

血液微小循環系のマルチスケールシミュレーションに向けて

松本洋一郎^{*}, 高木 周[†], 杉井 泰介[†], 山田 雄士[†]

^{*} 東京大学 大学院工学系研究科
東京都文京区本郷 7-3-1
e-mail: ymats@mech.t.u-tokyo.ac.jp

[†] 東京大学 大学院工学系研究科
東京都文京区本郷 7-3-1

要旨

人体内の血液循環に対するシミュレーション技術の開発は、高齢化社会においてより深刻な問題となる、循環器疾患、脳血管疾患などに対する高度医療を達成するために、極めて重要な意味を持っている。ここでは、体内の物質交換において特に重要となる微小循環系に関連して、脂質二分子膜を有するベシクルを含む流れのマルチスケール解析を題材とし、マイクロ・メゾ・マクロのそれぞれのスケールで有効となるシミュレーション手法について説明する。ミクロスケールとして、分子動力学法による生体膜の詳細解析、メゾスケールとして、散逸粒子動力学法による生体膜のシミュレーション、マクロスケールとして Immersed Boundary 法を用いたせん断流中の変形リポソームの連続体レベルでのシミュレーションを紹介し、これらの手法により得られた数値計算結果とその妥当性を議論する。

1. はじめに

来るべき高齢化社会における超高度医療応用技術の一つとして、人体そのものをシミュレートする人体シミュレータなるものの開発が大きな期待を集めている。中でも、人体内の血液循環に対するシミュレーション技術の開発は、循環器疾患、脳血管疾患などに対する高度医療を達成するために、極めて重要な意味を持っている。

従来、血流に関しては心臓や脳に関するものを中心に研究が進められており、これらの研究では、血液全体を連続体とみなすのが一般的である。一方、体内の物質交換において重要となる微小循環系においては、変形しながら移動する赤血球や血管造影用マイクロバブルなどの要素を分散体とみなした分散混相流としての扱いが必要となる。さらに、赤血球による酸素の輸送や、マイクロカプセルによる薬物の輸送(DDS)に対しては、膜を介した分子レベルでの物質輸送まで考慮する必要がある。よって、現象の全体像を捉えるには分子レベルのマイクロ現象から連続体レベルのマクロ現象までを取り込んだマルチスケール解析を行う必要がある。

脂質や界面活性剤などの両親媒性分子は、水中で自己会合しミセルや 2 分子膜を形成する。特に生体中においては、脂質 2 分子膜は生体膜の基本構造を形成しており、様々な生命活動を支えている。そのため、脂質 2 分子膜からなる膜小胞体(リポソームやベシクル)は、生体膜機能の解明や微小循環系における血流構造の解明などにおいて極めて重要である。また、近年ではドラッグデリバリーシステム(DDS)や人工酸素運搬体、あるいは創薬

といった応用面においても注目されてきている。

本稿では、血液微小循環系で特に重要となる、脂質二分子膜を有するベシクル（リポソーム）を含む流れのマルチスケール解析に向け、ミクロ・メゾ・マクロのそれぞれのスケールで有効となるシミュレーション手法と、得られた結果について説明する。

まず始めにミクロスケールの解析に関連して、分子動力学(Molecular Dynamics, MD)法を用いて、分子スケールにおける単純拡散による膜透過現象に関して解析した結果について説明する。単純拡散による膜透過は、水分子や酸素分子の輸送など、重要な生命活動と深い関わりがある。しかしながら、透過係数の実験的解析は一般に困難であり、例えば、最も研究されている分子のひとつである水の透過係数ですら、幾つかの値が報告されており、オーダーが合う程度の一致しか得られていない。さらに、分子透過のメカニズムに至っては、未だ明確にはなっていないというのが現状である。近年では、分子動力学法等を用いた分子レベルでの脂質 2 分子膜の研究は盛んに行われており、透過現象に関しても解析が行われている^{1)~4)}。しかし、そのほとんどは透過分子の種類による影響を議論するのみであり、MD による脂質分子の透過に対する影響の解析に関しては、筆者らの知る限り Shinoda らによる脂質分子の炭化水素鎖の枝分かれの影響に関する報告²⁾のみである。一方、例えば脂質分子の疎水基の鎖長、飽和度、枝分かれといった特徴が透過現象に与える影響の重要性が近年報告されている。そこで、本研究では、炭化水素鎖の長さの異なる 3 つの脂質分子を用い、分子動力学解析により、様々な透過分子に対する脂質膜垂直方向の自由エネルギープロファイルの計算を行った。また、水分子に対しては、局所的な拡散係数を計算し、3 つの脂質膜に対する透過係数の見積もりを行った。

次に、メゾスケールにおける解析手法として、分子スケールでの解像度を有しつつも、メゾスケールの現象も解析可能な散逸粒子動力学(Dissipative Particle Dynamics, DPD)法⁵⁾により脂質 2 分子膜の解析を行う。ここでは、分子動力学(Molecular Dynamics, MD)解析の結果を再現するような DPD 脂質モデルを提案する。DPD 法は、複数の原子や分子を一つの粒子として粗視化し、その粒子に働く保存力、散逸力、ランダム力を計算してゆく手法であり、分子動力学と比較してその扱うことのできる時間・空間スケールが非常に大きい。そのため、ベシクルの変形など、比較的大きなスケールでの現象を扱う上で強力な計算手法となりうる。しかし、現状では特定の分子の情報から直接的に DPD 粒子モデルをボトムアップ的に構築する手法は確立されていない。そういった中で、Groot ら⁶⁾は、DPPE 脂質分子に関して、各粗視化セグメントのパラメータを用いることで、DPD モデルにおける粒子間相互作用パラメータを提案している。しかし、彼らのモデルにおいても分子内の粒子間結合ポテンシャルの構築に関してはその根拠が乏しく、また柔らかい結合モデルを用いているために脂質分子の各セグメントが実際よりも空間的に広い分布を示している。本研究では、Groot らの粒子間パラメータに加えて、MD 解析で得られた結果を用いて分子内の粒子間の結合ポテンシャル、および角度ポテンシャルを考慮した DPD 脂質モデルの導入を行う。また、計算結果を MD 解析と比較することにより、その妥当性の検証を行う。

次に、以上の計算により得られた結果を用いて、脂質膜の熱揺らぎに関して調べる。近年、膜の熱揺らぎが様々な現象において重要な役割を果たしているという報告がなされている。例えば、マイクロピペット法による曲げ剛性の測定⁷⁾や、リポソームの単純せん断流中の変形実験⁸⁾においては、熱揺らぎによって“折りたたまれていた”膜が伸びることによる面積増加が重要な役割を果たしていることが報告されている。また、これまでに、MD 法や粗視化 MD 法、DPD 法などによって、2 分子膜や単分子膜に関して、分子レベル

から熱揺らぎの解析が行われてきている⁹⁻¹¹⁾。これらの数値計算においては、膜の熱揺らぎをスペクトル解析することによって、膜の曲げ剛性係数を計算することができる。そのため、得られた曲げ剛性係数を実験値やMD計算の結果と比較することで、用いた脂質モデルの妥当性を検証することができる。しかしながら、それらにおける膜面の定義に関しては統一的な方法は構築されておらず、それぞれ報告によって異なる手法を用いているのが現状である。また、界面の揺らぎを捉える解像度の影響に関する考察や、熱力学的な視点からの考察はほとんどなされていない。そこで、本研究では、菊川らによって提案された界面定義方法¹²⁾を脂質2分子膜系に適用し、2分子膜の膜面を定義するとともに、膜面の熱揺らぎに関するスペクトル解析を行い、曲げ剛性係数を求める。また、計算した曲げ剛性係数を実験値やMD計算の結果と比較し、脂質分子モデルの妥当性を検証する。

最後にマクロスケールのシミュレーションとして、せん断流中で変形するリポソームの挙動に関する連続体としての数値計算結果を示す。ここでは、有限差分法による離散化を行い、膜面の追跡には、Peskinらにより開発されたImmersed Boundary法¹³⁾を用いる。単純せん断流中に存在するリポソームは、膨潤率やリポソーム内外の粘性比の影響によりTank-Treading, Tumblingと呼ばれる運動をすることが知られている。本稿では、特にTank-Treading運動に着目し、他者の結果との比較および考察を行う。

