

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19H01166

研究課題名(和文) マイクロカプセルを介した化学物質の新たな環境動態の解明と評価

研究課題名(英文) Investigating the dynamics change of encapsulated chemicals in microcapsule

研究代表者

鑑迫 典久 (Tatarazako, Norihisa)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：40370267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロカプセル(MC)とは化学物質を分解性ポリマーで内包した固形の粒子であり近年、ドラッグデリバリー、環境耐性を持つ農薬、徐放性香料など多岐に使用され、MC製品は年々増加している。化学物質本来の水溶解度や環境中安定性などとは異なる挙動を有することになるがその環境影響はほとんど明らかになっていない。MC製品からMCを抽出することが難しかったため、我々は自らMCを合成しメダカ、ミジンコを用いた生態毒性試験をおこなった。結果として、MC化により芯材の安定した曝露が行われ遅効性が確認できたが毒性は増加していなかった。しかしこのMC合成技術を応用して試験困難物質を対象とした新たな曝露手法を提案できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ドラッグデリバリー、環境耐性を持つ農薬、徐放性香料など多岐にMC製品が使用されその量も増加している。内包物である気体、液体や固体が微小粒子となり、紫外線、熱、酸素などの外部環境からも保護され、放出時間や場所がコントロールされる。MC化は本来の化学物質の物性と異なる挙動を示しつつ、本来の化学的性質は有している。化審法ではMCの芯材、壁剤は別々に扱い、MCとしての評価はしていない。つまり従来の環境中の分布モデルがMCには当てはまらず、既存のリスク評価法が適用できない。本研究はMCの生態影響の特性を明らかにすることができ、将来MCの化学物質としての新たな管理手法の構築に資すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Microcapsules (MCs) are the solid particles encapsulating a chemical substance inside of degradable polymers. It has been introduced to the wide range of applications such as drug delivery system, environmentally tolerant pesticides and sustained release of flavourings results in the increasing number of MC products year by year. Although the dynamics of those chemicals are assumed to be changed, those effect to the environment is not yet investigated well.

We synthesized MC by our own method and carried out ecotoxicity tests by medaka and Daphnia magna. The results showed that encapsulation of chemicals as MC enables them to become stable and the occurrence of the toxicity effect were delayed, but the intensity of the toxicity were not increased.

This new approach using MC for toxicity testing is valid for the substances which has impractical (unstable) characteristics like insoluble or volatile.

研究分野：生態毒性、環境化学、環境リスク

キーワード：プラスチック 生分解 粒子 生態影響 バイオアッセイ ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

マイクロカプセル(MC)とは近年開発された技術で、固体の外郭で形成された中空のミクロン単位の粒子を指し、コア部に物質を恒久的または一時的に封入することができる。封入物としては医薬品、香料、農薬、色素などの物質が挙げられる。外郭にはアルギン酸ナトリウム、メラミン、イソシアン酸塩、エチルセルロース、ポリビニルアルコール、ゼラチンなどがある(R.J.Marathe,ら、2015、日本カプセルプロダクツ; <http://www.japancapsular.com/about/>)。この技術は既に工業分野、医学分野、農業分野(Hedao, R.K.; Gite, V.V.2014)、食品分野など多面にわたって急速に普及し、私達の生活のなかにとけ込んでいる。MCによって包埋されると、化学物質は本来の性質である分子量、水溶解度、水・オクタノール分配係数、加水分解性、揮発性、昇華性などがカプセル剤成分に依存することになり、同時に環境中の挙動も変化することが予想される。難水溶性で揮発性物質(香料等)がカプセル内(基剤)に高濃縮されて水中に懸濁(分散)状態となり、水生生物によってそれらが経口摂取されて体内に取り込まれる。そしてカプセルが破れて芯材が直接体内に移行、吸収されるか排出される。(図1)

