

課題番号 【1-2103】

体系的番号 (JPMEEERF20211003)

課題名：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

課題代表者 荒川久幸

課題代表機関 国立大学法人 東京海洋大学

研究実施期間 令和3年度-令和5年度

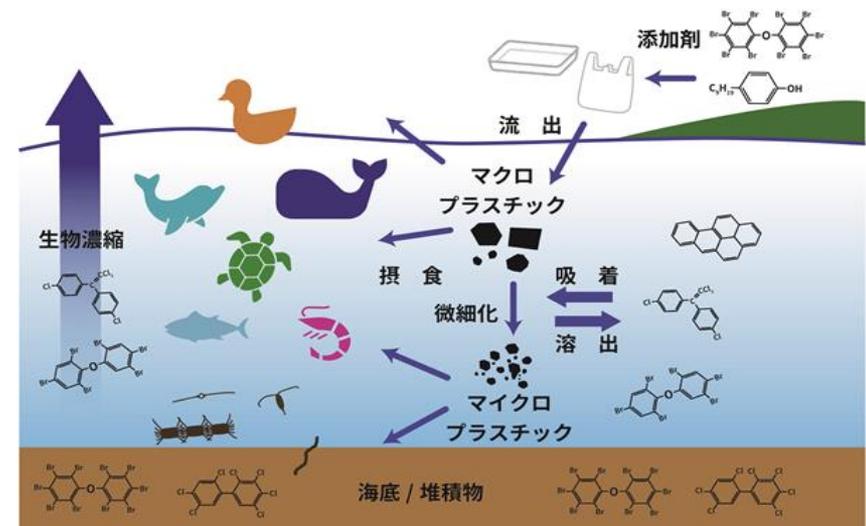
研究体制 サブテームリーダー 小池義和
(学校法人 芝浦工業大学)

1. はじめに(研究背景等)

背景 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、これらは海域で細片化されている。海洋マイクロプラスチック(以下MPs; <5mm)は、海洋生態系へ様々な影響を及ぼすことが懸念されている。従前からのMPs調査は、多大な労力と時間が必要。

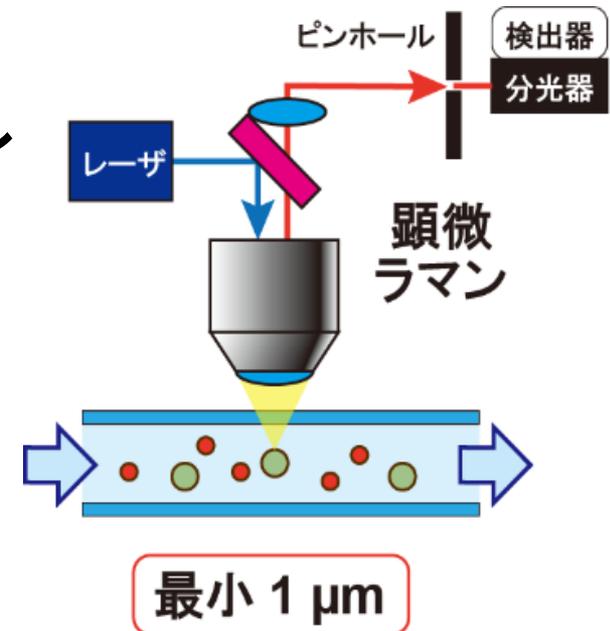
MPs汚染の正確な評価のためには、効率的で統一された計測手法の開発が不可欠である。また、現状では目開き350 μm程度のネットを使用することから、微細なMP(以下SMP)の濃度情報はほとんど得られていない。

特に生物影響が大きいといわれる微細なMP(SMP)の分布や挙動の把握が必要となっており、その計測手法の開発が急務。



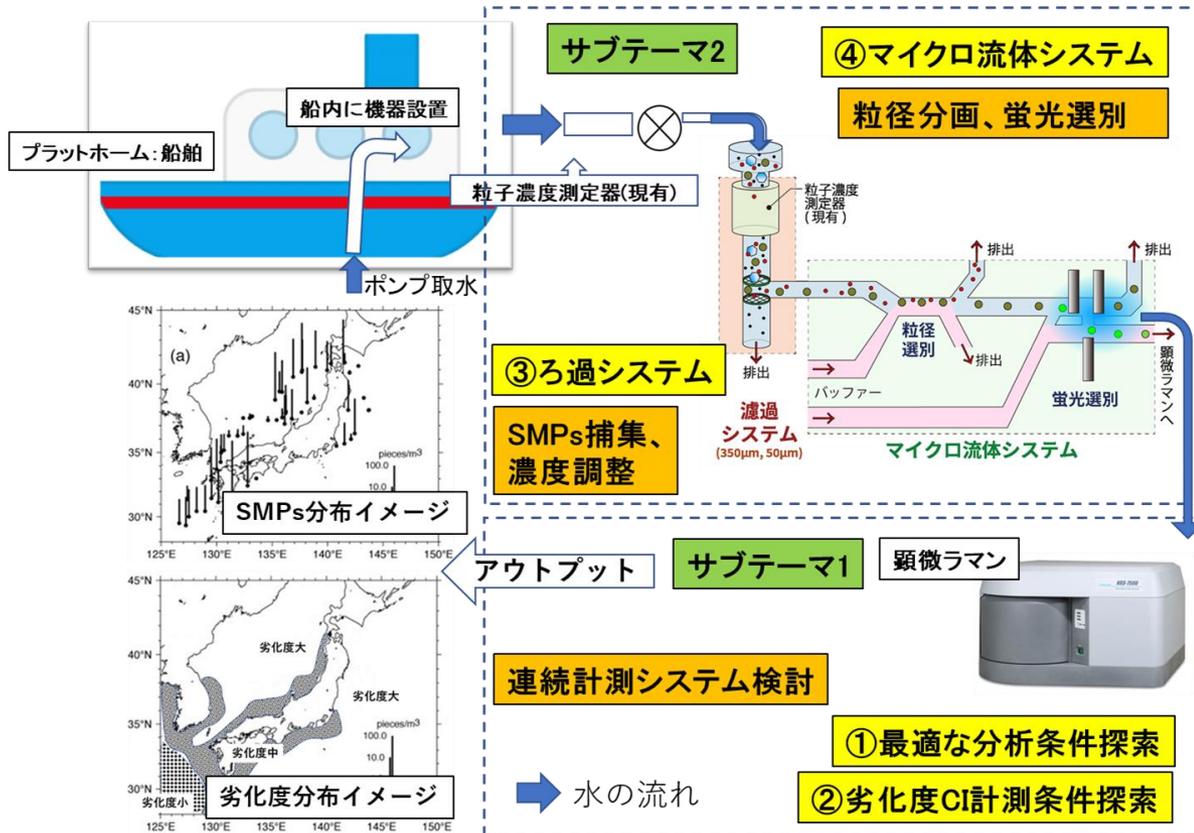
2.研究開発目的

船舶へ表層の海水を引き込み、SMP(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SMP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。



3.研究目標及び研究計画

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。



3.研究目標及び研究計画

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。

(項目1)

① 計測(検出・劣化分析)環境の構築、微細なマイクロプラスチック(SMP)の計測条件を決定し、分析システムの構築。

(令和3-4年度)

② システムを船舶へ搭載し、船上での運用条件の決定。(令和4-5年度)

(項目2)

完成システムにより、現場海域(日本海)におけるSMPの分布およびその劣化度(CI)の分布の把握。(令和5年度)

3.研究目標及び研究計画

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。

(項目3)

MPs粒子の海水から粒子を捕集するろ過システム部の開発と高濃度への濃縮。(令和3-4年度)

(項目4)

一定量を顕微ラマン分光光度計へ移送する集積マイクロ流体システム。(令和3-4年度)

サブテーマ1 & 2: 現場海域での実証試験 (令和5年度)

4. 研究開発内容

【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

項目1 ①顕微ラマン分光光度計(イメージング計測)での計測条件:

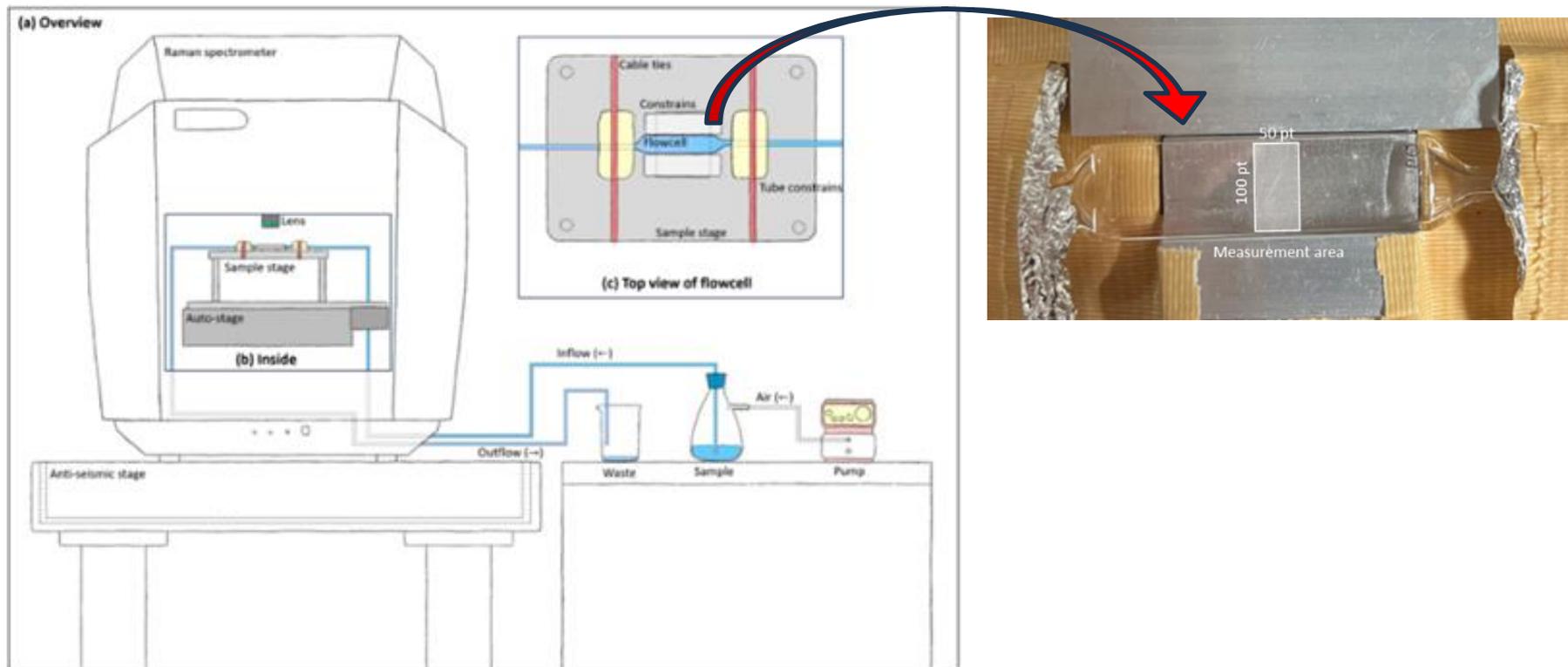


図1 セルをラマン光度計へ設置した様子

②船舶での使用条件

実験方法(水深4mから採取)

- (1) 研究室海水のMPs濃度
- (2) 船舶の動揺が計測に与える影響

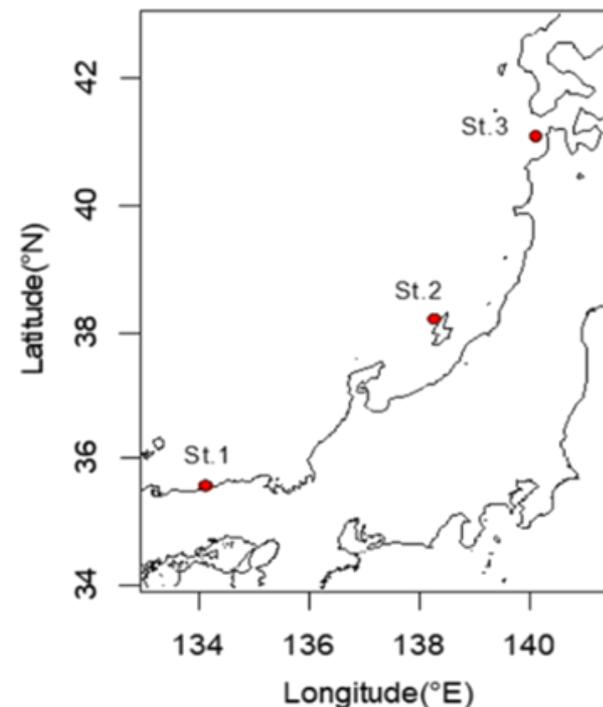
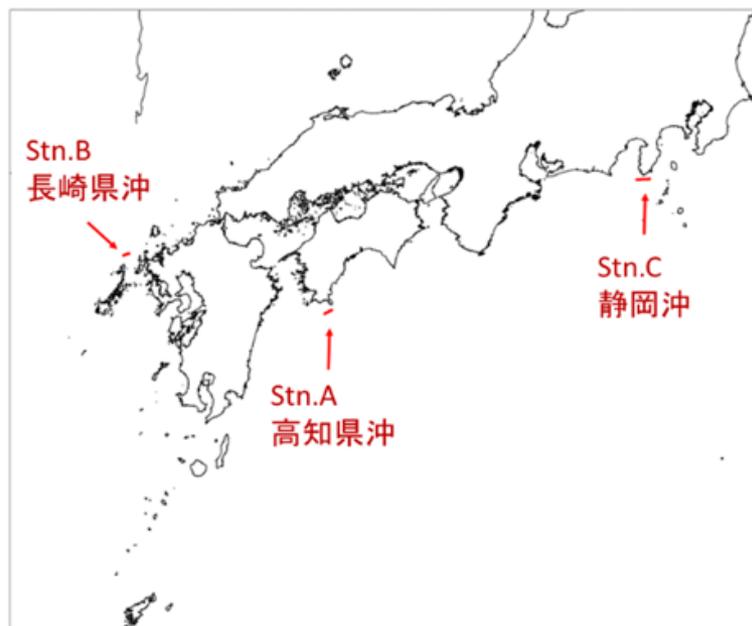


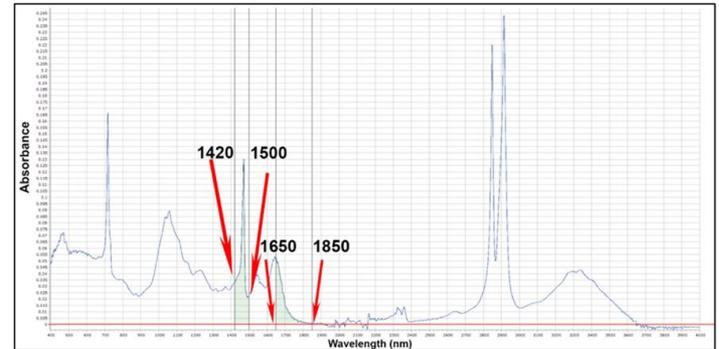
図3 研究室海水の分析

研究室海水は、連結した濾過器を目合いの大きい順
(355 μm , 100 μm , 30 (45) μm)に通過、通水時間:1時間

③カルボニルインデックス (CI) の計測

Carbonyl Index

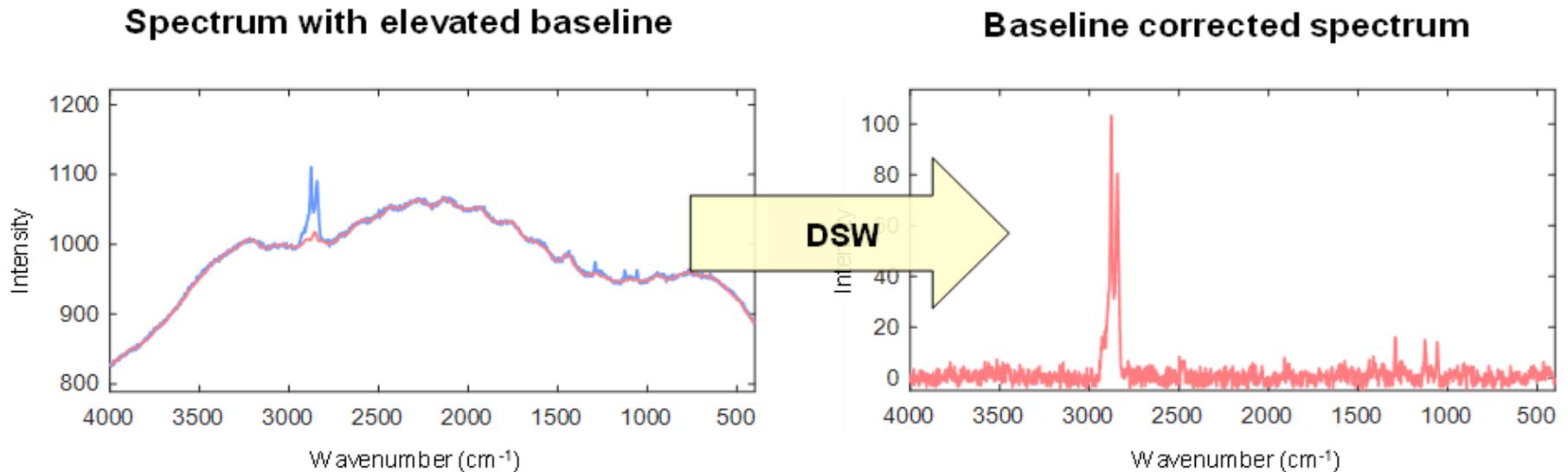
$$= \frac{\text{Area under band } 1850 - 1650 \text{ cm}^{-1}}{\text{Area under band } 1500 - 1420 \text{ cm}^{-1}}$$



