

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

公 募 区 分 : 環境問題対応型研究 (一般課題)

研究予定期間 : 令和3 (2021) 年度 ~ 令和5 (2023) 年度

課 題 番 号 : 【1-2103】

体系的番号 : (J P M E E R F 2 0 2 1 1 0 0 3)

研 究 課 題 : 「顕微ラマン光度計を用いた海洋マイクロプラスチックの連続計測システムの開発」

Research Title : Development of a Continuous Measurement System for
Characterization of Marine Microplastics using Raman Microscope

研 究 代 表 者 : 荒川 久幸

研 究 代 表 機 関 : 国立大学法人 東京海洋大学

研 究 分 担 機 関 : 学校法人 芝浦工業大学

研 究 領 域 : 統合領域

キ ー ワ ー ド : 顕微ラマン光度計, 劣化度, マイクロ流体システム, マイクロプラスチック, ろ過システム

令和6 (2024) 年5月

目次

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書	1
I. 成果の概要	3
1. はじめに（研究背景等）	5
2. 研究開発目的	5
3. 研究目標	5
4. 研究開発内容	6
選別システムの評価	13
5. 研究成果	14
5－1. 成果の概要	14
5－2. 研究目標の達成状況	14
5－3. 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献	15
6. 研究成果の発表状況の概要	16
6－1. 成果の件数	16
6－2. 主な査読付き論文等の主要な成果	16
7. 国際共同研究等の状況	17
8. 研究者略歴	17
II. 成果の詳細	18
II－1 サブテーマ1「海洋マイクロプラスチックの連続的な検出・分析システムの開発」	18
[サブテーマ1 要旨]	18
1. サブテーマ1 研究開発目的	18
2. サブテーマ1 研究目標	18
3. サブテーマ1 研究開発内容	18
4. サブテーマ1 結果及び考察	24
5. サブテーマ1 研究目標の達成状況	30
II－2 サブテーマ2「ろ過システム部およびマイクロ流体システム部の開発」	32
[サブテーマ2 要旨]	32
1. サブテーマ2 研究開発目的	32
4. サブテーマ2 研究目標	32
3. サブテーマ2 研究開発内容	33
4. サブテーマ2 結果及び考察	40
5. サブテーマ2 研究目標の達成状況	44
III. 研究成果の発表状況の詳細	48
(1) 成果の件数	48
(2) 誌上発表	48
(3) 口頭発表	50
(4) 知的財産権	52
(5) 「国民との科学・技術対話」の実施	52
(6) マスメディア等への公表・報道等	53
(7) 研究成果による受賞	53
(8) その他の成果発表	53

I. 成果の概要

<課題情報>

公 募 区 分 :	環境問題対応型研究（一般課題）
研 究 実 施 期 間 :	令和 3（2021）年度 ～ 令和 5（2023）年度
課 題 番 号 :	【1-2103】
研 究 課 題 :	「顕微ラマン光度計を用いた海洋マイクロプラスチックの連続計測システムの開発」
研 究 代 表 者 :	荒川 久幸（東京海洋大学，教授）
重 点 課 題（主）:	【重点課題⑥】グローバルな課題の解決に貢献する研究・技術開発（「海洋プラスチックごみ問題への対応」）
重 点 課 題（副）:	【重点課題⑩】大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究
行政要請研究テーマ（行政ニーズ）:	（1-3）海洋環境における複合的要因を加味したプラスチック劣化メカニズムの解明と劣化試験方法の開発
研 究 領 域 :	統合領域

<キーワード>

顕微ラマン光度計
劣化度
マイクロ流体システム
マイクロプラスチック
ろ過システム

<研究体制>

サブテーマ 1 「海洋マイクロプラスチックの連続的な検出・分析システムの開発」

<サブテーマ 1 リーダー及び研究分担者>

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
東京海洋大学	学術研究院	教授	荒川久幸	
東京海洋大学	学術研究院	教授	内田圭一	
東京海洋大学	学術研究院	教授	宮崎唯史	
東京海洋大学	学術研究院	教授	北門利英	2022 年 9 月 ～ 2024 年 3 月

サブテーマ2「ろ過システム部およびマイクロ流体システム部の開発」

<サブテーマ2リーダー及び研究分担者>

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
芝浦工業大学	工学部	教授	小池義和	
芝浦工業大学	工学部	教授	二井信行	
芝浦工業大学	工学部	教授	長澤純人	
芝浦工業大学	工学部	教授	ラジャゴパラン, ウマ・マヘスワリ	

研究協力者：

東京海洋大学	海洋環境科学部門	博士研究員	渡邊秀行	2021年10月～2022 年3月
東京海洋大学	海洋環境科学部門	博士研究員	楊子江	2022年10月～2024 年3月

<研究経費（間接経費を含む）>

年度	直接経費	間接経費	経費合計
2021	27,000千円	8,100千円	35,100千円
2022	27,000千円	8,100千円	35,100千円
2023	27,000千円	8,100千円	35,100千円
合計	81,000千円	24,300千円	105,300千円

1. はじめに（研究背景等）

プラスチックは年間数100万トン以上が海域へ流出しており (Schmidt et al., 2017)、これらは海域で経年的に細片化され、微細な粒子となり、漂っている (Lebreton et al., 2019)。海洋に存在する直径5 mm以下のプラスチックは海洋マイクロプラスチック（以下MPs）とよばれ、海洋生態系へ様々な影響を及ぼすことが懸念され、世界中で調査が進められている。従前からの海表面のMPsの調査は、主に目開き350 μm 程度のネットで粒子を捕集し、手作業で1粒子ずつ取り出し、赤外分光分析計を使用するため、多大な労力と時間が必要である (Isobe et al., 2014)。MPs汚染の正確な評価のためには、効率的で統一された計測手法の開発が不可欠である。また、現状では目開き350 μm 程度のネットを使用することから、このサイズ以下の微細なMPs（以下SMPs）の濃度情報はほとんど得られていない。

SMPsの分析については、顕微 FTIR の使用により、解析する手法が提案されているが、いまだ確立された定量的な手法には至っていない。何より、顕微 FTIR で解析する上では、MPs をフィルタなどで捕集し、乾燥する必要性があり、連続的な観測は行うことができない。SMPs の採取に関して今までの研究において、350 μm および 50 μm の二重のニューストーンネットを開発し、広い範囲の粒子サイズの MPs の採取を行った。しかしながら、ネットを使用する以上 50 μm 付近およびそれ以下の粒子は採取できていない。

2019 年 6 月、G20 において大阪ブルー・オーシャン・ビジョンが提案され、海洋のプラスチックごみ対策を行うことを各国首脳間で共有した。ここでは 2050 年までに海洋プラスチックごみによる新たな汚染をゼロにすることを目標とした。この国際ビジョンの達成のためにも、微細な MPs を含めた海洋の MPs の詳細な分布把握が必要となっている。

（参考文献）

- SCHMIDT, C., T. KRAUTH and S. WAGNER (2017) Export of plastic debris by rivers into the sea. *Environ. Sci. Tech.* 51, 12246-12253.
- LEBRETON, L.C.M., M. EGGER and B. SLAT (2019) A global mass budget for positively buoyant macroplastic debris in the ocean. *Sci. rep.* 9, 12922.
- ISOBE, A., KUBO, K., TAMURA, CI., et al. (2014) Selective transport of microplastics and mesoplastics by drifting in coastal waters. *Mar. Poll. Bull.*, 89, 324-330.

2. 研究開発目的

海洋MPsの汚染の実態把握のためには全球的な分布の理解が必要である。しかしながら、350 μm より小さなサイズのMPs(SMPs)の知見は非常に少なく、断片的である。さらにSMPsの知見の集積が進まない理由はデータの取得解析に著しく労力が必要であることである。

本研究の目的は、船舶へ表層の海水を引き込み、SMPs（主にポリエチレン(PE)、ポリスチレン(PS)およびポリプロピレン(PP)）を、顕微ラマン分光光度計を用いて、連続的に自動で検出し定量計測するシステムを開発し、海域のSMPsの濃度および劣化度を把握する手法を完成することである。

本研究は二つのサブテーマで構成される。サブテーマ1では、項目1として試料から連続的にSMPsを検出する顕微ラマン分光光度計での計測法の開発および検出されたSMPsのカルボニルインデックス（以下CI）による劣化度の計測法の実現を行う。また項目2として、完成したシステムを船舶へ搭載し、実証試験を行い、日本海におけるSMPs濃度分布および劣化の分布を示す。サブテーマ2では、海水中の粒子を捕集・濃縮するろ過システムおよび検出器へ導入する集積マイクロ流体システム部の開発を行い、サブテーマ1のシステムに組み込む。

3. 研究目標

全体目標	海面の微細なマイクロプラスチック (10-350 μm) を連続的に検出し、分析するシステムを開発し、日本沿岸海域のマイクロプラスチック濃度および劣化の分布を明らかにする。
------	--

サブテーマ 1	「海洋マイクロプラスチックの連続的な検出・分析システムの開発」
サブテーマ 1 実施機関	東京海洋大学
サブテーマ 1 目標	顕微ラマンを用いた微細なマイクロプラスチック連続分析システムの開発を目的とする。項目1において計測（検出・劣化分析）環境の構築、計測条件を決定し、分析システムを構築する。項目1およびサブテーマ2で開発されたシステムを船舶へ搭載し、船上での計測条件を決定する。項目2では、完成システムによって、現場海域（日本海）における微細なマイクロプラスチック (SMPs) の分布およびその劣化度 (CI) の分布を明らかにする。

サブテーマ 2	「ろ過システム部およびマイクロ流体システム部の開発」
サブテーマ 2 実施機関	芝浦工業大学
サブテーマ 2 目標	顕微ラマン分光光度計による分析システムへ自動でサンプルを導入するためのろ過システム部およびマイクロ流体システム部を開発する。ろ過システム部では、微細なマイクロプラスチック (10-350 μm) を濃縮するシステム、マイクロ流体システム部では、濃縮された試料を顕微ラマン分析に最適に導入するシステムを完成する。

4. 研究開発内容

本研究では、航走中の船舶において船内に引き込まれている海水中の微細なマイクロプラスチック (10-350 μm) の濃度を連続的に計測するシステムの開発を目的としている。【サブテーマ1】海洋マイクロプラスチックの連続的な検出・分析システムを開発として、顕微ラマン分光光度計を利用した計測手法を開発し、【サブテーマ2】ろ過システム部およびマイクロ流体システム部の開発として、海水中のマイクロプラスチックを高濃度に濃縮するシステムを開発した。最終的に両サブテーマで開発された手法およびシステムを用いて日本沿岸海域の微細なマイクロプラスチック濃度を計測した。

【サブテーマ1】海洋マイクロプラスチックの連続的な検出・分析システムの開発

サブテーマ 1 項目 1 は、顕微ラマン分光光度計において連続的に計測するためのガラスセルの検討、計測条件の探索、計測方法の開発、および計測結果から粒径と劣化度 (CI) を求める手法の確立を行うことを目標としている。これらの検討を進めるために、①顕微ラマン光度計の導入と計測条件の決定および計測手法の確立、②顕微ラマン光度計の船舶での使用条件の決定（船内へ取水されている海水の MPs 濃度および顕微ラマン分光光度計への揺れの影響）、および③マイクロプラスチックの劣化度（カルボニルインデックス；CI）の計測法、海域における CI の変化を検討した。項目 2 は、項目 1 で構築された顕微ラマンシステムとサブテーマ 2 で構築されたろ過システムを統合し、日本周辺海域の SMP 濃度と CI を調べた。

① 顕微ラマン分光光度計での計測条件：

セルの形状、レーザー強度、被写体深度などの連続計測に適した計測条件を決定した。試験用の粒子はポリエチレン (PE) とした。蒸留水および濾過海水に PE 粒子（直径 100 μm ）を懸濁し、濃度約 2 mg/mL とした。セルは、PDMS-石英板により流路を作製した。しかしながら、アクリル製流路および PDMS 流路では強度に不安があるため、市販の石英セル (40×10×0.5 mm) を使用することとした。

適切な計測条件を決定するため、以下の点を検討した。(a) レーザー強度、(b) 露光時間、(c) 粒子の深度

(焦点位置からの粒子のずれ)、(d)植物プランクトン粒子の影響について検討した。(a)では、レーザー強度は最大るとき、水中に存在する粒子からのラマン散乱光が明瞭であった。(b)では、露光時間0.1 secで信号は明瞭であり、時間が長いほど明瞭な信号となるが、一方で水中の粒子が動くことによって信号が低下することが発生する。このことから本研究での露光時間は0.1 secと設定した。(c)では焦点位置を流路の上面に設定した時、PE粒子（ ϕ 100 μm ）の下限から100 μm 深い位置までPEの信号を得ることができた。また ϕ 50 μm の粒子の場合、粒子の下限から50 μm の位置まで信号を得ることができた。これらのことから計測条件として、レーザー強度41.4 mW、照射時間0.1 secとすることでセルの深さ方向に対して50 μm の位置に焦点を合わせることにした。このことより、粒径50 μm 以上のサイズの粒子に対して流路の広い範囲で検出できることが確認できた。(d)では、PE粒子懸濁液中に植物プランクトン混合時、レーザー波長532 nmにおいてプラスチックおよび植物プランクトンの蛍光は計測を阻害することはなかった。このことを踏まえて、ラマン光度計によるイメージング観測における、グラスセルでの分析範囲、格子条件を決定した。

さらに、ラマン分光計のイメージング計測で濃度を決定する方法を検討した。イメージング計測した場合、MPsの検出は粒子の断面積によって決定される。粒子の検出率 R は以下のようにあらわされる。

$$R = \begin{cases} \pi \left(\frac{d_e}{2}\right)^2 & 0 < d_e \leq 1 \\ \left(\pi - 4 \arccos \frac{1}{d_e}\right) \left(\frac{d_e}{2}\right)^2 + d_e \sin \left(\arccos \frac{1}{d_e}\right) & 1 < d_e \leq \sqrt{2} \\ 1 & \sqrt{2} < d_e \end{cases} \quad (1)$$

ここで、 d_e は等価粒子直径である。

d_e と検出率 R にはよい関係がみられ、粒径が大きいほど検出率が増加する関係が得られ、この関係は実験でも確かめられた。

これらの結果を踏まえて、ラマン光度計を用いた、微細マイクロプラスチックの分析システムを作製した（図0-1）。海水中のMPs濃縮部（サブテーマ2）で濃縮されたMPs懸濁液をポンプで間欠的にグラスセルへ導入しセル内の5000点の100 μm 格子計測を実施することで微細なMPsのラマンスペクトルを取得する。このスペクトルとスタンダードPE粒子のスペクトルの相関をとり、PE粒子濃度を決定することが可能となった。

100 μm より微細なMP濃度を分析する際には格子サイズを目的のサイズとすることで微細なMPの濃度計測が可能である。

さらに、イメージング計測のできるラマン光度計は高額であることから利用範囲が限られる可能性が考えられる。そこで、イメージング計測によらないラマン分光計測法を検討した。本手法ではビーカー内にPE粒子を懸濁し、レーザーを照射してPE粒子の存在を把握する方法である（ビーカー法；図0-2）。この結果、水中のPE濃度が高いほど標準PEに近いスペクトルが得られた。

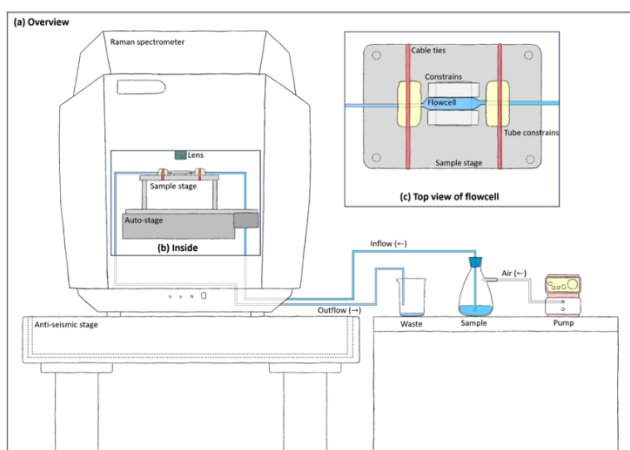


図 0-1（図 1-12）計測システムの全体構成



図 0-2（図 1-14）ビーカー法の計測の様子

② 顕微ラマン光度計の船舶での使用条件: 船内取り込み海水の MPs 濃度および船の振動がラマン光度計の計測に与える影響について検討した。船内取り込み海水は、使用船舶（東京海洋大学神鷹丸）の水深約 4m の船底の取水口から取り込まれ、原海水のまま研究室へ引き込まれている。この海水は、同船の研究室に設置された表層観測装置の計測に利用されると同時に、この配管から分岐し研究室の蛇口から取水することが可能である。この海水をラマン光度計の調査時に分析に使用することになることから、どのような MPs が検出されるのか検査した。調査海域は高知沖（2021 年 8 月 21 日）、長崎沖（2021 年 8 月 26 日）、静岡沖（2021 年 9 月 7 日）であった。また 2022 年 7 月 26 日-31 日にかけて日本海において取水し濃度計測を行った。

蛇口からの海水は流量計を通過したのち、355 μm 、100 μm のステンレスふるいを通過し、50 μm メッシュ（ポリアミド製）のハンドネットに吐出される。1 時間通水したのち、篩とネットをミリ Q 水で洗浄し、サイズごとに粒子を採取した。採取後のサンプルは冷蔵で保存し、研究室へ持ち帰った。サンプルは研究室においてステンレス篩（355 μm 、100 μm 、45 μm ）によって蒸留水で洗浄しながら、再度捕集し、粒子をビーカーへ溜めた。このサンプルを Fenton 試薬で酸化処理し、NaI 溶液で密度分離し、その上澄みを集めた。355 μm 以上の粒子は目視により採取した。100 μm および 50 μm のサンプルはそれぞれ PTFE フィルタ（ ϕ 25 mm、孔径 10 μm ）に捕集した。355 μm 以上の粒子は、FTIR-ATR（FTIR-4600、Jasco inc.）により、フィルタに捕集された粒子は顕微 FTIR（IRT-7200、Jasco inc.）により、赤外吸光スペクトルを測定した。そのスペクトルをデータベース（KnowItall）と照合し、HQI 値が 60 以上のものをプラスチックと決定した。

さらに顕微ラマン光度計を搭載予定の船舶（東京海洋大学神鷹丸）での取水管からの海水に含まれる微細なマイクロプラスチック（SMP）濃度および航行中の振動を調べた。当該船舶の研究室海水の、45-350 μm のサイズの SMP の濃度は海域 A、B、C では 100-660 個 m^{-3} 程度であった。一方、日本海側の Sta. 1、2、3 では、30-350 μm で 1330-4360 個 m^{-3} であった。（表 0-1）

これらの SMP の主な成分は PE であった。このことから、顕微ラマン光度計による現場サンプルのスペクトルデータと PE のスペクトルとの相関を取ることで、連続データから PE のマイクロプラスチックの濃度が把握できると考えられた。図 0-3 は 200 点の連続計測とそれぞれの計測での相関係数を示した。2 計測で PE との相関が非常に高くなり、検出に成功した。

表 0-1 研究室海水の SMP 濃度

Station	Sea area	MPs concentration (pieces m^{-3})		
		> 45 μm	> 100 μm	> 350 μm
Sta. A	高知沖	61	39	0
Sta. B	宮崎沖	244	72	0
Sta. C	長崎沖	305	356	2
		> 30 μm	> 100 μm	> 350 μm
Sta. 1	鳥取沖	1273 $\pm$ 379.0	57.1	0
Sta. 2	佐渡沖	2779 $\pm$ 720.9	373.3 $\pm$ 229.4	0
Sta. 3	津軽半島沖	3633 $\pm$ 1796	733.3 $\pm$ 660.0	0

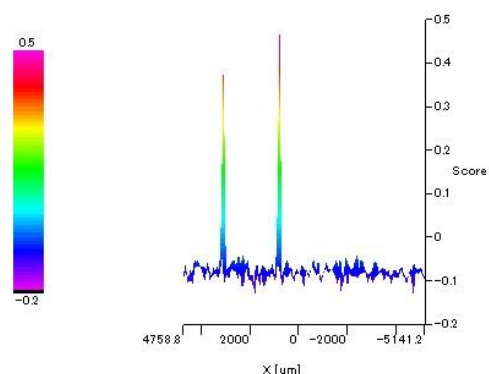


図 0-3（図 1-13）連続的な計測によって検出された PE 粒子

つぎに、船舶の動揺がラマン光度計へ影響するのか検証した。調査使用船舶（東京海洋大学神鷹丸）の研究室に設置された防振台上にラマン光度計相当の錘を配置し、その揺れを加速度計で計測した。観測は 2022 年 2 月 2 日-10 日の実習航海時に実施した。調査海域は尾鷲沖、高知沖、および新宮沖とした。計測基板で計測した角速度を高速フーリエ変換 (FFT) で解析した。サンプリングレートは 100 Hz であったため、船舶の横

揺れ計測には十分である。今回の計測では、計測時間が5時間のデータを用いてFFT解析を行った。FFTの解析は0-50 Hzの範囲で行われたが、1 Hz以上での反応がほとんど見られなかったため、周波数の範囲は0-1 Hzとした。神鷹丸において船の振動がラマン光度計の計測に影響しないことの確認のために防振台上での振動を計測した。防振台での固有振動は0.17-0.21 Hzであった。防振台が共振を起こす条件は約3 Hzであることから、共振によるラマン光度計の計測への影響は無視できると考えられた。

③ カルボニルインデックス (CI) の計測: ラマン光度計と FTIR の CI の相違、CI 算出時のベースライン補正、について検討した。

従来のCIの結果の多くは、FTIRおよび顕微FTIRの赤外スペクトル計測で得られている。ラマン光度計で計測したスペクトルには伸縮振動による散乱が見られる。ラマン散乱はFTIRによる赤外吸光の信号より小さい。CIの算出手法としてさまざまな波数の比が提案されている。各手法のCIの値を比較したところ、ラマン光度計の結果からCIを求めるためには、いくつかの手法で対応が見られることを確認した。(表0-2)

表0-2 (表1-1、1-5) CIの計算手法(a)および各手法の値の関係(b) (*; $P < 0.05$)

(a)

Method ID	X_1/X_2	Spectroscopy	Reference
M-01	[1650 1850]/[1420 1500]	FTIR & Raman	Almond et al., 2020
M-02	1714/720	FTIR & Raman	Benitez et al., 2013
M-03	1720/720	FTIR & Raman	Focke et al., 2011
M-04	1713/730	FTIR & Raman	Antunes et al., 2017
M-05	1710/1380	FTIR & Raman	Ali et al., 2016
M-06	1714/1463	FTIR & Raman	Yeh et al., 2015
M-07	1714/1462	FTIR & Raman	Elanmugilan et al., 2014
M-08	1712/1472	FTIR & Raman	Jakubowicz et al., 2012
M-09	1740/2020	FTIR & Raman	Roy et al., 2005
M-10	1725/2722	FTIR & Raman	Carvalho et al., 2013
M-11	1296/1063	Raman	Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022
M-12	1296/1130	Raman	Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022
M-13	1296/1418	Raman	Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022; Reineccius et al., 2022
M-14	1296/1440	Raman	Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022
M-15	1296/1460	Raman	Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022
M-16	1296/2852	Raman	Phan et al., 2022
M-17	1296/2884	Raman	Phan et al., 2022

(b)

	M-01	M-02	M-03	M-04	M-05	M-06	M-07	M-08	M-09	M-10	
	Station A										
Raman	M-01	0.17	0.23*	0.23*	0.19	0.13	0.22	0.21	0.25*	0.22	0.05
	M-02	0.11	0.17	0.15	0.14	0.04	0.15	0.15	0.16	0.07	0.00
	M-03	0.20	0.18	0.17	0.13	0.08	0.18	0.17	0.21	0.29*	0.05
	M-04	0.13	0.06	0.06	0.02	0.02	0.09	0.07	0.09	0.09	0.00
	M-05	-0.03	-0.05	-0.05	-0.11	0.00	-0.04	-0.05	-0.02	0.04	0.10
	M-06	-0.05	-0.01	-0.01	-0.05	-0.04	0.01	0.00	0.03	0.04	0.15
	M-07	-0.05	-0.01	-0.01	-0.05	-0.05	0.00	-0.01	0.02	0.04	0.14
	M-08	0.03	0.10	0.10	0.05	0.09	0.14	0.13	0.13	0.18	0.09
	M-09	0.08	0.03	0.01	0.01	0.08	0.03	0.02	0.05	0.04	-0.10
	M-10	0.10	-0.03	-0.05	-0.10	-0.18	0.02	0.00	0.07	-0.01	-0.10
	M-11	0.10	0.24*	0.24*	0.23*	0.16	0.24*	0.24*	0.19	0.07	-0.13
	M-12	0.11	0.03	0.03	0.01	-0.02	0.05	0.05	0.07	-0.10	-0.16
	M-13	0.14	0.17	0.18	0.25*	0.31*	0.17	0.18	0.11	-0.01	-0.01
	M-14	0.27*	0.30*	0.29*	0.36*	0.38*	0.30*	0.31*	0.26*	0.24*	0.02
	M-15	0.29*	0.37*	0.37*	0.41*	0.42*	0.37*	0.39*	0.31*	0.23*	-0.05
	M-16	0.25*	0.29*	0.29*	0.34*	0.25*	0.28*	0.29*	0.24*	0.11	-0.08
	M-17	0.32*	0.35*	0.35*	0.41*	0.29*	0.34*	0.35*	0.30*	0.19	-0.10

次に CI 算出時にベースラインが高いため（ノイズが大きい）安定した値が得られにくい。そこで Double sliding window 法(DSW 法)を開発し、ベースライン補正を施すことで CI 値のノイズの軽減が達成された(図0-4)。