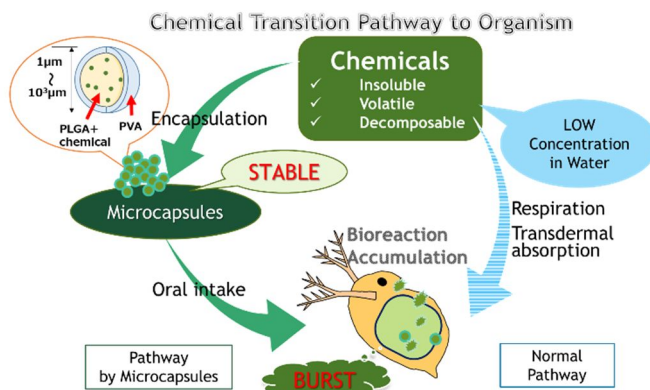


図1 カプセル化された化学物質(マイクロカプセル)の水生生物への曝露経路

近年、香料や消臭剤をポリアミド樹脂でMC化して混ぜている洗濯用柔軟剤が急速に普及している。洗濯時に投与された柔軟剤中のMCが、下水処理場などの処理施設で十分に分解されずにMCのまま水環境中に放出されて、魚貝類に取り込まれる可能性がある。ヒトに対する影響としては、「香害」(岡田幹治、2017)という匂いから逃れられない社会が出来つつあることが懸念されているが、香りを濃縮したままで移動でき、長期持続可能なMCの普及がそれを後押ししていると考えられる。現時点で、MC技術は我々の生活の中に浸透しつつあるが、環境中に放出された場合の挙動について調べた知見は乏しい。MCによる曝露形態は、従来の化学物質とは異なるリスク評価手法が必要とされ、新たな環境問題の提起となる。

一方、研究代表者は化審法の新規化学物質審査に携わり、様々な化学物質について環境リスクを評価してきている。その中で揮発性が高く、水溶解度が低い(脂溶性が高い)物質については、水生生物の試験実施自体が困難であるために、生態毒性に関する情報が不足している。また近年動物保護の観点から哺乳類で行われてきた生物試験を、動物愛護の対象となりにくい魚類に置き換える動きがある。しかし、ラットでは吸入、注射、混餌等で曝露可能な化学物質が、魚類試験では難しい場合がある。そこでカプセル技術を使うことで、対象化学物質の性状によらず水生生物に容易に化学物質を曝露できる可能性がある。

以上より本研究では新素材であるMCに着目し、その有効利用も視野に入れつつ環境中にどのくらい拡散・残存するかと、水生生物に与える影響を明らかにする。

2. 研究の目的

マイクロカプセル(MC)は芯材として香料、色素、農薬、医薬品などの化学物質が封入されており、目的に応じて場所、経過時間、摩擦熱などある条件下でカプセルが破裂し芯材の化学物質が放出される。現行の化学物質管理は、化学構造式による大気、水、土壌、生物、底泥の環境の各相における化学物質の分配を表すモデルを基に行われているが、カプセルに内包された化学物質にはそれが適用できない。

本研究では、MCの環境水中での安定性、破裂条件、水生生物への移行、蓄積、排出などを明らかにする。次に生分解性ポリマーを基剤とし、生態毒性があるPPCPsや農薬を芯材としてMCを合成し、そのメダカやミジンコに対する生態毒性試験を行い、カプセルを介した場合の毒性発現の違いを明らかにする。上記環境中挙動と生態毒性値の変化から、カプセル化剤の新たな環境リスクを考察する。

3. 研究の方法

(1) 2019年度

マイクロカプセル(MC)の水中挙動と水生生物への移行性、それに伴う生態毒性への影響を明らかにするため、まずはMCの実態を知ることとし、香料成分をMC化して添加している市販の柔軟剤3種類(ソフラン;ライオン、レノア;P&G、フレア;花王)および有効成分がMC化された防虫農薬(トレボンMC剤)を対象にして、MCをフィルター濾過で除去したサンプルや、超音波処理および熱処理によってカプセルを破裂させたサンプルについて、ミジンコおよび

メダカ仔魚を用い、標準試験法に準拠した急性毒性試験を実施し、元の製品と毒性結果を比較した。

血球計算盤、パーティクルカウンターなどを用いて粒子数を計測した。

(2) 2020年度

カプセルの水中挙動や生体内動態をより正確に把握するために、市販のMC製品/製剤からカプセルをフィルター過や遠心分離などで精製することを試みたが、夾雑物(界面活性剤、安定化剤など)とコロイド状態になっており困難だった。そこで、MC合成装置を用いてMCの合成を試みた。