2. ミクロスケールシミュレーション (分子動力学法による脂質二分子膜の解析)

2.1 計算手法

2.1.1 分子動力学法

計算対象として脂質64分子と水1600分子によって構成される脂質2分子膜を用いた。脂質分子にはDLPC, DMPC, DPPCの3種類を用いた。これらの脂質分子の相違点は炭化水素鎖の長さであり、炭素の数はそれぞれ12, 14, 16である。それぞれの脂質分子の分子構造を図1に示す。脂質分子のポテンシャルパラメータはSmondryevら⁷⁾によるものを用い、水分子はTIP3Pモデルを用いた。計算セルには3次元周期境界条件を課し、クーロンポテンシャルの計算にはSPME法を用いた。計算はNP_nγTアンサンブル¹⁶⁾(粒子数 N , 圧力テンソルの P_{zz} 成分 P_n , 表面張力 γ , 温度 T が一定。)で行った。 P_n は1 atm, γ は0 N/m, T は320 Kで制御を行った。時間刻みは2 fs, 総計算時間は10 ns(500万MDステップ)である。

2.1.2 透過係数

Marrinkら¹¹⁾によれば、水分子に対する透過係数 P は

$$\frac{1}{P} = \int_{z_1}^{z_2} R(z) dz = \int_{z_1}^{z_2} \frac{\exp\{\Delta G(z)/k_B T\}}{D_z(z)} dz, \quad (1)$$

として計算できる。ここで、 k_B はボルツマン定数、 z は膜面に垂直方向の座標、 $\Delta G(z)$ と $D_z(z)$ はそれぞれある z 座標における自由エネルギーと拡散係数であり、 $R(z)$ は透過に対する局所抵抗を表している。すなわち、式(1)によれば、 z 方向に沿って自由エネルギープロファイルと局所的な拡散係数のプロファイルを計算することにより、透過係数を求めることができる。本研究では、透過分子に関してはO₂, NO, CO, および水分子を考慮した。O₂, NO, COに関しては自由エネルギープロファイルの計算を行った。水分子に関しては自由エネルギープロファイルの計算と拡散係数の計算を行い、式(1)に従って透過係数の評価を行った。

2.1.3 自由エネルギーの計算

自由エネルギーの計算に関しては、Widom 法に改良を加えた Cavity Insertion Widom(CIW)法¹⁷⁾を用いた。この手法によると、ある z 座標における過剰化学ポテンシャルは、

$$\mu^{\text{exc}}(z) = -k_B T \ln \left\langle \exp \left[-v_{N+1}(\mathbf{r}^N) / k_B T \right] \right\rangle - k_B T \ln \langle P_{\text{cav}}(z) \rangle, \quad (2)$$

で表される。ここで、 $v_{N+1}(\mathbf{r}^N)$ は $N+1$ 個目の仮想粒子が系の N 個の粒子との間にもつポテンシャルエネルギー、 P_{cav} は半径 R_{cav} の cavity を見出す確率である。この方法は、通常の結果を用いて、ある間隔で z 座標方向にスラブを切り、その中において近傍に粒子が存在しない領域(cavity)を見出し、その領域に仮想粒子を挿入する方法である。ただし、水分子の膜外における自由エネルギープロファイルの計算に関しては、より精度のよい値を計算できるため、水分子の局所的な数密度から求める手法^{1), 2)}を用いた。

2.1.4 拡散係数の計算

水分子の局所拡散係数の計算に関しては、脂質膜の内外に対してそれぞれ異なる手法を用いて計算を行った。水分子が豊富に存在する膜の外側に関しては、水分子の速度自己相関関数から求める方法を用いた。また、膜の内側に関しては透過分子に働く揺動力の相関関数から求める方法^{1)-4), 18)}を用いた。この手法は、ある透過分子を(RATTLE 法等を用いて) z 座標に固定し、その透過分子に働く揺動力の相関関数を時間積分することで拡散係数を求める方法である。すなわち、局所拡散係数 $D(z)$ は、

$$D_z(z) = (RT)^2 / \int_0^\infty \langle \Delta F_z(z, t) \Delta F_z(z, 0) \rangle dt \quad (3)$$

と表すことができる。ここで、 $\Delta F_z(z)$ はある z 座標に固定された水分子に働く z 方向の揺動力であり、

$$\Delta F_z(z, t) = F_z(z, t) - \langle F_z(z) \rangle_t \quad (4)$$

である。 $\langle \dots \rangle_t$ は時間平均を示す。

これらの手法によって自由エネルギープロファイルと拡散係数を求め、式(1)を用いて透過係数を計算することができる。

Table 1 Potential parameters of test particles

	atom	$\sigma / \text{\AA}$	$\epsilon / \text{kJ/mol}$	q / e	$r_{\text{bond}}^d / \text{\AA}$
DLPC	O ₂	3.09	0.363	0.0	1.016
	a				
DMPC	CO	3.742	0.460	+0.021	1.128
	b				
DPPC	NO	3.250	0.712	+0.028	1.150
	c				
	O	3.120	0.666	-0.028	

^a parameters from Fischer and Lago¹⁹⁾.

^b parameters from CHARMM library²⁰⁾.

^c parameters from Li et al.²¹⁾

^d r_{bond} is the bond length.

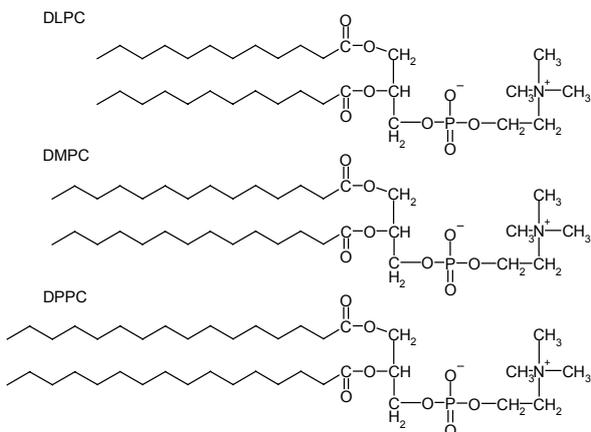


Fig. 1 The molecular structure of DLPC, DMPC and DPPC.

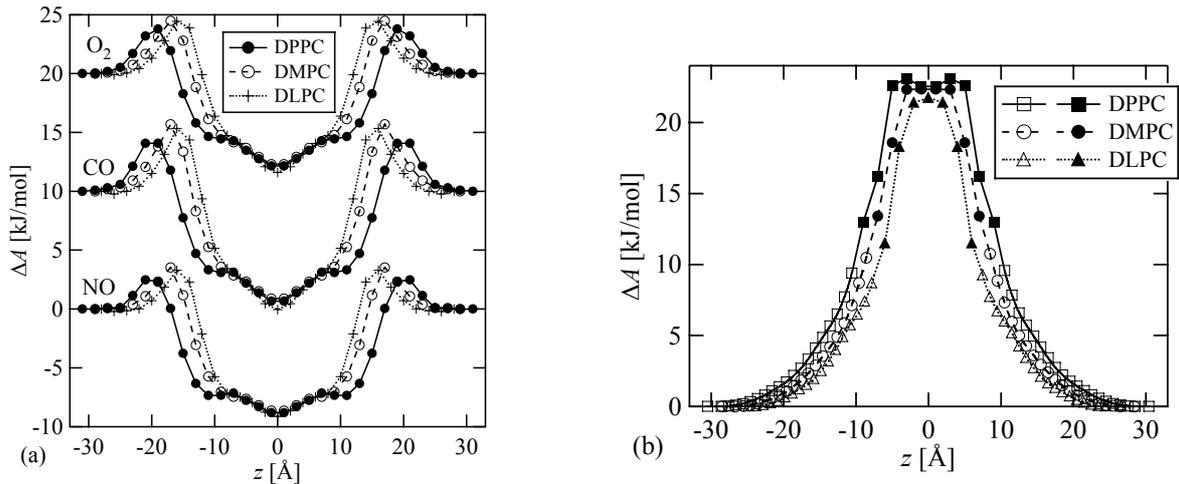


Fig. 2 (a) Free energy profiles of O_2 , CO, and NO. The CIW method was applied to all regions. The CO profiles and O_2 profiles are shifted by 10 and 20 kJ/mol, respectively. (b) Free energy profiles of water. The open symbols (outside the membrane) were obtained from the local density of water molecules, and the closed symbols (inside the membrane) were obtained by the CIW method.