(1)ラマン光度計およびFTIRによるCIの関連

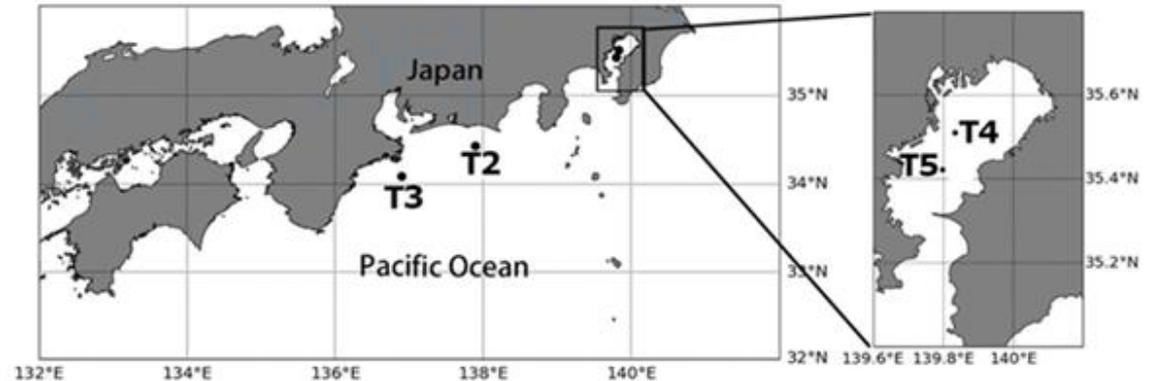
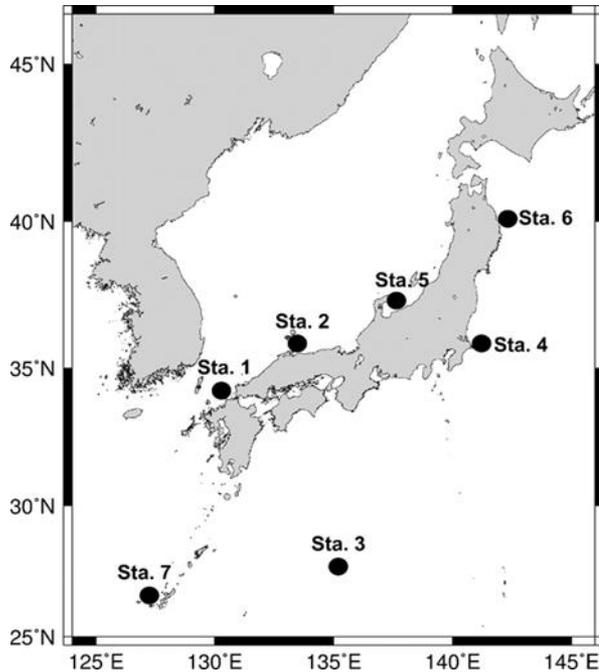
Method ID	X_1/X_2	Spectroscopy	Reference
M-01	[1650 1850]/[1420 1500]	FTIR & Raman	Almond et al., 2020
M-02	1714/720	FTIR & Raman	Benítez et al., 2013
M-03	1720/720	FTIR & Raman	Focke et al., 2011
M-04	1713/730	FTIR & Raman	Antunes et al., 2017
M-05	1710/1380	FTIR & Raman	Ali et al., 2016
M-06	1714/1463	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

(2) スペクトルのベースライン補正



スペクトルにはノイズが含まれる。そこでノイズの低減を目的にベースライン補正法を検討して、DSW法を開発した。

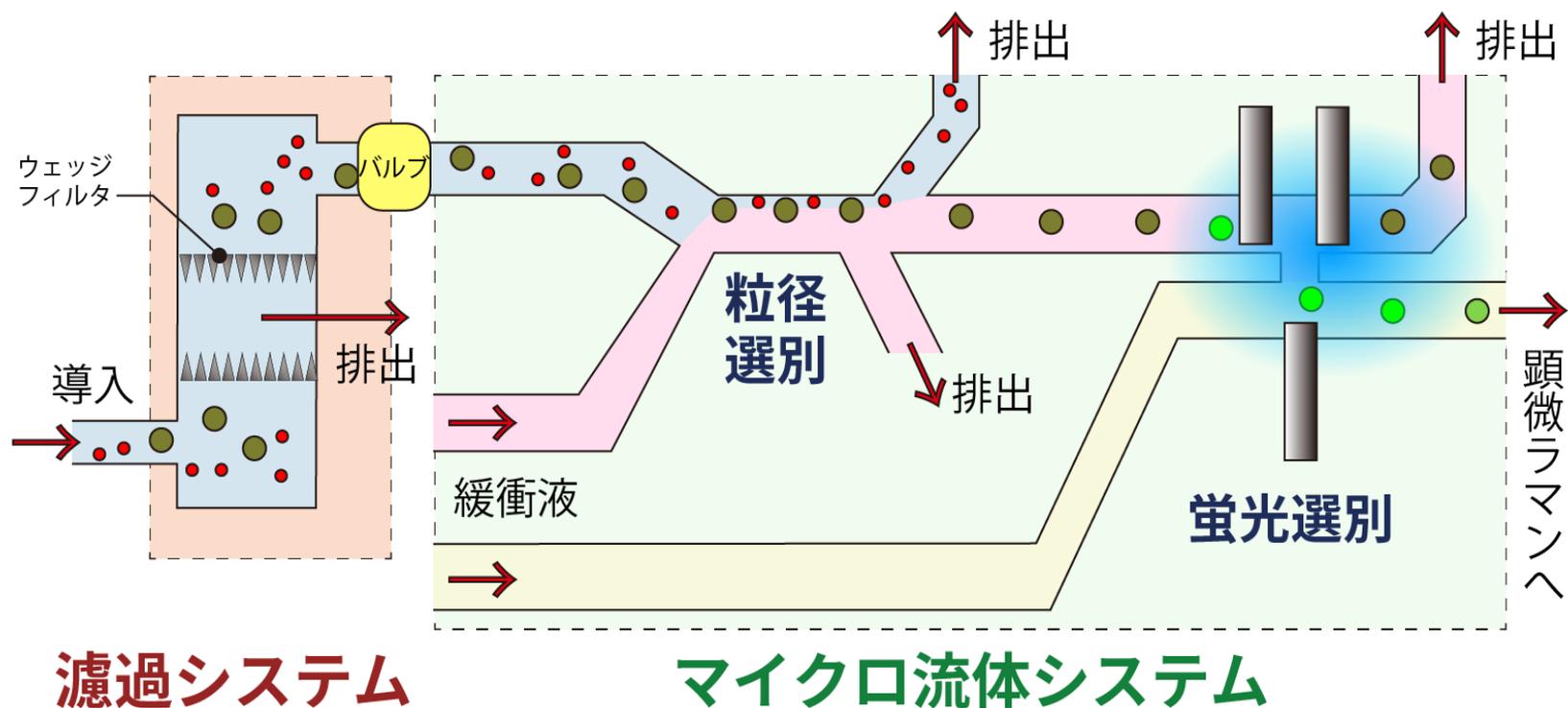
(3)MPサイズとCIの関係



環境中のMPのCIが海域で異なるのか、サイズで異なるのか、検討した。

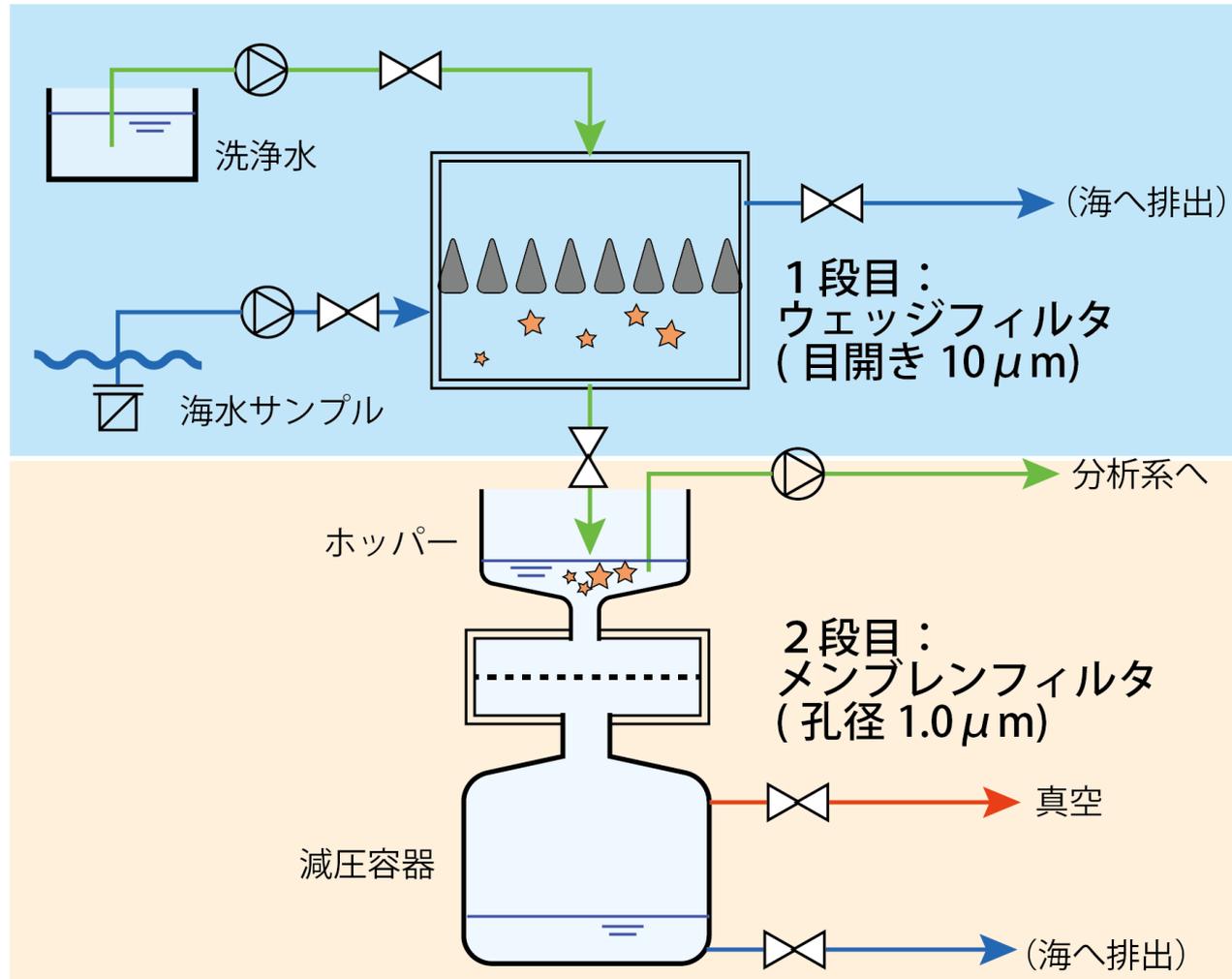
4. 研究開発内容

【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目標その1: 連続的に, 大量の海水から粒子が得られるようにする