MCの生態毒性試験を考慮し、ミジンコやメダカが摂食できる大きさのカプセルを作成するため、小さい粒子を形成できてかつ生態影響が少ない基剤として、乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA; 乳酸とグリコール酸がランダムに共重合したポリマー)を選んだ。芯材は農薬、香料とし、外郭にはやはり生態影響の少ないPVA(ポリビニルアルコール)を選び、MC合成装置を用いて、基剤と外郭の素材間の界面張力差、比重、粘度などのパラメーターを変化させながら、カプセルの合成方法を検討した。

(3) 2021年度

引き続きMC合成の条件検討を試みた。昨年と同様基剤にPLGA、外郭にPVAを選び、芯材は農薬、香料、ホルモン剤とし合成条件の検討をおこなった。芯材のカプセル化効率を上げるため、基材や外殻の濃度、成分比率、芯材成分の添加量などを変化させて最適値を求めた。

合成されたカプセルの形状や大きさの確認は、粒子形状画像解析装置「PITA-04」(セイシン)および蛍光顕微鏡(キーエンス)を用いて行った。

水に溶けない物質や水中で不安定な物質をカプセル化することで、試験困難物質の生態毒性評価が可能になることを確認するため、香料成分を包埋したMCを合成し、ミジンコの毒性試験を実施した。

(4) 2022年度

MCの生物影響を確認するため、生物が摂取できる微細なカプセルの合成に重点を移して研究をおこなった。

MC合成装置ではナノサイズの均一な粒子まで作成できるはずであったが、海外品のためコロナ禍の影響もあり一部消耗部品の調達が難しく、MC合成装置の稼働が停滞していた。そこでそれとは別に、MC合成装置を使わずに、2液の表面張力を利用して簡易にカプセルを合成する方法を検討した。

生態毒性を持つ医薬品や農薬を芯材としてMCを合成し、カプセルではない場合の毒性とカプセル化による生態毒性を比較することを実施した。

カプセル合成条件が昨年度までに判明してきたが、より精細に検討した。生物が摂取できる微細なカプセルの合成が可能になったので、生態毒性を持つ合成香料(リナロール)や内分泌かく乱化学物質(エチニルエストラジオール)を芯材としてMCを合成し、カプセルではない場合の毒性とカプセル化による生態毒性の比較に重点を置いた。

また、カプセル製剤を用いて、ミジンコやメダカ仔魚を用いたMCの急性毒性試験の実施およびその生態影響の検出を継続した。MCは遅効性であることが判明したため、従来法よりも曝露期間を長くするなど毒性試験の手法を新たに改良した。

合成されたカプセルの形状や大きさの確認は、粒子形状画像解析装置「PITA-04」(セイシン)および蛍光顕微鏡(キーエンス)を用いて行った。

(5) 2023年度

環境汚染物質の中から近年問題となっているPFAS類をMC化して、前年度までの手法でメダカ仔魚に曝露した。

原点に戻り環境中の香料成分の検出等を試みた。

カプセル化による化学物質の物性変化の性質を利用して、水に溶けない物質や水中で不安定な物質をカプセル化することで、従来は試験が困難とされている化学物質に対して水生生態毒性試験が可能になる可能性も見えてきた。

化学物質の生物摂取量は、水中濃度ではなく1カプセル当たりの包埋量×摂取カプセル個数×体内吸収効率によって表される関数と考えられるのでその定量化を試みた。

また、広い意味でカプセルを介した化学物質の新たなリスク評価手法についても検討した。

4. 研究成果

(1) 2019年度

市販製剤中のMCの大きさ、存在量などを血球計算盤と光学顕微鏡を用いて検出した。またMCは弱い超音波処理では破裂せず、強力な超音波や熱処理等により破壊されることも確認した。農薬を用いたミジンコ急性毒性の場合に、毒性発現の遅延が認められた。それはMC製剤の徐放効果により影響が遅延したと思われるが、48時間経過後には最終的な影響量(EC50)はカプセルの有無で等しくなった。つまりカプセル化は薬剤の放出時間を遅らせるだけで最終的な放出量が生態毒性値に影響していた。これは用いた薬剤が比較的安定で、水にもやや溶解したための現象と考えられる。また市販の柔軟剤中の香料は成分や量が不明であること、香料はメダカやミジンコに対して急性毒性が弱いこと、市販の柔軟剤に含まれる香料以外の成分(界面活性剤、安定化剤など)の方がメダカやミジンコに対する急性毒性が強いことなどの原因により、MC