2.2 計算結果と考察

以後、脂質膜の中央平面を $z = 0$ とする。自由エネルギープロファイルの計算は 3ns から 8ns までの 5ns の分子動力学計算の結果を用いた。また、 R_{cav} は 1.9 \AA とした。まず、DLPC, DMPC, および DPPC 脂質膜における、 O_2 , CO, NO に対する自由エネルギープロファイルを図 2(a) に示す。また、用いたポテンシャルパラメータを表 1 に示す。図 2(a) より、 O_2 のような非極性分子、あるいは CO や NO のように極性が小さい分子に対しては、脂質膜内における自由エネルギーは小さく、安定に存在することができることが分かる。一方、脂質-水界面においてエネルギー障壁が存在する。これは、この領域において脂質頭部が密にパッキングされていることの影響が大きいと考えられる。また、炭化水素鎖の長さが異なると、障壁の位置がシフトしていることが分かる。このことから、非極性分子に関しては分子の数密度が支配的に働いていることが分かる。次に、水分子に対する自由エネルギープロファイルを図 2(b) に示す。水分子に対しては、脂質膜内に大きなエネルギー障壁が存在する。また、DPPC 膜においては、 $z = 0 \text{ \AA}$ 付近に自由エネルギーの極小があることが分かる。これは、この領域は分子の存在しない空洞領域(Free Volume)が多く存在し、水分子の感じるポテンシャルが比較的低くなっているためであると考えられる。また、炭化水素鎖が短くなるにつれてエネルギー障壁の幅が狭くなり、膜中央にみられた自由エネルギーの極小が DLPC ではなくなっている。すなわち、炭化水素鎖が短いほど、脂質頭部や水層からのクーロン相互作用が、脂質膜の内側にまで及んでいることが分かる。

また、計算された局所拡散係数を図 3 に示す。速度自己相関関数による膜外の拡散係数の計算に関しては、計算系を z 方向に 3 \AA の厚さでスラブに分割し、時刻 t においてそのスラブ内にある水分子に対して $t+40\text{ps}$ まで追跡し、計算を行った。また、 $t = 4\text{ns}, 6\text{ns}, 8\text{ns}, 10\text{ns}$ における分子座標を用い、 $NP_n\gamma T$ アンサンブルから NVT(Nose-Hoover chain) アンサンブルに切り替えて計算を行った。揺動力の自己相関関数による膜内の拡散係数の計算に関しては、DPPC, DMPC に対しては $z = 0 \text{ \AA}, 3 \text{ \AA}, 6 \text{ \AA}$ に、DLPC に対しては $z = 0 \text{ \AA}, 3 \text{ \AA}$ に水分子を固定して計算を行った。その際、拡散係数を計算した場合と同様に $t = 4\text{ns}, 6\text{ns}, 8\text{ns}, 10\text{ns}$ における分子座標を用い、NVT アンサンブルで計算した。それぞれの固

定点において約 2ns から 4ns の計算を行っている。まず、膜外に関しては、水相の中央付近においてバルク水の値(TIP3P 水分子 1600 個, 320K, 1atm, Anderson Nosé-Hoover NPT ensemble で $7.8 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ であった)に近い大きな拡散係数を示す一方で、脂質分子に近づくにつれて拡散係数が小さくなり、脂質/水界面付近において最も小さくなる。膜内においても脂質分子から離れるにつれて拡散係数が大きくなり、膜の中央付近で極大になる。すなわち、膜の外側においても、内側においても、脂質/水界面からの距離、すなわち脂質極性基や膜間水分子とのクーロン相互作用が透過水分子の拡散現象に対して支配的に働いているのが分かる。

得られた水分子に対する自由エネルギープロファイル、局所拡散係数から、式(1)を用いてある z 座標における透過に対する局所的抵抗 $R(z)$ を求めることができる。計算された $R(z)$ を図 4 に示す。DPPC, DMPC においては膜中央ではなく、膜の中央から数 Å 離れた位置に大きな抵抗があることが分かる。これは、自由エネルギーの最大値がその位置にあることおよび拡散係数が $z = 0$ で極大になることに起因している。この局所抵抗 $R(z)$ を積分することにより、透過係数を見積もることができる。計算された透過係数は DLPC において $4.0 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$, DMPC において $6.8 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$, DPPC において $1.3 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$ であった。従来の実験的解析からは、様々な値が報告されているが、DPPC 膜においてはおよそ $10^{-3} \sim 10^{-2} \text{ cm/s}$ のオーダーである^{22)~26)}。実験的な誤差は大きいものの、本計算結果は DPPC 膜に対する透過係数をよく再現している。ただし、ここで注意しなければならないのは、式(1)より、自由エネルギー差は指数関数で影響してくるため、特に値の大きな脂質膜内外の自由エネルギー差の統計的誤差による影響が大きい点である。すなわち、前述した図 4 の $R(z)$ の計算誤差が大きく、このため、結果として計算される透過係数に関しても誤差が大きくなる。従って、値そのものの定量的な議論に関しては問題があるが、鎖長が短いほど透過係数が大きくなるという定性的性質に関しては、正確に捉えられていると考えることができる。

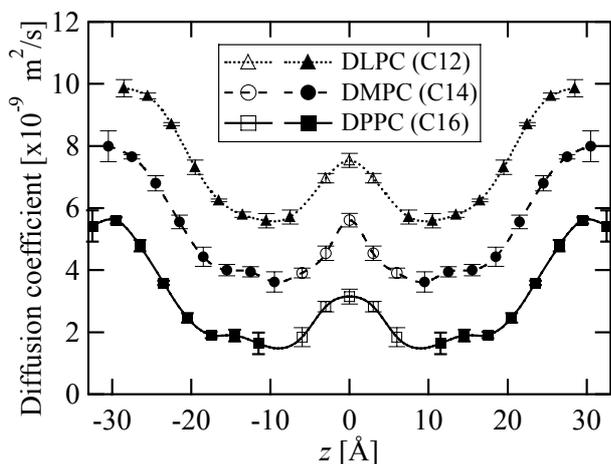


Fig. 3 Local diffusion coefficient of water molecule. The DLPC profiles and DMPC profiles are shifted above by 4×10^{-9} and $2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, respectively.

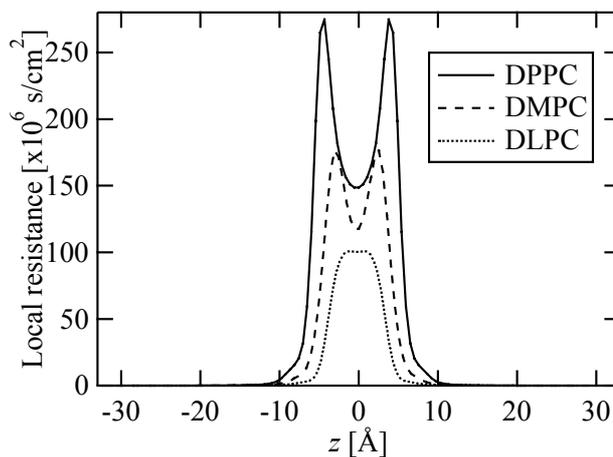


Fig.4 Local resistance to permeation of water molecules.