① 2段濾過濃縮システムの開発



① SUS316L/ヘルール利用システム



ハウジング
外観



逆洗流入
ろ過流出

リデューサ

ファイン
ウェッジ
ストレーナ

異径
チーズ

ろ過
流入

逆洗流出



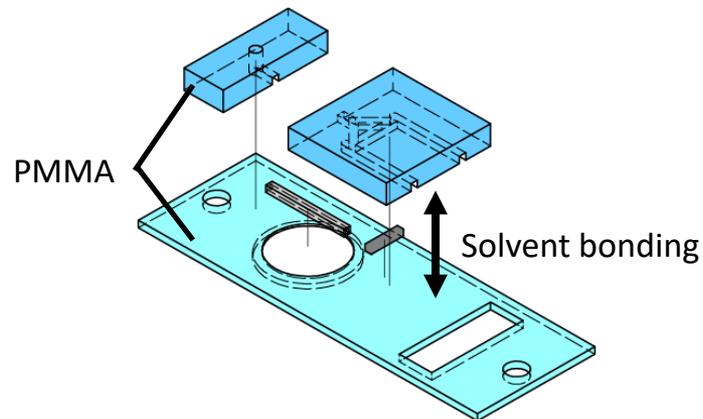
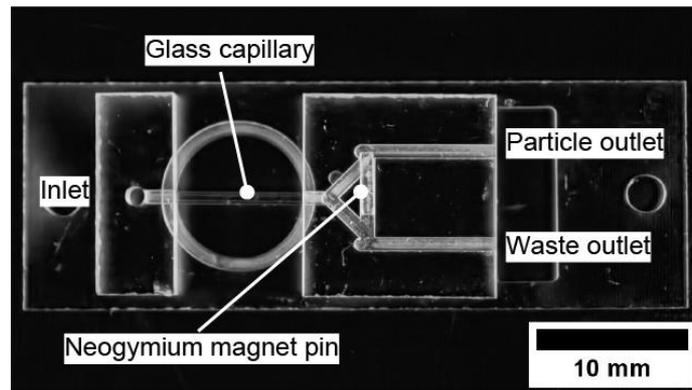
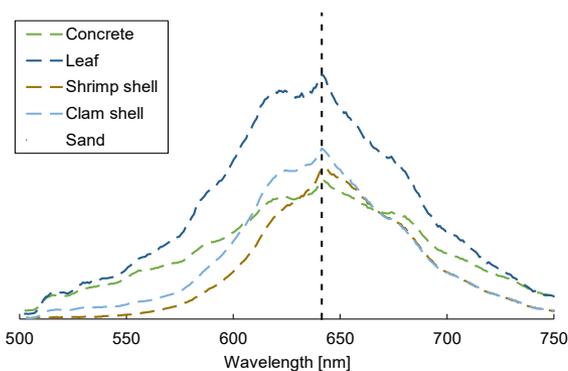
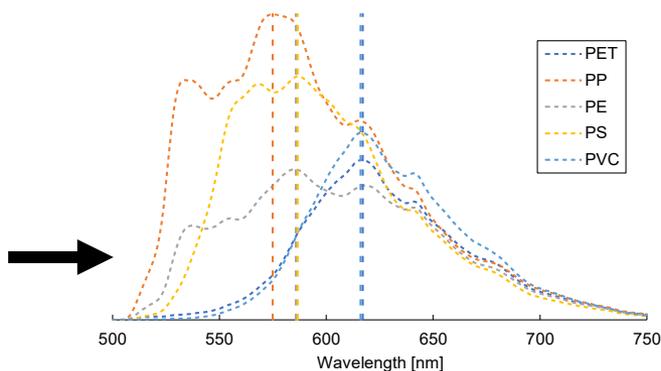
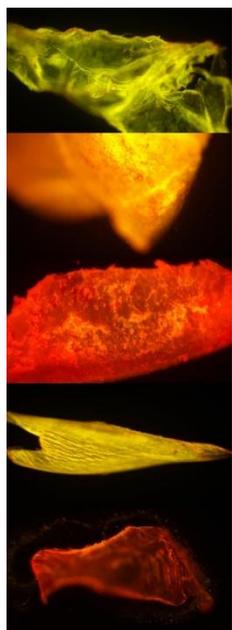
逆洗流入

ろ過流出

ろ過
流入

逆洗流出

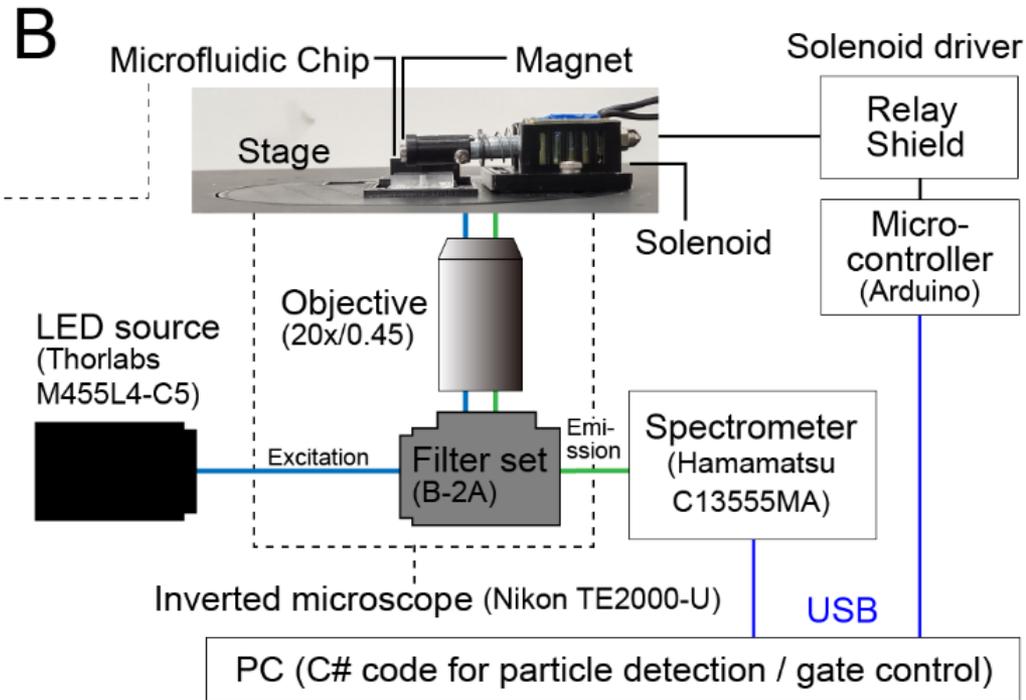
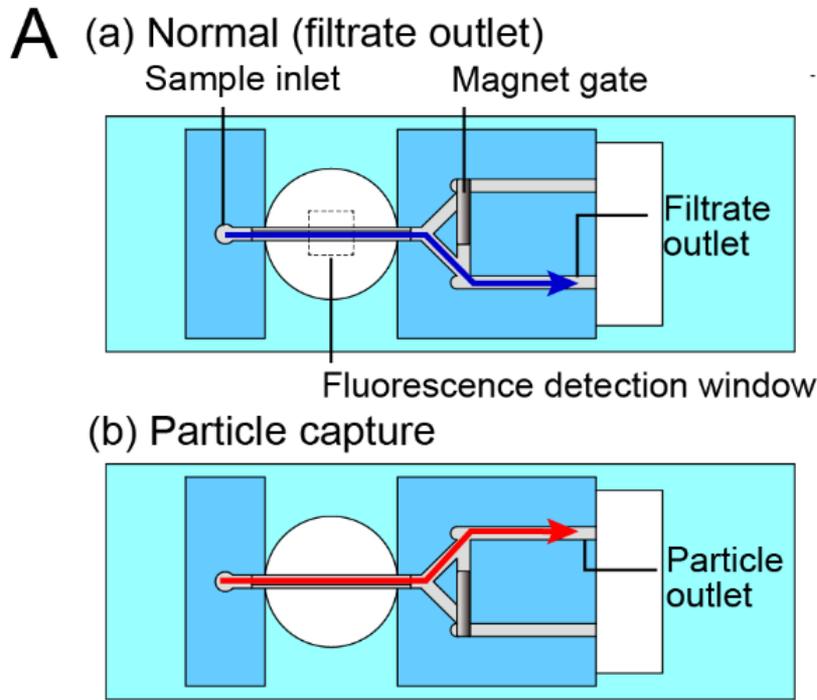
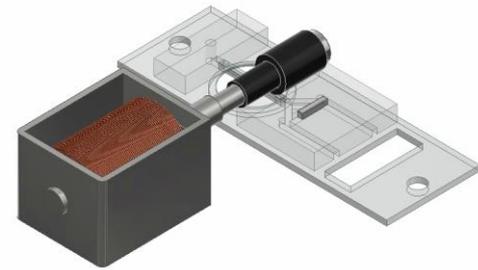
② 蛍光に基づくマイクロ流体選別



Nile Redで染色された粒子の蛍光スペクトルピークは、プラスチックの場合、570-600[nm]もしくは600-630[nm]に存在した(非プラスチック材料は、それらと離れたところにピークがある)

②選別システム全体の構成

- ソレノイドで外部の磁石を変位させることで内部の磁石ゲートを変位させる
- 分光器により粒子の蛍光を検出し、検出後ただちに流路を"Particle Capture"に切替, 3sで"Normal"に復帰.