に起因する生態毒性の違いをはっきりと検出できなかった。

市販の柔軟剤中には界面活性などの香料以外の比較的生物学影響の大きい成分が含まれていて、MC だけの毒性影響を検出できなかったため、香料成分の定量分析は行なわなかった。

微小サイズの MC を自動的に合成できる装置を購入し、様々な種類の MC を合成できるようになった。本装置は直径 1 ~ 100 μm の MC 粒子を作成することができるが、口の小さいミジンコやメダカ仔魚も経口摂取できるものをつくる必要がある（ミジンコ < 30 μm 、メダカ < 100 μm 目安）。ただし、基剤と外殻の 2 剤の組み合わせにより合成条件を個別に検討する必要がある。よって、基剤と外殻候補になる化学物質の選定とそれらの合成の条件検討は個別に検討する必要がある。

(2) 2020 年度

MC 合成装置を用いて、基剤と外殻の 2 剤の濃度、流速、送液圧力、流路径などについての検討を行い、直径 20 ~ 50 μm のカプセルの合成に成功した。ただし、基材を PLGA に統一し、内部の薬剤（芯材；農薬または発色剤）毎に条件検討した。

カプセル合成に使用している MC 合成装置が海外製のため、その交換部品の入手がコロナ禍の影響で輸入が難しく、代替品の検討などを行ったが、代替品ではうまくいかなかった。そのため一時期合成に着手できずに計画の進捗が遅れてしまった。その後、部品の一部が入手できるようになったが、納期が未定の部品もあり使い方を工夫しながら研究を続けた。

カプセル製剤中の MC 数を血球計算盤と光学顕微鏡だけではなく、粒子計測装置（PITA04）を用いて計測を行った。カプセルの総数だけではなく、その大きさと数の分布が測定できないが工夫した。

超音波などを用いてカプセル破壊し、その芯材成分を取り出す方法などについても検討した。

(3) 2021 年度

香料（リナロール）を包埋した MC を合成しミジンコの毒性試験をおこなったところ、ミジンコはカプセルを摂取しカプセルによる毒性影響が検出された。空のカプセルでは影響がなかったため、カプセルに包埋された成分の影響であることが分かった。

カプセル合成に使用している MC 合成装置が海外製のため、その交換部品の入手は相変わらずコロナの影響で入手が難しい状況が続いた。代替品があるものについては入手できたが、合成に必須のガラス板加工品は入手が困難だったため、古いものを再生させるなど工夫しながら使用した。並行して MC 合成装置を使わない合成方法などの検討も行った。

PITA04 の処理ソフトを更新することで、カプセルの大きさの分布だけではなく、おおよその個数濃度としてヒストグラムの作成が可能になった。ただし PITA04 は大きい粒子が混ざっているとセルが詰まってしまう点が欠点だった。

高周波の超音波発生装置を用いてカプセル破壊し、その心材成分を取り出す手法について確立した。

(4) 2022 年度

合成装置を使わず 2 液の表面張力を利用して簡易にカプセルを合成する方法では、PLGA を基材とし分散剤に PVA を選び、それらの濃度、成分比率を様々な組み合わせで最適反応条件を検討し、そこに芯材成分を添加して微調整することにより、MC の合成に成功した（図 2）。MC 合成反応後に超純水で置換しながら 5 回以上遠心分離して MC の洗浄を行い、カプセル以外の成分を除いた。合成装置の MC（直径およそ 2 ~ 3 μm 程度）よりも粒径の分布は広がるが、ほぼ同程度の大きさのカプセルを短時間で量産する手法を確立できた。採用した条件により合成される粒子の大きさは、市販の柔軟剤中カプセルのサイズ（5 ~ 10 μm 程度）よりは小さく、生物が摂取する上で問題はなかった。

