この結果について、解析を進めた。

メトキシ基周辺の水の個数については、Materials Studioに付属するPipeline Pilotを介して、

MaterialsScript API を利用し、自作の Perl のプログラムを併用しながら行った。トキシ基周りに中間水が存在するという仮定のもと、メトキシ基の酸素原子から 1 箇の距離に応じた存在する水の個数を算出し、メトキシ基の酸素原子からの距離に応じて、1 箇に範囲を設定し、その中に入る水分子について、メトキシ基に対する水の相対速度を算出した。

【平成 26 年度】平成 25 年度の結果から、中間水の存在を示すにあたり、メトキシ基と水の相対速度では十分に示せそうにないだろうと考え、PMEA 中の酸素原子に対する水分子の分類を試みた。まず、構造は isotactic に限定し、Conformer を用いてモノメトリックな構造を作成した上で、らせん状になる 50 量体を初期材料として設定した。

材料中の酸素原子へ強制的に 3[]となる位置へ水分子を配置する。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。そして、材料中に水を取り込んだ状態を作り出し、周りに飽和状態の水が存在し、分子動力的シミュレーションを行った。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した。

また、分子動力的シミュレーションの結果から、官能基周辺の水分子の補足時間を調べることで、中間水としての振る舞いを示すことを試みた。メトキシ基に対する周りの水分子の距離の時間推移を算出し、全フレームの平均距離が小さいものから順にグラフ化した。このときのシミュレーション条件としては、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]分出力するとした。

結果・考察

【平成 24 年度】シミュレーションの結果から、官能基に対する水の動径分布関数から水素結合の配置位置、拡散係数から水の動きやすさを示した。

自己拡散係数は PHEA、PBA、PMEMA、PHEMA、PEA、PMEA、PPEA の順に低下した。すでに検討したモノマー周りに水を飽和状態に配置させたときの分子動力的シミュレーションの結果によれば、PHEA、PBA、PMEA、PHEMA、PEA、PPEA、PMEA という順であった。水の配位数もこれまでの実験方法とは異なっているので、単純比較はできないが、PMEA、PMEMA の順番に入れ替わりがあるものの、モノマーの場合と今回のオリゴマーのときとではほぼ同じ並びであった。DSC では PMEA のみ中間水の存在が予想されていることから、今回のシミュレーション結果のみから、どこまでが妥当な結果を示しているのか線引きができなかった。また、水が少ないと計算誤差も増えるため比較が難しかったことや、水の拡散係数を基準とした比較用の指標の重要性から、現実的な密度を基準にした水分子の配置より、飽和状態に水分子を配置したモデルの方が、本シミュレーションにはよさそう

であると考えられた。また、分子動力的シミュレーションで中間水の存在を示すには、飽和状態の水に対して、全体の水の拡散係数を算出するよりも、官能基に対する距離に応じた水の動きやすさとしての値を求めることがふさわしいと考え、これを今後の方針とした。また、吸着エネルギーや動径分布関数を用いることで、どの位置に吸着しやすく、官能基からどれぐらいの距離に水分子が存在しているのかを示す指標となると考えられた。PMEA と PMEMA については、水の配置位置はほぼ同様であったが、エステル結合のカルボニル酸素原子での水素結合の大きさに違いがあること、また、水の動きやすさとしての拡散係数に差があることから、エステル結合のカルボニル酸素原子周辺の水の動きにくさが影響したものと考えた。今後、中間水の存在をシミュレーションとして示すためには、PMEA と PMEMA のメチル基の有無によって、この水の動きにくさに違いがどのように現れるかに着目して進めるのがよいと考えた。

高分子材料に含まれる中間水の存在との関係性が示唆された。NMR での計測結果からも、PMEA には高分子に取り込まれた水の存在があると考えられ、それがメトキシ基の酸素原子に存在するものであると推察された。メトキシ基は運動性がよく、そこに取込まれている水をシミュレーションから表現することが本研究の目指すところとなると考えられた。

【平成 25 年度】 MEA を対象とし、これまでの実験、シミュレーションによって予測されたメトキシ基の酸素原子近傍の水分子の振る舞いについて、解析した。isotactic の結果、(syndiotactic の結果について、いずれも 5 回の試行の結果から検討したが、似通った結果もあれば、異なる結果もあった。平均した結果での比較を行うにはサンプル数が十分でないと考え、isotactic のときの水分子の数よりも syndiotactic のときの水分子の数の方が相対的に多いと見受けられた。水分子の平均 2 乗距離変位が時間に対して線形となっている部分を取り出し、Cell 内全体の水分子についての拡散係数を計算し、5 試行数分で平均してみると、isotactic が 6.7×10^{-6} [cm^2/s]、syndiotactic が 6.8×10^{-6} [cm^2/s]となった。ただし、取り出す時間幅などによっても結果が異なることに注意は必要である。より多くの試行数で傾向を見ていく必要があると思うが、現在の結果を見ると、水分子全体の動きとしては isotactic と syndiotactic に大きな差異はないと思われた。

また、100ps のデータに対して解析をしたところ、近い距離にあっても、離れた距離にあっても水分子の平均的な速度に違いはなかった。解析前には中間水というのはメトキシ基に対してほぼ固定で大きく外れることなくとどまり続ける水であると考えていた。そのため、酸素原子間の同程度距離関係ある水分子は同じように振る舞うと考え、メトキシ基側の酸素原子からの 1 毎に区切られた範囲での水分子全体をひとまとまりで考えるアルゴリズムを用いた。しかしながら、動画から水分子がメトキシ基の近くに存在しているのを確認することができる。これから、中間水とバルク水との差を示すには全体の水分子の統