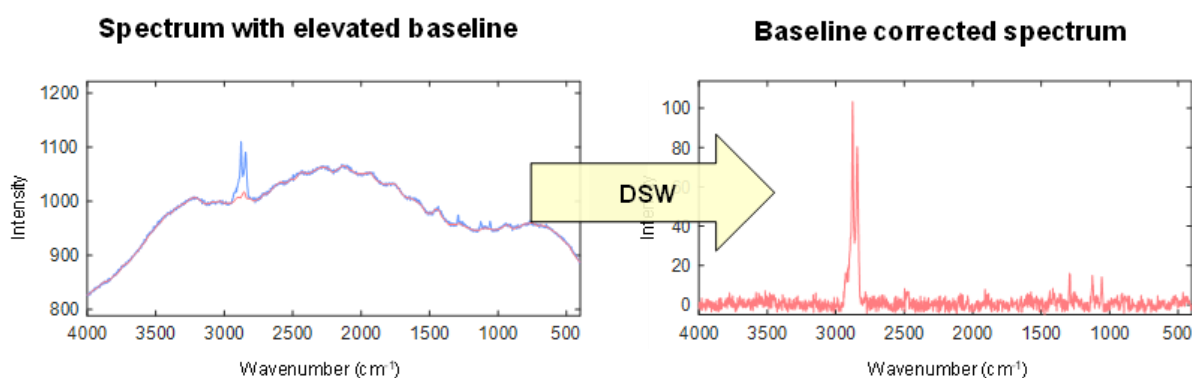


図0-4 (図1-16) ラマン光度計のスペクトルに DSW でベースライン補正を実施した例

CI がプラスチックの劣化の指標になる可能性は指摘されている。しかしながら、現場海域の MPs において CI がどのように変化するか明らかにされていない。そこで CI が MPs の劣化の指標として使用できるか検討した。MPs は 2017 年に日本沿岸海域で採取した。採取した点は Sta. 1 (対馬海峡)、Sta. 2 (日本海)、Sta. 3 (沖縄)、Sta. 4 (銚子沖)、Sta. 5 (富山沖)、Sta. 6 (三陸沖)、Sta. 7 (東シナ海)であつ

た。それぞれの MPs の赤外吸光を FTIR により測定した。さらにこの MPs の粒子サイズを顕微鏡で調べた。CI は、 $1850\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ および $1500\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$ のエリアの比で求めた。(Almond et al., 2020)

日本沿岸海域の MPs (PE) の CI は、0.55-0.79 であった。CI は房総半島沖や富山沖で高く、日本海で小さかった。一方、MPs のサイズは房総半島沖や富山沖で小さく、日本海で大きかった。すなわち、CI と MPs のサイズには負の相関関係がみられた ($p < 0.05$)。このことから、CI は MPs の劣化の指標として使用できると考えられた。(図 0-5) さらに、現場海域の微細な MPs (SMPs) の CI を求めた。海面の PE SMPs の CI は非常に大きかった。このことは PP においても同様であった。これらのことから、現場海域の MPs の CI はそのサイズと良く対応していることが確認された。

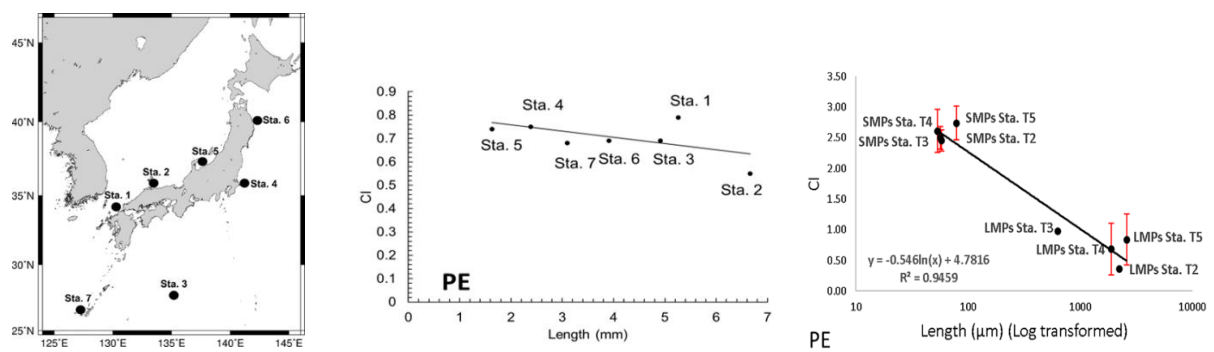


図0-5 (図1-7、1-17) 日本周辺海域の観測点およびMPsのCIとサイズの関係

項目2では、サブテーマ1およびサブテーマ2で得られた計測法およびシステムを船舶に搭載して現場海域の濃度観測を行った。観測は①2023年7月および②2024年2月の2回である。2023年7月では長崎県佐世保から青森県までの間で、2024年2月では東京から紀伊半島沖までの間で行った。

観測①ではろ過システムの2段階目が完成していなかったことから、2段階目の濃縮の代わりに手動でサンプル海水の濃縮をおこなった。その後、2024年2月に2段階目の濃縮器を組み込み、サンプル回収の校正実験を行った。さらに、観測②において、完成システムを運用して現場海域の MPs 濃度分析を行った。観測①では、2個の PE 粒子が検出された。この結果をもとに $100\text{--}350\text{ }\mu\text{m}$ の PE 濃度を概算すると 582 個 m^{-3} と概算された。またラマン光度計で求めたこの粒子の CI は 0.26-0.40 であった。

2段階濃縮装置のサンプル回収の校正実験では、 $100\text{--}350\text{ }\mu\text{m}$ の粒子は 80-100 %の回収率があり、確実に計測できることが分かった。さらに、観測②では図 0-6(a)の航路で公開中に14回の採水・濾過を行い(各回 1 m^3)、ラマン高度計システムを運用し、現場計測を行った。その結果は PE 粒子1個の検出ができた。

これらのことから、本観測システムによって現場海域での航走中での SMPs 濃度の計測が可能であると言えた。

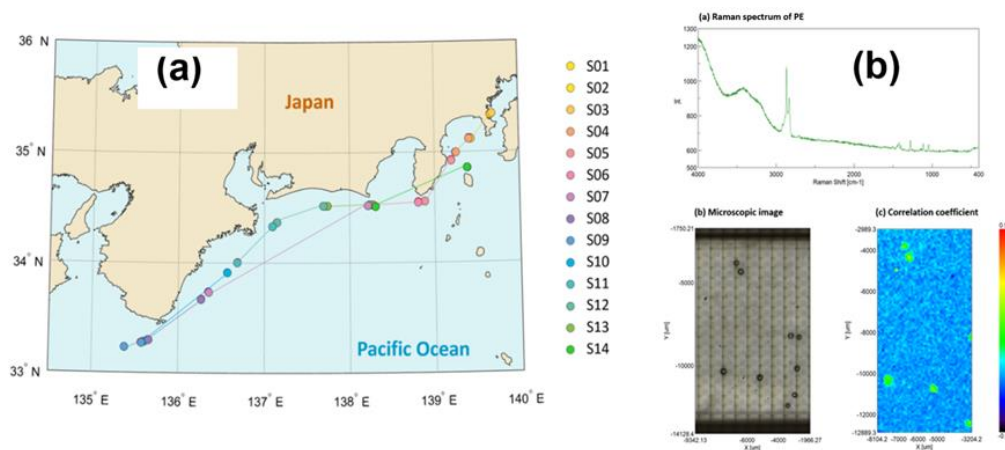


図 0-6 (図 1-8、1-19) 2024 年 2 月の航路(a)と検出スペクトル(b)

【サブテーマ2】ろ過システム部およびマイクロ流体システム部の開発

サブテーマ2では以下の3項目に分けて検討を進めた。①環境海水中の粒子を採取するためのろ過装置の開発、②MPの検出と分離のためのマイクロ流体デバイスの設計、③濾過システムの評価である。

①環境海水中の粒子を採取するためのろ過装置の開発

本研究においてターゲットとするMP粒子のサイズレンジは350 μm 未満であり、ニューストンネットのようなネットのメッシュサイズよりも小さい。しかも、粒子を回収するためには、当該ネットを取り廻す必要があり、濾過→粒子回収の処理を連続させることは原理的に極めて困難である。

MPとその他の夾雑物粒子を含む海水を大量にサンプリングするために、陸上ポンプまたは水中ポンプにより送液された海水をろ過し、ろ液を海に戻すことが可能なフィルタハウジングを中心としたサンプリング装置を製作した。海水をくみ上げるのとは別の独立したポンプから、ろ過時とは反対の向きに液体を流す（逆洗）ことで、フィルタ表面に捕集された粒子を回収して外部に取り出すことが可能な構造とした。フィルタは、目開き10 μm のファインウェッジストレーナ®（東洋スクリーン工業）をカスタマイズしたものを使用した。フィルタハウジングは、図0-7Aのように、サニタリー配管で用いられるヘルール継手のT字管（チーズ）をカスタマイズしたものをを用いた。フィルタ、ハウジングともに材料をステンレス（SUS303、SUS316）にし、サンプルへのプラスチック片などの混入による汚染を最小限に抑えた。前項で述べた海水ろ過フィルタでは、粒子は5回の逆洗を経て逆洗水約1.6Lの液体の中に分散した状態で回収される。しかし、このオーダーの体積のサンプルをマイクロ流路に導入しても、MPに遭遇できる確率は相当に低い。よって、逆洗で回収したサンプルを図Bに示したステンレス製吸引ろ過装置でポリカーボネート（PC）製、孔径1 μm 、直径 ϕ 90 mmのメンブレンを通して濃縮した。その後、Fenton反応（化学的）と比重分離（物理的）により目的粒子の濃度を高め、さらに、蛍光色素Nile Redによる染色を実施した。

②MPの検出と分離のためのマイクロ流体デバイスの設計

海洋SMPsの分析の効率を向上させるためには、試料中の興味の粒子の濃度を上げることが求められる。そのためのマイクロ流体素子として、目的粒子(SMP)の輸送媒体としての液体サンプルを通過させることができる流路をもち、対象の粒子を、なるべく少ない体積の液体と共に特定の位置へ分離することができることが求められる。液体サンプルの中から、目的粒子(SMP)の存在を検出することができることが望ましい。

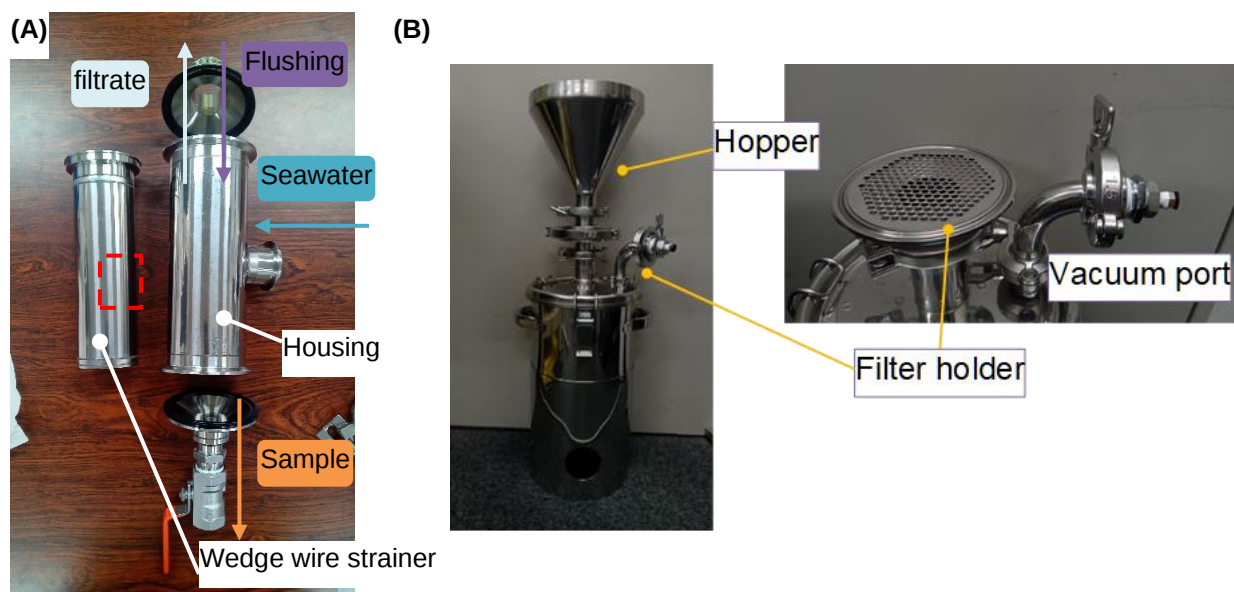


図 0-7 (図2-2, 2-4) A) 海水のろ過と、ウェッジフィルタ表面の残渣の回収を液体に触れることなく実行できるハウジング。 B) 海水試料をろ過し、粒子を濃縮するためのメンブレン吸引濾過ユニット

以上の条件を踏まえて、Nile Redからの蛍光検出がしやすく、かつ流路を切り替えて選別が容易にできるデバイスを設計した。具体的には、図0-8Aに示すように、1×1×5mmの市販の直方体のネオジム磁石ピンを流路内に埋め込み、その運動により2つの流路を交互に閉塞するような機構のバルブを実装した。流路の材料には摩擦の小さいPMMAを採用し、蛍光検出のための領域は、バックグラウンド蛍光を低減するため、φ1mm、内径がφ0.5mmの正方形断面のガラスキャピラリを組み込む設計とした。

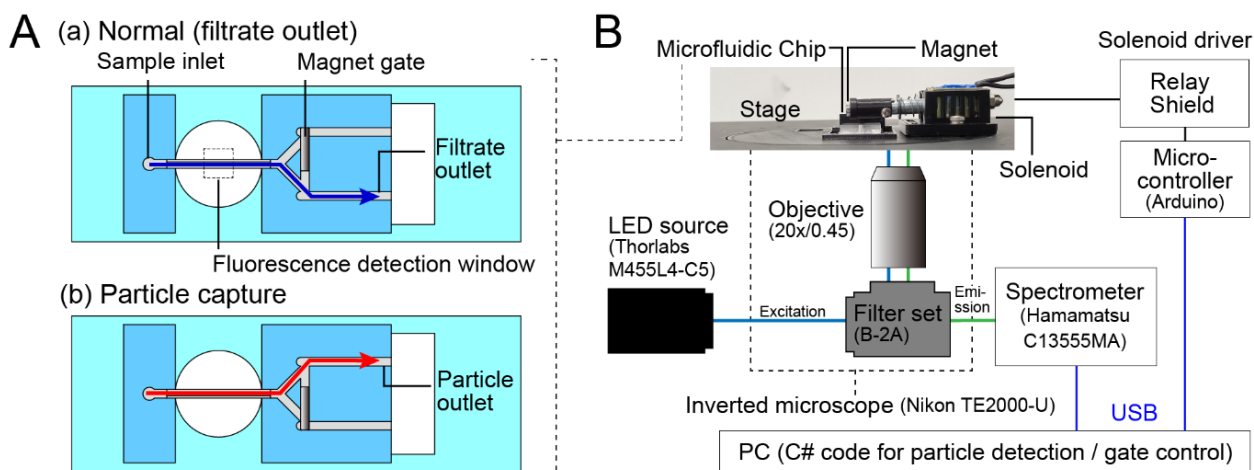


図0-8 (図2-7) A) マイクロ流体選別の原理. B) マイクロ流路上での粒子検出・分離系.

マイクロ流体デバイスを含むシステムを図0-8Bに示す。蛍光顕微鏡のサイドポートより分光器経由で蛍光分光スペクトルを取得した。PC上のプログラムにより、顕微鏡の視野に入る粒子の分光スペクトルが以下の条件を満たすかを判定し、マイコンボードを介して市販のプル型ソレノイドの先端に取付けたネオジム磁石を直線運動させ、真上をオーバーラップしながら移動するネオジム磁石の引力により磁性体ゲートを流路内で摺動させた。

$$\frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I d\lambda}{\lambda_2 - \lambda_1} > 1000 \text{ または } \frac{\int_{\lambda_3}^{\lambda_4} I d\lambda}{\lambda_4 - \lambda_3} > 1000$$

ここで、 I は蛍光強度、 $\lambda_1 \sim \lambda_4$ それぞれ571.76、601.18、601.18、631.00 [nm]である。

③濾過システムの評価

まず、本システムによってどれだけの体積の海水を濾過処理できるかを検証した。5回のろ過-逆洗を1サイクルとしたとき、5サイクル分の濾過時の流量の時間変化の典型例を図0-9Aに示した。逆洗により、サイクル再開時の流量は当初の最高流量(200 mL/s以上)に回復するが、サイクルを重ねるごとに流量低下の速度は増加する。より頻繁に逆洗を実施すると、流量低下が抑えられる一方、逆洗水の体積が増加し、2段目のメンブレン濾過の頻度が増加することとなるため、現状は手動で2段濾過を行っている以上、運用上は逆洗サイクルの設定に最適値が存在する。対して、各サイクルの積算流量をサイクルごとに示したものが図0-9Bである。3サイクルまでは比較的安定して100 L程度の濾過量を確保できている。よってトータルで300 Lは安定して濾過できるといえる。本結果は粒子の量が多い豊洲運河の水であることを鑑みると、陸地から距離のある洋上で採取された海水はさらに多く濾過できることが期待できる。実際、東京海洋大学神鷹丸に同濾過装置を搬入して洋上で濾過を実施した際には、1000 Lの濾過を達成できた。

選別システムの評価

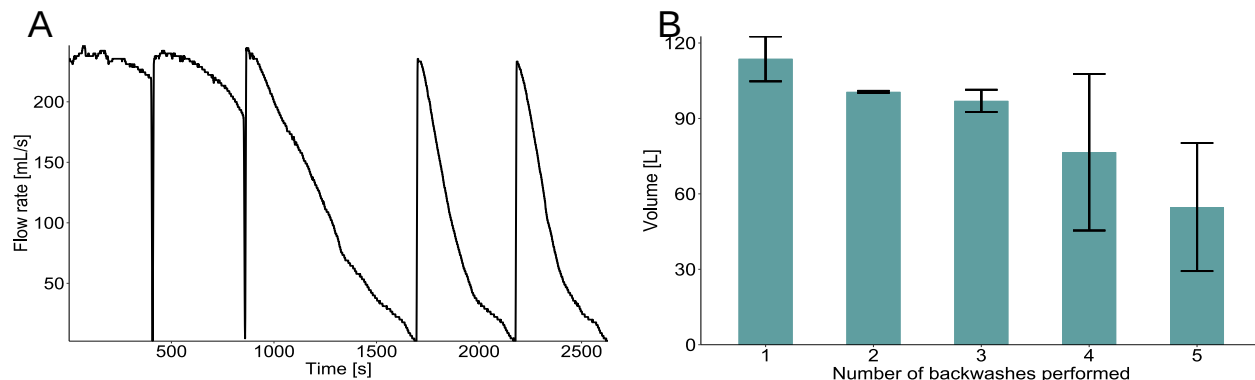


図0-9 (図2-9) 10 μ m ウェッジフィルタろ過装置における豊洲運河水の典型的な濾過特性. A) ろ過装置を通過した海水の流量の時間変化. B) 逆洗実施毎の濾過積算流量

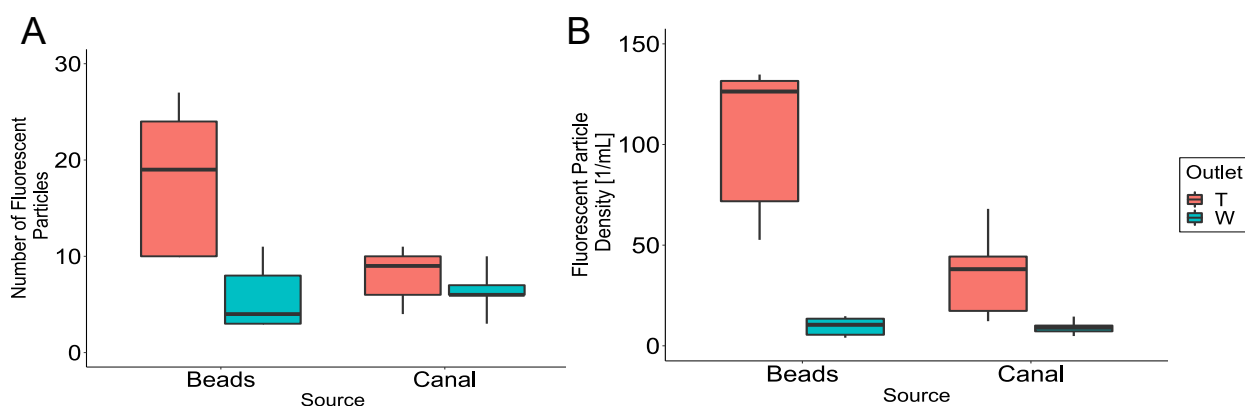


図 0-10 (図2-10) A) マイクロ流路の2つの出口 (粒子回収出口はTarget-Outlet, 廃棄物側出口はWaste-Outletと表記した) においてそれぞれ回収された蛍光粒子の数の分布 (N=5). B) マイクロ流路の2つの出口で回収された蛍光粒子の, シース液の体積を加味した濃度[個/mL]の分布

これまでの濾過の過程により濃縮された豊洲運河由来の粒子を含む懸濁液。また、理想的な蛍光粒子として、直径約150 μ mの蛍光マイクロビーズについて、マイクロ流路で選別を行った。

図0-10Aは、出口 (粒子回収側(Target:T)と廃棄側出口 (Waste:W)) において回収された、目的粒子すなわち蛍光標識されたMPあるいは蛍光ビーズの個数の分布である。この種のデバイスの評価によく用いられる緑色蛍光PEビーズでは、70%を超える回収率であったが、運河由来の粒子では、誤って廃棄されるMPの粒子の量が多かった。一方、図0-10Bは、シース液ごと回収された粒子の個数を、シース液の体積で除した値 (濃度) の分布である。蛍光PEビーズほどではないが、液体の体積を加味すると、MPであっても、2つの出口の間で濃度の差が顕著であり、粒子を濃縮する効果が認められた。

現在も、豊洲運河から採取した粒子の選別において、特に誤廃棄される粒子が多い原因を追究しているが、その理由として、豊洲運河由来のもとより粒子数の多いサンプルで、処理速度が間に合わなかったことがまず挙げられる。加えて、ごく限られた一部の粒子のしかも静止時に得られたスペクトルより選別条件を設定していたことが考えられる。目下、NR染色した豊洲運河の粒子の蛍光スペクトル選別を行わずに取得記録し、蛍光スペクトルの網羅的な分析をしたうえで選別条件を設定し、選別結果の粒子の特性を調べて選別条件を調整していく実験を行っている。

(参考文献)

Almond et al. 2020. Determination of the carbonyl index of polyethylene and polypropylene using specified area under band methodology with ATR-FTIR spectroscopy. e-Polymers, 20(1), 369-381.

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

全体として、サブテーマ1における顕微ラマン光度計を用いた計測システム部およびサブテーマ2における環境海水を計測可能な濃度へ濃縮するシステム部のそれぞれが構築され、合わせて運用することにより、環境海水のMP濃度計測が実現できた。サブテーマ1では、顕微ラマン光度計を用いた計測システムを考案し、その計測条件を決定しMP濃度を求める手法を作出した。さらにCIの計測手法を工夫し、明瞭なCI値を用いて、MP粒子サイズとの対応、ラマン光度計を用いたときにCI値の算出法を明らかにした（3、4、7、8）。顕微ラマン光度計を用いた現場海域のMP濃度とCI値が計測できるシステムができたことから、目標が達成できた。サブテーマ2では、濾過システムは、海洋上で1000 Lの海水を濾過できるという目標を達成し、特許出願中である(55)。選別システムは、特に運河水のような現実の環境から採取した粒子について、まだ回収率を改善すべきだが、MPとみられる粒子を選別濃縮すること自体は達成できた。

5-2. 研究目標の達成状況

＜全体の達成状況＞・・・・・・・・・・・・・・・・ 3. 目標どおりの成果をあげた

「顕微ラマン光度計を用いた海洋マイクロプラスチックの連続計測システムの開発」

全体目標	全体の達成状況
海面の微細なマイクロプラスチック(10-350 μm)を連続的に検出し、分析するシステムを開発し、日本沿岸海域のマイクロプラスチック濃度および劣化の分布を明らかにする。	(全体の達成状況と具体的な理由・根拠) 海水の2段階ろ過システムを作出しMPsの連続計測が行える程度の濃縮に成功した。またMPsの濃縮液をガラスセルに導入し、濃度計測が行える手法を確立した。本システムにより現場海域のPE MPs濃度を計測できた。

＜【サブテーマ1】達成状況＞・・・・・・・・・・・・・・・・ 3. 目標どおりの成果をあげた

「海洋マイクロプラスチックの連続的な検出・分析システムの開発」

サブテーマ1目標	サブテーマ1の達成状況
顕微ラマンを用いた微細なマイクロプラスチック連続分析システムの開発を目的とする。項目1において計測(検出・劣化分析)環境の構築、計測条件を決定し、分析システムを構築する。項目1およびサブテーマ2で開発されたシステムを船舶へ搭載し、船上での計測条件を決定する。項目2では、完成システムによって、現場海域(日本海)における微細なマイクロプラスチック(SMPs)の分布およびその劣化度(CI)の分布を明らかにする。	顕微ラマンの分析条件、サンプルセル、ポンプを決定し、分析システムを構築した。また劣化度の指標CIの計測法、現場海域におけるMPのサイズとCIとの関連を検討した。 1. MP濃度を決定する手法を作出した。 2. CIの算出にベースライン補正を用いることで精度を高めた。PE MPおよびSMPにおいて、粒子サイズとCIが負の関係のあることを見出した。 3. サブテーマ2のろ過システムとラマンの分析システムを連続的に運用し、SMPの濃度計測システムを完成した。本システムで計測した日本海のSMP濃度は580 個 m^{-3} 、CIは0.26-0.40であった。

＜【サブテーマ2】達成状況＞・・・・・・・・・・・・・・・・ 3. 目標どおりの成果をあげた

「ろ過システム部およびマイクロ流体システム部の開発」

サブテーマ 2 目標	サブテーマ 2 の達成状況
顕微ラマン分光光度計による分析システムへ自動でサンプルを導入するためのろ過システム部およびマイクロ流体システム部を開発する。ろ過システム部では、微細なマイクロプラスチック（10-350 μm）を濃縮するシステム、マイクロ流体システム部では、濃縮された試料を顕微ラマン分析に最適に導入するシステムを完成する。	1. 図 1 に示すオールステンレスの濾過システムを設計製作し、洋上で1000 Lの海水の連続的な濾過が可能であることを示した。 2. 図 2 に示す、現実の環境から得られる多様な粒子の導入選別に対応できるマイクロ流体システムを開発した。顕微ラマンへの導入部分の開発については今後の課題となった。