5.結果及び考察

【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

①計測条件

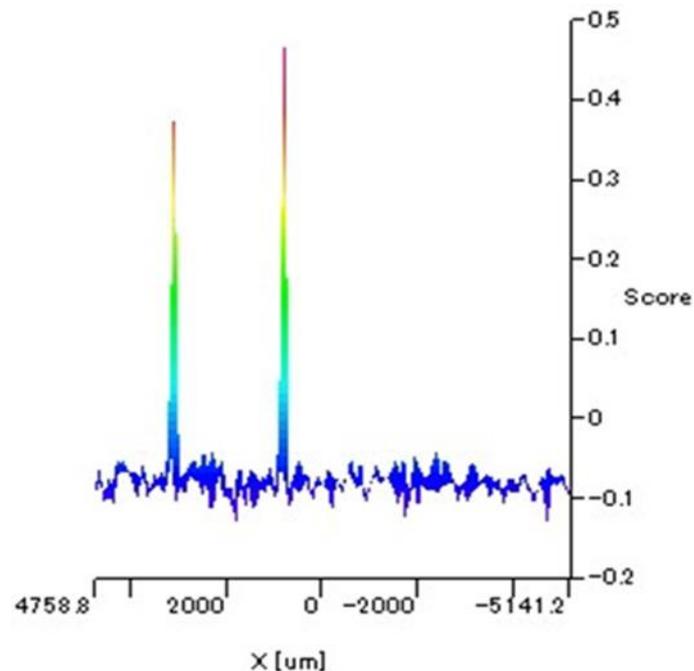
(ラマン光度計; 日本分光NRS-4500)

レーザー強度: 41 mJ (最大)

露光時間: 0.1 sec (最小)

焦点位置: 上面から50 μ m

植物プランクトンの影響: 無し



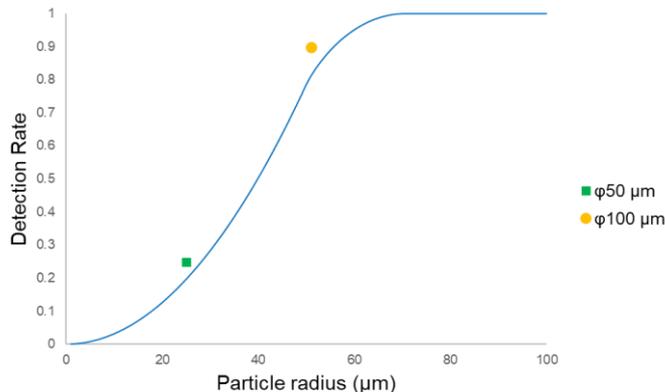
連続的な計測によって検出されたPE粒子

・ラマン光度計の連続計測でPEが検出。

イメージング計測による濃度測定

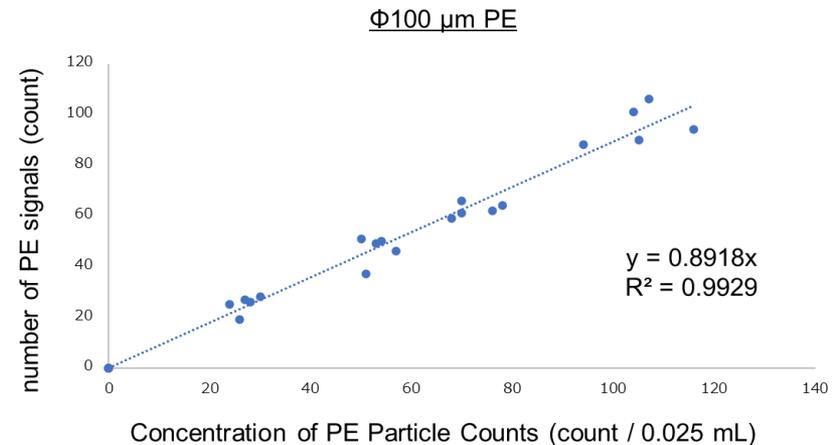
$$\bullet \quad R = \begin{cases} \pi \left(\frac{d_e}{2}\right)^2 & 0 < d_e \leq 1 \\ \left(\pi - 4 \arccos \frac{1}{d_e}\right) \left(\frac{d_e}{2}\right)^2 + d_e \sin\left(\arccos \frac{1}{d_e}\right) & 1 < d_e \leq \sqrt{2} \\ 1 & \sqrt{2} < d_e \end{cases} \quad (1)$$

ここで、 R は検出率、 d_e は等価粒子直径である。この関係から、 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。



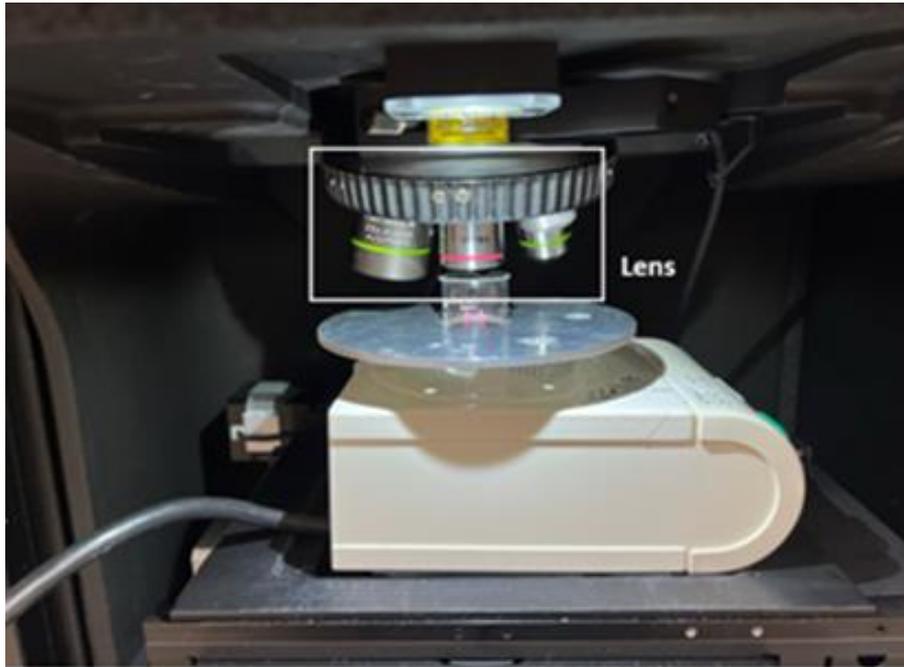
格子間隔 100 μmの場合

- 50 μm: **19.6 % theoretical**
- 100 μm: **78.5 % theoretical**
- 200 μm: **100 % theoretical**



粒子サイズの違う場合もきれいな関係

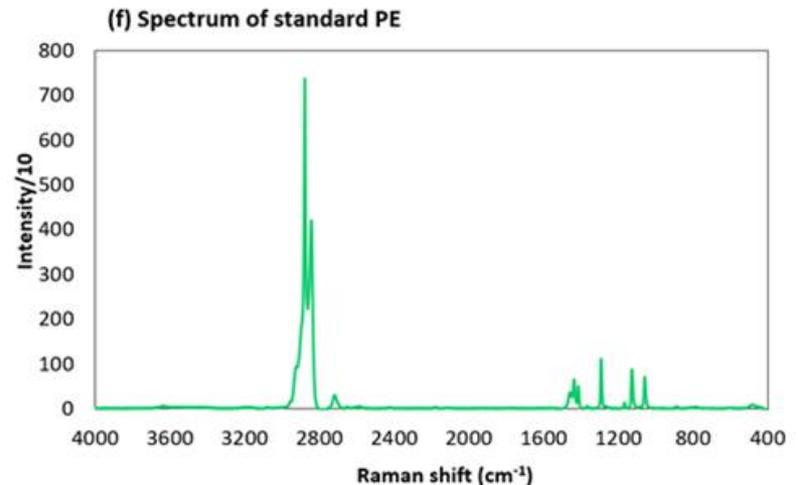
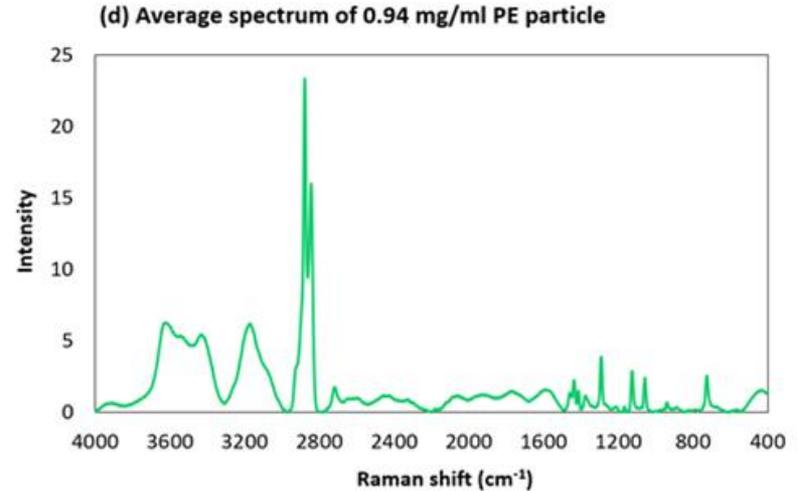
ビーカー法による計測