3. ミクروسケールからメゾスケールへ

次にここでは、さらに大きなスケール、すなわちメゾスケールの現象に対する解析手法

と、分子動力学法との比較に関して述べる。緒言で述べたように、メゾスケールの現象を解析するための手法の開発は、輸送現象をマクロスケールで捉えていくために重要なこととなる。

3.1 散逸粒子動力学 (DPD) 法

DPD 法は、複数の原子や分子を一つの粒子として粗視化し、その粒子に働く保存力、散逸力、ランダム力を計算してゆく手法である。ここでは、MD 法による計算結果を用いた DPD 脂質モデルを提案する。また、MD 法の計算結果と DPD 法の計算結果の比較を行い、DPD モデルの検証を行う。

DPD 法では、DPD 粒子に働く保存力 \mathbf{F}_{ij}^C 、散逸力 \mathbf{F}_{ij}^D 、ランダム力 \mathbf{F}_{ij}^R はそれぞれ、

$$\begin{aligned}\mathbf{F}_{ij}^C &= -a_{ij} \left(1 - \frac{|\mathbf{r}_{ij}|}{r_c} \right) \mathbf{n}_{ij}, \\ \mathbf{F}_{ij}^D &= \gamma \omega^D(|\mathbf{r}_{ij}|) (\mathbf{n}_{ij} \cdot \mathbf{v}_{ij}) \mathbf{n}_{ij}, \\ \mathbf{F}_{ij}^R &= \sigma \omega^R(|\mathbf{r}_{ij}|) \zeta_{ij} \Delta t^{-1/2} \mathbf{n}_{ij},\end{aligned}\quad (5)$$

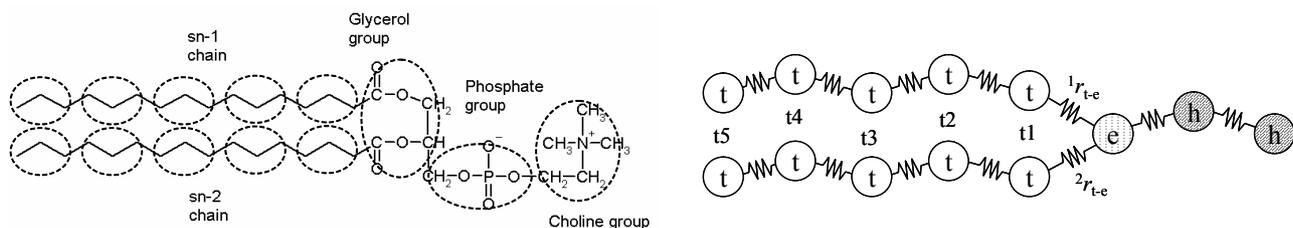
と表わされる。ここで、 \mathbf{r}_i は粒子 i の位置を表し、 $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i$ 、 \mathbf{n}_{ij} は \mathbf{r}_{ij} 方向の単位ベクトル、 r_c はカットオフ半径、 a_{ij} は粒子間の反発力の最大値を決定するパラメータである。 $|\mathbf{r}_{ij}| > r_c$ のときは $\mathbf{F}_{ij}^C = \mathbf{F}_{ij}^D = \mathbf{F}_{ij}^R = 0$ である。また、 γ は摩擦パラメータ、 σ はノイズパラメータ、 $\omega^D(\mathbf{r}_{ij})$ と $\omega^R(\mathbf{r}_{ij})$ は重み関数である。本計算では、 $\gamma = 4.5$ 、 $\sigma = 3$ とした。また、無次元の温度、粒子質量、数密度、時間刻みをそれぞれ $kT^* = m^* = 1$ 、 $\rho^* = 3$ 、 $\Delta t^* = 0.05$ とした。脂質分子内の結合している粒子間に働く力 \mathbf{F}_{ij}^S に関しては、 $\mathbf{F}_{ij}^S = -C(r_{eq} - |\mathbf{r}_{ij}|) \mathbf{n}_{ij}$ を用いた。ここで、 C はばね定数、 r_{eq} は結合粒子間の平衡距離である。脂質は 200 分子、水は 1667 粒子用いた。DPD 水粒子ひとつは水分子 3 つを粗視化している。計算セルのサイズは $12.2 \times 12.2 \times 9.6$ とした。また、脂質分子内の角度ポテンシャルに関しては、 $U_\theta = 1/2 K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2$ を用いた。粒子に働く力は、 $\mathbf{F}_i = -\nabla U_i$ で表される。

本研究で用いた脂質分子 (DPPC) の分子構造を図 5(a) に、DPD 脂質モデルを図 5(b) に示す。DPD 脂質モデルは、Groot ら⁶⁾ による粗視化手法を用い、式(5)で表わされる粒子間相互作用パラメータ a_{ij} に関しては、 $a_{ww} = a_{tt} = a_{ee} = 78$ 、 $a_{wt} = a_{th} = 104$ 、 $a_{we} = a_{eh} = 79.3$ 、 $a_{wh} = 75.8$ 、 $a_{hh} = a_{te} = 86.7$ (添え字に関しては、図 5(b) を参照。w は水粒子を表わす。) を用いた。また、平衡結合距離と平衡角度は、各 DPD 粒子に相当する原子群の重心による分布関数のピーク位置を DPPC 脂質膜の MD 計算¹⁴⁾ から求めることにより決定した。平衡結合距離 r_{eq} に関しては、 $r_{eq, t-t} = 0.55$ 、 $r_{eq, t-e} = 0.69$ 、 $r_{eq, e-e} = 0.59$ 、 $r_{eq, e-h} = 0.68$ 、 $r_{eq, h-h} = 0.63$ とした。ただし、MD 法で得られた鋭い結合距離分布を再現するためには、ポテンシャルにおけるばね定数を非常に大きな値 (例えば $C = 1000$ 程度) にする必要があるが、それに伴い、計算のための時間刻みを小さくする必要がある。本計算では極端に小さな時間刻みを避けるため、比較的柔らかい結合 ($C = 100$) として扱った。角度に関しては、定義できる 12 個の角度に対してポテンシャルを与えた。 θ_{eq} は MD 計算から求めたものを用いた。 K_θ に関しては MD の角度分布に近似的に一致するような値の 1/4 の値を与え、結合ポテンシャルと同様にやわらかいポテンシャルを用いた。

3.2 MD 法と DPD 法の計算結果の比較

計算のスナップショットを図 6 に示す。ここで比較する MD 解析は、DPPC 脂質からなる 2 分子膜¹⁴⁾ である。また、膜面垂直方向 (z 方向) における数密度分布を図 7 に示す。ここで、脂質膜の中央平面を $z = 0$ としている。以降、DPD 法で得られた結果に関して次元

を戻す際は、距離に関しては $R_c = 6.4633\text{\AA}$ 、時間に関しては $\tau = 88.0\text{ps}$ を用いている。図7より、脂質分子に関して、MD 法による解析結果においては鋭いピークを示す一方で、DPD 法においては全体的に広い分布を示していることが分かる。特に、t4 セグメントの分布に関して、MD では脂質膜中央にくぼみがある一方で、DPD では膜中央にピークを有する分布になっている。これは、DPD モデルにおいて、柔らかな結合、および角度ポテンシャルを与えたことが原因として考えられる。そのため、MD の数密度分布を再現するには、さらに硬いポテンシャルを導入するか、あるいは DPD 粒子ひとつに相当する原子数を大きくした DPD 脂質分子モデルを用いることが必要であると考えられる。また、本来は膜中央付近には局所的なボイド領域(Free Volume)が多く存在するが、DPD ではそれを再現できないことが分かる。一方、頭部セグメントのピーク的位置や、水分子の分布に関しては、2つの手法で非常によい一致が得られている。また、脂質分子の膜面方向(x,y 方向)の平均2乗変位から、脂質分子の膜面方向の拡散係数を求めた。その際、MD に関しては2nsから4ns、DPD に関しては2nsから6nsまでのデータを用いた。得られた側方拡散係数は、MD においては $1.8 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$ 、DPD においては $1.5 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$ であった。実験や他の MD 計算からは $1 \sim 3 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$ ^{27), 28)} という結果が得られており、本計算結果は MD、DPD とともにそれらとよい一致を示している。以上のことから、今回構築した脂質分子モデルを用いると、脂質分子のするどい数密度分布は再現できないものの、水の数密度分布や脂質分子の拡散係数は再現できることが分かる。粗視化に伴う影響に関しては、今後さらに検討を進めていく必要がある。



(a) The molecular structure of DPPC. The dashed circles indicate the coarse grained segments in DPD simulation.