5-3. 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献

<得られた研究成果の学術的意義>

サブテーマ 1 では、従来の海面のMPsの濃度分布での点の把握から、連続的な濃度把握へという独創性がある。このことの実現のために、ラマン光度計の利点を活用する計測法を開発した点は革新的である。従来、比較的大きなMP(> 350 μm)の濃度が調べられていたが、10 μm - 350 μmの微細なMPを計測できるように発展した。このことは海域のMPの総量や収支を理解するうえで非常に有用と言える。さらに、海域のMPsの劣化度の把握を行った。本研究によって、海域のMPsのCIとサイズに関係があることを初めて示した。このことにより海域でのMPsの運命を把握できる。現場において採取から計測まで短時間で計測できる手法が初めて完成された、という点から先導性がある。

サブテーマ 2 では、ウェッジフィルタとメンブレンフィルタの2ステージの濾過システムを開発し、従来のMPの回収方法に比べて、ネットを用いるよりも小さなMP粒子(SMP)の回収、曳航やネットの取廻しが不要など、はるかに簡便な運用をもたらす。そして小型船舶でも運用可能なほどコンパクトである。このことから、海域のSMPの分布の把握のための方法として先導性があると考えられる。また、マイクロ流体デバイスは、流路内磁石ゲートを用いた独自の流れ切り替え方法によりこれまでの理想的な粒子でなく、自然や環境から得られる組成不明の粒子サンプルを受け入れて処理できるようになったことを示すことができ、今後の性能改善をはかることができれば、発展性があると考えられる。

<行政等に既に貢献した成果>

現時点において、環境行政および環境産業に貢献、活用された事例はない。

<行政等に貢献することが見込まれる成果>

本研究において、船舶に取り込まれる海水を利用したMPs濃度の計測が可能となった。本計測手法はいずれの船舶でも使用することが可能である。多くの船舶で利用されることで従来の調査で計測できなかった水域でのMPの濃度の把握が可能となる。貢献の見通しについては、各種船舶でのMPの濃縮、濃度計測が可能になることから、積極的に導入を促すことで、広い水圏でのMPsの汚染の実態把握に貢献できる。

6. 研究成果の発表状況の概要

6-1. 成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	12
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	2
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	10
口頭発表（学会等・査読なし）：	30
知的財産権：	1
「国民との科学・技術対話」の実施：	12
マスコミ等への公表・報道等：	0
研究成果による受賞：	0
その他の成果発表：	0

6-2. 主な査読付き論文等の主要な成果

成果番号	主要な成果（10件まで）
12	E. Wangkanklang, Y. Koike, System for monitoring progress in a mixing and grinding machine using sound signal processing. Micromachines, 2021, 12. 1041. https://doi.org/10.3390/mi12091041
2	H. Xu, H. Nakano, T. Tokai, T. Miyazaki, H. Hamada, H. Arakawa. Contamination of sea surface water offshore the Tokai region and Tokyo Bay in Japan by small microplastics. Marine pollution bulletin, 2022, 185, 114245. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114245
3	M. Celik, H. Nakano, K. Uchida, A. ISOBE, H. ARAKAWA. 2023. Comparative evaluation of the carbonyl index of microplastics around the Japan coast, Marine Pollution Bulletin, 190, 114818. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114818
4	Z. Yang, H. Arakawa. 2023. A double sliding-window method for baseline correction and noise estimation for Raman spectra of microplastics. Marine Pollution Bulletin, 190, 114887. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114887

5	Z. Yang, H. Arakawa. 2023. A beaker method for determination of microplastic concentration by micro-Raman spectroscopy, MethodsX, 11, 102251. https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102251
6	Y. Cheng, J. Zhang, H. Nakano, K., Ueyama N., H. Arakawa. 2023. Coumarin 6 staining method to detect microplastics. Marine Pollution Bulletin, 193, 115167. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115167
7	Z. Yang, H. Nagashima, H. Arakawa. 2023. Development of automated microplastic identification workflow for Raman micro-imaging and evaluation of the uncertainties during micro-imaging. Marine Pollution Bulletin. 193, 115200. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115200
8	Z. Yang, M. Çelik, H. Arakawa. 2023. Challenges of Raman spectra to estimate carbonyl index of microplastics: A case study with environmental samples from sea surface. Marine Pollution Bulletin, 194, 115362. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115362
9	Z. Yang, M. Çelik, H. Nakano, H. Arakawa. 2023, Accessing the intrinsic factors of carbonyl index of microplastics: physical and spectral properties, baseline correction, calculation methods, and their interdependence. Marine Pollution Bulletin, 197, 115700. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115700
55	荒川久幸, 楊子江, 永島滉也, 小池義和, 二井信行, 長谷川夏旺, 「マイクロプラスチック含有水濃縮装置およびマイクロプラスチック含有水濃縮方法, マイクロプラスチック濃度測定装置およびマイクロプラスチック濃度測定方法」特願2024-028646

※この欄の成果番号は「Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細」と共通です。

7. 国際共同研究等の状況

＜国際共同研究等の概要＞

特に記載すべき事項はない。

8. 研究者略歴

＜研究代表者略歴＞

代表者氏名	略歴（学歴，学位，経歴，現職，研究テーマ等）
荒川久幸	東京水産大学水産学研究科修了 博士（水産学） 東京海洋大学准教授を経て、 現在、東京海洋大学教授 専門は海洋環境学、研究テーマは海洋光環境

＜研究分担者（サブテーマリーダー）略歴＞

分担者氏名	略歴（学歴，学位，現職，研究テーマ等）	参画期間
1) 小池義和	東京工業大学大学院総合理工学研究科修了 博士（工学） 東京工業大学精密工学研究所助手を経て、2000年4月に芝浦工業大学工学部二部電気工学科の講師として着任。現在、芝浦工業大学工学部電気電子課程教授 主に超音波応用、海洋観測装置について研究	

II. 成果の詳細

II-1 サブテーマ1「海洋マイクロプラスチックの連続的な検出・分析システムの開発」

〔サブテーマ1 要旨〕

サブテーマ1では、項目1として試料から連続的にSMPを検出する顕微ラマン分光光度計を用いた計測法およびシステムの開発、検出されたSMPのカルボニルインデックス（以下CI）による劣化度の計測法の開発を目的とした。項目2としてサブテーマ（2）で作出されたる過システムと顕微ラマン分析システムを統合し、船舶で実証試験を行い、日本周辺海域におけるSMP濃度分布および劣化の分布を示すことを目的とした。

項目1として、顕微ラマン光度計、セル、およびポンプからなるシステムを構築し、SMP濃度を測定するための計測条件、濃度算出方法を決定した。また、CIの算出方法の検討とベースライン補正の有用性を確認した。この手法をもとにMPのCIを測定し、MPサイズとCIに負の関係があることを明らかにした。項目2では顕微ラマン光度計システムで海域のSMP濃度を調べ、PEのMPの検出には成功した。

1. サブテーマ1 研究開発目的

サブテーマ1では、項目1として試料から連続的にSMPを検出する顕微ラマン分光光度計での計測法の開発および検出されたSMPのカルボニルインデックス（以下CI）による劣化度の計測法の開発を行う。また項目2として、完成したシステムを船舶へ搭載し、実証試験を行い、日本海におけるSMPs濃度分布および劣化の分布を示す。

2. サブテーマ1 研究目標

サブテーマ1	「海洋マイクロプラスチックの連続的な検出・分析システムの開発」
サブテーマ1 実施機関	東京海洋大学
サブテーマ1 目標	顕微ラマンを用いた微細なマイクロプラスチック連続分析システムの開発を目的とする。項目1において計測（検出・劣化分析）環境の構築、計測条件を決定し、分析システムを構築する。項目1およびサブテーマ2で開発されたシステムを船舶へ搭載し、船上での計測条件を決定する。項目2では、完成システムによって、現場海域（日本海）における微細なマイクロプラスチック（SMPs）の分布およびその劣化度（CI）の分布を明らかにする。

3. サブテーマ1 研究開発内容

サブテーマ1 項目1は、顕微ラマン分光光度計において連続的に計測するためのグラスセルの検討、計測条件の探索、計測方法の開発、および計測結果から粒径と劣化度（CI）を求める手法の確立を行うことを目標としている。これらの検討を進めるために、①顕微ラマン光度計の導入と計測条件の決定および計測手法の確立、②顕微ラマン光度計の船舶での使用条件の決定（船内へ取水されている海水のMPs濃度および顕微ラマン分光光度計への揺れの影響）、および③マイクロプラスチックの劣化度（カルボニルインデックス；CI）の計測法、海域におけるCIの変化を検討した。さらに項目2では、サブテーマ2のシステムと統合し、現場海域のMPの濃度計測を行った。

① 顕微ラマン分光光度計での計測条件（初年度および2年度計画）：セル形状、レーザー強度、被写体深度などの連続計測に適した計測条件を決定した。試験用の粒子はポリエチレン（PE）とした。蒸留水および濾過海水にPE粒子（コアフロント社製、直径100 μm）を懸濁し、濃度約2 mg/mLとした。セルは、PDMS-石英板により流路を作製した。流路はアクリル板のCNC切削によって作製した型を用い、PDMS（信越 KE-106）を型取りして流路形状（幅1000 μm×深さ500 μm×20 mm）を得た。上面に合成石英板（厚さ0.3 mm、精研硝子）をプラズマ接合した。しかしながら、アクリル製流路およびPDMS流路では強度に不安があるため、市販の石英セル（スターナ社製、40×10×0.5 mm、図1-1）を使用することとした。図1-2に導入したラマン分光光度計へのセルの設置状況を示した。流路中にPEを懸濁した蒸留水をポンプによって導

入し、止水条件で PE 粒子の検出の可否を調べた。レーザーの波長は 532 nm とし、その強度は強いほどラマン散乱の信号が明瞭に取得できた。PE 懸濁試水を溜めたビーカーから定量ポンプ (Tacmina 社製) でセルへ PE 粒子懸濁水を導入した。

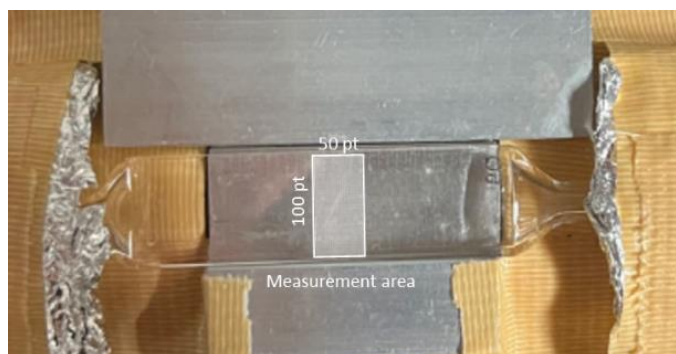


図 1-1 石英セル

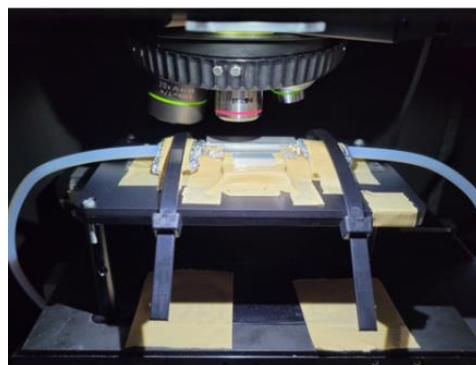


図 1-2 セルをラマン光度計へ設置した様子

適切な計測条件を決定するため、以下の点を検討した。(a) レーザー強度、(b) 露光時間、(c) セル内での焦点深度(焦点位置からの粒子のずれ)、(d) 植物プランクトンの蛍光の影響について検討した。(a) では、レーザー強度を最大 (41.4 mW)、50%、25%とした。レーザー強度は最大するとき、水中に存在する粒子からのラマン散乱光が明瞭であった。(b) では、露光時間を 0.1、0.2、0.3 および 0.4 秒とし、検出結果(HQI) への影響を検討した。露光時間 0.1 sec で信号は明瞭であり、0.2 sec 以上では大きな変化は見られなかった。露光時間が長いほど明瞭な信号となるが、一方で水中の粒子が動くことによって信号が低下すること可能性が発生する。このことから本研究での露光時間は 0.1 sec と設定した。(c) ではサイズの異なる ($\phi 50 \mu\text{m}$ および $100 \mu\text{m}$) ポリエチレン粒子 (PE) を懸濁した蒸留水および濾過海水をセルに導入し、深さ方向に焦点をずらして PE が検出できる範囲を検討した。焦点位置を流路の上面に設定した時、PE 粒子 ($\phi 100 \mu\text{m}$) の下限から $100 \mu\text{m}$ 深い位置まで PE の信号を得ることができた。また $\phi 50 \mu\text{m}$ の粒子の場合、粒子の下限から $50 \mu\text{m}$ の位置まで信号を得ることができた。これらのことから計測条件として、レーザー強度 41.4 mW、照射時間 0.1 sec、セルの深さ方向に対して $50 \mu\text{m}$ の位置に焦点を合わせることとした。このことより、粒径 $50 \mu\text{m}$ 以上のサイズの粒子に対して流路の広い範囲で検出できることが確認できた。(d) では、PE 粒子懸濁液中に植物プランクトン (*Chaetoceros gracilis*) を 10^4 ind mL^{-1} の濃度で混合し、ラマン計測への影響を検討した。レーザー波長 532 nm においてプラスチックおよび植物プランクトンの蛍光は計測を阻害することはない。これらのことからラマン光度計による分析条件を決定した。

② 顕微ラマン光度計の船舶での使用条件 (初年度および 2 年度計画) : 船内取り込み海水の MPs 濃度および船の振動がラマン光度計の計測に与える影響について検討した。船内取り込み海水は、使用船舶 (東京海洋大学神鷹丸) の水深約 4m の船底の取水口から取り込まれ、原海水のまま研究室へ引き込まれている。この海水は、同船の研究室に設置された表層観測装置の計測に利用されると同時に、この配管から分岐し研究室の蛇口から取水することが可能である。この海水をラマン光度計の調査時に分析に使用することになることから、どのような MPs が検出されるのか調べた。調査海域は高知沖 (2021 年 8 月 21 日)、長崎沖 (2021 年 8 月 26 日)、静岡沖 (2021 年 9 月 7 日) (図 1-3) であった。また 2022 年 7 月 26 日-31 日にかけて日本海 (図 1-4) において取水し濃度計測を行った。

蛇口からの海水は流量計を通過したのち、 $355 \mu\text{m}$ 、 $100 \mu\text{m}$ のステンレスふるいを通過し、45 もしくは $30 \mu\text{m}$ メッシュ (ポリアミド製) のハンドネットに吐出される。1 時間通水したのち、篩とネットをミリ Q 水で洗浄し、サイズごとに粒子を採取した。採取後のサンプルは冷蔵で保存し、研究室へ持ち帰った。サンプルは研究室においてステンレス篩 ($355 \mu\text{m}$ 、 $100 \mu\text{m}$ 、 $45 \mu\text{m}$ ($30 \mu\text{m}$)) によって蒸留水で洗浄しながら、再度捕集し、粒子をビーカーへ溜めた。このサンプルを Fenton 試薬で酸化処理し、NaI 溶液で密度分離し、その上

澄みを集めた。355 μm 以上の粒子は目視により採取した。100 μm および 45 μm もしくは 30 μm のサンプルはそれぞれ PTFE フィルタ ($\phi 25\text{ mm}$ 、孔径 10 μm) に捕集した。355 μm 以上の粒子は、FTIR-ATR (FTIR-4600、Jasco inc.) により、フィルタに捕集された粒子は顕微 FTIR (IRT-7200、Jasco inc.) により、赤外吸光スペクトルを測定した。そのスペクトルをデータベース (KnowItall) と照合し、HQI 値が 60 以上のものをプラスチックと決定した。

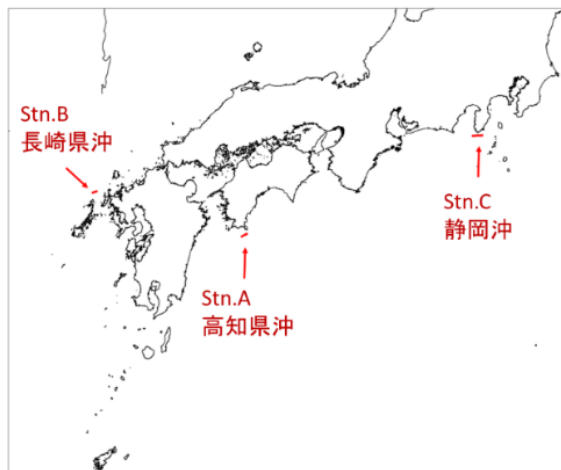


図 1-3 調査船研究室海水の分析海域 (2021)

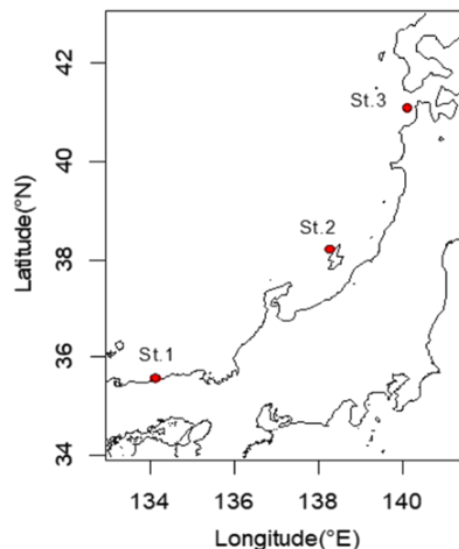


図 1-4 調査船研究室海水の分析海域 (2022)

さらに計測システムが完成後には船上で顕微ラマンのイメージング計測を行う必要がある。航行中の振動が計測へ影響を及ぼす可能性があることから、顕微ラマン光度計を搭載予定の船舶 (東京海洋大学神鷹丸) の航行中の振動を調べた。

③ カルボニルインデックス (CI) の計測 (2 年度および 3 年度計画) : プラスチックの劣化度の指標として CI はよく取り上げられる。しかし、MP に関する CI の情報は非常に少ないため、MP の劣化度の指標になるのかははっきりしていない。また CI は FTIR スペクトルを用いて分析されることが多く、ラマン光度計でのそれとの対応ははっきりしていない。そこで、(a) ラマン光度計と FTIR の CI の相違、(b) CI 算出時のベースライン補正、(c) MP のサイズと CI との関係について検討した。

(a) では、通常得られる CI の結果が FTIR の赤外スペクトル計測から行われることから、ラマン光度計で CI が同様に評価できるか検討した。ラマン光度計で計測した散乱光には伸縮振動による散乱が見られる。ラマン散乱は FTIR による赤外吸光の信号より小さい。また CI の算出手法としてさまざまな波数の比が提案されている。(表 1-1) これらの手法間で CI 値が対応するかを検討した。(図 1-5) この分析用サンプルは、図 1-6 の観測点で採取した。

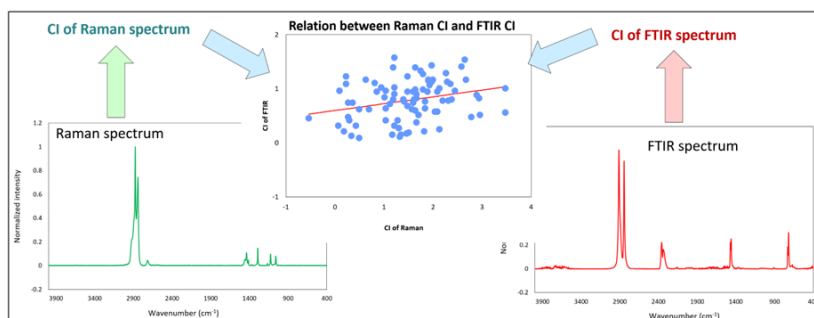


図 1-5 Raman スペクトルと FTIR スペクトルから求めた CI の比較イメージ

表1-1 CIの計算手法

Method ID	X_1/X_2	Spectroscopy	Reference
M-01	[1650 1850]/[1420 1500]	FTIR & Raman	Almond et al., 2020
M-02	1714/720	FTIR & Raman	Benítez et al., 2013
M-03	1720/720	FTIR & Raman	Focke et al., 2011
M-04	1713/730	FTIR & Raman	Antunes et al., 2017
M-05	1710/1380	FTIR & Raman	Ali et al., 2016
M-06	1714/1463	FTIR & Raman	Yeh et al., 2015
M-07	1714/1462	FTIR & Raman	Elanmugilan et al., 2014
M-08	1712/1472	FTIR & Raman	Jakubowicz et al., 2012
M-09	1740/2020	FTIR & Raman	Roy et al., 2005
M-10	1725/2722	FTIR & Raman	Carvalho et al., 2013
M-11	1296/1063	Raman	Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022
M-12	1296/1130	Raman	Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022
M-13	1296/1418	Raman	Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022; Reineccius et al., 2022
M-14	1296/1440	Raman	Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022
M-15	1296/1460	Raman	Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022
M-16	1296/2852	Raman	Phan et al., 2022
M-17	1296/2884	Raman	Phan et al., 2022



図1-6 CIの比較のサンプルの採取点

(b)では、通常のスペクトル計測した場合、そのスペクトルはノイズレベルが高く、CIの算出に使用する $1650-1850\text{ cm}^{-1}$ および $1420-1500\text{ cm}^{-1}$ 付近の信号の変化を捉えにくく、CI値が安定しない。ノイズを低減するため、ベースラインを補正することを検討した。

(c)では、MPが海域で次第に劣化し微細化するならば、MPのサイズとCIに負の関係があると想定される。しかしながら、現場海域のMPsにおいてCIがどのように変化するのかわかりにされていない。そこでCIがMPsの劣化の指標として使用できるか検討したMPsは2017年に日本沿岸海域で採取したものである。採取した点はSta. 1 (対馬海峡)、Sta. 2 (日本海)、Sta. 3 (沖縄沖)、Sta. 4 (銚子沖)、Sta. 5 (富山沖)、Sta. 6 (三陸沖)、Sta. 7 (東シナ海)であった(図1-7(a))。それぞれのMPの赤外吸光をFTIRにより測定した。さらにこのMPsの粒子サイズを顕微鏡で調べた。CIは、 $1850-1650\text{ cm}^{-1}$ および $1500-1420\text{ cm}^{-1}$ のエリアの比で求めた。(Almond et al., 2020) さらにSMPのCI計測を行った。図1-7(b)にSMPの観測点を示した。観測海域は東海沖と東京湾である。

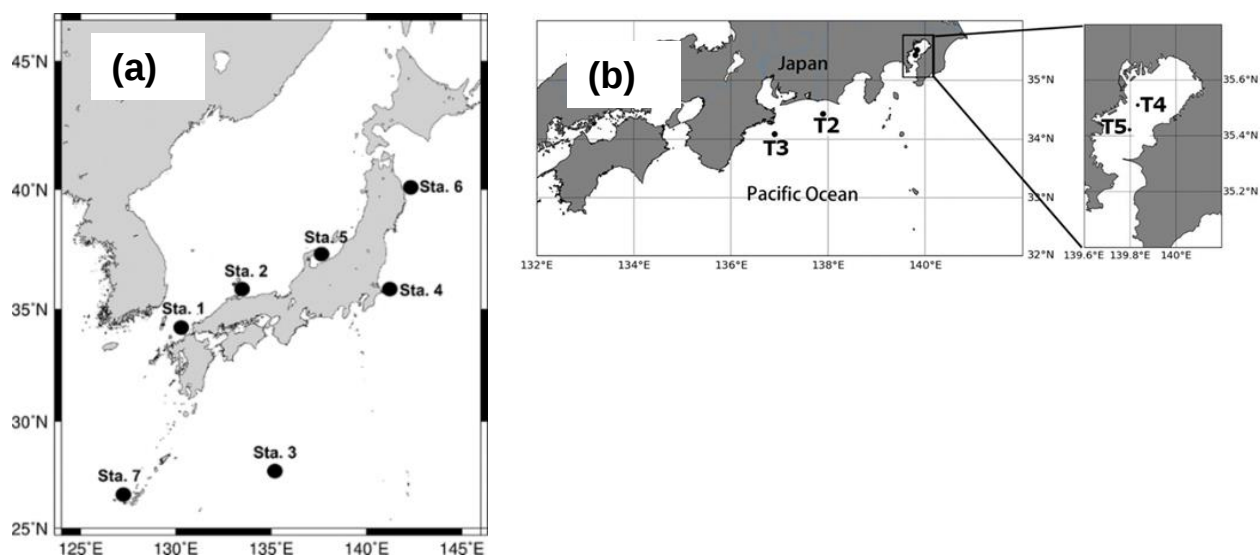


図 1-7 (図 0-5) MP サンプルの採取点

項目2 最後に、サブテーマ 1 およびサブテーマ 2 で得られた計測法およびシステムを船舶に搭載して現場海域の濃度観測を行った。観測は①2023年7月および②2024年2月の2回である。

観測①は2023年7月では長崎県佐世保から青森県までの間で行った(図1-8左)。このときはろ過システムが完成していなかったことから一部のみを搭載し、一部を手動で行い、サンプル海水を濃縮した。ろ過システムを約10時間運用し、1 m³の海水を約200 mLに濃縮し、さらにメンブレンフィルタ(孔径; 10 μm、PTFEフィルタ)で50-60 mLまで減量した。その海水を定量ポンプでガラスセルへ間欠的に送出し、顕微ラマン光度計で5000点のイメージ計測を行った。

その後、2段階のろ過システムが完成したことから(図1-9)、実験室内でSMPの回収試験を行った。回収試験では、100 μmおよび約300-350 μmの球形のPE粒子を用いた。

さらに観測②において、2024年2月に東京から紀伊半島沖までの間で完成システムを運用し、現場海域のMP濃度分析を行った(図1-8右)。ここでは2段階ろ過で50-60 mLまで減量された海水をポンプで直接ガラスセルへ送水し計測した。計測法は観測①と同じとした。