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、汎用できる計測法を検討した。

⇒PE粒子の存在を検出した。

また濃度に応じてピークが高くなった。



②-1. 顕微ラマン光度計の船舶での使用条件

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 ± 379.0	57.1	0
Sta. 2	佐渡沖	2779 ± 720.9	373.3 ± 229.4	0
Sta. 3	津軽半島沖	3633 ± 1796	733.3 ± 660.0	0

・研究室海水に含まれる主なMPsの種類はPE。

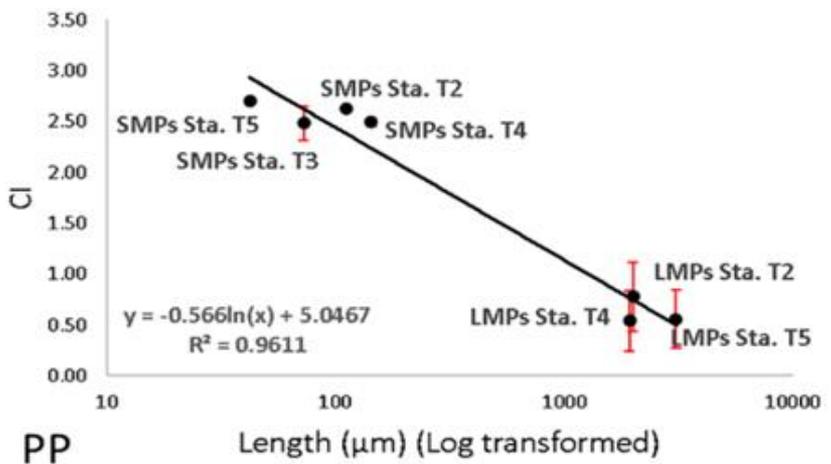
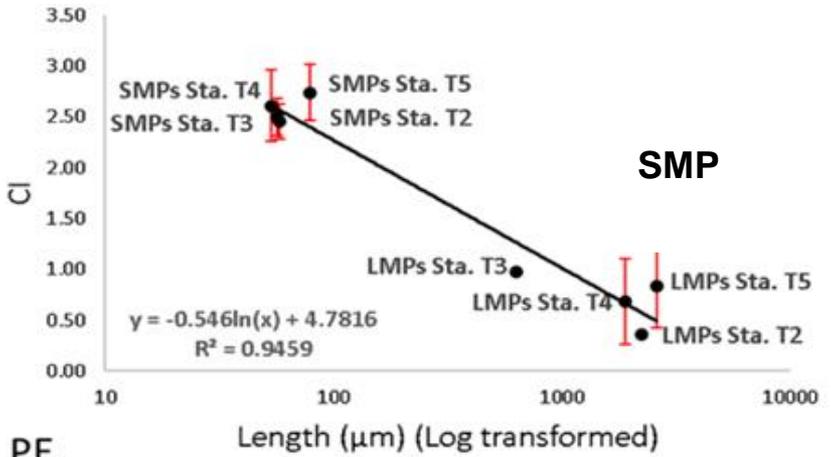
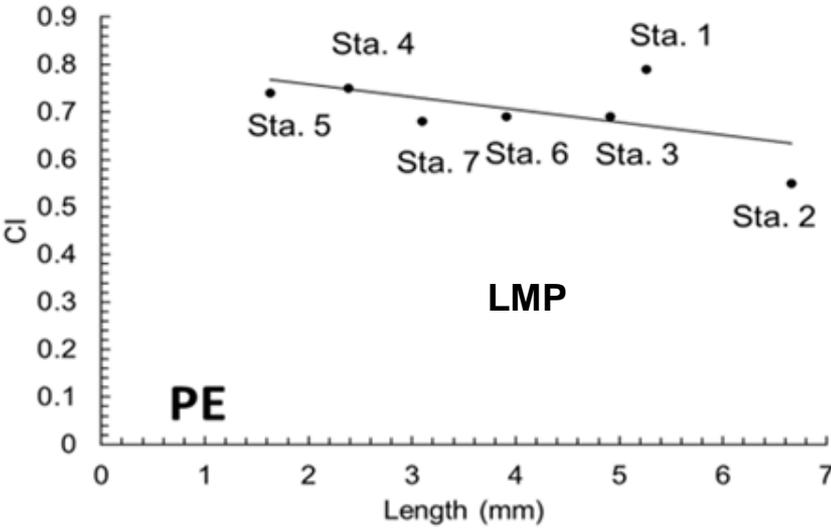
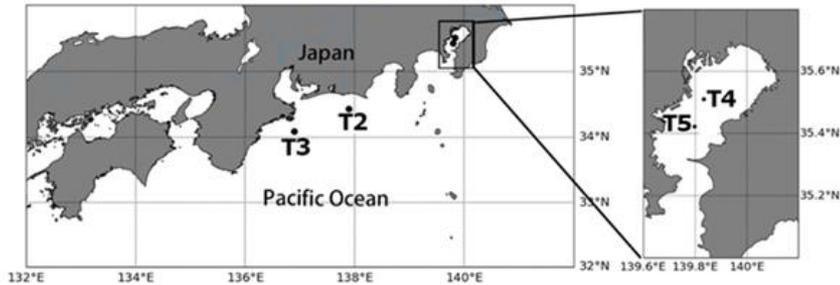
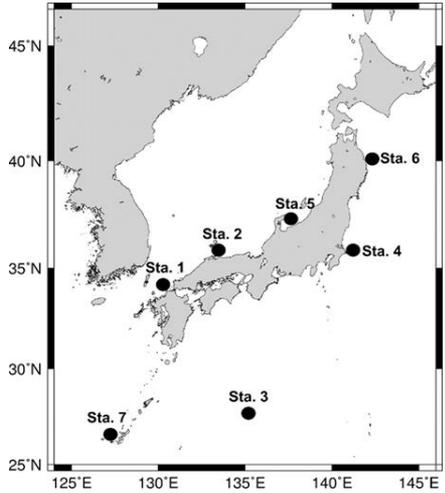
③CIの計測

(1)CIの比較

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

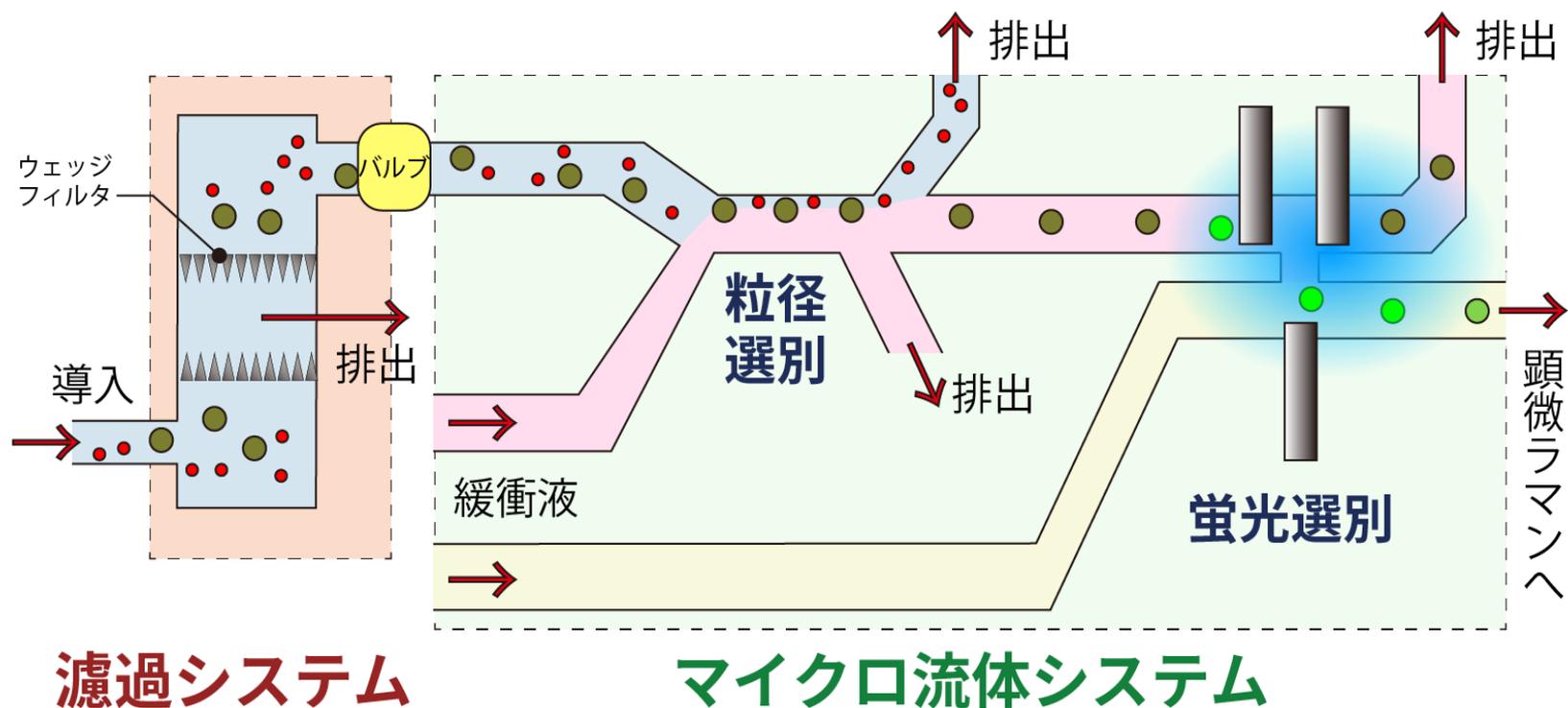
	M-01	M-02	M-03	M-04	M-05	M-06	M-07	M-08	M-09	M-10	
	<i>Station A</i>										
Raman	M-01	0.17	0.23*	0.23*	0.19	0.13	0.22	0.21	0.25*	0.22	0.05
	M-02	0.11	0.17	0.15	0.14	0.04	0.15	0.15	0.16	0.07	0.00
	M-03	0.20	0.18	0.17	0.13	0.08	0.18	0.17	0.21	0.29*	0.05
	M-04	0.13	0.06	0.06	0.02	0.02	0.09	0.07	0.09	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