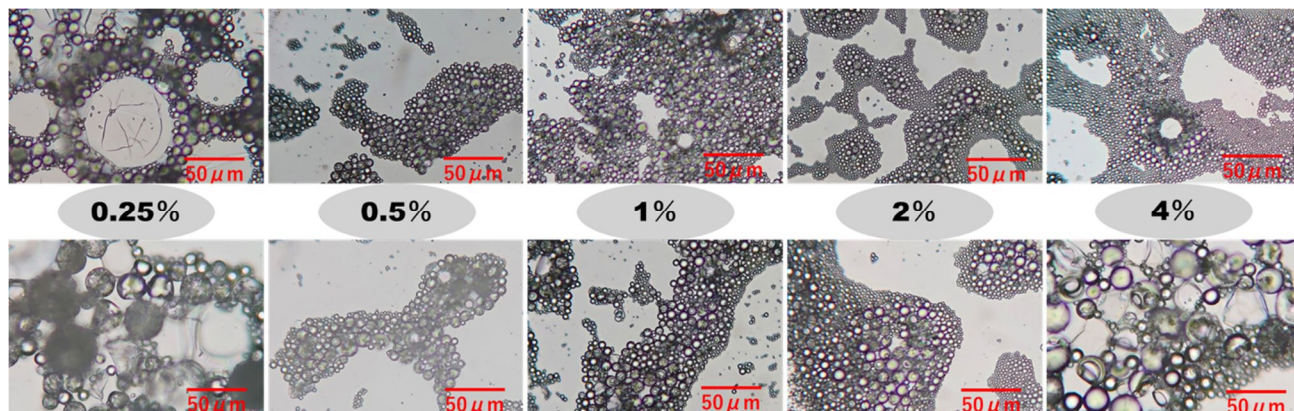


図 2 PVA 濃度を変えて合成されたマイクロカプセル 芯材は添加していない
PVA 濃度: 0.25 ~ 4% 混液時の (PLGA:PVA) = 1:4 (上段), 1:5 (下段)

溶液中の MC 数を血球計算盤と光学顕微鏡および粒子計測装置 (PITA04) を用いて計測する手法もブラッシュアップした。従来の PITA04 は凝集などで大きくなった粒子が混ざっているとセルが詰まってしまうという欠点があったが、幅の広いセルを入手し、MC の測定レンジを広げた。

カプセルを破壊しその芯材成分濃度を定量する検討は継続中である。

顕微鏡下でミジンコがカプセルを摂取していることを確認したが、時々空カプセルを摂取したミジンコで影響がみられることが判明したため、その原因を追究している。

メダカの仔魚 (孵化後 2 週間) は空のカプセルで影響がなかったため、カプセルに内分泌かく乱化学物質 (エチニルエストラジオール) を包埋して摂取させたところ、ピテロジェニンレセプターの mRNA が応答し、コントロールに比べて上昇したことから MC を摂取していることが判明した。

また、揮発し易い香料成分の一つのリナロールを MC に包埋してミジンコに曝露したところ、ミジンコがオスを産仔したことから、香料によるミジンコの内分泌攪乱が確認できた。

エチニルエストラジオールもリナロールも難水溶性物質であり、水生生物に対する曝露が難しい試験困難物質であるが、今回のエンドポイントは水溶解度以下でも検出できるので、以後水溶解度以上でしか検出できない試験困難物質でも試験することとした。

(5) 2023 年度

生態毒性が大きく変わるとされる化学物質を芯剤として MC を合成し、環境リスク評価に資するための方策を考え、環境中半減期が短い易加水分解物質、水中濃度が高くない難水溶性物質や揮発性物質などの MC 化を試みた。

環境汚染物質の中から newPOPs として近年問題となっている PFAS 類 (PFOA, PFOS, GenX など) を MC 化して、前年度までの手法でメダカ仔魚に曝露した。

ミジンコおよびメダカへのカプセル投与では、PFOA, PFOS とともに急性影響は認められなかったが、GenX は死亡した。しかし、水中に直接 GenX を投与した場合には死亡しなかった (図 3)。GenX の水溶解度上限では死なないが、MC 化による体内曝露で死亡した可能性がある。MC の効果として非常に興味深い。

一方共同研究者らによる野外調査により宍道湖のシジミから数種類の香料成分が検出された。一度に多種類の香料成分が検出されたことは異常であるが、すべて天然に存在している成分であり、カプセルを介しているという証拠を得ることが難しかった。

MC の環境リスク評価には、影響評価 (生態毒性) と曝露評価 (環境中濃度) を知る必要があるが、MC 剤による環境中濃度の定義が難しく環境リスクの考え方を適用することは難しいことが分かった。