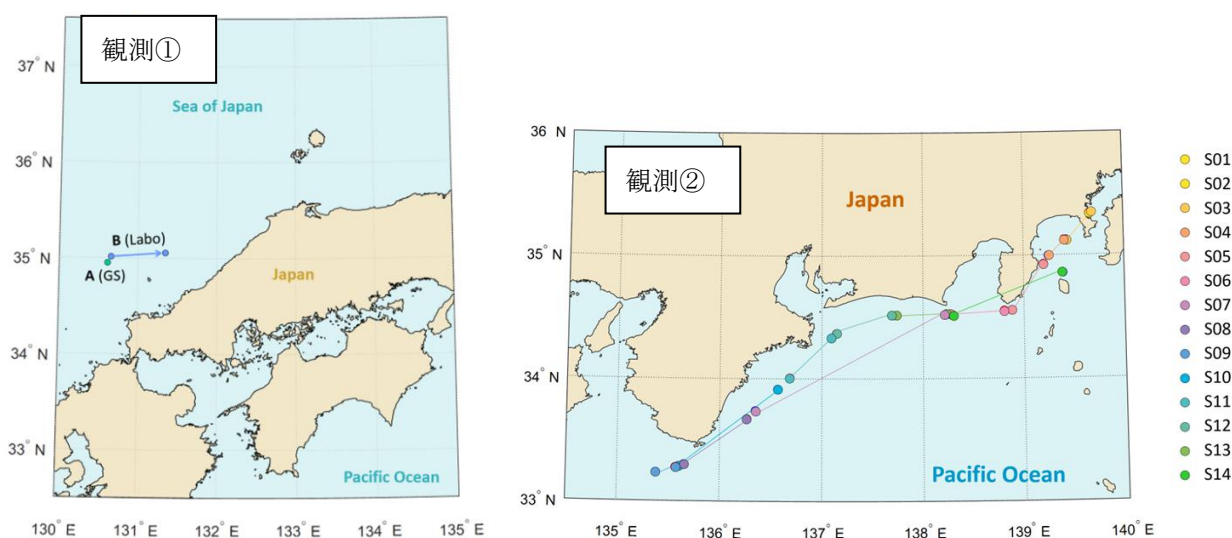


図 1-8 (図 0-6) システムを運用した観測点

観測①; 2023 年 7 月、観測②; 2024 年 2 月

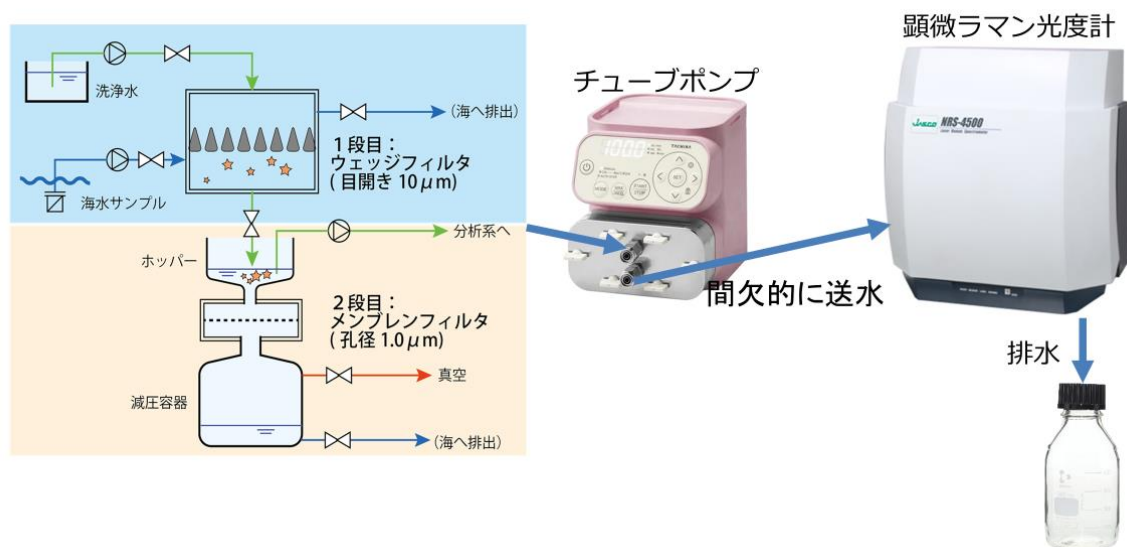


図 1-9 2 段階ろ過システムと統合した計測システム

表1-2 測定パラメータと推定マイクロプラスチック濃度

		LB sample
Sampling	海水量 (V_{sea})	850 L
	フィルタ孔径	10 μm
	分析用のサンプル量 (V_{sp})	54 mL
Raman imaging	Sub-sample count (I)	9
	Sub-sample volume (v_{sp})	0.0243 mL
	Total sub-sample volume ($\sum_{i=1}^I v_{\text{s}pi}$)	0.2182 mL
Naïve approach (PE)	総観測粒子数 (k)	2 pieces
	概算濃度 ($\hat{C}$)	582 pieces m^{-3}

4. サブテーマ1 結果及び考察

サブテーマ1項目1では、顕微ラマン分光光度計において連続的に計測するためのガラスセルの検討、計測条件の探索、計測方法の開発、および計測結果から粒径と劣化度（CI）を求める手法の確立を行う。このために、①顕微ラマン光度計の導入と計測条件の決定および計測手法の確立、②顕微ラマン光度計の船舶での使用条件の決定（船内へ取水されている海水のMPs濃度および顕微ラマン分光光度計への揺れの影響）、および③マイクロプラスチックの劣化度（カルボニルインデックス；CI）の計測法、海域におけるCIの変化を検討した。さらに項目2では、サブテーマ2のMP濃縮システムと統合し、現場海域のMPの濃度計測を行った。

項目1 ①：顕微ラマン光度計の計測条件は、(a)レーザー強度最大；41.4 mW、(b)露光時間；0.1 sec、(c)焦点位置；流路の上面から50 μmの位置とした。このことより、粒径50 μm以上のサイズの粒子に対して流路の広い範囲で検出できることが確認できた。ラマン光度計によるイメージング観測における、ガラスセルでの分析範囲、格子条件はセルの形状と計測時間から、それぞれ50×100回測定、100 μm格子とした。

次に顕微ラマン光度計を用いたMPsの検出・濃度計測について検討した。まず、スペクトルからMPを同定するワークフローを考案し、作業を整理した（図1-10）。

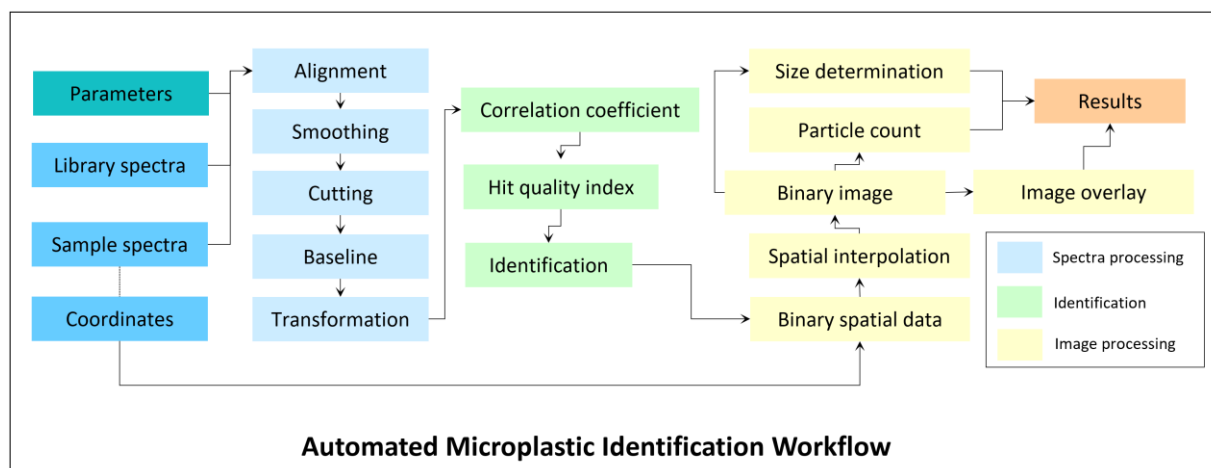


図1-10 ラマンイメージングによるMPs計測のワークフロー

さらに、ラマン分光計のイメージング計測で濃度を決定する方法を検討した。イメージング計測した場合、MPsの検出は粒子の断面積によって決定される。粒子の検出率 R は以下のようにあらわされる。

$$R = \begin{cases} \pi \left(\frac{d_e}{2}\right)^2 & 0 < d_e \leq 1 \\ \left(\pi - 4 \arccos \frac{1}{d_e}\right) \left(\frac{d_e}{2}\right)^2 + d_e \sin \left(\arccos \frac{1}{d_e}\right) & 1 < d_e \leq \sqrt{2} \\ 1 & \sqrt{2} < d_e \end{cases} \quad (1)$$

ここで、 d_e は等価粒子直径である。

この関係から、 d_e と検出率 R は図1-11のようになった。 d_e が大きいほど検出率が増加する関係が得られ、この関係は実験でも確かめられた。

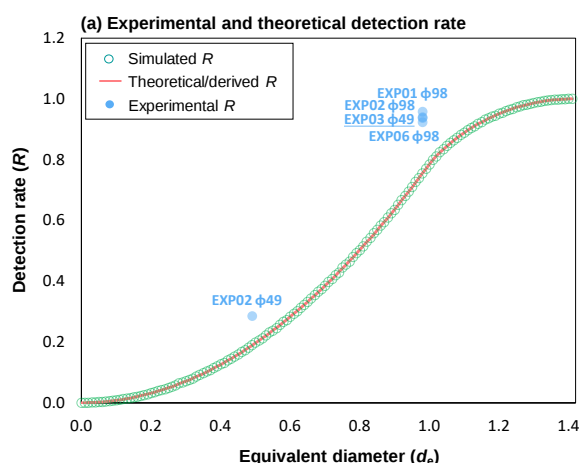


図1-11 粒子直径と検出率の関係

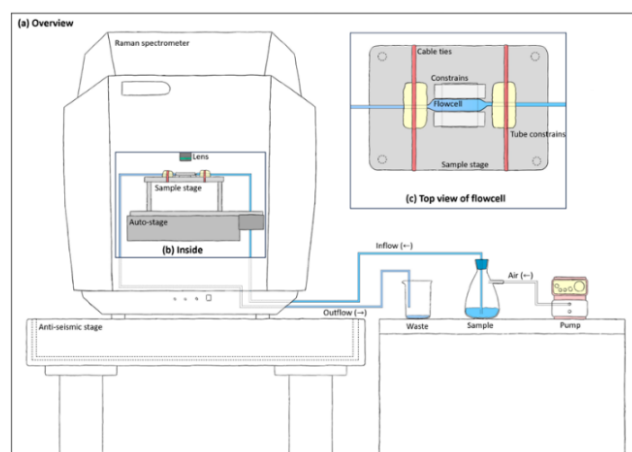


図1-12 計測システムの全体構成

これらの結果を踏まえて、ラマン光度計を用いたSMPの分析システムを作製した（図1-12）。海水中のMP濃縮部（サブテーマ2）で濃縮されたMP懸濁液をポンプで間欠的にガラスセルへ導入しセル内の5000点の100 μm 格子のイメージング計測を実施することでSMPのラマンスペクトルを取得する。このスペクトルとスタンダードPE粒子のスペクトルの相関をとり、PE粒子濃度を決定することが可能となった。（図1-13）

さらに、イメージング計測のできるラマン光度計は高価であることから利用範囲が限られる可能性が考えられる。そこで、イメージング計測によらないラマン分光計測法を検討した。本手法ではビーカー内にPE粒子を懸濁し、レーザーを照射してPE粒子の存在を把握する方法である（ビーカー法；図1-14）。この結果、水中のPE濃度が高いほど標準PEに近いスペクトルが得られた（図1-15）。

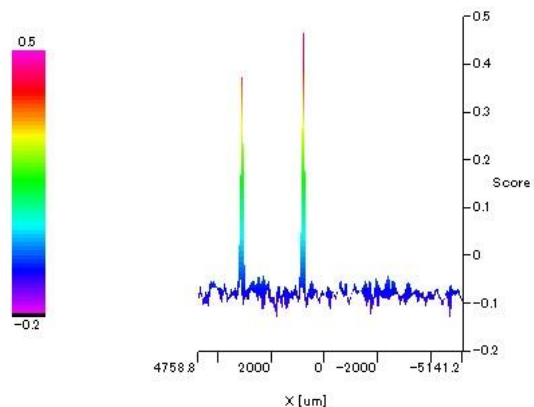


図1-13 連続的な計測によって検出されたPE粒子

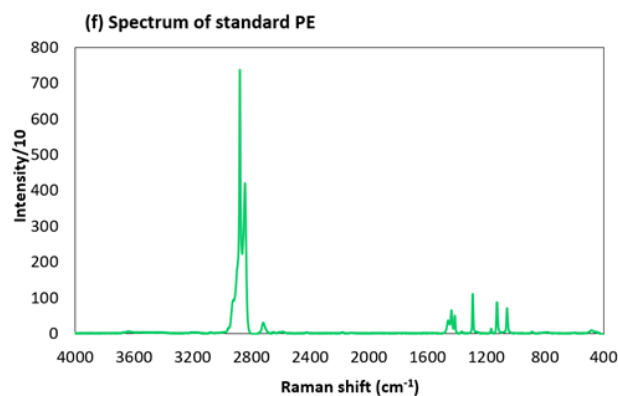
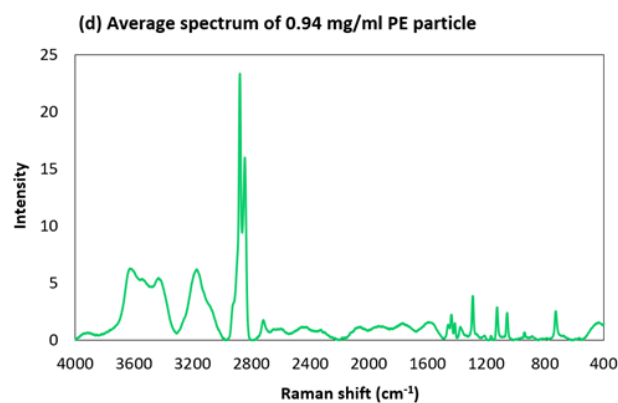


図1-15 ビーカー法によるPEの信号

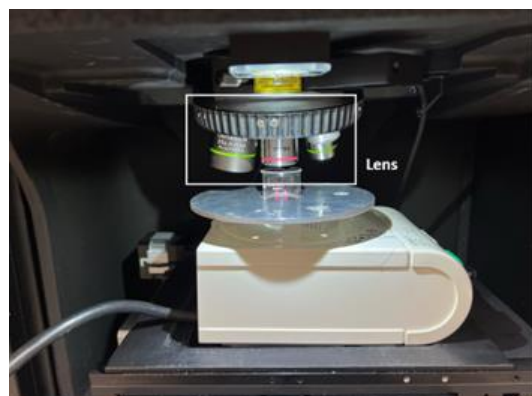


図1-14 ビーカー法の計測の様子

項目1 ②顕微ラマン光度計の船舶での使用条件の決定

当該船舶の研究室海水の、30 (45)–350 μm のサイズのSMPsの濃度は海域A、B、Cでは100–660 個 m^{-3} 程度であった。一方、日本海側のSta. 1、2、3では、1330–4360 個 m^{-3} であった。(表1-3)

これらのSMPの主なポリマータイプはPEであった。このことから、顕微ラマン光度計による現場サンプルのスペクトルデータとPEのスペクトルとの相関を取ることで、連続データからPEのマイクロプラスチックの濃度が把握できると考えられた。

表1-3 研究室海水のSMPs濃度

Station	Sea area	MPs concentration (pieces m^{-3})		
		> 45 μm	> 100 μm	> 350 μm
Sta. A	高知沖	61	39	0
Sta. B	宮崎沖	244	72	0
Sta. C	長崎沖	305	356	2
Station	Sea area	MPs concentration (pieces m^{-3})		
		> 30 μm	> 100 μm	> 350 μm
Sta. 1	鳥取沖	1273 $\pm$ 379.0	57.1	0
Sta. 2	佐渡沖	2779 $\pm$ 720.9	373.3 $\pm$ 229.4	0
Sta. 3	津軽半島沖	3633 $\pm$ 1796	733.3 $\pm$ 660.0	0

つぎに、船舶の動揺がラマン光度計へ影響するのか検証した。調査使用船舶（東京海洋大学神鷹丸）の研究室に設置された防振台上にラマン光度計相当の錘を配置し、その揺れを加速度計で計測した。観測は2022年2月2日–10日の実習航海時に実施した。調査海域は尾鷲沖、高知沖、および新宮沖とした。計測基板で計測した角速度を高速フーリエ変換(FFT)で解析した。サンプリングレートは100 Hzであったため、船舶の横揺れ計測には十分である。今回の計測では、計測時間が5時間のデータを用いてFFT解析を行った。FFTの解析は0–50 Hzの範囲で行われたが、1 Hz以上での反応がほとんど見られなかったため、周波数の範囲は0–1 Hzとした。神鷹丸において船の振動がラマン光度計の計測に影響しないことの確認のために防振台上での振動を計測した。防振台での固有振動は0.17–0.21 Hzであった。防振台が共振を起こす条件は約3 Hzであることから、共振によるラマン光度計の計測への影響は無視できると考えられた。(表1-4)

表1-4 航走中の防振台の固有周波数

	尾鷲沖	高知沖	新宮沖
横揺れ固有周波数[Hz]	0.209	0.171	0.179
ロール周りの固有周期[s]	4.78	5.84	5.58

項目1 ③カルボニルインデックス (CI) の計測:

(a) ラマン光度計とFTIRのCIの相違

CIについてFTIRによって得られた値とRaman光度計によって得られた値との関係を検討した。Sta. AではM-14からM-17で有意な相関係数であり、Sta. BではM-09とM-15で有意な相関係数であった。このことはラマン光度計でCIをもとめた場合、手法を限定することでFTIRと同様にMPの劣化度を示すことができるといえた。(表1-5)

表 1-5 (表 0-2) 各手法による CI 値の関係 (*; $P < 0.05$)

		M-01	M-02	M-03	M-04	M-05	M-06	M-07	M-08	M-09	M-10
<i>Station A</i>											
Raman	M-01	0.17	0.23*	0.23*	0.19	0.13	0.22	0.21	0.25*	0.22	0.05
	M-02	0.11	0.17	0.15	0.14	0.04	0.15	0.15	0.16	0.07	0.00
	M-03	0.20	0.18	0.17	0.13	0.08	0.18	0.17	0.21	0.29*	0.05
	M-04	0.13	0.06	0.06	0.02	0.02	0.09	0.07	0.09	0.09	0.00
	M-05	-0.03	-0.05	-0.05	-0.11	0.00	-0.04	-0.05	-0.02	0.04	0.10
	M-06	-0.05	-0.01	-0.01	-0.05	-0.04	0.01	0.00	0.03	0.04	0.15
	M-07	-0.05	-0.01	-0.01	-0.05	-0.05	0.00	-0.01	0.02	0.04	0.14
	M-08	0.03	0.10	0.10	0.05	0.09	0.14	0.13	0.13	0.18	0.09
	M-09	0.08	0.03	0.01	0.01	0.08	0.03	0.02	0.05	0.04	-0.10
	M-10	0.10	-0.03	-0.05	-0.10	-0.18	0.02	0.00	0.07	-0.01	-0.10
	M-11	0.10	0.24*	0.24*	0.23*	0.16	0.24*	0.24*	0.19	0.07	-0.13
	M-12	0.11	0.03	0.03	0.01	-0.02	0.05	0.05	0.07	-0.10	-0.16
	M-13	0.14	0.17	0.18	0.25*	0.31*	0.17	0.18	0.11	-0.01	-0.01
	M-14	0.27*	0.30*	0.29*	0.36*	0.38*	0.30*	0.31*	0.26*	0.24*	0.02
	M-15	0.29*	0.37*	0.37*	0.41*	0.42*	0.37*	0.39*	0.31*	0.23*	-0.05
	M-16	0.25*	0.29*	0.29*	0.34*	0.25*	0.28*	0.29*	0.24*	0.11	-0.08
	M-17	0.32*	0.35*	0.35*	0.41*	0.29*	0.34*	0.35*	0.30*	0.19	-0.10
<i>Station B</i>											
Raman	M-01	-0.16	-0.14	-0.14	-0.20	-0.39	-0.21	-0.21	-0.14	-0.07	-0.23
	M-02	-0.12	-0.18	-0.17	-0.14	-0.09	-0.21	-0.21	-0.20	0.06	-0.03
	M-03	-0.11	-0.16	-0.15	-0.14	-0.17	-0.19	-0.20	-0.19	0.06	-0.09
	M-04	-0.02	-0.10	-0.10	-0.15	-0.19	-0.16	-0.16	-0.07	-0.01	-0.10
	M-05	-0.07	-0.16	-0.15	-0.13	-0.11	-0.20	-0.20	-0.15	0.09	-0.11
	M-06	0.04	0.04	0.06	0.01	-0.02	-0.04	-0.04	0.05	0.07	0.09
	M-07	0.08	0.09	0.10	0.06	-0.01	0.01	0.01	0.09	0.10	0.11
	M-08	0.11	0.10	0.11	0.07	0.15	0.10	0.11	0.12	0.27	-0.04
	M-09	0.33	0.56*	0.56*	0.52*	0.14	0.46*	0.48*	0.53*	0.55*	0.35*
	M-10	0.14	0.12	0.13	0.02	-0.22	0.03	0.03	0.15	0.28	0.01
	M-11	0.23	-0.07	-0.07	0.07	0.21	0.11	0.10	-0.05	0.23	0.06
	M-12	0.15	-0.04	-0.05	0.08	0.23	0.02	0.03	-0.05	0.22	0.03
	M-13	0.07	-0.11	-0.12	0.02	0.28	-0.06	-0.04	-0.13	-0.10	0.04
	M-14	0.00	-0.17	-0.18	-0.06	0.20	-0.16	-0.15	-0.17	-0.08	0.01
	M-15	-0.12	-0.24	-0.24	-0.10	0.34*	-0.21	-0.19	-0.23	-0.16	0.04
	M-16	-0.14	-0.27	-0.28	-0.13	0.16	-0.25	-0.23	-0.28	-0.14	-0.13
	M-17	-0.11	-0.23	-0.24	-0.13	0.12	-0.23	-0.21	-0.25	-0.22	-0.11

(b) CI算出時のベースライン補正

ベースラインとノイズの標準偏差を推定するために、ダブルスライディングウィンドウ (DSW) 法を提案した。模擬スペクトルによる検証の結果、DSW法はノイズの標準偏差を正確に推定できることが示された。また、SNRとベースラインの組み合わせが異なる状況でも、ユーザーの介入なし（自動的）に確実にスペクトルを扱うことができた。実験スペクトルを用いた評価では、DSW法が様々な状況に対応できる安定した信頼性の高い性能を持つことが明らかになった。したがって、DSW法は、環境サンプルのラマンスペクトルの前処理や自動処理に推奨される。ベースライン補正の自動化によりCI値のばらつきを軽減できた。(図1-16)

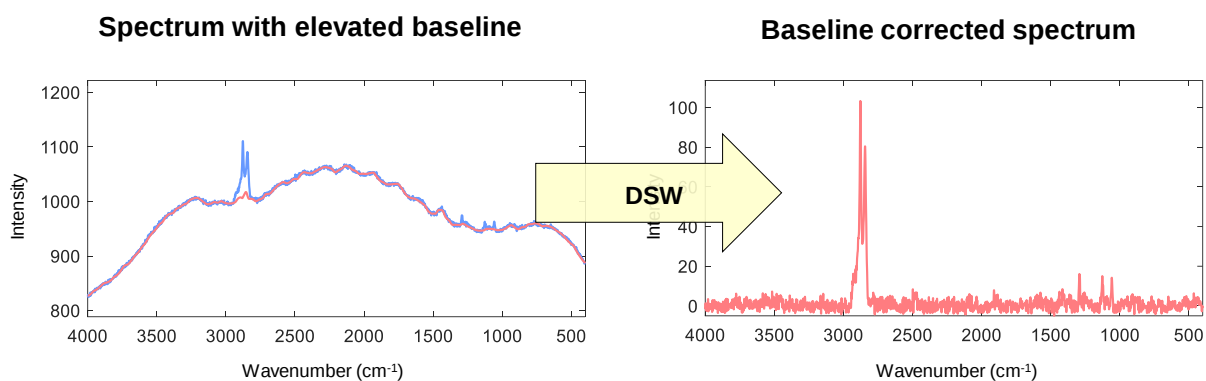


図 1-16 (図 0-4) ラマン光度計のスペクトルに DSW でベースライン補正を実施した例

(c) MP のサイズと CI との関係

日本沿岸海域の MP (PE) の CI は、0.55-0.79 であった。CI は房総半島沖や富山沖で高く、日本海で小さかった。一方 MP のサイズは房総半島沖や富山沖で小さく、日本海で大きかった。すなわち CI と MP のサイズには負の相関関係がみられた。このことから、CI は MP の劣化の指標として使用できると考えられた。(図 1-17) さらに、現場海域の微細な MP (SMP) の CI を求めた。海面の PE SMP の CI は非常に大きかった。このことは PP においても同様であった。これらのことから、現場海域の MP の CI はそのサイズと非常に良く対応していることが確認された ($p < 0.05$)。

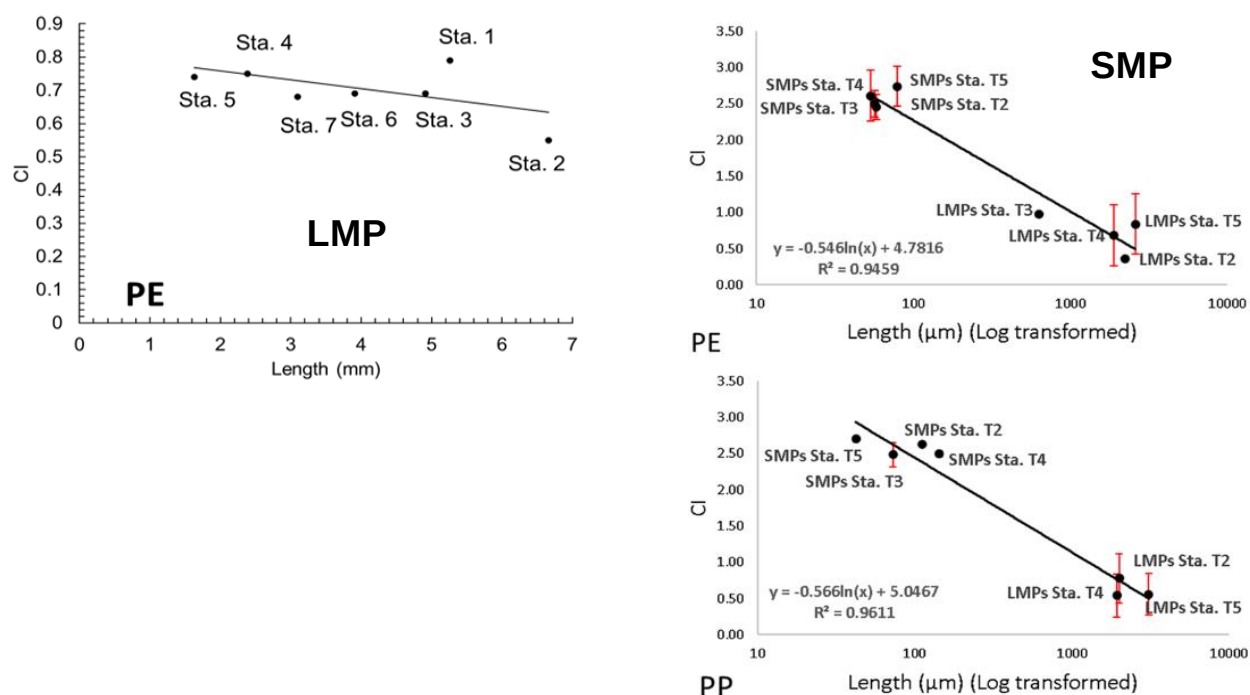


図1-17 (図0-5) 日本周辺海域の観測点およびMPsのCIとサイズの関係
左 ; LMP、右 ; SMP.