計的データによって示すのは難しく、それぞれの水分子の振る舞いについての傾向をグループ化した上で比較検討するのがよいと考えられた。中間水の振る舞いを捉えるために、全フレームの統計的な解析ではなく、官能基に捕捉された時間を見ていくことを提案した。

【平成 26 年度】これまでの結果から、材料中に存在する水分子のグループ化をした上で、その動きを捉えることが、不凍水、中間水、バルク水の違いを示すことにつながると考えていた。PMEA 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。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た。

次に、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、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に対して、平均二乗変位の傾きの差、動径分布関数の時間推移をみたところ、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（バルク水）と同化してしまう可能性があると考えられた。

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。

そこで、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。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。

総括

本研究では NMR によって PMEА 中に含まれる水の存在可能性とその位置を探り、分子動力的シミュレーションによって、中間水の表現を様々なアプローチで試みた。3 年間の結果を受けて導かれたのは次の 2 点である。

- 1) PMEА 中に含まれる酸素原子に対して水素結合を強制的に作ったときの吸着エネルギー比較や吸着させた水分子が周りに拡散していくか検討することで、不凍水としての示し方ができるのではないかということ。
 - 2) 2) 酸素原子の周りに存在する水分子の捕捉時間を算出することで、中間水としての存在を示す指標となりうるのではないかということ。
- 今後は中間水の有無に応じて、他の材料との比較を進め、本法の妥当性について検討していきたい。

業績（論文）

- (1) Muragaki Y, Uematsu M, Iseki H, Umezu M: Analysis of Benefit-risk Balance in Decision-making of the Food and Drug Administration for Pre-market Approval of Therapeutic Medical Devices, *Advanced Biomedical Engineering* 2 101-106 2013 年
- (2) Uematsu M, Asato K, Ichihashi T, Umezu M, Nakaoka R, Matsuoka A, Aomi S, Iimura H, Suzuki T, Muragaki Y, Iseki H., A surgical navigation system for aortic vascular surgery: a practical approach, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2013; 2013:5327-30 2013 年

業績（学会発表）

- (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, May 2015 (accepted)
- (2) 植松美幸, 齋島由二, 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 PMEА 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 年 11 月
- (3) 植松美幸, 高橋泰浩, 梅津光生, 中岡竜介, 新見伸吾, 青見茂之, 飯村浩, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋, 岩崎清隆. ユーザビリティを考慮した大血管ナビゲーションの設計開発, *日本コンピュータ外科学会誌*. 16 (3): 329-330 2014 年 11 月
- (4) 植松美幸, 齋島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 瀬川勝智, 中野達也: 血液適合性評価のための中間水同定シミュレーション, *日本バイオマテリアル学会大会予稿集* 35th 396 2013 年 11 月
- (5) 植松美幸, 此枝央人, 櫻井裕之, 正宗賢, 中岡竜介, 新見伸吾, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋: 皮弁挙上時の血管走行把握を支援するナビゲーション誤差検討, *日本コンピュータ外科学会誌* 15(2) 202-203 2013 年 8 月

- (6) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 中野達也, 瀬川勝智: 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析(第2報), 高分子学会医用高分子シンポジウム講演要旨集 42nd 61-62 2013年7月
- (7) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也: 医用高分子材料の表面近傍における水和状態のシミュレーション的評価, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム予稿集 2012 355 2012年11月
- (8) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也: 医用高分子材料の生体適合性評価指標開発に向けた分子動力的シミュレーション, 人工臓器(日本人工臓器学会) 41(2) S.219 2012年11月
- (9) 岸本眞治, 村垣善浩, 岡本淳, 吉光喜太郎, 鈴木孝司, 伊関洋, 吉澤晋, 梅村晋一郎, 植松美幸, 松岡厚子, 阿部信隆, 仲本秀和, 鍋木正志, 川畑健一, 石井宏志: 先端医療機器開発における国際標準化の役割, 日本レーザー医学会誌 33(3) 282 2012年10月
- (10) 安里権也, 植松美幸, 市橋琢弥, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村浩, 青見茂之, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋: 解剖学的特徴点計測における誤差評価についての実験的検討, 日本コンピュータ外科学会誌 14(3) 224-225 2012年10月
- (11) 植松美幸, 市橋琢弥, 安里権也, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村浩, 青見茂之, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋: TAAA Navigator の開発と臨床的評価の実際, 日本コンピュータ外科学会誌 14(3) 356-357 2012年10月
- (12) 市橋琢弥, 植松美幸, 安里権也, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 東隆, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋: 弓部大動脈瘤用ステントグラフト留置過程のデータに基づく可視化に向けた初期的検討, 日本コンピュータ外科学会誌 14(3) 396-397 2012年10月
- (13) 此枝央人, 櫻井裕之, 植松美幸, 佐藤生馬, 上内洋輝, 正宗賢: 穿通枝皮弁(DIEP flap)挙上時の血管走行可視化の試み, 日本形成外科学会誌 32(7) 535 2012年7月
- (14) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 中野達也, 瀬川勝智: 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析(第1報), 高分子学会医用高分子シンポジウム講演要旨集 41st 61-62 2012年6月