(3) サイズとCIの関係



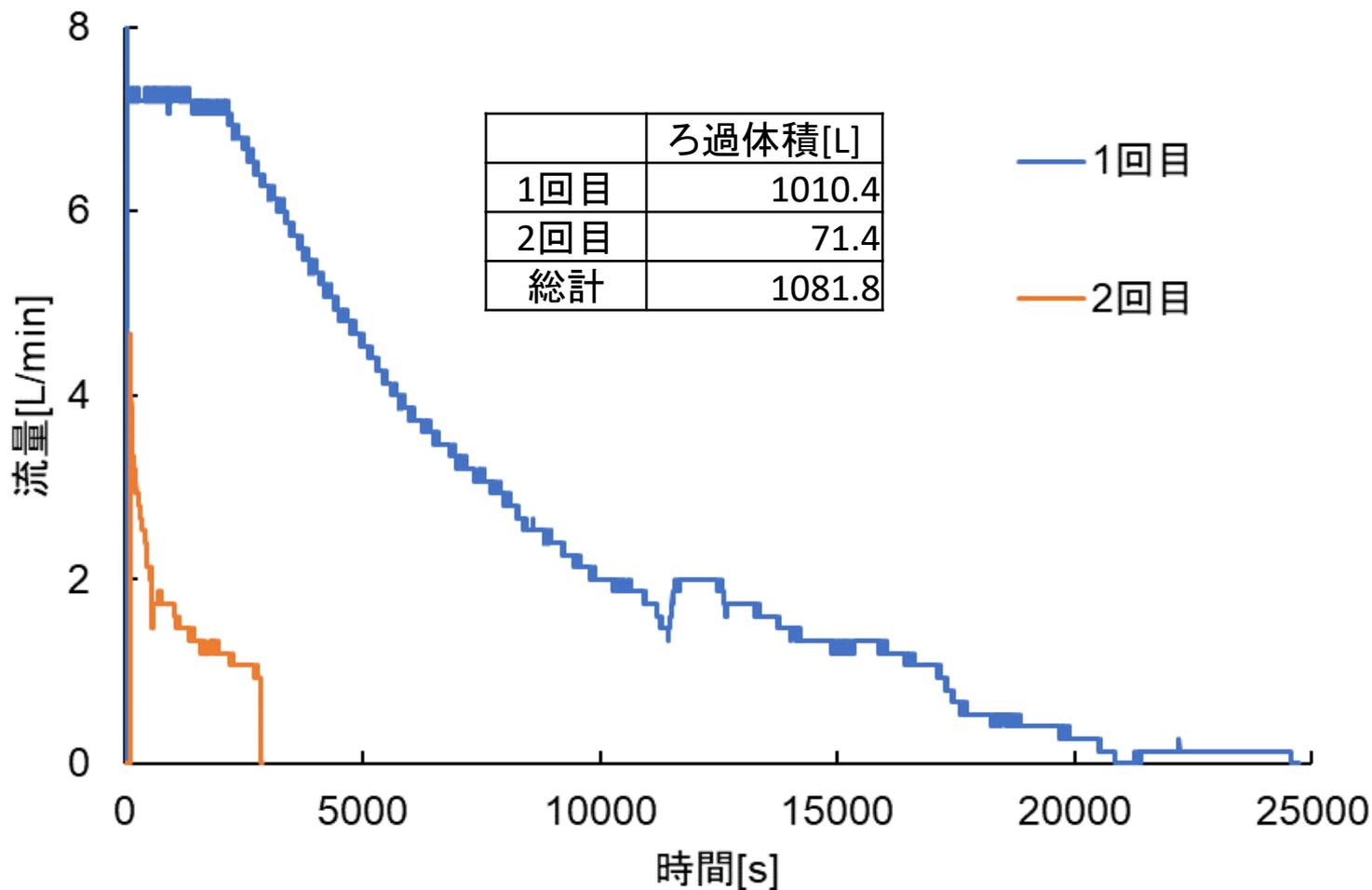
5.結果及び考察

【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



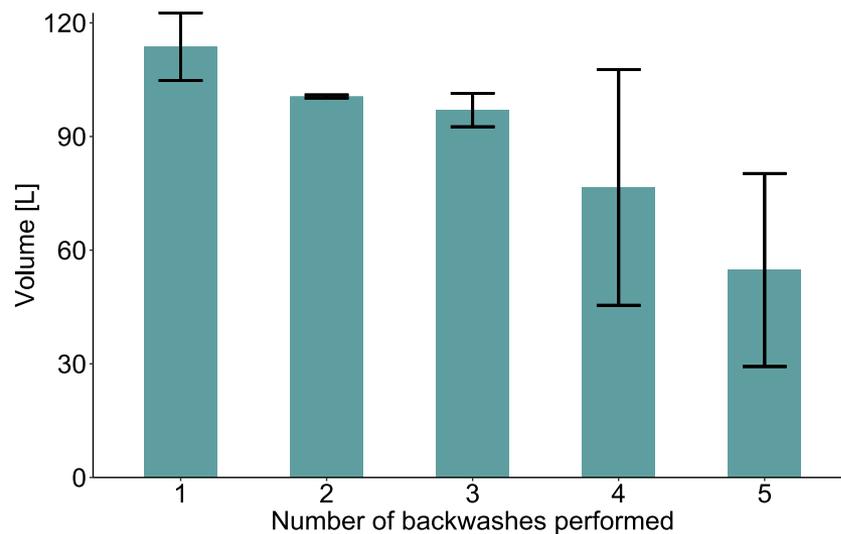
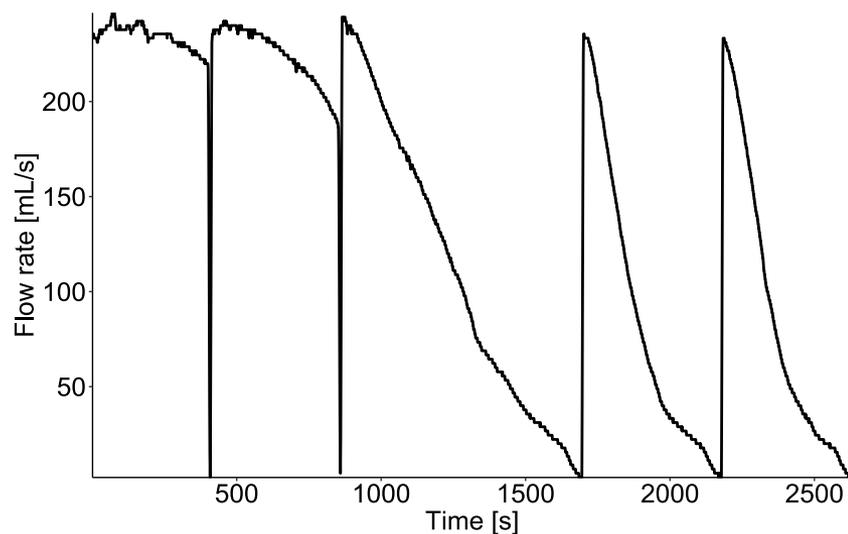
①濾過性能(神鷹丸・日本海)

2023/7/27 14:49~21:37



①逆洗最適化の効果（豊洲運河）

- 豊洲運河（東京都江東区）の水からの粒子の濾過抽出を試みた
- 約10分の駆動を5回繰り返すことで、400Lの採水あたり1.6Lの粒子懸濁液を取得できた。
- この懸濁液は、メンブレンフィルタろ過の適用により10ml以下になる。