項目2 システム運用による現場海域MP濃度測定

観測①では、2 個の PE 粒子が検出された (図 1-18)。この結果をもとに 100-350 μm の PE 濃度を概算すると 582 個 m^{-3} と概算された。(表 1-2)

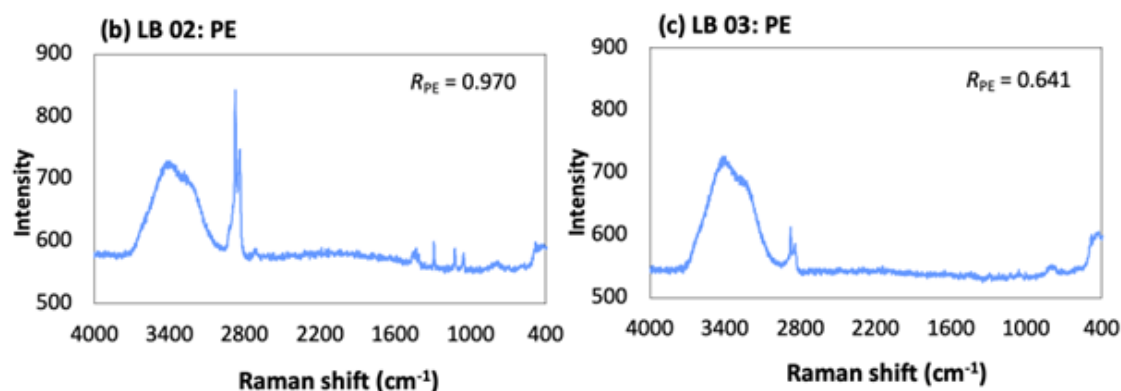


図 1-18 検出された PE SMP のスペクトル

観測①の後、2 段階濃縮装置が完成したのでサンプル回収の校正実験を行った。回収率は表 1-6 のような結果となった。2 段階濃縮システムから顕微ラマン光度計の検出までで、100 μm および 350 μm の粒子は 80-100 %の回収率があり、確実に計測できることが分かった。

表 1-6 PE 粒子を用いた回収率

実施例	ポリエチレン (PE)	回収率 (%)
1-1	250 μm ～300 μm 赤色着色	100.9 $\pm$ 20.4
1-2	250 μm ～300 μm 赤色着色	81.7 $\pm$ 22.1
1-3	250 μm ～300 μm 赤色着色	110.5 $\pm$ 19.2
1-4	250 μm ～300 μm 赤色着色	110.5 $\pm$ 28.0
1-5	250 μm ～300 μm 赤色着色	100.9 $\pm$ 7.2
2-1	90 μm ～106 μm 無着色	88.1 $\pm$ 10.9
2-2	90 μm ～106 μm 無着色	117.5 $\pm$ 9.9
2-3	90 μm ～106 μm 無着色	78.9 $\pm$ 10.3
3-1	300 μm ～355 μm 無着色	80.7 $\pm$ 20.7
3-2	300 μm ～355 μm 無着色	99.7 $\pm$ 15.9
3-3	300 μm ～355 μm 無着色	109.2 $\pm$ 12.6

さらに、観測②では図 1-8 観測②の航路で公開中に 14 回の採水・濾過を行い（各回 1 m^3 ）、ラマン高度計システムを運用し、現場計測を行った。その結果は PE 粒子 1 個の検出ができた。（図 1-19）またこの観測で得られた PE 粒子の CI_{Raman} は 0.77-2.73 (M-15 ; $\text{X1/X2} = 1296/1460$; Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022)であった。これらのことから、本観測システムによって現場海域での航走中での SMP 濃度の計測が可能であると言えた。

本報告では 10 μm の検出には触れていない。本研究では現場海域の 2 段階濾過の海水を用いて、格子間隔 10 μm として 5000 点計測を行った。しかしながら、10 μm の PE SMP は検出できなかった。この原因は以下の 2 つと考えている。一つはセルの深さである。50 μm 以上の粒子では深さ 500 μm のセルで検出した。10 μm の粒子の検出には 100 μm 以下の深さのセルでの検出する必要があると考えられる。また格子間隔を 10 μm とした場合、計測時間を同じ程度（約 1.5 時間；5000 点計測）とすると計測するサンプル量が非常に小さくなる。すなわち、さらなるサンプルの濃縮が必要と考えられる。

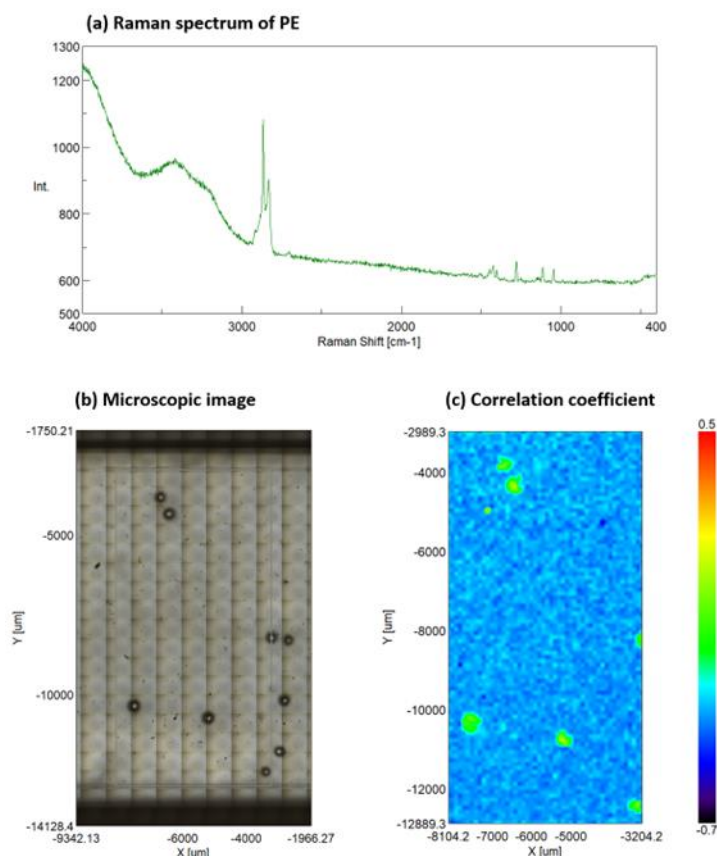


図 1-19 (図 0-6) 2024 年 2 月 (観測②) の検出スペクトル

5. サブテーマ 1 研究目標の達成状況

サブテーマ 1 では、顕微ラマン光度計の分析条件、サンプルセル、ポンプを決定し、分析システムを構築した。また劣化度の指標 CI の計測法、現場海域における MP のサイズと CI との関連を検討した。

1. SMP 濃度をラマン高度計システムで決定する手法を構築した。

顕微ラマン光度計、石英セル、定量ポンプの組み合わせにより、連続的な（バッチ式）濃度の計測システムが構築できた。計測はイメージングによる格子計測によって行われ、100 μm 粒子をターゲットとした場合、100 μm 格子の 5000 点計測 (100×50) で濃度が決定できる。イメージング格子計測による濃度計測手法を確立した。システムに導入される海水中の MP 濃度を明らかにした。このことにより、システムに導入する海水の求められる濃縮量が決定できた。

顕微ラマン光度計を用いた計測システムは目標通り構築できた。

2. CI の算出にベースライン補正を用いることで精度を高めた。ラマン光度計の計測結果を用いて CI 計測が可能かを検討した。FTIR 計測による CI と比べて有意な相関のある算出法を決定した。さらに CI 値を正確に見積もるためにベースライン補正の有用性を明らかにした。PE MP において、粒子サイズと CI が負の関係のあることを見出した。

CI をラマン光度計で測定する手法は目標通り構築できた。

3. サブテーマ 2 のろ過システムとラマンの分析システムを連続的に船上で運用し、SMP の濃度計測システムを完成した。本システムを用いた調査で日本海の PE SMP (ϕ 100 μm) の濃度は 580 個 m^{-3} 程度であり、その CI は 0.26-0.40 であることを決定した。しかしながら、濃度の精度を高めるため、ろ過システムから導入する海水の MP 粒子の濃縮をさらに進める必要があると考えられた。航走中の船舶の海水中の MP を濃縮し、連続的（バッチ式）に計測するシステムは目標通りの構築できた。MP 濃度の計測にはさらなる粒子濃縮が必要であると考えられた。

サブテーマ 1 付録

本報告では 10 μm の検出には触れていない。50 μm 程度までの粒子は現在のシステムで確実な計測が実現できた。しかしながら、30 μm 以下では明確な信号が得られにくくなった。これは格子イメージング計測を行う際にステージが移動し、それに伴ってセル内の粒子が動くことに起因すると感じられた。すなわち、この原因の一つはセルの液層の厚さにあるといえた。そこで、2024 年 2 月 3 日 Sta. 09（熊野灘沖）（図 1-8 観測②）の 2 段階ろ過水のサンプルを使って、10 μm サイズの MP の検出を試みた。

2 段階ろ過水サンプル 3 mL をガラススライド上に滴下し（図 1-20 (a)）、40℃で 24 時間乾燥した。その後、顕微ラマン光度計により 10 μm 間隔の格子測定(100 $\times$ 100 points)を行った（図 1-20 (b)、(c)）。スライドガラス上の連続した 6 領域を 5 か所（計 30 領域）計測した。

このサンプルから 2 粒子の PE が検出された（図 1-21）。この結果から 10 μm MP の濃度を推定すると約 690 個 m^{-3} と推定された。

本研究の目的はフローセルを用いて連続的な（バッチ）観測を行うことである。10 μm サイズの粒子の観測のためには液層の浅いセルによって観測が可能と考えられた。

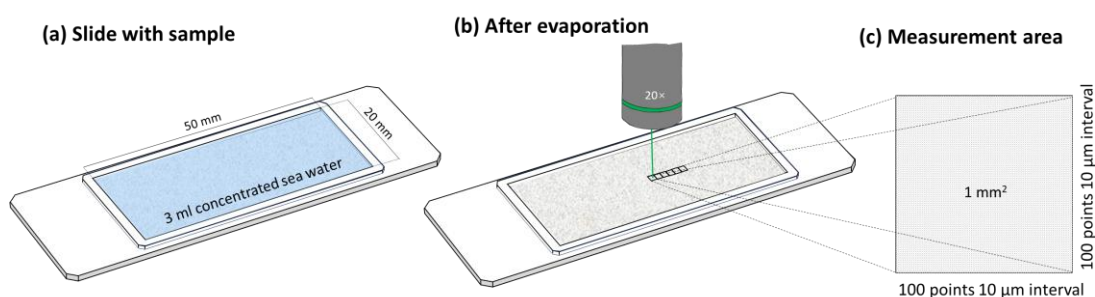


図 1-20 10 μm サンプルの測定準備と計測の様子

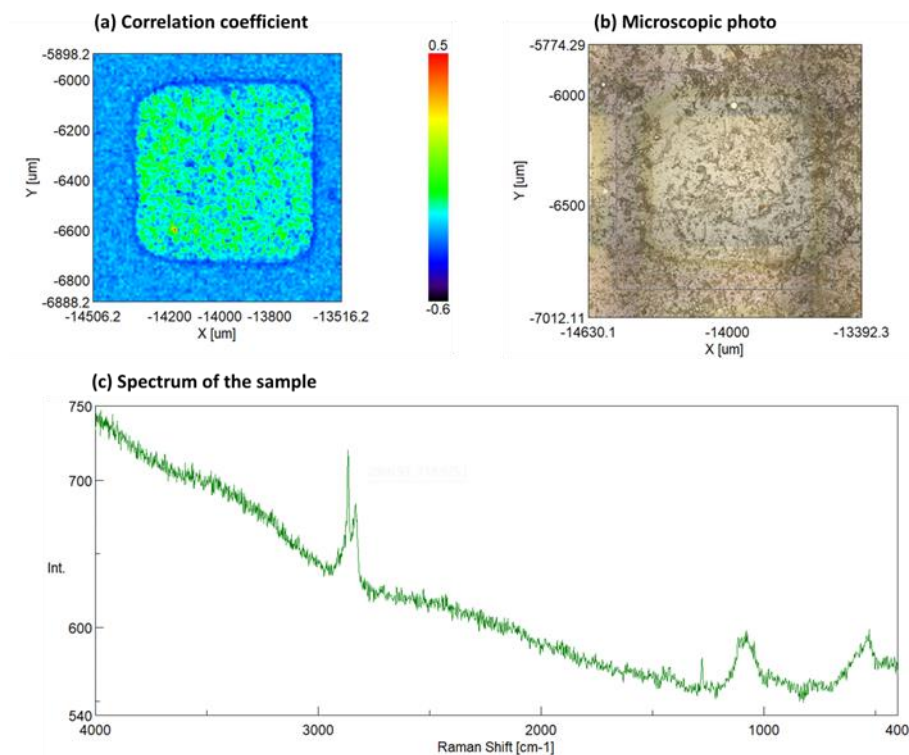


図 1-21 PE MP 信号の観測の一例

Ⅱ－２ サブテーマ２「ろ過システム部およびマイクロ流体システム部の開発」

〔サブテーマ２要旨〕

350 μm より小さなサイズのMP(SMP)の知見の集積を推進するため、大量の海水から粒子を捕集するためのろ過システムと、本分析に値する粒子を選別するためのマイクロ流体システムを開発した。

濾過システムは、1段目が目開き10 μm のファインウェッジストレーナ、2段目が孔径1 μm のメンブレンフィルタからなり、ステンレス製のハウジングに格納され、船舶への搭載も容易であった。豊洲運河（東京都江東区）の水を200 Lろ過して評価したところ、1段目濾過によって10 μm 以上の粒子を含む水約1.6 Lまで、2段目濾過を経ると液相を完全に除去するまで濃縮することができた。粒子はFenton反応、Nile Red染色され、流路への導入のため1 mg/L キサンタンガム水溶液10 mLに懸濁した。

マイクロ流体デバイスは、Nile Red染色され、マイクロ流路を通過する粒子の蛍光スペクトルに応じて2方向に粒子を分配して選別する機能を持つ。蛍光粒子が通過しスペクトル検出する領域は石英ガラスキャピラリーとした。後段の選別領域は、ネオジム磁石片が封入された透明アクリル樹脂(PMMA)製で、磁石片を外部から駆動することにより流れを2方向のいずれかに制御する。

蛍光顕微鏡上で検出領域を中心波長455 nmのLED青色光源により励起しつつ、上記懸濁液を流路へ10 mL/hの流量で1 mL導入した。蛍光分光スペクトルにおける特定の波長範囲での強度平均値が一定のしきい値を超えた場合、MPと判定して上記磁石片操作により分画した。蛍光マイクロビーズにて評価したところ、回収率は平均74.4%、豊洲運河で採取されたサンプルの粒子では平均55.6%であった。

ろ過システム部については、目標であった、船舶に搭載可能で、目開き10 μm のフィルタによる洋上での海水1000 Lの濾過が可能なシステムは達成されたと考える。

一方、選別システムは、現実のSMPsを精度よく分離するには課題があるものの、最近論文発表された同種のデバイスと同等以上の分離性能を生かし、課題解決を継続していくべきと思われる。

1. サブテーマ２研究開発目的

従前からの海表面のMPの調査は、主に目開き350 μm 程度のネットで粒子を捕集し、手作業で1粒子ずつ取り出すため、多大な労力と時間が必要なうえ、350 μm 以下の微細なMP（以下SMP）の濃度情報はほとんど得られていない。荒川（研究代表者）らは、350 μm および50 μm の二重のニューストンネットを開発し、広いサイズ範囲のMPの採取を行ったが、ネットを使用する以上50 μm 付近およびそれ以下の粒子は採取できていない。

そこで、350 μm より小さなサイズのMP (SMP)の知見の集積を推進するため、顕微ラマン分光光度計による分析システムへ自動でサンプルを導入するためのろ過システム部およびマイクロ流体システム部を開発する。開発すべきシステムは、以下に大別される。

- (1) 大量の海水から粒子を捕集するためのろ過システム
- (2) 顕微ラマン分光光度計測に値する粒子だけを選別するためのマイクロ流体システム

サブテーマ２研究目標

サブテーマ２	「ろ過システム部およびマイクロ流体システム部の開発」
サブテーマ２実施機関	芝浦工業大学
サブテーマ２目標	顕微ラマン分光光度計による分析システムへ自動でサンプルを導入するためのろ過システム部およびマイクロ流体システム部を開発する。ろ過システム部では、微細なマイクロプラスチック（10-350 μm ）を濃縮するシステム、マイクロ流体システム部では、濃縮された試料を顕微ラマン分析に最適に導入するシステムを完成する。

3. サブテーマ 2 研究開発内容

まず、各研究開発の内容の説明に先立ち、図 2-1に、本サブテーマにて確立した、サンプリングや処理の各段階のイメージを示す。海水はポンプでくみ上げられ、ウェッジフィルタで区画されたハウジングを通過することで、粒子をハウジングまたはウェッジフィルタ上に残留させる。粒子は逆洗操作によりハウジングから排出され、メンブレンフィルタによりさらに濃縮後、Fenton反応、Nile Red染色を経て、マイクロ流体デバイスでMP特有の蛍光スペクトルをベースにソーティングされる。ソーティングされた粒子が最終的に顕微ラマン分析の対象となる。なお、蛍光色素での染色時を除き、マイクロ流路に導入するための粒子は、液体に分散させた状態で処理、輸送、保管した。

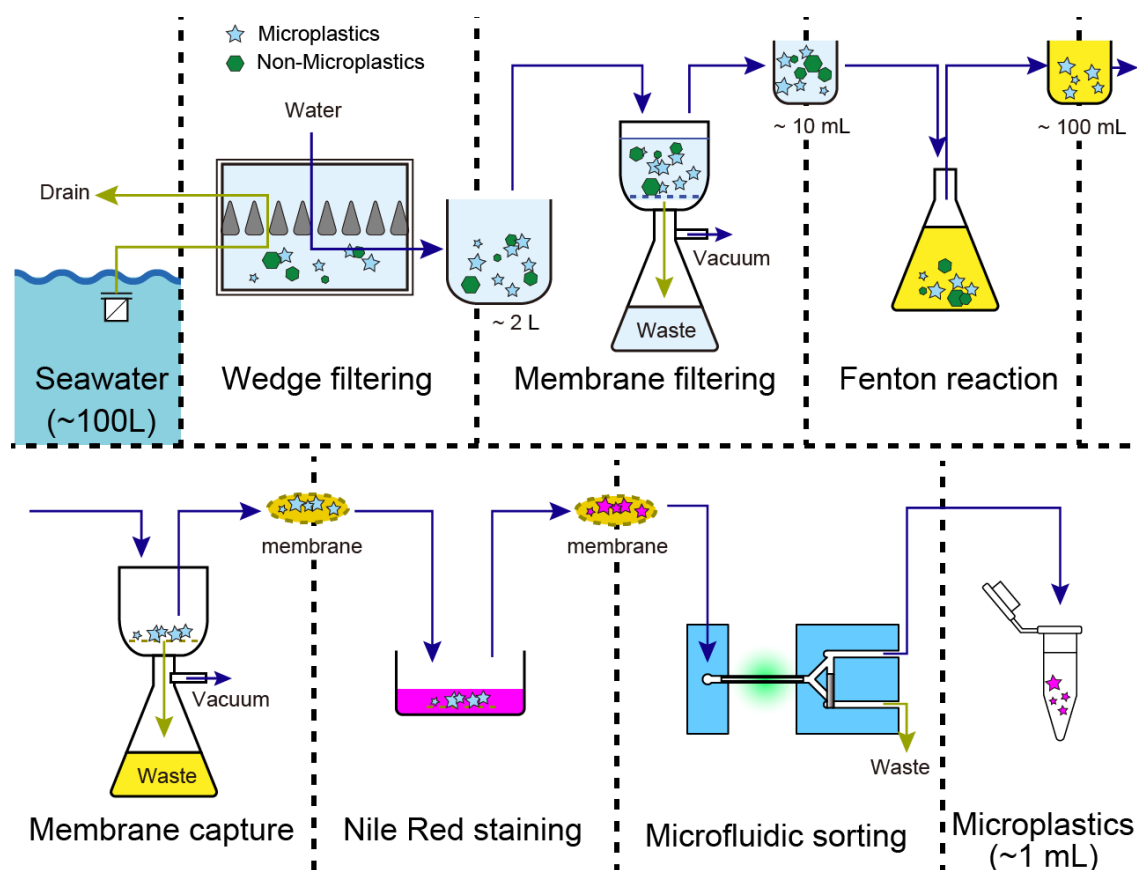


図 2-1 サブテーマ2にて開発した、海水からの粒子の捕集と SMP サンプル調製の流れ

3. 1 環境海水中の粒子を採取するためのろ過装置（初年度および2年度計画）

本研究においてターゲットとするMP粒子のサイズレンジは350 μm 未満であり、ニューストンネットのようなネットのメッシュサイズよりも小さい。しかも、粒子を回収するためには、当該ネットを取り廻す必要があり、濾過→粒子回収の処理を連続させることは原理的に極めて困難である。そこで、まず、ポンプを用いて海水をくみ上げ、それを濾過し、さらに粒子のみを回収する、これらのプロセスを、なるべく前段のプロセスを中断せずに実施できる方法を検討した。

当初の研究計画段階では、連続的に沈殿物を回収することができる遠心分離機を用いることも検討していた。粒子をその粒径に依存せず連続して回収できる意味では理想的であったが、重量と消費電力が大きく実験の機会が失われかねないこと、そして目的の粒子は海水よりむしろ比重が小さいこともあるということで、この方法の採用は見送られ、粒子分布と連続性という意味では制限が生じるものの、粒子の比重に依存せず回収が可能な濾過の原理を採用した。したがって、以下、SMPを回収する際にフィルタを用いて海水中の粒子をろ過する方法が有効であるとして研究開発を実施した。

MPとその他の夾雑物粒子を含む海水を大量にサンプリングするために、陸上ポンプまたは水中ポンプにより送液された海水をろ過し、ろ液を海に戻すことが可能なフィルタハウジングを中心としたサンプリング装置を製作した。図-2のように、海水をくみ上げるのとは別の独立したポンプから、ろ過時とは反対の向きに液体を流すことで、フィルタ表面に捕集された粒子を回収して外部に取り出すことが可能な構造とした。以後、このようにろ過と逆向きに流体を流す、英語でbackflushなどと表現される動作のことを逆洗とよぶ。逆洗は、装置の操作者が液体に直接触れることなくサンプリングを行うことを可能にすると同時に、フィルタの詰まりを解消してシームレスにろ過を再開できるようにするための操作でもある。

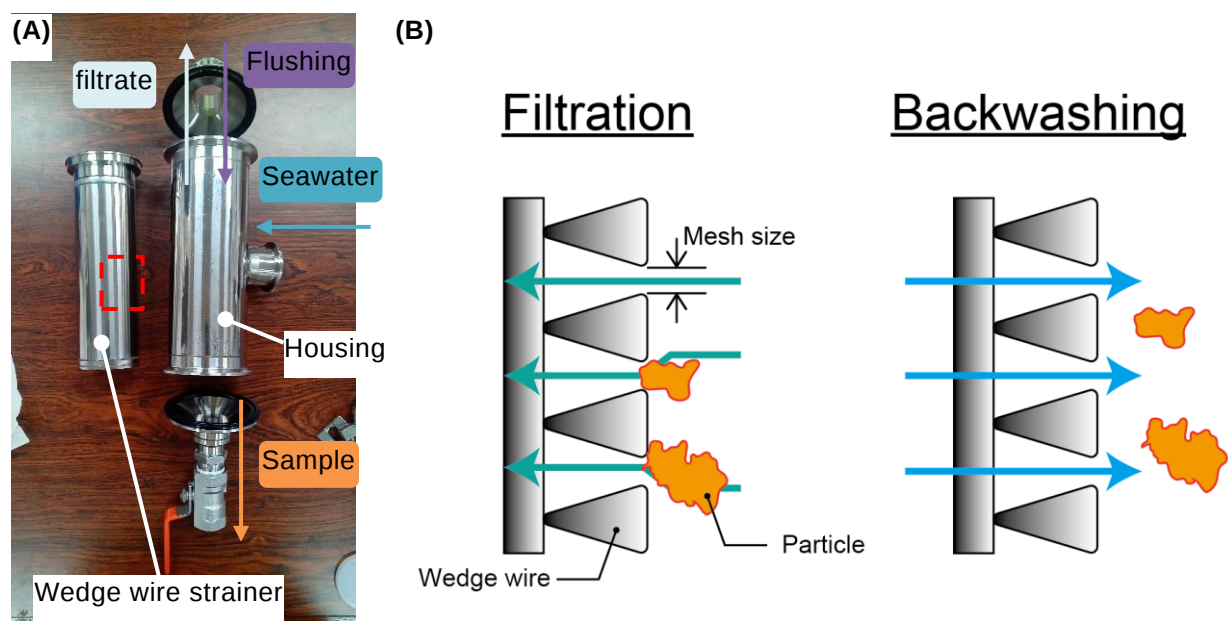


図 2-2 (図0-7) A) 海水のろ過と、ウェッジフィルタ表面の残渣の回収を液体に触れることなく実行できるハウジング。B) ウェッジワイヤストレーナの断面模式図と、ろ過、逆洗の概念