(b) The model used in DPD simulation. All DPD beads are connected by springs.

Fig.5 Molecular structure of DPPC(a) and corresponding DPD particle(b).

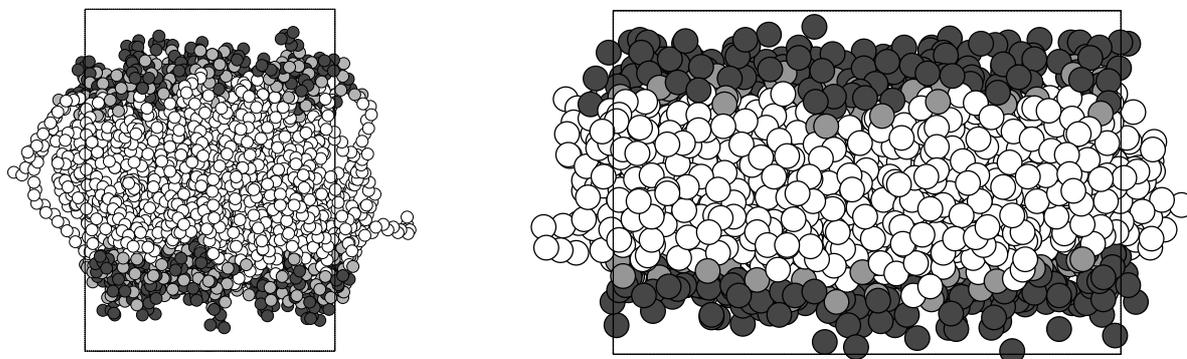


Fig. 6 Snapshots of MD simulation (left) and DPD simulation (right). The white spheres show hydrocarbon chains and the darker spheres indicate head groups. Water particles are not displayed.

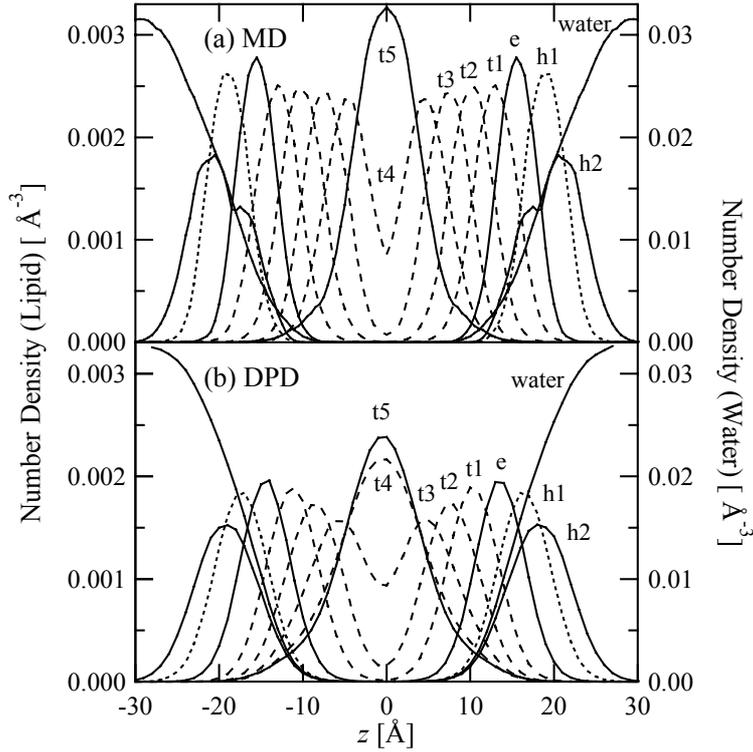


Fig. 7 Number density profiles obtained from (a) MD simulation and (b) DPD simulation. The tail distributions are divided by two for clarity.

3.3 膜の熱揺らぎの解析

本節では、脂質膜の熱揺らぎに関して述べる．膜の熱揺らぎをスペクトル解析することによって、膜の曲げ剛性係数を計算することができる．そのため、得られた曲げ剛性係数を実験値やMD計算の結果と比較することで、用いた脂質モデルの妥当性を検証することができる．

3.3.1 膜面定義方法

菊川らによる界面定義方法¹²⁾においては、従来の時間・空間的に平均化された粒子密度分布からの界面の定義とは異なり、分子的な情報を維持しながら、局所・瞬時的な界面を定義する．この定義では、1体密度を平滑化することで、密度を場の量として再定義する．これによって、場にある密度を持った等値面として界面を定義することが可能となる．

具体的には、計算セルに直交格子を与え、界面定義に用いる粒子(ここでは、水粒子とする)の存在位置に対し、以下の平滑化された δ 関数、

$$D(\mathbf{x} - \mathbf{x}^p) = \begin{cases} (2k\Delta x)^{-3} \prod_{i=1}^3 \left\{ 1 + \cos \frac{\pi}{k\Delta x} (x_i - x_i^p) \right\}, & \text{if } |x_i - x_i^p| < k\Delta x, \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (6)$$

を仮定し、これによって与えられる密度を以下の式によって各格子点上に求める．

$$\rho^{(l)}(\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^N D(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i^p). \quad (7)$$

ここで、 \mathbf{x} はグリッド点の位置ベクトルを示し、 \mathbf{x}_i^p は粒子の位置ベクトルを示す．また、式(6)において、 Δx はグリッド幅を、 k は δ 関数の広がり我代表する値である． Δx 、 k を

変えることで、捉える界面の解像度を調節することができる。全格子点上の1体密度の確率密度関数は典型的には水相側と膜側の水粒子が存在しない領域の2つにピークを持つ。本研究では、2つのピークを与える密度の中間値を界面密度と定義した。また、この熱揺らぎの解析に関しては、脂質800分子、水6668粒子(水20004分子に相当)からなる系を用いた。

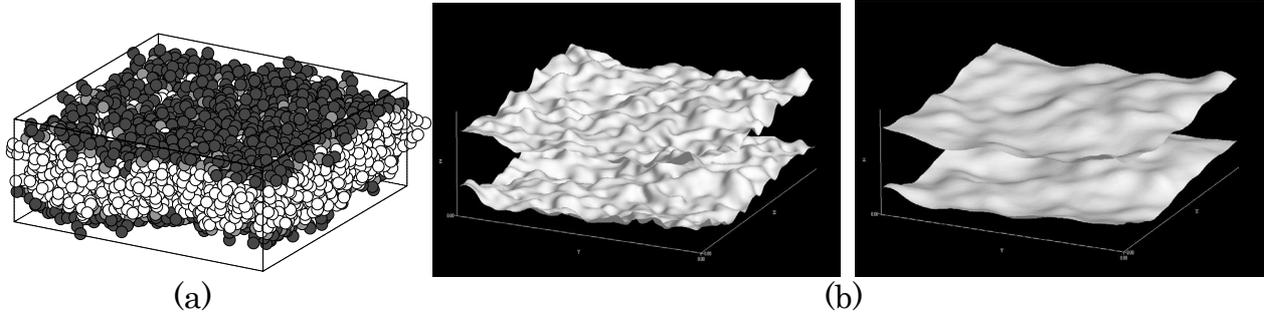


Fig. 8 (a) The snapshot of the calculated lipid bilayer. The water particles are not shown. (b) The snapshot of the lipid/water interfaces which are defined in this study. Left: $k=5$. Right: $k=9$.