MC は欧州ではマイクロプラスチックと同等に規制対象となっているが、日本では特に規制はない。また日本の化審法は、内包する物質とカプセル化剤を別々に評価対象としており、MC としての評価は行っていない。つまり、全ての化学物質が MC 化によって POPs と同等の性質を有する可能性がある点について何ら考慮されていない。我々の結果から、MC は生物に取り込まれた後で分解され、体内で高濃度曝露されている可能性が示されたが、野外または生物体内から破砕された MC のかけらを検出することは容易ではなく、野外で MC による汚染を特定することが難しいことも判明した。よって、MC による環境汚染の実態は今後も進めていかなくてはならない。

一方で、化学物質の安全性評価に用いられている生物試験において、動物福祉により哺乳類の試験から魚類、甲殻類の試験に移行しつつあるが、水中で不安定な化学物質の影響を水生生物で検出することは難しく、魚類の代替試験生物としての限界でもあった。しかし、試験困難物質を MC 化することによって容易に曝露試験が行えるようになり、MC 技術により水生生物の代替試験生物としての可能性が広がった。

今後 MC の利点欠点に留意しながら、バランスよく活用していくことが望まれる。

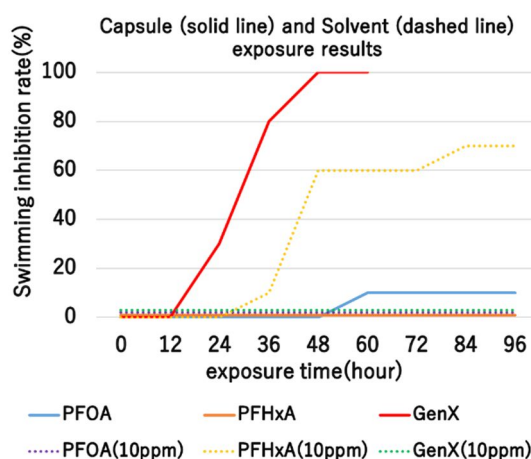


図3 PFAS (PFHxA, PFOA, GenX) をカプセル化してミジンコに曝露した結果
実線はカプセル化したもの、破線はカプセル無

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Okazaki Y, Tatarazako N
2. 発表標題 Detection of Size-Dependent Physical Effects of Microplastics Using Extended Acute Toxicity Test
3. 学会等名 SETAC EUROPE 33rd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鑓迫典久、新野竜大、山本裕史
2. 発表標題 環境化学物質に関する国際研究の動向とトピックス SETAC において
3. 学会等名 第2回 環境化学物質3学会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yukiyo Okazaki, Go Ueta, Norihisa Tatarazako
2. 発表標題 Biological Effects of Microcapsules
3. 学会等名 SETAC EUROPE 34th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鑓迫典久
2. 発表標題 マイクロプラスチックの生態影響
3. 学会等名 環境ホルモン学会第22回研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihisa Tatarazako, Kazufumi Misawa, Yukiyo Okazaki
2. 発表標題 DAPHNIA ACUTE TOXICITY OF MICROPLASTICS AND THE MICROCAPSULES
3. 学会等名 SETAC Europe 29th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihisa Tatarazako, Yukiyo Okazaki
2. 発表標題 DAPHNIA ACUTE TOXICITY OF MICROPLASTICS DEPENDING ON THE SIZES
3. 学会等名 SETAC North America 40th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三澤和文、岡崎友紀代、鎌迫典久
2. 発表標題 オオミジンコ急性毒性を用いたマイクロカプセル剤農薬の影響評価
3. 学会等名 第25回日本環境毒性学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩田 忠久、鎌迫典久、岡崎友紀代、 他	4. 発行年 2023年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 362
3. 書名 海洋汚染問題を解決する生分解性プラスチック開発 ~分解性評価から新素材まで~	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石橋 弘志 (Ishibashi Hiroshi) (90403857)	愛媛大学・農学研究科・准教授 (16301)	
研究分担者	寺崎 正紀 (Terasaki Masanori) (10363904)	岩手大学・人文社会科学部・教授 (11201)	
研究分担者	山室 真澄 (Yamamuro Masumi) (80344208)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授 (12601)	
研究分担者	山岸 隆博 (Yamagishi Takahiro) (30379333)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・主任研究員 (82101)	
研究分担者	堀江 好文 (Norie Yoshifumi) (60785137)	神戸大学・内海環境教育研究センター・准教授 (14501)	
研究分担者	山本 裕史 (Yamamoto Hiroshi) (60380127)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・室長 (82101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岡崎 友紀代 (Okazaki Yukiyo) (60527737)	愛媛大学・農学研究科・研究員 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------