メインとなる海水ろ過のためのフィルタは、ファインウェッジストレーナ®（東洋スクリーン工業）をカスタマイズしたものを使用した。これはウェッジワイヤストレーナ¹と呼ばれるタイプのもので、断面形状がくさび型(wedge)であるようなワイヤーを支柱に巻き付けた構造のフィルタである。ワイヤーの間隔すなわちフィルタの目開きは、10 μm を選択した。これにより、捕集される粒子の大きさの下限は10 μm に制限された。上限については、目開き350 μm のフィルタを上流に配置することも考えられたが、管路抵抗の増大によりろ過時の流量が低下し、もともと希薄なMPを得るために多くの海水を処理したいという要求が満たせなくなると考え、配置しなかった。ただし、ポンプを使用した実際のサンプリングにおいて、最初に水を取り込む位置には別のストレーナがあり、5 mm～以上の粒子はブロックされる。

フィルタハウジングは、サニタリー配管で用いられるヘルール継手のT字管（チーズ）をカスタマイズしたものを、配管部品やバルブによって、ろ過前の海水の導入口、ろ液の排出口、逆洗用の流体の導入口、逆洗によりフィルタ表面から回収された粒子を含むサンプルを排出する出口が割り当てられた。フィルタ、ハウジングともに材料をステンレス（SUS303、SUS316）にし、サンプルへのプラスチック系の破片などが混入することによる汚染（contamination）を最小限に抑えた。

¹ 直線形状の支柱にワイヤーを並べた平板型のタイプはウェッジワイヤスクリーンとよばれる。

3. 2 実地での海水試料のサンプリング実験（2年度および3年度計画）

実際の環境から海水中に含まれる粒子をサンプリングするための実験を行った。サンプリングは、東京都江東区を流れる豊洲運河に面した船着場（35°39'40.8"N、139°47'45.2"E）で行った。運河を流れる海水は、まず海水ろ過用の陸上ポンプにより、フィルタハウジングに送られ、ろ過された。ろ過中にフィルタを通過する海水の流量は、流量センサを用いて計測し、Arduino互換のマイコンボードによってMicroSDカードに記録された。以下のような条件を実験的に決め、このうちどれか一つが満たされたとき、ろ過を停止する。

1. フィルタを通過した海水の累計体積が 100 L に到達する
2. 流量計の読みが 0 になる
3. ろ過を開始してから 15 分が経過する

ろ過停止後、逆洗用の陸上ポンプから水道水を送液して逆洗を実行し、フィルタに捕集された海水中の粒子を、水道水ごと容積約1.6 Lの容器に回収した。また、逆洗操作後、ろ過を再開し、同じ条件にしたがって、計5回のろ過と逆洗を繰り返した。

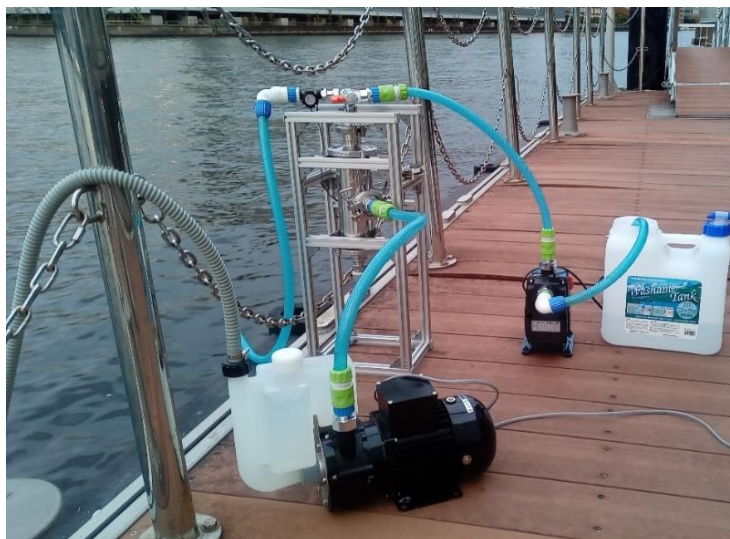


図 2-3 サンプル採取場所の豊洲運河（東京都江東区）において、2 台のポンプをろ過/逆洗で使い分け、数百 L の大容量の海水から粒子を 1.6 L 程度の水道水で洗浄・回収するサンプリングを行った。

3. 3 メンブレンろ過による海水試料の体積削減（3年度計画）

前項で述べた海水ろ過・粒子サンプリング装置では、MP粒子とその何倍もの量の有機物粒子・砂などが、フィルタハウジング内に残留した海水と水道水が混合された約1.6 Lの液体の中に分散した状態で回収された。しかし、このオーダーの体積のサンプルをマイクロ流路に導入しても、MPに遭遇できる確率は相当に低い。また、このあとMPの純度を上げるために行う物理・化学的処理においても、試薬の消費量を無意味に増加させることになる。したがって、回収したサンプルから液相をできるだけ除去し、固体の粒子をなるべく小さい体積の液体に分散させる、濃縮の操作が必要であった。

先述の逆洗などによって採取された数Lのサンプルをメンブレンフィルタ²によりろ過、濃縮するため

² 数 μm ～数百nmの孔径（ポア径）をもつ膜状のフィルタ。たとえば細胞培養に用いられる培地のろ過など、液体中の微小な粒子を除去して清澄化するのに用いられる。ふつう、専用のフィルタホルダやアダプタなどがセットになったユニットにメンブレンをセットし、真空ポンプなどフィルタの2次側を減圧する装置によって、負圧でサンプルをろ過する。

に使用した、ステンレス製吸引ろ過装置を図 2-4に示した。メンブレンについては、材料、孔径、直径について様々なラインナップがあるが、本装置においては、ポリカーボネート（PC）製、孔径 $1\ \mu\text{m}$ 、直径 $\phi 90\ \text{mm}$ のメンブレンを採用した。孔径・直径（表面積）ともに比較的大きい方に合わせ、多くの海水をろ過できるようにした。

ウェッジフィルタろ過装置からの回収で得られた約 $1.6\ \text{L}$ のサンプルは、以下のような手順で粒子を純水に分散することによって、約 $10\ \text{mL}$ にまで濃縮された。

1. 組立（フィルタホルダにメンブレンをセット、ホッパーをヘルールクランプで固定、吸引ポートと真空ポンプを硬質チューブで接続）
2. ホッパーに、逆洗により得られた海水サンプルを注ぎ、減圧濾過により、メンブレン上の水がすべてなくなるまで吸引する
3. $15\ \text{mL}$ コニカルチューブに純水 $10\ \text{mL}$ と、回収したメンブレンを移す
4. コニカルチューブをボルテックス($2000\ \text{rpm}$)で振動攪拌して粒子を純水に分散させる

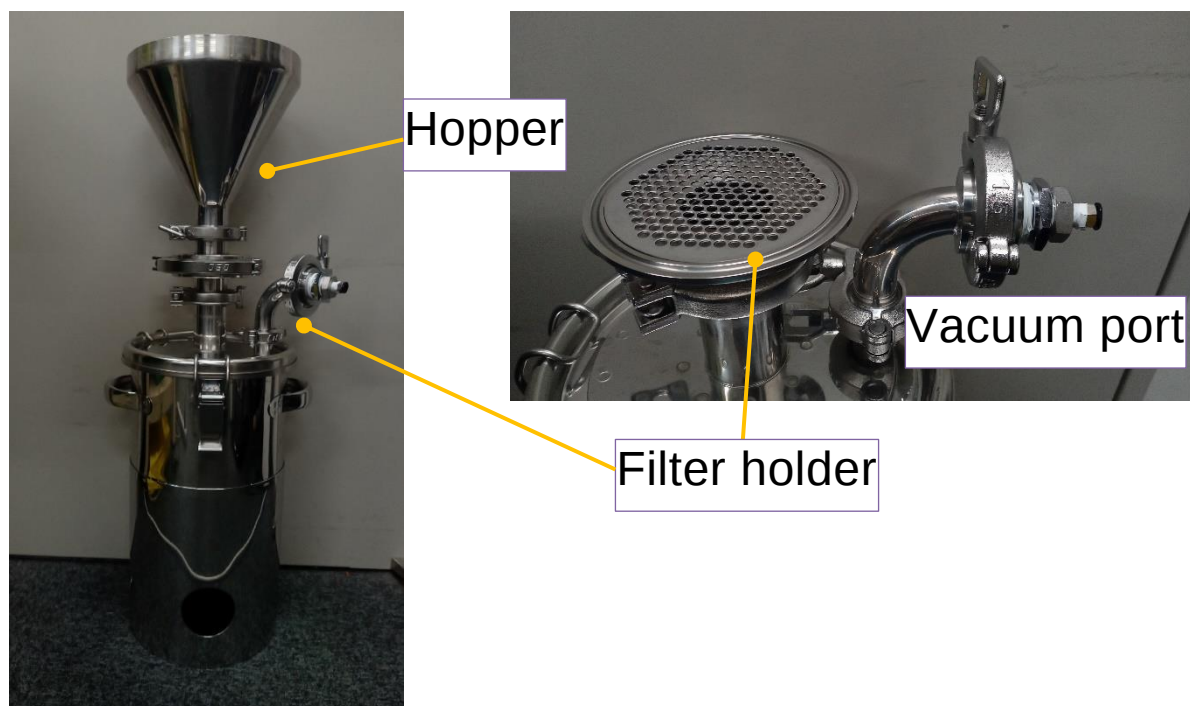


図 2-4（図0-7）海水試料をろ過し、粒子を濃縮するためのメンブレン吸引濾過ユニット。

3. 4 試料中粒子の密度分離と有機物酸化処理（3年度計画）

海水中にはプランクトンなどの大量の有機物粒子が含まれているため、化学的な処理によりこれらを分解し、目的の粒子であるプラスチック粒子の濃度を高める必要がある³。そのため、メンブレンろ過により得られた、海水由来の粒子を含む液体のサンプルに対しFenton反応による酸化処理を行った。

さらに、MP粒子より比重の大きい砂などの無機物を除去するため、密度に基づいた粒子の分離も行った。ポリマー種によりMP粒子の密度はさまざまであった。本研究においては、MPの中でも存在比率が特に多いことが報告されているPE、PSやそれに密度の近いプラスチックを分離するため、サンプルにNaClを溶解させることで分散媒の比重を大きくし、静置してMPを浮上させる方法をとった。また、密度分離を先述のFenton処理よりも後に行うことで、MP粒子の表面に付着したバイオフィルムの影響

³ マイクロ流路内でMPの存在を検出する際に、全体として粒子数が多いために相対的に遭遇率が低くなるばかりでなく、後述の蛍光色素が結合しやすい脂質などを含む有機物が残留していると、蛍光センシングによるそれらとMPの弁別もより困難になるため。

によって粒子全体での密度が高くなり、分離時に損失するリスクを回避しようとした。

Fenton試薬による有機物酸化処理と粒子の密度分離を行うために、以下に示す手順を実行した。

1. Fenton 試薬（体積比 1 : 1 の、5 M H_2O_2 と 50 mM FeSO_4 ）を調製する。
2. Fenton 試薬と海水由来の粒子を含むサンプルを、ビーカーで等量混合する（Fenton 試薬の終濃度はそれぞれ 1.25 M、12.5 mM）。
3. 小さな穴をあけたアルミホイルなどで蓋をし、室温で 24 時間静置する。
4. Fenton 反応後のサンプルに NaCl を飽和するまで少しずつ加え⁴、10 分程度静置する
5. セロロジカルピペットを使い、ビーカーから別の容器に上清を移す

3. 5 蛍光色素による試料中粒子の染色（初年度および2年度計画）

環境の海水中から採取した多数の粒子の中からMPの存在を検出する（蛍光標識する）ため、蛍光色素Nile Redによる染色を実施した。ここまで、サンプリングされた粒子は液体に分散させた状態であった。しかし、蛍光染色については、先行研究によりMPの検出にもっとも効果的な濃度や温度の調整を含む、手順（プロトコル）が報告されていた⁵。その条件にできる限り近づけられるよう、サンプルから液相を除去する工程が含まれた。

Nile Redによる粒子の染色は、以下の手順にしたがって行った。

1. 密度分離が終わった粒子を含む液体のサンプルをファンネルに入れ、減圧濾過により、メンブレン上に液体がなくなるまで吸引する
2. ピンセットなどで、粒子が捕集されたメンブレンを金属またはガラス製のディッシュに移す
3. $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Nile Red をマイクロピペットに $200 \mu\text{L}$ とり、メンブレン上の粒子がまんべんなく染色されるよう全体に滴下する
4. ホットプレートにディッシュを移し、アルミホイルなどで蓋をして 60°C で 10 分間保温する⁶
5. 15 mL コニカルチューブに純水 10 mL を加え、メンブレンを移す
6. コニカルチューブをボルテックス（2000 rpm）で振動攪拌後、ピンセットでメンブレンを取り出す

3. 6 MPの検出と分離のためのマイクロ流体デバイスの設計（初年度および2年度計画）

海洋SMPsの分析の効率を向上させるためには、試料中の興味の粒子の濃度を上げることが求められる。そのためのマイクロ流体デバイスに求められる要件を以下に示す。

- 目的粒子(SMP)の輸送媒体としての液体サンプルを通過させることができる流路をもち、対象の粒子を、なるべく少ない体積の液体と共に特定の位置へ分離することができる。
- 液体サンプルの中から、目的粒子(SMP)の存在を検出することができる。

一方、本研究の目的を達成する上では、以下のようなことを考慮しなくてはならない。

- 環境中から採取された MP 粒子をターゲットとしており、流路内を通過する粒子の寸法、形状を予測することが難しい

⁴ この時点でサンプルは純水ではなく、溶質となるNaClは、純水の室温下の溶解度で示されるほど多く溶けないため、NaClは数百mgずつ注意深く加え、固体の残留を確認した時点で投入を停止した。

⁵ MPの蛍光標識においては、強い蛍光強度、輝度が得られることが、非プラスチック粒子との弁別において重要となる。本研究では、Nile Red（固体）を、エタノールとアセトンの等量混合溶媒に溶かし、染色後 $50\sim 60^\circ\text{C}$ で保温した

⁶ 加温により蛍光強度を高くする目的のほか、残った液体Nile Redが溶出し、このあとマイクロ流路に導入する際に、粒子の輸送媒体まで蛍光をもってしまう現象（バックグラウンド蛍光）を防ぐために乾燥させる目的がある。

- 粒子の大きさや密度ではなく、材質に基づき分離したい

よって、粒子の寸法のばらつきを許容するため、流路全体で見た時流線が一部だけ変わるように、粒子を局所的に分離するのではなく、流線をすべてシフトさせ、一定体積の液体ごと粒子を輸送し、1個1個の流体力学的特性に左右されないよう確実に分離するような形状を検討した。

以上から、流路の断面寸法を $\square 1\text{ mm}$ （1辺 1 mmの正方形）に設定し、その断面積を維持しながらパスが途中で2つに分かれる(z軸方向で見た時Y字形状となる)ようにした。何らかの機構により流路内の液体の流れを変化させ、分岐した2流路のうち特定の一方に誘導、粒子を集積することが可能な設計とした。

3. 7 粒子分離の機構（初年度および2年度計画）

次に、2つに分かれた流路のうち、特定の一方に流れの方向を切り替えられるようなバルブを検討した。方法としては、以下のようなものが考えられた。

1. 流路の材料を PDMS のようなエラストマーとし、流路壁を外部アクチュエータで変形させることで、流路を閉塞する
2. 流路を塞ぐような別の物体を挿入し、外力で操作する

流路断面が $\square 1\text{ mm}$ とマイクロ流路の中では比較的大きいことから、PDMSなどの変形でこの断面を完全に閉塞することは難しく、2.のように何らかの独立した部品が流れを遮るゲートのような機構が有効であると考えた。そこで、直方体のゲートを流路内に埋め込み、その運動により2つの流路を交互に閉塞するような機構のバルブを実装することとした。

また、ゲートをアクチュエータなどの外力によって駆動する方法についても検討した。通過する液体の中の粒子を分離するにあたっては、流路は閉鎖空間であることが望ましく、漏れが生じるような加工は極力避けた。したがって、直接ゲートとアクチュエータが接触しない駆動方式として、磁力を利用した駆動を採用した。具体的には、ゲートに図2-5に示すような、 $1\times 1\times 5\text{ mm}$ の市販の直方体のネオジム磁石ピンとし、流路外部の磁場を変化させて非接触でゲートを駆動する方式とした。分岐した2つの流路のうち片方を交互に閉塞できるよう、磁石ピン長手方向に摺動可能な溝を流路間に設け、埋め込んだ。

さらに、前項で述べた磁性体ゲートが、外部磁場の変化に応じてゲートが止まることなく追従するように、適切な流路の材料を選定した。PDMSでは摩擦力が大きく、外部磁場を変化させても磁性体ゲートが変位しにくいという問題が発生したため、流路の材料にはより摩擦力の小さいPMMAを採用した。よって、流路の溝および流路への液体導入口となる穴は、PMMA板への直接のCNCフライス加工により製作した。一方、蛍光センシングの対象となる領域、すなわちFOVにおいては、バックグラウンド蛍光を低減するため、染色されにくい石英ガラスにすることとした。既存のPMMAの部分と組み合わせやすい、外径が $\square 1\text{ mm}$ 、内径が $\square 0.5\text{ mm}$ であるような矩形のガラスキャピラリーを採用し、組み込む設計とした。

最終的に、図 2-5のように、厚さ3 mm、幅16 mmの亚克力板の流路層を、それぞれ長さが6 mm、15 mmとなるようInlet側とOutlet側の2つに分割し、磁性体ゲートとガラスキャピラリーを間に差し込んだ状態で、長さ52 mm×幅18 mm×厚み1 mmのスライドガラス層と溶剤接着により接合したチップ形状のマイクロ流体デバイスとなった。

3. 8 マイクロ流体デバイスと蛍光検出による粒子選別（2年度および3年度計画）

検出、分離されるべき粒子の進入するイベントに合わせて、図 2-6Aに示すように流路チップ内に埋め込まれた磁石ピンのゲートを駆動して、流れを制御するシステムを構築した。具体的には、アクチュ

エータの選定、実装と、粒子検出システムの実装である。

- 蛍光色素で染色された環境試料由来の粒子の中から、MP 粒子であることを強く示唆するような蛍光をセンサにより検出するための光学系

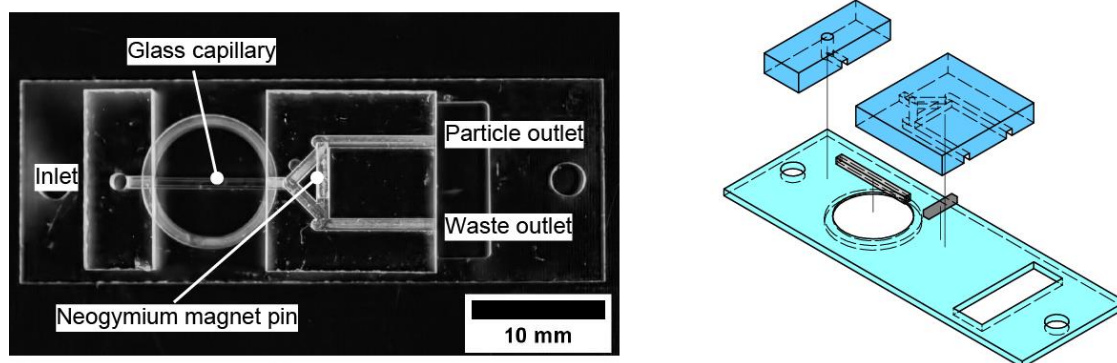


図 2-5 粒子分離のための、分岐部と流路閉塞ゲートをもつ、PMMAプラスチックベースの流路チップ。粒子検出のFOVとなる部分にはガラスを用いることで、光学的なノイズを低減した。

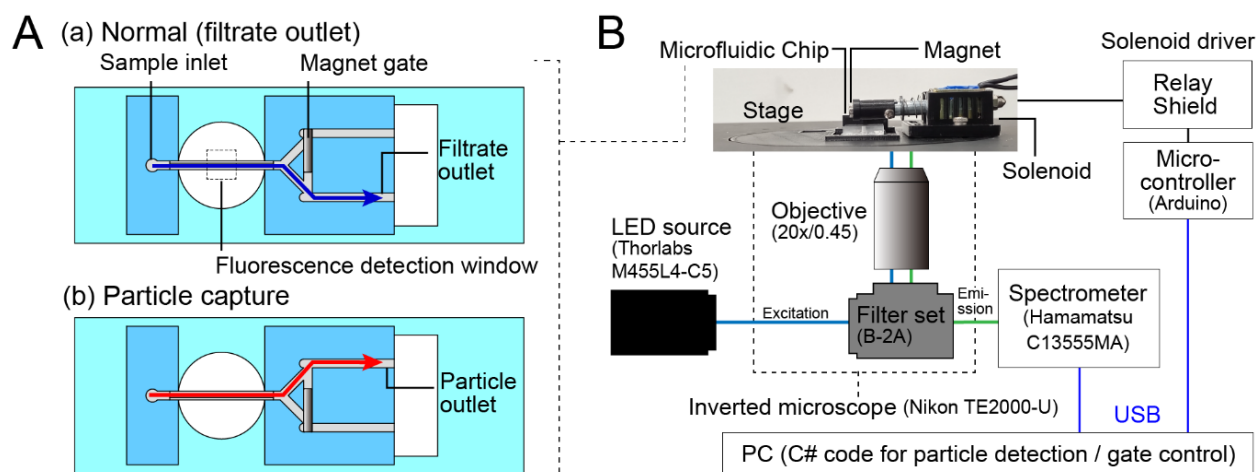


図 2-6 A) マイクロ流体選別の原理。B) マイクロ流路上での粒子検出・分離系。

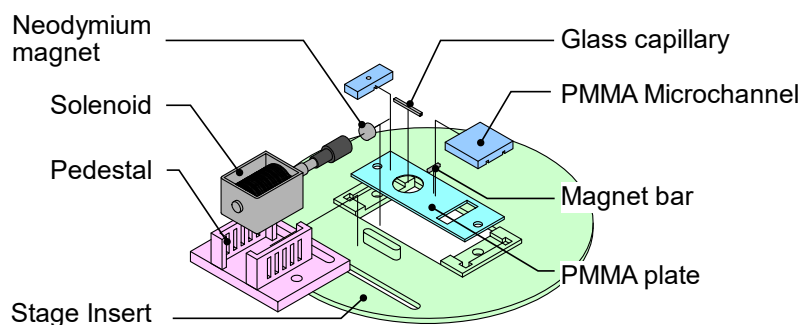


図 2-7 (図0-8) チップやソレノイドを固定するために顕微鏡のステージにはめ込んで使用するステージインサート。ソレノイドを固定するための台座は、レールにまたがりスライド可能な構造とした。

3. 9 目的粒子の検出に応じてゲートを駆動するための制御系（初年度および2年度計画）

以上を含む一連のシステムのブロックダイアグラムを図 2-6Bに示す。蛍光顕微鏡のサイドポートより分光器経由で蛍光分光スペクトルを取得した。PC上のプログラムにより、取得された蛍光の情報に

基づき分離対象の粒子かどうか判定し、マイコンボードへゲートを駆動するための制御信号を送る。

流路チップ内に埋め込まれた磁性体ゲートは、真上をオーバーラップしながら移動するネオジム磁石の引力により流路内を摺動させた。ネオジム磁石を直線運動させるために、市販のプル型ソレノイドを用いた駆動システムを作成した（図 2-7）。

3. 10 MP粒子の存在を検出するための分光スペクトルの処理（3年間継続計画）

本研究の目的は、MP粒子(目的粒子)とそうでない粒子(夾雑物粒子)が混在するサンプルの流れの中から、目的粒子のみ分離できるデバイスを開発することである。ここで、先述のように、先行研究により Nile Redのような一部の蛍光色素は、海水中に含まれる粒子のうちMP粒子のみに、特異的に蛍光を付与することが知られている。したがって、ここに、「サンプルからMPを分離する実験」は、「サンプルからMPであることを示唆する蛍光を発する粒子を分離する実験」に置き換わったといえる。以後、染色され蛍光発光するようになったMPのことを単に蛍光粒子と表記する場合がある。

市販のプラスチック製品などから切り出した5種類のプラスチック片をNile Redにより染色し、分光器で図 2-に示したような波形を得た。そのピーク波長（信号強度が最大値を取る波長）について、大まかに波長が短いグループと長いグループの2つに分類した。この分類をもとに、以下のように表される、特定波長範囲の平均蛍光強度に対するしきい値の基準によって、MPの存在を判定した。

$$\frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I d\lambda}{\lambda_2 - \lambda_1} > 1000 \text{ または } \frac{\int_{\lambda_3}^{\lambda_4} I d\lambda}{\lambda_4 - \lambda_3} > 1000$$

ここで、 I は蛍光強度（A/Dカウント⁷）であり、 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 、 λ_4 はそれぞれ571.76 [nm]、601.18 [nm]、601.18 [nm]、631.00 [nm]に相当する分光スペクトルデータの配列のインデックス番号である。FOVの分光スペクトルがこの条件を満たした場合、磁性体ゲートが駆動される。以降、断りがない限り対物レンズは20倍（Nikon Plan Fluor ELWD 20x/0.45）、分光器の蓄積時間は50000 [μs]とした。