3.3.2 計算結果

計算のスナップショットを図8に示す。図8(b)には、上述した方法を用いて定義された界面の $k=5$ の場合と $k=9$ の場合のスナップショットを示す(Δx は約0.25)。捉える界面の解像度を上げる($k=5$)と、膜の分子スケールの小さな揺らぎを捉えられている一方で、解像度を下げる($k=9$)と小さな揺らぎは鈍らされていることが分かる。また、図8(b)からも分かるように、本計算系では、2分子膜を形成しているため、2つの脂質-水界面が定義される。本研究ではそれら2つの界面の、 z 方向に関する平均位置を膜面と定義する。ここで、ある局所的な膜面位置 $z(x,y)$ と、平均的な膜面位置 z_0 との変位を $h(x,y)$ とおく。すなわち、 $h(x,y)=z(x,y)-z_0$ とする。すると、膜面の揺らぎのスペクトル強度 $\langle |\tilde{h}(q)|^2 \rangle$ と波数 q との関係は次式のように示すことができる⁹⁾⁻¹¹⁾。

$$\langle |\tilde{h}(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{A} (\gamma q^2 + \kappa q^4)^{-1}. \quad (8)$$

ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は温度、 A は膜面積、 γ は表面張力、 κ は曲げ剛性係数である。式(8)は、連続体としての膜のエネルギー式から導かれた式であり、本計算においてもマクロな極限で成り立つと考えられる。また、本計算では、 γ はほぼ0としているため、式(8)によれば、連続体としてみなせるような低波数側の極限において、 q^4 に比例した挙動が期待される。本手法によって定義された膜面の揺らぎのスペクトル強度 $S(q)=\langle |\tilde{h}(q)|^2 \rangle A$ を図9に示す。 Δx は約0.25とし、 k を5から9まで変えることにより、捉える界面の解像度の影響を調べた。図9より、スペクトル強度は、低波数側で k の値によらず一致していることが分かる。また、低波数側で q^4 に漸近する挙動を示しており、式(8)から期待される挙動と一致している。すなわち、 k の値によらず大きな揺らぎ成分を捉えることができであり、その挙動は理論から予想されるマクロな挙動と一致している。高波数側に関しては、界面を鈍らせるほどスペクトル強度が小さくなっている。式(8)から、(γ は0であるため、)図9を低波数側の極限で直線でフィッティングしたもから膜の曲げ剛性係数 κ が計算できる。計算された曲げ剛性係数は、 $5.0 \pm 1.3 \times 10^{-20}$ Jであった。(エネルギーの無次元

化の単位は $k_B T$ である。)ただし、これは最も低波数側の測定点の 2 点, 3 点, 4 点を用いてフィッティングした結果の平均値および標準偏差で表している。曲げ剛性係数は、実験や分子動力学計算⁹⁾からおよそ $4\sim 5 \times 10^{-20}$ J という値が報告されており、本計算がそれらとよい一致を示していることが分かる。

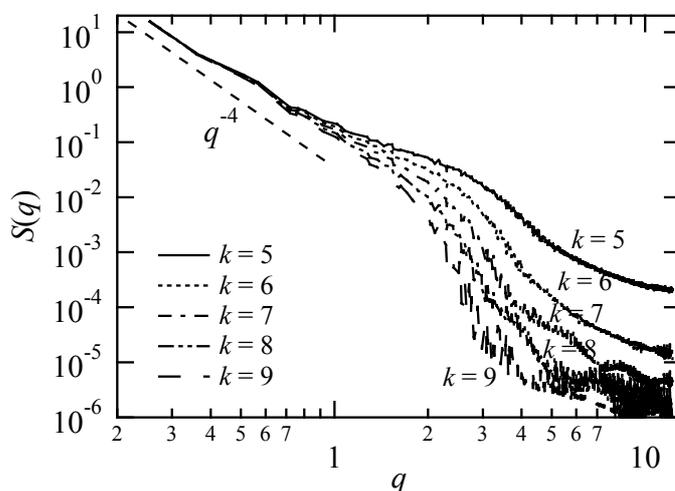


Fig. 9 Fluctuation spectrum of the calculated bilayers as a function of the wave number, q . The dashed line represents the undulatory q^{-4} behavior.

4. マクروسケール シミュレーション (有限差分法による連続体計算)

毛細血管内における赤血球の変形流動挙動は、マイクロ分散相としての混相流の扱いが必要である。赤血球は、脂質二分子膜の下に膜骨格構造と呼ばれる構造体を有しており、膜全体の強度をその構造により維持している。そのため、赤血球においては、膜骨格構造の持つ力学的特性をモデル化した超弾性体モデルが用いられるのが通常である。一方、DDS カプセルや人工酸素運搬体などでは、膜骨格構造をもたず、脂質二分子膜で構成されたリポソームが用いられる。リポソームの表面では脂質分子が二次元液体のように自由に動き回ることができるため、超弾性体モデルとは異なり、以下に示す Helfrich モデル²⁹⁾と呼ばれる曲げ剛性を有する流動膜によりモデル化されることが多い。

ここでは、リポソームのマルチスケール解析に向けて、せん断流中において変形するリポソームの連続体としての計算手法および結果について説明する。

4.1 せん断流中の変形リポソームの連続体計算

ここでは一様せん断流中に存在する変形リポソームに関する数値計算について説明する。一様せん断流中の変形リポソームは、図 10 に示すように変形の度合いやせん断の強さにより、一定の角度に傾いた形状を保ちながら膜の表面がキャタピラーのように回転する (a) Tank-Treading と呼ばれる運動と、リポソーム全体が変形しながら回転する (b) Tumbling と呼ばれる運動をする。これらの運動形態の違いは、例えば血管壁近傍のせん断の強いところで、赤血球やリポソーム (GL) がどのように振舞うかと大きく関連している。

脂質二分子膜の力学的特性として、その表面積と体積をほぼ一定に保ちながら周囲の流動に応じてさまざまな形状をとることが知られている。本研究では、脂質二分子膜を持つリポソームの流れ場中での変形挙動について、界面追跡法の一つである Peskin¹³⁾により開発された Immersed Boundary (IB) 法を用いて、連続体としての数値解析を行った結果を紹介する。

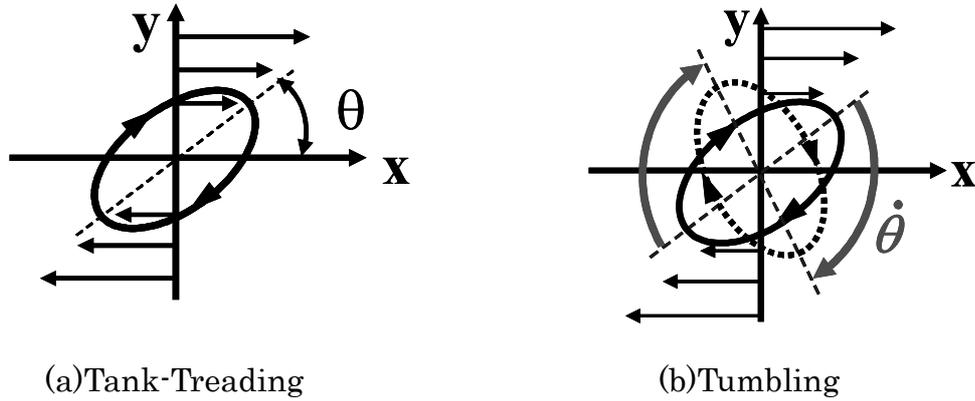


Fig.10 The behavior of deformed liposome in a simple shear flow

4.2 Immersed Boundary(IB)法

IB法では流れ場は、固定矩形格子状においてオイラー的に記述された質量保存式(9)と運動量保存式(10)を用いて記述される。

$$\nabla \cdot \mathbf{U} = 0 \quad (9)$$

$$\frac{\partial \rho \mathbf{U}}{\partial t} = -\nabla p + \nabla \cdot \mu (\nabla \mathbf{U} + {}^t \nabla \mathbf{U}) + \mathbf{F} \quad (10)$$