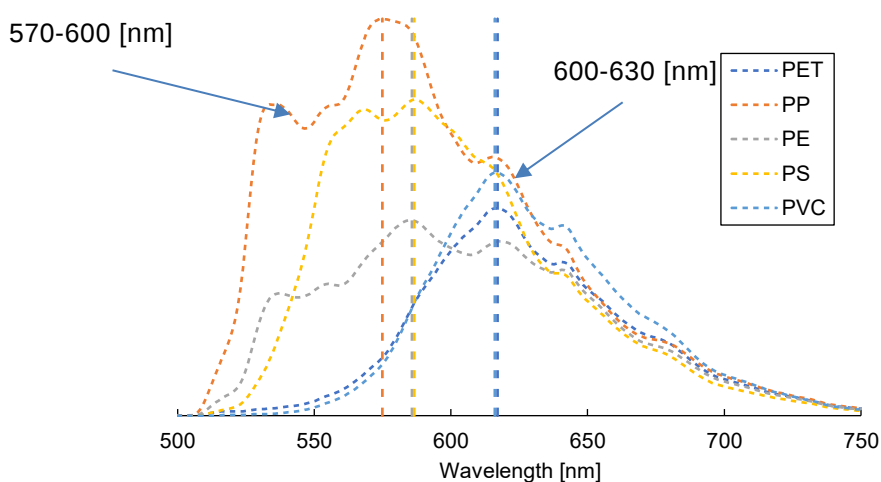


図 2-8 プラスチック試料を Nile Red で染色し、455[nm]の励起光源で励起したときの分光スペクトル

4. サブテーマ 2 結果及び考察

⁷ 分光器に入射した光の強度に対応する値で、スペクトル波形の縦軸に相当する。粒子の輝度と、分光器での蓄積時間に依存する。実験で利用した分光器（C13555MA、浜松ホトニクス）は、330～830 [nm]の波長範囲の分光スペクトルデータを、要素数512個の配列に格納する。判定基準の1000という値は、実験的に決められた。

4. 1 濾過システム

まず、本システムによってどれだけの体積の海水を濾過処理できるかを検証した。5回のろ過-逆洗を1サイクルとしたとき、5サイクル分の濾過時の流量の時間変化の典型例を図 2-Aに示した。逆洗を行っている間は流量が0になるため、その部分は除外して表示した。逆洗によりフィルタ表面から粒子が除去されて目詰まりが緩和され、サイクル再開時の流量は当初の最高流量(200 mL/s以上)に回復するが、サイクルを重ねるごとに流量低下の速度が増加していることがわかる。より頻繁に逆洗を実施すると、流量低下が抑えられる一方、逆洗水の体積が増加し、2段目のメンブレン濾過の頻度が増加することとなるため、現状は手動で2段濾過を行っている以上、運用上は逆洗サイクルの設定に最適値が存在する。

対して、各サイクルの積算流量をサイクルごとに示したものが図 2-Bである。3サイクルまでは比較的安定して100 L程度の濾過量を確保できている。よってトータルで300 Lは安定して濾過できるといえる。本結果は粒子の量が多い豊洲運河の水であることを鑑みると、陸地から距離のある洋上で採取された海水はさらに多く濾過できることが期待できる。実際、東京海洋大学神鷹丸に同濾過装置を搬入して洋上で濾過を実施した際には、1000 Lの濾過を達成できた。

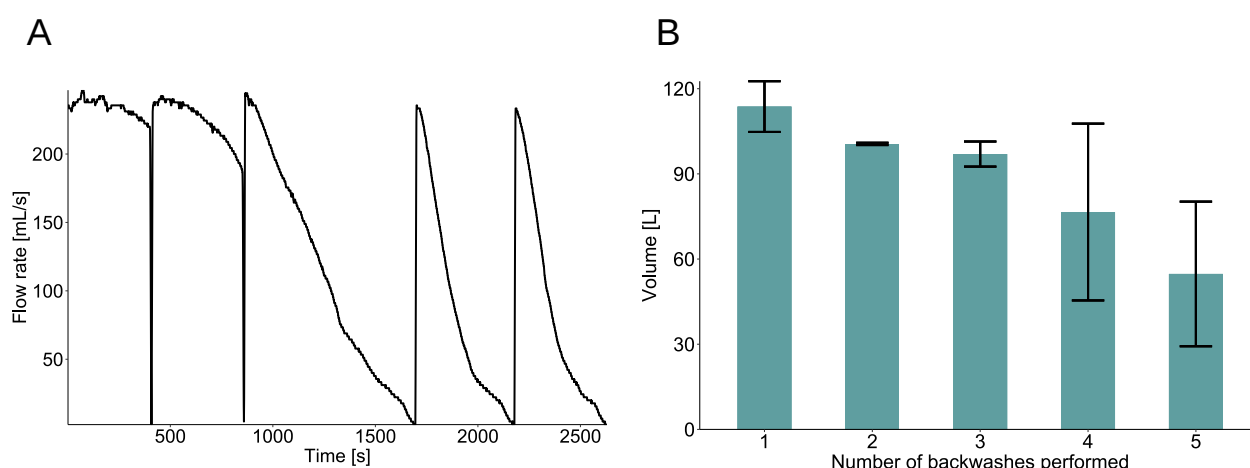


図 2-9 (図0-9) 10 μ m ウェッジフィルタろ過装置における豊洲運河水の典型的な濾過特性。A) ろ過装置を通過した海水の流量の時間変化。B) 逆洗実施毎の濾過積算流量

4. 2 マイクロ流路の出口に集積された蛍光粒子数の分布

これまでに示した手順までで、約100 L程度の豊洲運河の海水の中に存在する粒子が、10 mLの純水に懸濁されている状態となった。マイクロピペットを用いてこの懸濁液を1 mLとり、純水と2 mg/L キサンタンガム⁸水溶液を混合し、終濃度1 mg/Lの キサンタンガム水溶液に分散させた（サンプルを4倍希釈した）。以後、この懸濁液をマイクロ流路用のMPサンプルとした。また、理想的な蛍光粒子として、直径約150 μ mの蛍光マイクロビーズについても評価を行った。マイクロ流路の2つの出口

(Outlet) は、それぞれ、目的粒子である蛍光標識されたMPまたは蛍光ビーズが回収される「粒子回収側出口」と、なにも検出されなかったときに、ブランクのシース液とMPではないと判定された粒子が回収される「廃棄物側出口」である。

図 2-Aは、それぞれの出口において回収された、目的粒子すなわち蛍光標識されたMPあるいは蛍光ビーズの個数の分布である。設計した通り、分光スペクトルの評価により、分離の対象であると判定さ

⁸ 粒子を輸送する液体の粘度を上げることにより、シリンジポンプからマイクロ流路へ導入する際の粒子の損失を少なくする意図がある。

れた粒子が粒子回収出口で回収された。しかし、コントロールである緑色蛍光PEビーズに比べて、MPの粒子は分離されにくかった（粒子回収出口で回収されない傾向にあった）。

図 2-Bは、シース液ごと回収された粒子の個数を、シース液の体積で除した値（濃度）の分布である。蛍光PEビーズほどではないが、液体の体積を加味すると、MPであっても、2つの出口の間で濃度の差がより顕著に表れた。

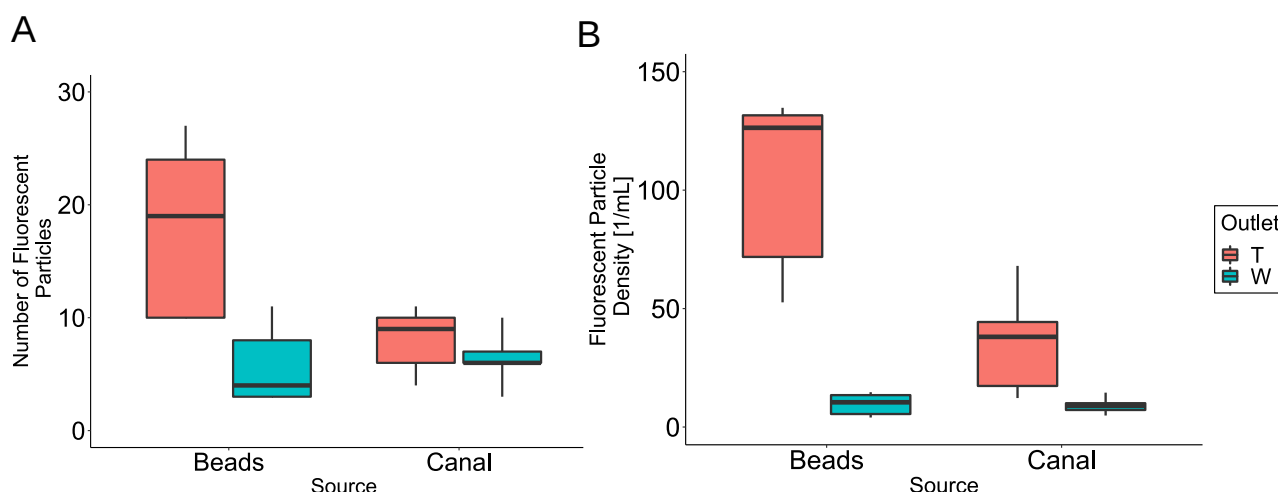


図 2-10 (図0-10) A) マイクロ流路の2つの出口（粒子回収出口はTarget-Outlet，廃棄物側出口はWaste-Outletと表記した）においてそれぞれ回収された蛍光粒子の数の分布（N=5）。

B) マイクロ流路の2つの出口で回収された蛍光粒子の、シース液の体積を加味した濃度[個/mL]の分布（N=5）。

現在も、豊洲運河から採取した粒子の選別において、特に誤廃棄される粒子が多い原因を追究しているが、その理由として、豊洲運河の粒子のうちごく限られた一部の粒子のしかも静止時に得られたスペクトルをもとに選別条件を設定していたことが考えられる。目下、NR染色した豊洲運河の粒子の蛍光スペクトル選別を行わずに取得記録し、蛍光スペクトルの網羅的な分析をしたうえで選別条件を設定し、選別結果の粒子の特性を調べて選別条件を調整していく実験が必要になると考えられる。

4. 3 蛍光粒子の回収率と濃縮率

蛍光分光に基づく分離の結果、蛍光粒子が誘導されるべきマイクロ流路の出口で回収された割合を示す回収率と、粒子回収出口で回収された時点での濃縮率を図2-11に示した。豊洲運河で採取したサンプル中の蛍光粒子を、分光スペクトルに基づきマイクロ流路上で分離することにより平均55.6%回収できた。また、その濃度を平均2.3倍上げることができた。

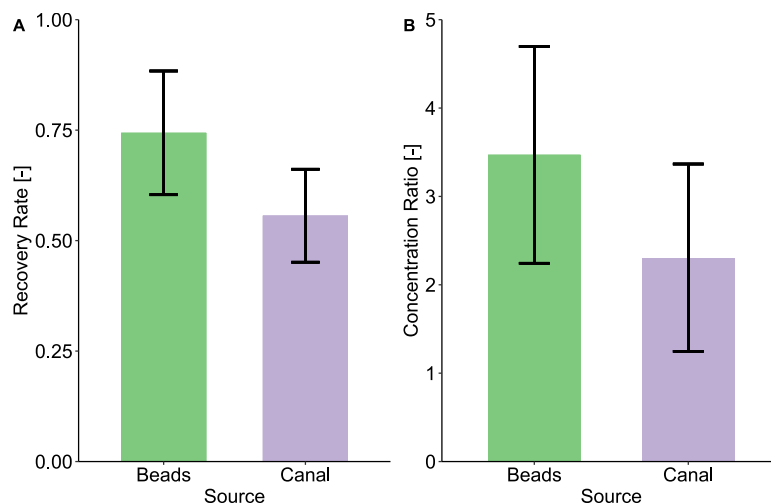
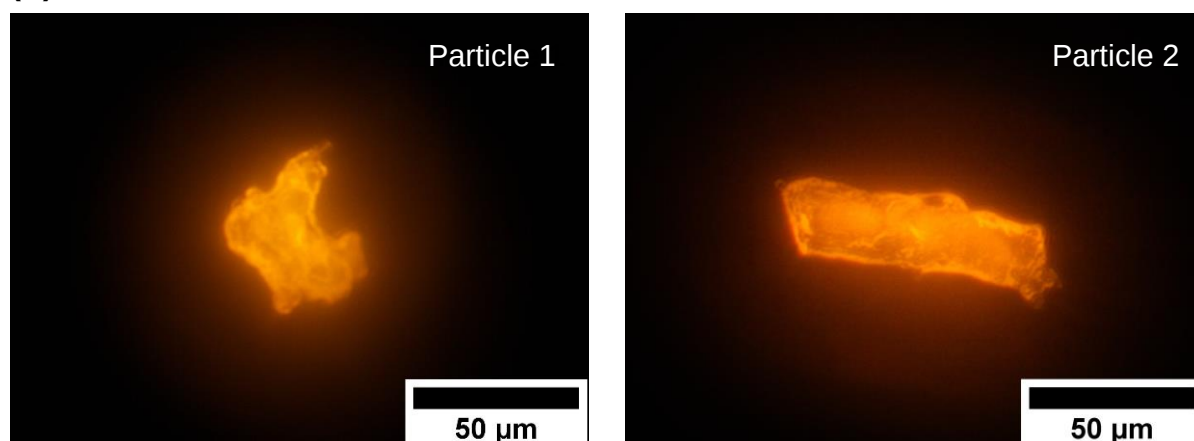


図 2-11 (A)マイクロ流路の出口で正しく回収できた蛍光粒子の割合を示す回収率(N=5)、(B) マイクロ流路への導入前後での蛍光粒子の濃度比(N=5)

4. 4 豊洲運河から分離されたMP粒子

豊洲運河でサンプリングされた海水から抽出された粒子の典型的な例を図 2-5に示した。このように Nile Red染色により一部の粒子の表面において蛍光発光（フォトルミネッセンス）が観察され、その特徴的な分光スペクトルは、MPを検出するプログラムにおいてMPのものであったと判定された。

(A)



(B)

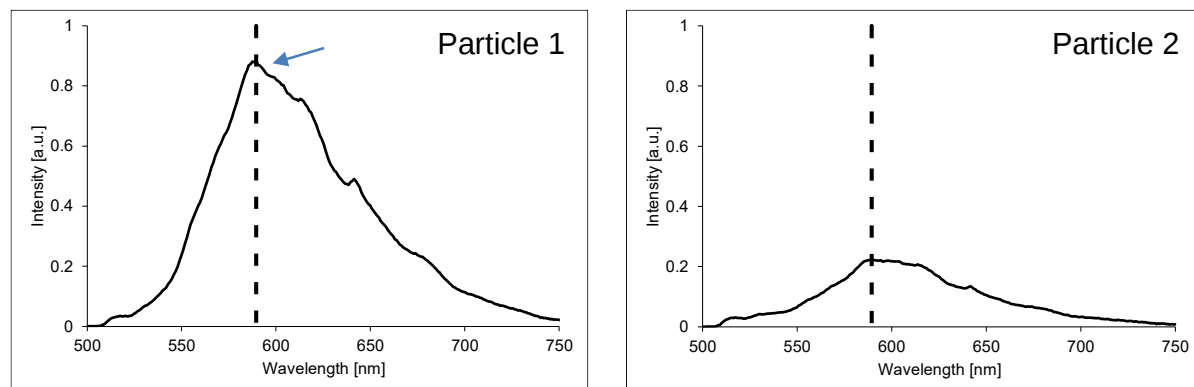


図 2-5 (A) マイクロ流路の粒子回収出口から回収された粒子の蛍光像. 対物 40 倍 (Nikon Plan Fluor ELWD 40x/0.60)、(B) 各粒子の蛍光分光スペクトル. 蓄積時間 (50000 μs)

5. サブテーマ2 研究目標の達成状況

本サブテーマの目的は「顕微ラマン分光光度計による分析システムへ自動でサンプルを導入するためのろ過システム部およびマイクロ流体システム部の開発」であり、さらに

1. ろ過システム部：微細なマイクロプラスチック（10-350 μm ）を濃縮するシステム
2. マイクロ流体システム部：濃縮された試料を顕微ラマン分析に最適に導入するシステム

という目標が設定された。

まず、1. ろ過システム部については、目標であった、船舶に搭載可能で、目開き10 μm のフィルタによる洋上での海水1000 Lの濾過が可能なシステムは達成された¹⁾と考える。豊洲運河のような濁りの強い水サンプルも、逆洗により200 L程度の濾過は十分実用できるレベルで可能であった。

一方、ウェッジフィルタで粒子を回収するには、逆洗水の水量が1回あたり300 mL度必要であり、それは、濾過水量(100 L)に比べて十分小さいが、顕微ラマン分光分析などの本分析で用いるにはもっと濃縮する必要がある。そこでウェッジ+メンブレンの2段濾過により、ポンプで送液された1000 L海水の半連続濾過を達成することができた。しかし、本研究期間内においては、濾過は半連続にとどまった。逆洗プロセスは電磁弁を使うことで自動化は可能だが、これまでの実験で、自動化が必要なほど逆洗の頻度を高くする必要がないことがわかっている。一方、2段目のメンブレン濾過については、実験終了時にメンブレンを取り出して粒子を回収するのは連続処理とはいいたところがあり、そこが一番の問題である。対策案の一つとしてホッパー内の液体を攪拌しつつ、減圧タンク内の真空を制御しながら連続的に逆洗液を受け入れることができること、そして攪拌されたホッパー内の液体をラマン分光顕微鏡に送るようにすることが考えられる。

また、2. マイクロ流体システムによる粒子の選別は、まず、目標の文言にある、「顕微ラマン分析に実際に導入すること」の試行は不十分であった。その主な理由は、サブテーマ2の実施環境においてアクセスできた顕微ラマン分光装置が、低速で位置合わせに時間がかかり、かつ試料のXY空間スキャンが全くできない、材料データベースが使えないなど、運用が非常に困難であり、統合を無理に試行することで開発本体が遅延することを回避した結果である。なお、サブテーマ1において使用されたXYスキャン可能かつ高速なラマン分光装置の性能を確認する限りでは、フローセルへ粒子懸濁液を送るタイミングを適切に制御すれば、本マイクロ流体システムとの統合は技術的にはさほど問題ないと考えている。一方、選別システム自体については、マイクロビーズなど理想的な粒子についてはほぼ問題なく選別でき、最近論文発表された同種のデバイスと同等それ以上の性能は達成できたといえる。それだけに、均質とも安定しているとも言い難い現実のSMPを、現状よりも精度よく分離することはおそらく可能であり、また本システムを用いてこそ今後も継続して取り組むべき課題であると考ええる。具体的には、上述のフローセルへの粒子の導入システムの追加構築、また、現在よりも高速高感度の顕微分光システムあるいは分光イメージング（またはハイパースペクトルイメージング）を確保し、天然の粒子のスペクトルデータ、ならびに、スペクトルと実際の粒子の種類（ラマン分光などで確認）との連関を機械学習（ルールベースあるいは深層学習）していくことが望まれる。

6. サブテーマ2 付録

マイクロ流体システムについて

マイクロ流体システムはSMPsの顕微ラマン分光分析などの効率・精度を上げるために、流路中のSMPs粒径を連続的に揃える（分級）ことを目的として計画されていた。前述のように、本マイクロ流体システムは顕微ラマン分光装置との統合の問題で、サブテーマ2の最終的な評価システムには組み込まれなかったが、マイクロ流体システム単体での設計・試作・評価は実施したので付録として報告する。

連続分級デバイスの設計：Pinched Flow Fractionation

流路中の粒子を分級する手法には以下のように、いくつかの種類がある。

- Field Flow Fractionation (FFF)
- SPLIT-flow Thin fractionation (SPLITT)
- Hydrodynamic Chromatography (HDC)
- Capillary Hydrodynamic Fractionation (CHDF)
- Pinched Flow Fractionation (PFF)

FFF、SPLITT 等は外から場を設ける必要があり、磁力や音響収縮を用いることが多い。これらは場のコントロールが必要な場合が多く、本用途では不向きである。また、HDC や CHDF などは毛細管現象や、水の運搬力を用いるため、連続的に分級することは難しい。そのため今回は Pinched Flow Fractionation (PFF) を採用した。PFF は層流状態の流れの中で、粒子を分級する方法である。この手法も FFF の一つと考えることが出来るが、音響場や磁場などのコントロールが不要な点が強みである。これは、大量の海水を処理するためには、海水を分散して処理するため多くのデバイスを作る必要がある。この点で PFF は今回の用途に優れた手法である。PFF を用いた研究はいくつか行われており、多様な応用がされている。図13に示すようにinlet-1から粒子のない液体を流し、inlet-2からは粒子を混ぜた液体を流す。すると、粒子が壁面に押され、壁にそれぞれの半径に従って整列させられる。従って重心の位置が壁から半径の距離になると予測できる。この時、層流内で粒子が流れているのであれば拡大部での流出位置に違いができ分級ができると考えられる。今回用いる流路では流路の分岐点まで平衡に拡大されている。この時半径 $R_d[\mu\text{m}]$ の狭窄部での幅 $w_p[\mu\text{m}]$ と重心の位置の比と拡大部での幅 $w_b[\mu\text{m}]$ と重心の位置 $Y_d[\mu\text{m}]$ の関係はEq.1 式で表せる。

$$w_p : (w_p - R_d) = w_b : Y_d \quad \text{Eq. 1}$$

ここで、流路拡大部での粒子位置 Y_d は、Eq.2 式で表せる。

$$Y_d = \frac{(w_p - R_d)}{w_p} w_b \quad \text{Eq. 2}$$

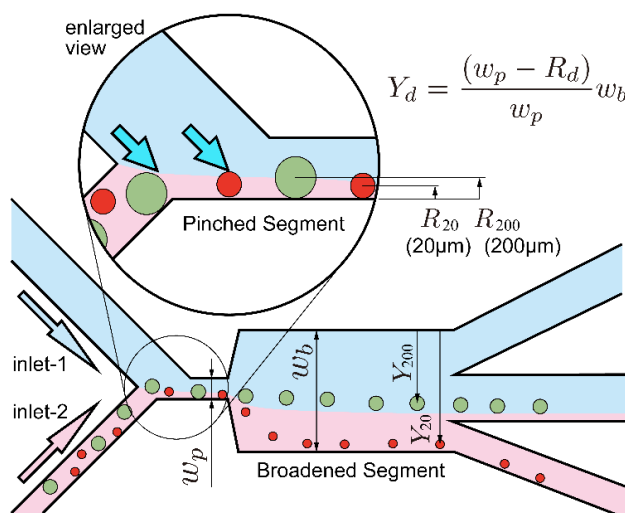


図2-13 Pinched Flow Fractionation (PFF) による連続分級システムの原理

今回の設計要求は次の二つである。

1. 蛍光選別の為に SMP の中から約 100 μm 以下のマイクロビーズを取り分ける
2. 流量を 10 mL/h よりも低くする

1の設計要件に対してはEq.2 式 を用いてデバイスの各パラメータを計算した。100 μm 以下のビーズを確実に特定のアウトレットへと流出するように設計することで粒子の大きさによる分級が可能となる。今回は、100 μm のビーズが確実にoutlet-3 へ流れるように設計した。具体的なパラメータを表2-1 に示す。2の設計要件に対しては流量が 3 つのアウトレット合わせて約 30 mL/h となる必要がある。そのため 3 つのアウトレットの合計が 480 $\mu\text{L}/\text{min}$ となるようにすることで2の設計要求を満たしつつ、分級を行うことが可能となる。アウトレットが 3 つで、それぞれの流路に等しい量の液体が流れるとしたとき、流量比が 2 : 1 であれば十分にピンチ部でサンプル粒子の入った液体を絞ることが出来る。そのため今回はinlet-1 とinlet-2 の流量比を 160 $\mu\text{L}/\text{min}$: 320 $\mu\text{L}/\text{min}$ とした。

表 2-1. Device Parameters

Parameter	Value	Description
wp [μm]	350	Width of Pinched Segment
wb [μm]	1200	Width of Broadened Segment
Edge positions	400, 800	These Edges divide Broadened Segment equally
100 μm OutPos.	1,028.6 μm	Out Position of 100 μm Beads is located in middle of Outlet-3

連続分級デバイスの試作

本連続分級デバイスはアクリルを用いて製作した。今回デバイスの製作手順を図2-14に示す。まず、3mm のアクリル板を卓上 CNC 工作機械 (KitMill RZ300、ORIGINALMIND) によって加工し、エンドミル (PS2-2.0x6) ($\phi 0.3$ チタン被覆タングステン) を用いて流路層を成形した。切削条件を表 2-2 に示す。マイクロ流路表面にはCNC切削痕が出来ていたが、底面ビーズが底面を滑ることはないと考えられるので研磨等を行わない。切削した溝を石鹼によって埋めることで流路がふさがらないようにした。1 mm のアクリル板で蓋をして、再度穴あけ加工等の切削加工を行った。石鹼を用いることによって非常に簡単に細かな箇所も接着することが出来た。

表 2-2. Configurations of Endmill

Endmill Radius	Spindle Speed	Cutting Feedrate	Cutting Feedrate
$\phi 0.3$	6000 rpm	50 mm/min	50 mm/min
$\phi 2$	6000 rpm	240 mm/min	200 mm/min

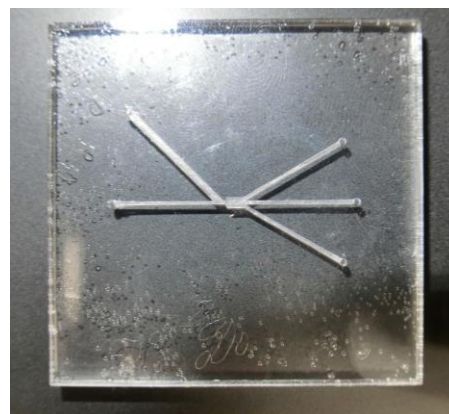
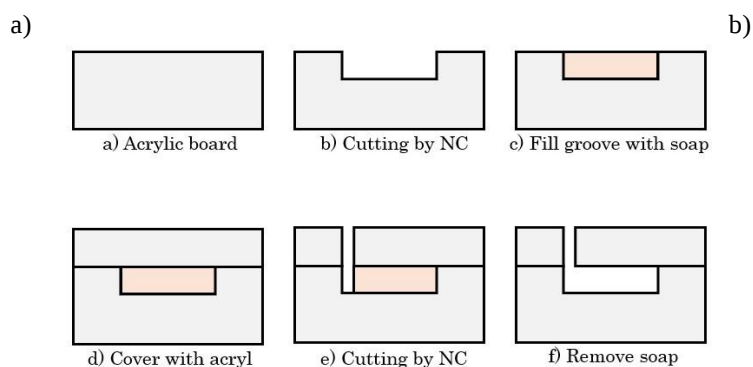


図2-14 a) マイクロ流体デバイスの製作プロセス、b) 試作したマイクロ流体デバイス

連続分級デバイスの評価実験

マイクロデバイス内の流れを確認するために、蛍光ビーズ（UVPMS-BY2-1.00 20-27 μm , Cospheric）（UVPMS-BY2-1.00 212-250 μm , Cospheric）を用いた。100 ニシカスピと呼ばれるポリプロピレン製の歯科用貼薬針を用いてチューブをデバイス、シリンジそれぞれに接続した。観察には倒立顕微鏡（TE300, Nikon）を用いた。蛍光フィルタ（DM505, Nikon）照明（100W 超高圧水銀ランプ, Nikon）を用いることで蛍光を観察した（図2-15）。