ここで、 \mathbf{F} は膜面から流体に与えられる力になる。IB法ではこの力は、固定格子上にない膜面上の点から、固定格子上の点に分配されることになる。

膜界面は界面上に配置した N 個の節点により界面要素を構築して表現される。 N 個の点は流れ場の速度 $\mathbf{U}(\mathbf{x}_i, t)$ によりラグランジュ的に移動させることにより、膜の形状を追跡する。ここで \mathbf{x}_i は膜上の点 i の位置ベクトルである。そして、その形状から生じる膜応力分布を界面要素上で積分した力 $\mathbf{f}(\mathbf{x}_i, t)$ を、界面要素上の点 \mathbf{x}_i に働く力として運動方程式に取り入れる。IB法では位置 \mathbf{X} に存在する流体が膜から受ける力 $\mathbf{F}(\mathbf{X}, t)$ を平滑化 δ 関数を用いて、次式のように近似する。

$$\mathbf{F}(\mathbf{X}, t) = \sum_{i=1}^N \{ \mathbf{f}(\mathbf{x}_i, t) \delta(\mathbf{x}_i - \mathbf{X}) \} \quad (11)$$

ここで、平滑化 δ 関数として、Peskin らによって提案された以下の式を用いる。

$$\delta(\mathbf{x}_i - \mathbf{X}) = \begin{cases} (4h)^{-n} \prod_{d=1}^n \left(1 + \cos \frac{\pi}{2h} (\mathbf{x}_i - \mathbf{X})_d \right) & (|\mathbf{x}_i - \mathbf{X}| < 2h) \quad (n: \text{空間の次元}) \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (12)$$

ここでは膜として脂質2分子膜を考え、膜面上の点 i に働く力 $\mathbf{f}(\mathbf{x}_i, t)$ は、以下に示す膜エネルギーの式を用いて求める。

$$W = \frac{1}{2} k_c \left(\frac{S}{S_0} - 1 \right)^2 S_0 + \frac{1}{2} k_b \int (c_1 + c_2)^2 dS \quad (3D) \quad ,$$

$$W = \frac{1}{2} k_c \left(\frac{l}{l_0} - 1 \right)^2 l_0 + \frac{1}{2} k_b \int (c_1)^2 dl \quad (2D) \quad (13)$$

ここで S は全表面積、 S_0 は歪みのない状態での全表面積、 c_1, c_2 は主曲率、 k_c, k_b はそれぞれ面膨張係数、曲げ剛性係数である。 l, l_0 は2次元膜の周の長さで、それぞれ S, S_0 に相当する。第一項は膜の全表面積の変化分に応じて生じるエネルギーを表す。第二項は膜の

曲げによるエネルギーで Helfrich²⁹⁾の曲げエネルギーとして知られる。膜内のエネルギーを用いて膜の微小要素に生じる力を以下の式から求めた。

$$\mathbf{f} = -\frac{\delta W}{\delta \mathbf{x}} \quad (14)$$

\mathbf{x} は膜上の位置ベクトルである。ここで実際の面膨張係数は非常に大きいため、わずかな面積変化で非常に大きな張力が生じてしまう。適切な時間ステップで安定に計算するため、面膨張係数は表面積を十分一定に保つ程度の実際の値より小さな値を与えた。また本モデルでは、リポソームの膜面内の流動性は表現されているが、膜の局所的な面積変化による張力（局所面張力）が導入されていない。代わりに全表面の変化分に応じて生じる仮想的な張力を与えることで全体の表面積一定の条件を満たすように復元力を与えている。

4.3 計算結果及び考察

パラメータとしてリポソーム内外の粘性比 $r = \mu_{in}/\mu_{out}$ と、以下の式で定義される膨潤率 τ を用いた。

$$\tau = \frac{V}{\frac{4\pi}{3} \left(\sqrt{\frac{S}{4\pi}} \right)^3} \quad (3D) \quad , \quad \tau = \frac{S_{2D}}{\pi \left(\frac{l}{2\pi} \right)^2} \quad (2D) \quad (15)$$

ここで V は 3 次元リポソームの体積、 S は表面積を、 S_{2D} は 2 次元リポソームの面積、 l は周の長さである。膨潤率は同じ表面積をもつ球に対する体積比率を示す無次元パラメータである。本計算では粘性比、膨潤率を変化させた時のリポソームの流動について調べた。

単純せん断流中の計算を行う前にまずは静水場中でのリポソームの形状の計算を行った。静水場中で十分な時間経過した後、リポソームは定常形状に落ち着いた。図 11 の $t=0.0$ の形状は 3 次元リポソームの $\tau=0.7$ の結果である。図のように棒状形状のリポソームが平衡形状として得られた。今回 $\tau=0.7$ 以上の条件で計算を行った結果、同様に棒状形状が得られた。また、2 次元リポソームについても同様の計算を行った結果、棒状形状を長軸を通る面で切断したような形状が平衡形状として得られた。

次に単純せん断流中のリポソームについて 2 次元計算を行った。長さスケール $R=(S_{2D}/m)^{1/2}$ 、時間スケール $t=1/\gamma$ とし、 $10R \times 10R$ の正方形計算領域内の中心に得られた平衡形状を初期形状として配置し、単純せん断流 $(\gamma y, 0)$ を与えた。 γ はせん断率である。ストークス流れとし、以下の式で与えられる無次元パラメータ C_l 、 C_b をそれぞれ 1.0×10^{-3} 、 0.5 とした。

$$C_l = \frac{\mu_{out} \gamma R}{k_c} \quad , \quad C_b = \frac{\mu_{out} \gamma R^3}{k_b} \quad (16)$$

計算開始とともにリポソームの膜が時計回りに回転を始めた。リポソームの全体的な形状に着目すると、計算開始とともに長軸が減衰振動を始め、最終的に長軸が x 軸となす角 θ の状態で定常形状に落ち着いた。すなわち、長軸を角度 θ に保ったまま、膜のみが回転する Tank-Treading 運動が再現された。次に、Tank-Treading 運動に着目し、膨潤率が 0.8 と 0.9 の場合について粘性比を変えた際の θ の値の変化について調べた。図 12 に Beaucourt らの結果³⁰⁾と比較した結果を示す。図より、膨潤率が大きいほど θ は大きいこと、粘性比が大きくなるにつれ θ は減少することが分かる。また、局所面張力を考慮した彼らの結果とよい一致を示した。

次に、単純せん断流中のリポソームについて 3 次元計算を行った。長さスケール

$R=(3V/4\pi)^{1/3}$, 時間スケール $t=1/\gamma$ とし, $8R \times 8R \times 8R$ の立法形計算領域内の中心に得られた棒状形状のリポソームを初期形状として配置し, 単純せん断流($\gamma y, 0, 0$)を与えた. C_1, C_b をそれぞれ $1 \times 10^{-3}, 10.0$ とした. $\tau=0.7$ の計算結果を図 12 に示す. 計算を開始すると膜が z 軸を中心に上図の紙面を見て時計回りに回転を始めた. リポソームの全体的な形状に着目すると, 2次元計算の結果と同じように Tank-Treading 運動が見られた. また図から, リポソームが流れのせん断によって引き伸ばされている様子が分かる. リポソームの内部体積一定の条件の下で, 引き伸ばされる量は流れのせん断力と膜の全表面積の変化分による張力, 膜の曲げ剛性によって決まる. 本計算条件では, C_1 が十分小さいため全表面積はほぼ一定である. そのため C_b を十分大きくしても全表面積と体積一定の拘束によって引き伸ばされる量は限界値をもつ. 次に粘性比を1として, 膨潤率を変えたときの θ の値について Kraus ら³¹⁾の結果と比較した. 結果を図 13 に示す. 図より膨潤率が大きくなるにつれ θ が増加することが分かる. また本結果は, 局所面張力を考慮した彼らの結果とよい一致を示した. 2次元数値計算と3次元数値計算の結果から, Tank-Treading の角度 θ に関しては局所面張力は影響を与えず, 本モデルを用いた数値計算によって θ について議論することができることが分かった. そこで膨潤率 $\tau=0.8, 0.9$ について粘性比の影響を調べた. 結果を図 14 に示す. 2次元数値計算の結果と同様に, 粘性比が大きくなるにつれ θ は減少する結果が得られた.

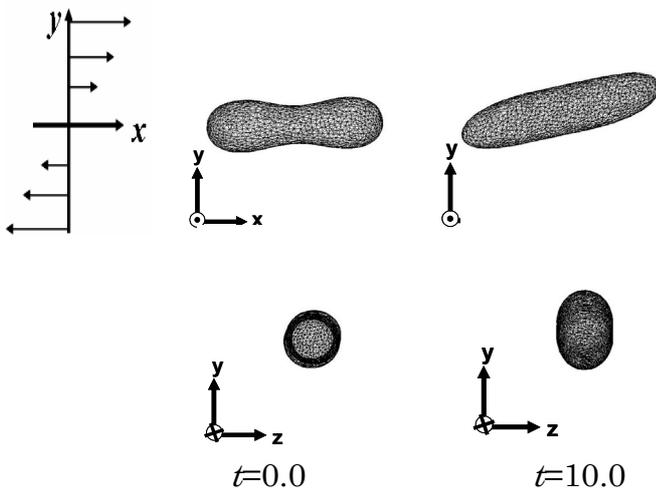


Fig.11 Shape change of 3D-Liposome in a simple shear flow($\tau=0.7$)

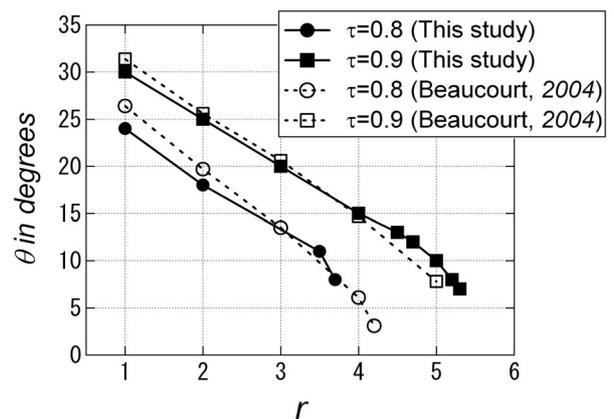


Fig.12 The angle θ for a various values of viscosity ratio r at $\tau=0.8, 0.9$ (2-Dimensional Liposome)

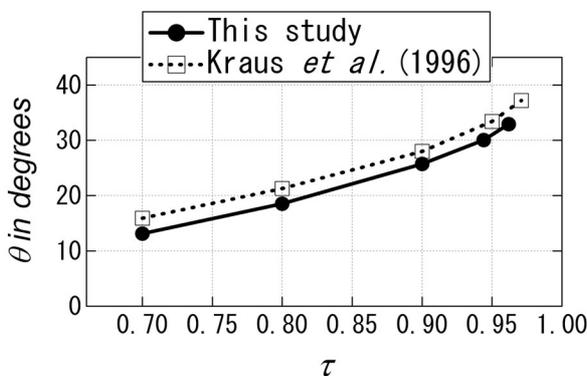


Fig.13 The angle θ for a various values of swelling ratio τ (3-D)

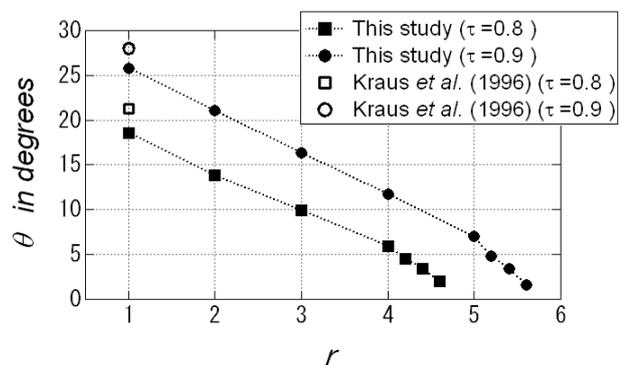


Fig.14 The angle θ for a various values of viscosity ratio r at $\tau=0.8, 0.9$ (3-D)

5. おわりに

本研究では、血液微小循環系の超大規模マルチスケールシミュレーションに向けて、(1)分子動力学法による生体膜の詳細解析、(2)散逸粒子動力学法による生体膜のメゾスコピックシミュレーション、(3)Immersed Boundary法を用いたせん断流中の変形リポソームの連続体レベルでのシミュレーションについて紹介した。これら様々なスケールの手法を合理的に接合することにより、血液微小循環系のマルチスケールシミュレーションが可能となる。これらの手法の開発は、次世代超高度医療応用技術に対するシミュレーション基盤の構築に向け、重要な役割を果たすと考えられる。

参考文献

- 1) S. J. Marrink and H. J.C. Berendsen, *J. Chem. Phys.*, **98** (1994), 4155.
- 2) W. Shinoda, M. Mikami, M. Baba and T. Hato, *J. Phys. Chem. B*, **108** (2004), 9346.
- 3) J. Ulander and A. D. J. Haymet, *Biophys. J.*, **85** (2003), 3475.
- 4) D. Bemporad and J. W. Essex, *J. Phys. Chem. B.*, **108** (2004), 4875.
- 5) P. J. Hoogerbrugge and J. M. V. A. Koelman, *Europhys. Lett.*, **19** (1992), 155.
- 6) R. D. Groot and K. L. Rabone, *Biophys. J.*, **81** (2000), 725.
- 7) R. Kwok and E. Evans, *Biophys. J.*, **35** (1981), 637.
- 8) K. H. de Haas, C. Bloom, D. van den Ende, M. H. G. Duits, and J. Mellema, *Phys. Rev. E*, **67** (1997), 7132.
- 9) E. Lindahl and O. Edholm, *Biophys. J.*, **79** (2000), 426.
- 10) R. Goetz, G. Gompper, and R. Lipowsky, *Phys. Rev. Lett.*, **82** (1999), 221.
- 11) S. J. Marrink and A. E. Mark, *J. Phys. Chem. B*, **105** (2001), 6122.
- 12) G. Kikugawa, S. Takagi, and Y. Matsumoto, *Comput. Fluids*, in press.
- 13) C. Peskin, *J. Comput. Phys.* **25** (1977), 220.
- 14) T. Sugii, S. Takagi, and Y. Matsumoto, *J. Chem. Phys.*, **123** (2005), 184714.
- 15) A. M. Smondyrev and M. L. Berkowitz, *J. Comp. Chem.*, **20** (1999), 531.
- 16) Y. Zhang, S. E. Feller, B. R. Brooks and R. W. Pastor, *J. Chem. Phys.*, **103** (1995), 10252.
- 17) P. Jedlovsky and M. Mezei, *J. Am. Chem. Soc.*, **122** (2000), 5125.
- 18) B. Roux and M. Karplus, *J. Phys. Chem.*, **95** (1991), 4856.
- 19) J. Fischer and S. J. Lago, *J. Chem. Phys.* **78** (1983), 5750.
- 20) A. D. MacKerell et al., *J. Phys. Chem. B*, **102** (1998), 3586.
- 21) H. Li, R. Elber and J. E. Straub, *J. Biol. Chem.*, **268** (1983), 17908.
- 22) A. Finkelstein, *J. Gen. Physiol.*, **68** (1976), 127.
- 23) S. Paula, A. G. Volkov, A. N. Van Hoek, T. H. Haines and D. W. Deamer, *Biophys. J.*, **70** (1996), 339.
- 24) Y. Graziani and A. Livne, *J. Membr. Biol.*, **7** (1972), 275.
- 25) J. Andrasko and S. Forsén, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60** (1974), 813.
- 26) M. Bloom, E. Evans and O. G. Mouritsen, *Q. Rev. Biophys.*, **24** (1991), 293.
- 27) E. Sackmann, In *Handbook of Biological Physics*, Vol. 1A, Structure and Dynamics of Membranes, R. Lipowsky and E. Sackmann, editors, Elsevier, Amsterdam, (1995), 213.
- 28) U. Essmann and M. L. Berkowitz, *Biophys. J.*, **76** (1999), 2081.
- 29) W.Z. Helfrich, *Naturforsch.*, **28c**, (1973), 693.
- 30) J. Beaucourt, et al., *Physical Rev. E*, **69**, (2004), 011906
- 31) M. Kraus et al., *Phys. Rev. Lett.* **77**, (1996), 3685.