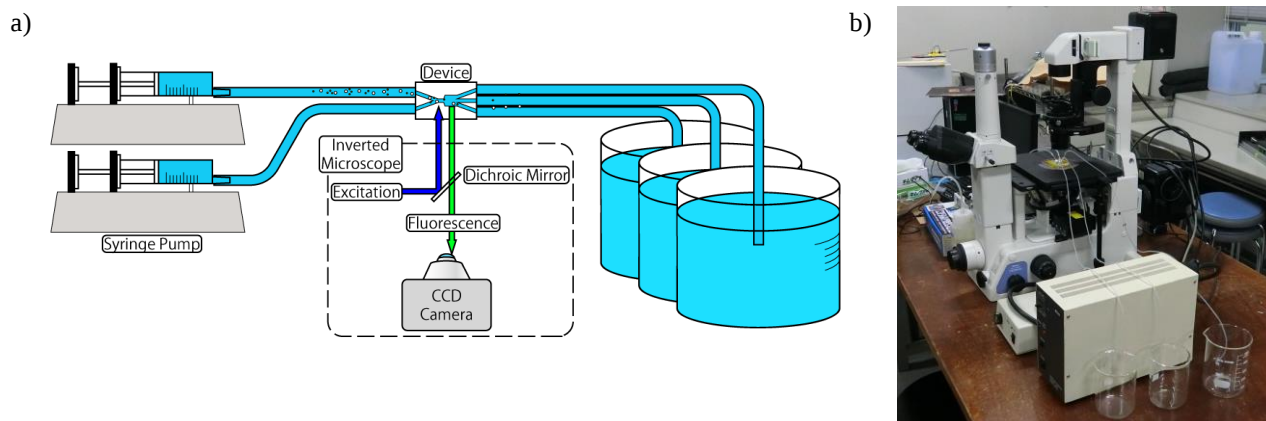


図2-15 a) マイクロ流体デバイスの実験セットアップ、b) 実験セットアップ写真

蛍光ビーズを用いたマイクロビーズの分級実験の結果を図2-16 に示す。デバイス設計では、直径235 μm のビーズが、outlet-2 とoutlet-3 の境界エッジに当たる設計になっている。直径235 μm よりも大きければそれよりも上部（outlet-2へ）に、小さければ下部（outlet-3へ）に流れる。このため、212-250 μm のビーズを使用した際には、この境界エッジに衝突しつつ、主にoutlet-2 に流出している（図16 a））。20-27 μm のビーズを使用した際には、ほぼoutlet-3 へ流れている（図2-16 b））。流れが安定した約10秒間の観察で 212-250 μm のビーズは7 個がoutlet-2 へ、6 個がoutlet-3 へ流出した。20-27 μm については計数できなかったが、約75%のビーズがoutlet-3 へ流出した。本デバイスによって、蛍光ビーズが分級されていることが確認された。

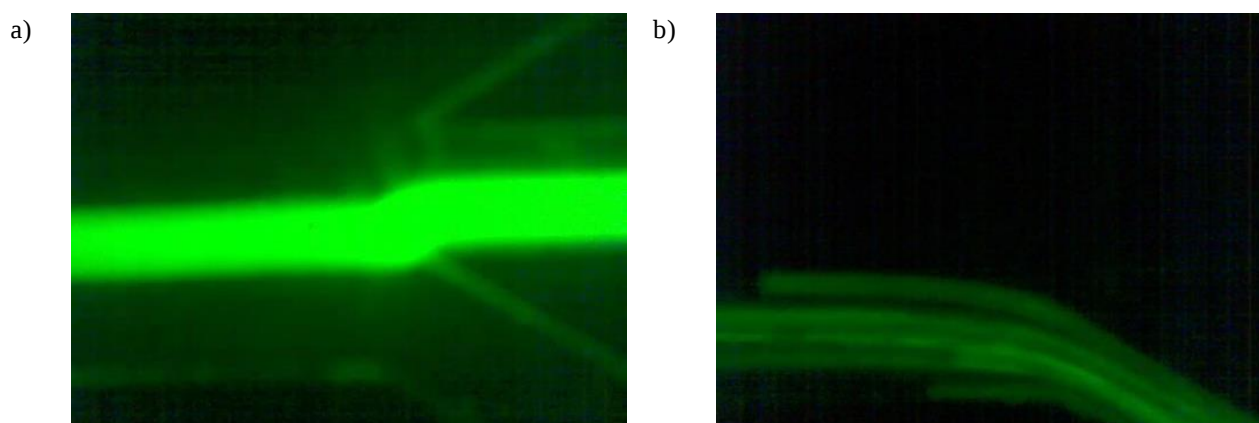


図2-16 a) 直径212-250 μm 蛍光ビーズはoutlet-2 へ、b) 直径20-27 μm 蛍光ビーズはoutlet-3 へ流出する様子。本デバイスによって、蛍光ビーズが分級されていることが確認できる

Ⅲ．研究成果の発表状況の詳細

※この項目の成果番号は通し番号です。

(1) 成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	12
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	2
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	10
口頭発表（学会等・査読なし）：	30
知的財産権：	1
「国民との科学・技術対話」の実施：	12
マスコミ等への公表・報道等：	0
研究成果による受賞：	0
その他の成果発表：	0

(2) 誌上発表

<査読付き論文>

成果 番号	【サブテーマ1】の査読付き論文
1	H. Xu, H. Arakawa. Determination of appropriate particle quantity on a filter for small microplastics analysis by microscopy. MethodsX, 2022, 9, 101646. https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101646
2	H. Xu, H. Nakano, K. Uchida, T. Tokai, T. Miyazaki, H. Hamada, H. Arakawa. Contamination in the sea surface around Japan coast by small microplastics. Marine pollution bulletin, 2022, 185, 114245. 10.1016/j.marpolbul.2022.114245
3	M. Celik, H. Nakano, K. Uchida, A. ISOBE, H. ARAKAWA. Comparative evaluation of the carbonyl index of microplastics around the Japan coast, Marine Pollution Bulletin, 2023, 190, 114818. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114818
4	Z. Yang, H. Arakawa. A double sliding-window method for baseline correction and noise estimation for Raman spectra of microplastics. Marine Pollution Bulletin, 2023, 190, 114887. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114887
5	Z. Yang, H. Arakawa. A beaker method for determination of microplastic concentration by micro-Raman spectroscopy, MethodsX, 2023, 11, 102251. https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102251

6	Y. Cheng, J. Zhang, H. Nakano, K., Ueyama N., H. Arakawa. Coumarin 6 staining method to detect microplastics. Marine Pollution Bulletin, 2023, 193, 115167. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115167
7	Z. Yang, H. Nagashima, H. Arakawa. Development of Automated Microplastic Identification Workflow for Raman Micro-Imaging and Evaluation of the Uncertainties During Micro-Imaging. Marine Pollution Bulletin, 2023, 193, 115200. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115200
8	Z. Yang, M. Çelik, H. Arakawa. Challenges of Raman spectra to estimate carbonyl index of microplastics: A case study with environmental samples from sea surface. Marine Pollution Bulletin, 2023, 194, 115362. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115362
9	Z. Yang, M. Çelik, H. Nakano, H. Arakawa. Accessing the intrinsic factors of carbonyl index of microplastics: physical and spectral properties, baseline correction, calculation methods, and their interdependence. Marine Pollution Bulletin, 2023, 197, 115700. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115700
10	H. Arakawa, H. Nakano, K. Uchida. A review; Plastics contamination in the coastal areas around Japan, La mer, 2023, 61, 165-173. https://doi.org/10.32211/lamer.61.3-4_165
11	Z. Yang, J. Zhang, H. Nakano, M. Celik, H. Arakawa. Spectral analysis of environmental microplastics using average spectra, Science of the total environment, 2024, 927, 171871. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171871

成果 番号	【サブテーマ2】の査読付き論文
12	E. Wangkanklang, Y. Koike, Micromachines, 2021, System for Monitoring Progress in a Mixing and Grinding Machine Using Sound Signal Processing. 12. 1041. https://doi.org/10.3390/mi12091041

< 査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野） >

成果 番号	【サブテーマ1】の査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）
	特に記載すべき事項はない。

成果 番号	【サブテーマ2】の査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）
	特に記載すべき事項はない。

< その他誌上発表（査読なし） >

成果 番号	【サブテーマ1】のその他誌上発表（査読なし）
	特に記載すべき事項はない。

成果 番号	【サブテーマ2】のその他誌上発表（査読なし）
13	小池義和, 二井信行, R.U. Maheswari, 長澤純人. 2022. 電子情報通信学会誌, 105, 5, 281-285. ガラス球構成フリーフォール型水中無人探査機を用いた海洋環境計測（小特集：極限環境の計測を支える回路とシステム技術，解説記事）

14	小池義和, 森野博章. 2022. 電子情報通信学会通信ソサエティマガジンB-plus, 63, 231-237, 深海 8,000 mに挑んだ「江戸っ子 1 号プロジェクト」に関わって
----	---

(3) 口頭発表

<口頭発表 (国際学会等・査読付き)>

成果番号	【サブテーマ1】の口頭発表 (国際学会等・査読付き)
15	H. ARAKAWA, H. NAKANO, K. UCHIDA. Web (国外), (2021) The 18th Japanese French Oceanographic Symposium, Tokyo, Japan, 2021. Plastics contamination in the coastal areas around Japan.
16	H. ARAKAWA. Web (国外), (2022) Plastic pollution in Asian waters, Concentration of small microplastics in sea surface waters around Japan.
17	H. Nagashima, Z. Yang, H. Arakawa. (国外) (2003) Frans-Japan oceanographic symposium. Development of a continuous measurement system for small microplastics using a micro-Raman spectrophotometer.

成果番号	【サブテーマ2】の口頭発表 (国際学会等・査読付き)
18	K. Shimomoto, S. Nagasawa (on-line) (Oct. 2021) 34th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2021), Continuous size classification device for marine microplastics by pinched flow fractionation.
19	M. Yamamoto, K. Kimura, S. Suzuki, Y. Koike (国内) (July 2022) 2022 27th OptoElectronics and Communications Conference (OECC) and 2022 International Conference on Photonics in Switching and Computing (PSC), Investigation on frequency characteristic of fiber optic probe hydrophone.
20	D. Endo, T. Kono, Y. Koike, H. Kadono, J. Yamada, U. M. Rajagopalan, Web (国外) (2022) SPIE Photonics West 2022, Application of laser speckles and deep learning in discrimination of supermicroplastics and zooplanktons
21	Y. Kurosaki, N. Hasegawa, Y. Koike, H. Arakawa, N. Futai (Hybrid, 国外 中国 and on-line) (Oct. 2022), 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2022), Microfluidic Device for Fluorescence Spectroscopy-based Sorting of Marine Microplastics,
22	A. WAKI, Y. ASUKA, M. YAMAMOTO, Y. KOIKE (国外 シンガポール) (Oct. 2023) the 49th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society (IECON2023), Accuracy of fiber optic probe hydrophone underwater ultrasonic cavitation environment
23	N. Puttaraksa, K. Kosumsupamala, H. Seki, S. Nagasawa, H. Nishikawa (国内) (Nov. 2023) 34th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2023) Fabrication of engineered microplastics in epoxy-based polymer (SU-8) by means of the penetration depth of protons using proton beam writing
24	H. Yokoi, Y. Kozato, Y. Koike (国外 チェコ) The 44th Photonics and Electromagnetics Research Symposium (PIERS2023) (Jun. 2023) Optical waveguides with microfluidic channel for Raman spectroscopy.

<口頭発表 (学会等・査読なし)>

成果番号	【サブテーマ1】の口頭発表 (学会等・査読なし)
25	荒川久幸. Web (国内), (2021) シンポジウム「練習船青鷹丸の教育と研究に果たしてきた役割」東京湾の濁度とマイクロプラスチック.
26	K. Uchida. Web (国内), (2021) Korea-Japan International joint seminar on maritime affairs, Present and Future Research on Micro-plastics in Japan. (2021年11月8日, 聴講者60名)

27	H. Arakawa. Web (国内), (2021) 東京海洋大学-上海海洋大学合同シンポジウム (2021年12月6日, 聴講者60名) Plastics contamination in the coastal areas around Japan.
28	M. Celik, H. Nakano, A. Isobe, H. Arakawa. Web(国内), (2022) JpGU, Comparative investigation of Carbonyl Index of Microplastics around Japan costs by using Specified Area Under Band method.
29	S. M. Hashim, H. Arakawa. Web (国内), (2022) 2022年度日仏海洋学会研究発表会, Marine microplastics and their interaction with benthic macrofauna.
30	下田平遼, 上嶋紘生, 會川鉄太郎, 宮崎唯史, 渡邊秀行, 荒川久幸. Web (国内), (2022) 2022年度日仏海洋学会研究発表会, 航走中に採取したマイクロプラスチックの濃度.
31	進裕貴, 戸田純実, 有村光弘, 小池義和, 荒川久幸, 下田平遼. Web (国内), (2022) 2022年度日仏海洋学会研究発表会, MEMS 慣性センサを用いた船上でのアクティブ除振台の性能
32	S. M. Hashim, Md. A. Jahangir, H. Arakawa. (国内), (2023) JpGU, Microplastic contamination in three sinks at the benthic zone: A case study of Tokyo Bay.
33	佐藤未来, 荒川久幸. (国内) (2023) 2023年度日仏海洋学会研究発表会, 東京湾におけるマイクロプラスチックの存在量.
34	Z. Yang, H. Arakawa. (国内) (2023) SEATUC symposium 2024, Baseline correction and carbonyl index (CI) calculations of microplastics.

成果 番号	【サブテーマ2】の口頭発表 (学会等・査読なし)
35	長谷川 夏旺, 黒寄 由佳, 土井内 太暉, 児玉 龍政, 二井 信行. Web (国内), (2021) 第44回研究会化学とマイクロ・ナノシステム学会, 粒子選別分離のための点字駆動可能な離散化側壁をもつマイクロ流路.
36	濱道 玲臣, 長澤 純人. Web (国内), (2021), 日本機械学会関東学生会第61回学生員卒業研究発表講演会, 海洋マイクロプラスチック測定評価のためのMEMSプロセスを用いた標準試料の製作方法.
37	有村 光弘, 戸田 純実, 進 祐貴, 小池 義和. Web (国内), (2021) 2021 年電子情報通信学会ソサイエティ大会, サーモパイルセンサを用いた姿勢推定精度の環境依存性の検討
38	林 僚哉, 高橋 響, E. Wangkanklang, 小池 義和. Web (国内), (2021) 超音波研究会, 音響信号を用いた攪拌播潰処理の進行状況推定
39	H. Yokoi, Y. Kozato, Y. Koike. (国外 米国) World Congress on Nanotechnology 2022 (Nano 2022) (Nov. 2022) Fabrication of optical waveguides with flow channel for analysis of super-microplastics.
40	芦川 和希, 石山 拓実, 山岸 優晴, 小池 義和, 長谷川 夏旺, 二井 信行, 関 宏範. (Web 国内) (2022) 2022 年電子情報通信学会ソサイエティ大会, 海洋マイクロプラスチック観測にセンサネットワークを用いるための画像処理の検討
41	黒寄由佳, 児玉龍政, 小池義和, 二井信行. Web (国内), (2020) 化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会, 離散化側壁流路とin situ Fenton反応による海水からのマイクロプラスチックの分離.
42	児玉龍政, 黒寄由佳, 小池義和, 二井信行. Web (国内), (2020) 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2020, マイクロ流体減圧を用いた海中その場サンプリングシステムの開発.
43	長谷川夏旺, 黒寄由佳, 土井内太暉, 児玉龍政, 二井信行. Web (国内), (2021) 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第44回研究会, 粒子選別分離のための点字駆動可能な離散化側壁をもつマイクロ流路.
44	土井内 太暉, 望月 康弘, 児玉 龍政, 小池 義和, 荒川 久幸, 二井 信行. (国内) (2022) 令和4年度日本水産学会秋季大会, フリーフォール型海中探査機に対応したマイクロプラスチック+環境DNA採取装置.
45	長谷川 夏旺, 黒寄 由佳, 荒川 久幸, 小池 義和, 二井 信行. (国内), (2022), 日本海洋学会 2022年度秋季大会, ファインウェッジ®フィルタによる海洋MP粒子の高効率捕集の検討.
46	木下 隼, ラジャゴパラン ウママヘスワリ, 小池 義和, 河野 貴裕, 山田 純. (国内), (2023), 第70回応用物理春学術講演会発表, レーザースペックルを用いたマイクロプラスチックの深海用測定装置の提案

47	L. Tyagi, H. Kadono, U.M. Rajagopalan. (国外 韓国) 10th East Asian Federation of Ecological Societies(EAFES) (Jul. 2023) Visualizing the Impacts of ZnO Nanoparticles on the internal activity of Lentil (Lens culinaris) Seeds using Biospekle Optical Coherence Tomography
48	A.Devi, H.Kadono, U.M.Rajagopalan. (国外 韓国) 10th East Asian Federation of Ecological Societies(EAFES) (Jul. 2023) Fast and Reliable micro bioassay based on Laser biospeckle
49	渥美 太晴, 進 祐貴, 石橋 巧実, 小池 義和, 木下 隼, ラジャゴパラン ウママヘスワリ. (国内), (2023), 2023年度電子情報通信学会ソサエティ大会, ガラス球2球構成海洋観測機の姿勢推定の精度検証
50	加賀美 昂希, 木下 隼, 河野 貴裕, 小池 義和, Uma Maheswari Rajagopalan. (国内), (2023), Optics & Photonics Japan 2023, レーザースペックルとdeeplearningを用いたスーパーマイクロプラスチックのサイズ判別
51	山内 秀馬, 長澤 純人. (国内), (2023), 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, 海洋マイクロプラスチックの船上ラマン分光検査のための振動再現システム
52	U.M. Rajagopala. (国内), (2024), The 18th South East Asian Technical University Consortium (SEATUC) Symposium 2024, Laser speckles in conjunction with deep learning algorithms in the discrimination of microplastics and their use in brine shrimps mobility,
53	N. Hasegawa, N. Futai. (国内), (2024), The 18th South East Asian Technical University Consortium (SEATUC) Symposium 2024, A microfluidic device for fluorescent-based marine microplastic separation,
54	T. Ishiyama, Y. Koike. (国内), (2024), The 18th South East Asian Technical University Consortium (SEATUC) Symposium 2024, Study on concentration method of ocean microplastic for in-situ observation

(4) 知的財産権

成果番号	発明者	出願者	名称	出願以降の番号	出願年月日
55	荒川久幸, 楊子江, 永島滉也, 小池義和, 二井信行, 長谷川夏旺	東京海洋大学, 芝浦工業大学	「マイクロプラスチック含有水濃縮装置およびマイクロプラスチック含有水濃縮方法, マイクロプラスチック濃度測定装置およびマイクロプラスチック濃度測定方法」	特願 2024-028646	2024年2月28日

(5) 「国民との科学・技術対話」の実施

成果番号	実施年度	【サブテーマ1】の実施状況
56	2021	内田圭一. 横須賀市市民大学講演, 「海洋プラスチックごみ」, 海洋環境と私たちの暮らし (2021年6月27日, 聴講者40名)
57	2021	荒川久幸. 横須賀市市民大学講演, 「海の濁りとその生物への影響」, 海洋環境と私たちの暮らし (2021年7月4日, 聴講者40名)
58	2022	荒川久幸, 内田圭一. (2022) 海洋大が調べたマイクロプラスチックを含む海洋プラスチック汚染の現状, Web, (2022年7月18日, 聴講者121名)
59	2022	荒川久幸. (2022) 松下政経塾シンポジウム, 「日本沿岸の海洋プラスチック汚染問題」 (主催: 松下政経塾, 2022年10月10日, 観客106名) にて講演
60	2023	荒川久幸, 小池義和. 「微細なマイクロプラスチック濃度の計測」 (主催: ERCA, 2023年5月29日, あわぎんホール, 観客358名) にて講演
61	2023	愛知教育大付属岡崎中学校 (2023年4月25日, 参加者4名) 学生が訪問. マイクロプラスチック講義および成果紹介
62	2023	北海道立旭川西高等学校 (2023年9月13日, 参加者9名) 学生が訪問. マイクロプラスチック講義および成果紹介
63	2023	上尾市立上尾中学校における特別授業「マイクロプラスチックについて」 (2024年3月4日, Web, 聴講者約10名)

64	2024	【予定】関西創価高等学校「海洋プラスチック汚染の現状」（2024年7月22日，参加者約20名）
----	------	---

成果 番号	実施 年度	【サブテーマ2】の実施状況
65	2021	小池義和. (Web国内) 2021 年電子情報通信学会基礎・境界ソサイエティ/NOLTA ソサイエティ大会(2021), 依頼シンポジウム"極限環境の計測を支える回路とシステム技術" (一般公開) 「ガラス球構成フリーフォール型水中無人探査機を用いた海洋環境計測」 (2021年9月16日, 聴講者40名)
66	2022	芝浦工業大学オープンテクノカレッジ, 「海を見る！？どこまで見る！？～豊洲で始める海洋観測～」 (2022年11月12日, 聴講者20名)
67	2023	芝浦工業大学オープンテクノカレッジ, 「海を見る！？どこまで見る！？～豊洲で始める海洋観測～」 (2023年12月2日, 聴講者19名)

(6) マスメディア等への公表・報道等

成果 番号	【サブテーマ1】のメディア報道等
	特に記載すべきことはない。

成果 番号	【サブテーマ2】のメディア報道等
	特に記載すべきことはない。

(7) 研究成果による受賞

成果 番号	【サブテーマ1】の研究成果による受賞
	特に記載すべきことはない。

成果 番号	【サブテーマ2】の研究成果による受賞
	特に記載すべきことはない。

(8) その他の成果発表

成果 番号	【サブテーマ1】のその他の成果発表
	特に記載すべきものはない。

成果 番号	【サブテーマ2】のその他の成果発表
----------	-------------------

	特に記載すべきものはない。
--	---------------

Abstract

[Research Title]

Development of a Continuous Measurement System for Characterization of Marine Microplastics using Raman Microscope.

Project Period (FY) :	2021-2023
Principal Investigator :	Arakawa Hisayuki
(PI ORCID) :	ORCID0000-0003-1209-5943
Principal Institution :	Tokyo University of Marine Science and Technology Minato City, Tokyo, JAPAN Tel: +81354630467 Fax: +81354630467 E-mail: arakawa@kaiyodai.ac.jp
Cooperated by :	Shibaura Institute of Technology
Keywords :	Micro-Raman spectrometer, degradation, microplastics, microfluidic system, filtration system

[Abstract]

The negative influence of small microplastics (SMP; < 350 μm) on marine organisms is of growing concern. However, conventional sampling using nets of 350 μm mesh size cannot provide information on the concentration of SMPs. Our objective was to construct a system to continuously measure the SMP concentration and SMP degradation on board using a micro-Raman spectrophotometer. (1) A glass flow cell and a metering pump were installed in the micro-Raman photometer. A system and method were developed to measure the concentration by batch imaging measurements of the flow cell. By changing the lattice spacing of the imaging measurements, it is possible to measure the different particle sizes (Yang et al., 2023a). (2) Detection of PE SMP was also achieved by the Beaker method (Yang and Arakawa, 2023a). (3) It was also shown that the degradation of SMP could be evaluated by Raman spectrophotometry using the carbonyl index (CI) (Yang et al., 2023b). The CI signal could be more accurately detected by baseline correction of the spectra (Yang and Arakawa, 2023b). For MPs in field water samples, we showed that the smaller the MP size, the larger the CI value (Celik et al., 2023). (4) A system to select SMP by particle concentration using filtration, chemical treatment, and fluorescence measurement was developed and evaluated. The use of fine wedge filters was efficient in filtration concentration. We developed a two-stage filtration system using a wedge filter and a membrane filter for the on-site (offshore) concentration of about 1000 L of seawater reducing it to about 10 mL. In addition, a microfluidic system was developed to sort particles

according to the Nile Red fluorescence spectrum. (5) The Raman spectrophotometer system and the two-step filtration system were operated in Sea of Japan and off the Tokai region, and the PE SMP was successfully detected. Since SMP concentrations vary widely in different areas of the ocean, the SMP concentration in the sample may require to be further concentrated for stable SMP detection and concentration measurement with this system.

[References]

- Z. Yang et al., 2023a. Development of Automated Microplastic Identification Workflow for Raman Micro-Imaging and Evaluation of the Uncertainties During Micro-Imaging. *Marine Pollution Bulletin*. 193, 115200. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115200>
- Z. Yang, H. Arakawa, 2023a. A beaker method for determination of microplastic concentration by micro-Raman spectroscopy, *MethodsX*, 11, 102251. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102251>
- Z. Yang et al., 2023b. Challenges of Raman spectra to estimate carbonyl index of microplastics: A case study with environmental samples from sea surface. *Marine Pollution Bulletin*, 194, 115362. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115362>
- Z. Yang, H. Arakawa, 2023b. A double sliding-window method for baseline correction and noise estimation for Raman spectra of microplastics. *Marine Pollution Bulletin*, 190, 114887. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114887>
- M. Celik, H. Nakano, K. Uchida, A. ISOBE, H. ARAKAWA. 2023. Comparative evaluation of the carbonyl index of microplastics around the Japan coast, *Marine Pollution Bulletin*, 190, 114818. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114818>

This research was funded by the Environment Research and Technology Development Fund (ERTDF).

別添

【参考資料】 終了研究成果報告書 公募審査・中間評価結果への対応

指摘等	対応状況・非対応理由等
採択時コメント「バランスの良い計測システムの開発は意義がある。他方で3年たってまだ計測システムが開発途上にとどまるようだと政策的ニーズに応じていないことにならないか、実現性の面で懸念する。」	様々な水圏でマイクロプラスチック濃度の計測が必要であり、その計測の精度や速度、限界を明らかにすることを心掛けた。また研究期間終了時のシステム実用化を目標とした。
中間評価コメント「システムの価格次第で普及が左右されるのではないか。他の手法で測定している濃度との相互比較検定をされることを望む。」	簡易的なラマン計測システム（ビーカー法）での計測を試みて、可能性を確認した。また従来の顕微FTIR法と比べて検出濃度は同程度であった。