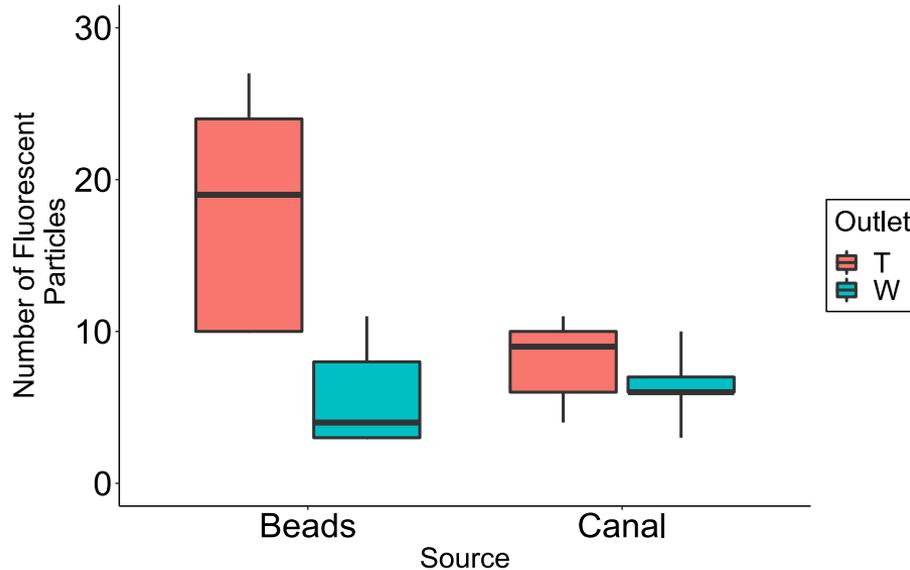


ろ過装置を通過した海水の流量の時間変化

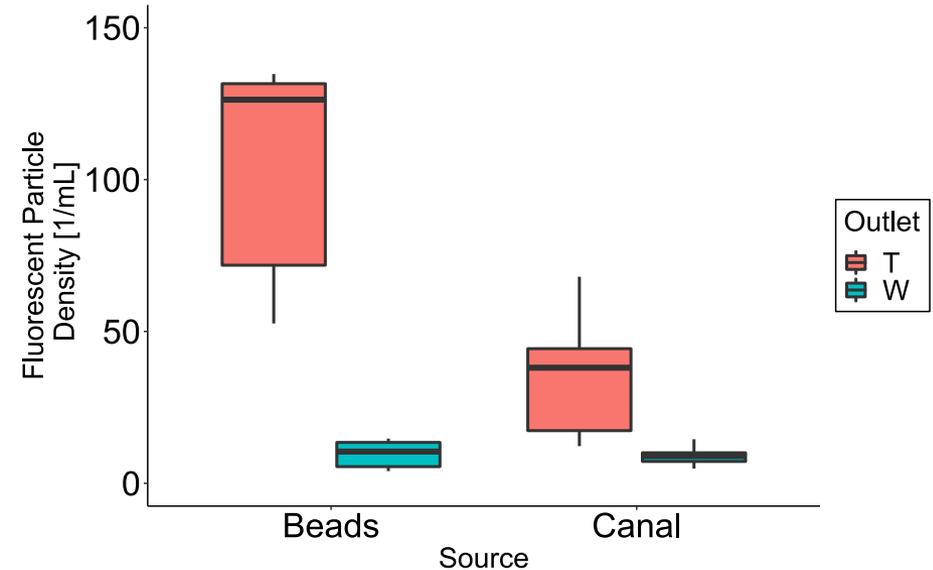
逆洗実施毎の濾過積算流量

② 蛍光マイクロ流体選別の効率

- Nile Red分光スペクトルに基づきMPと判定された粒子を回収できた
- 環境中のサンプルでは、ビーズに比べ分離の度合いが低い傾向
 - しかし、液体の体積を加味(濃度を計算)した場合は差が明確

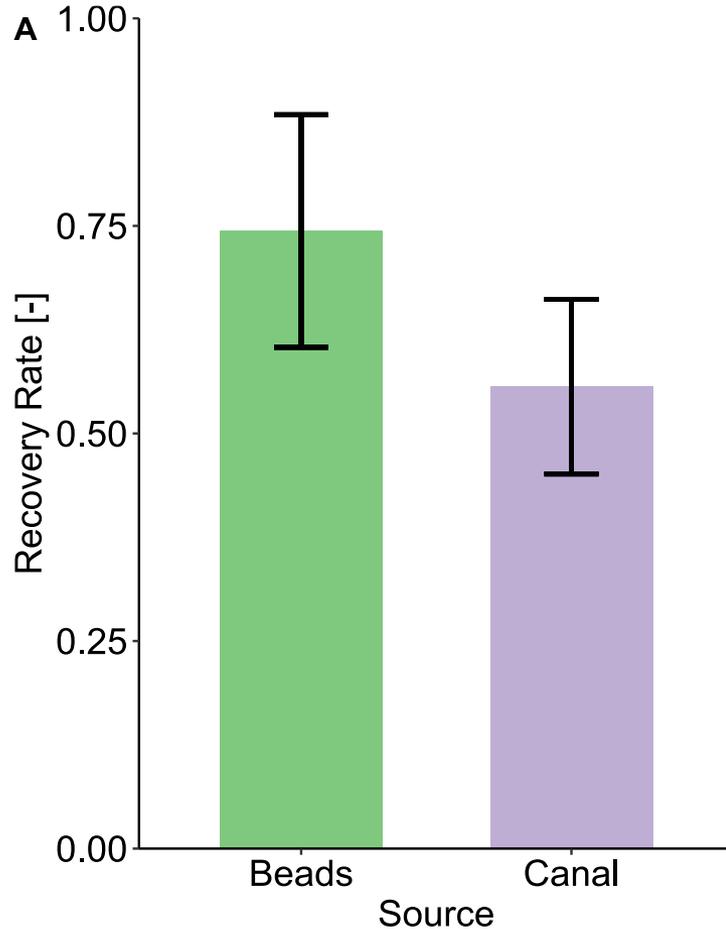


各流路出口ごとの蛍光粒子の数

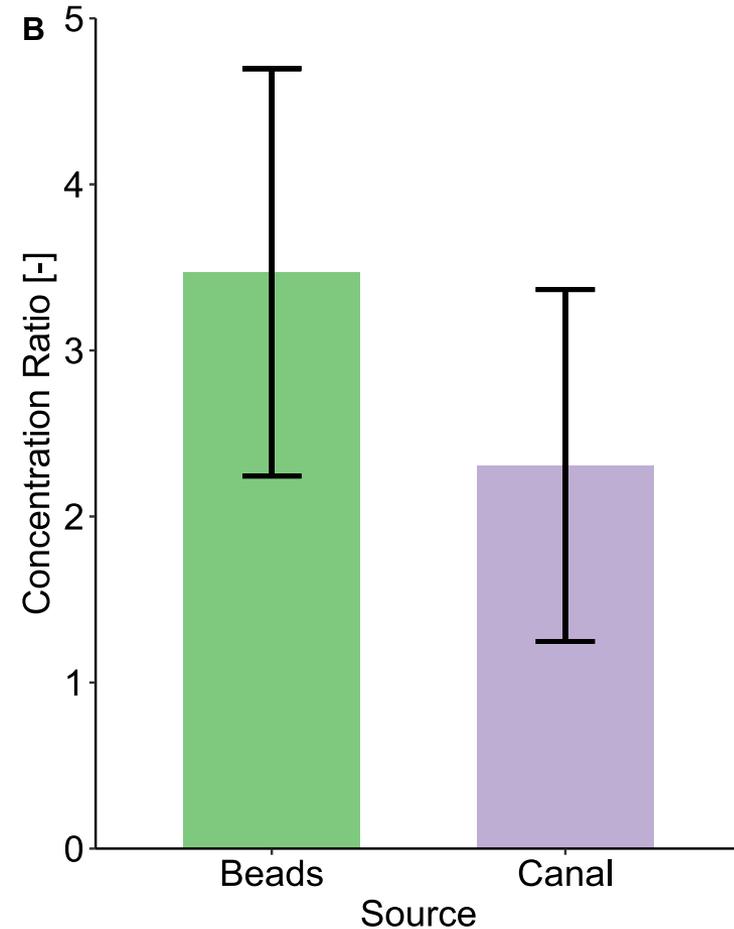


各流路出口ごとの蛍光粒子の濃度

② 蛍光粒子の回収率と濃縮率



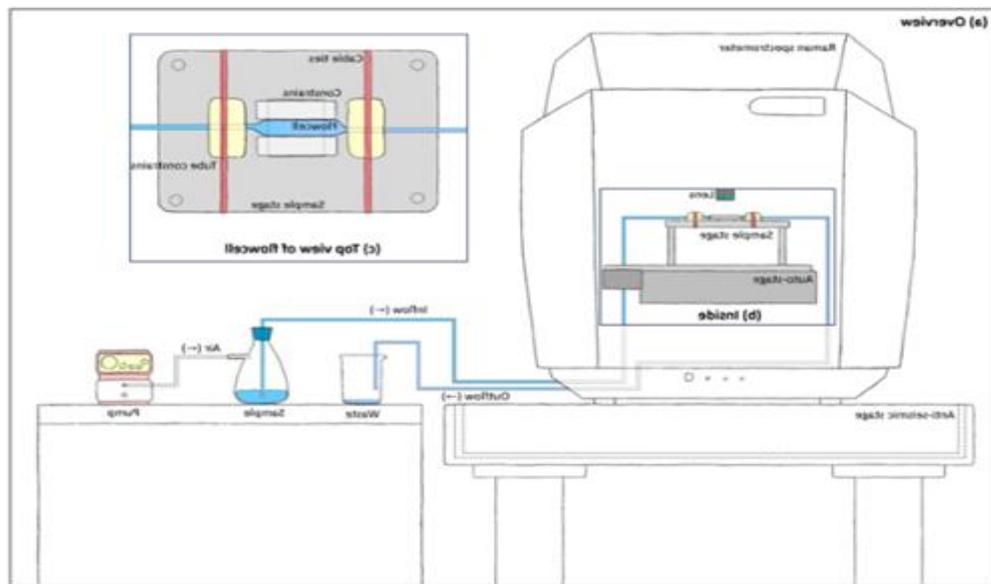
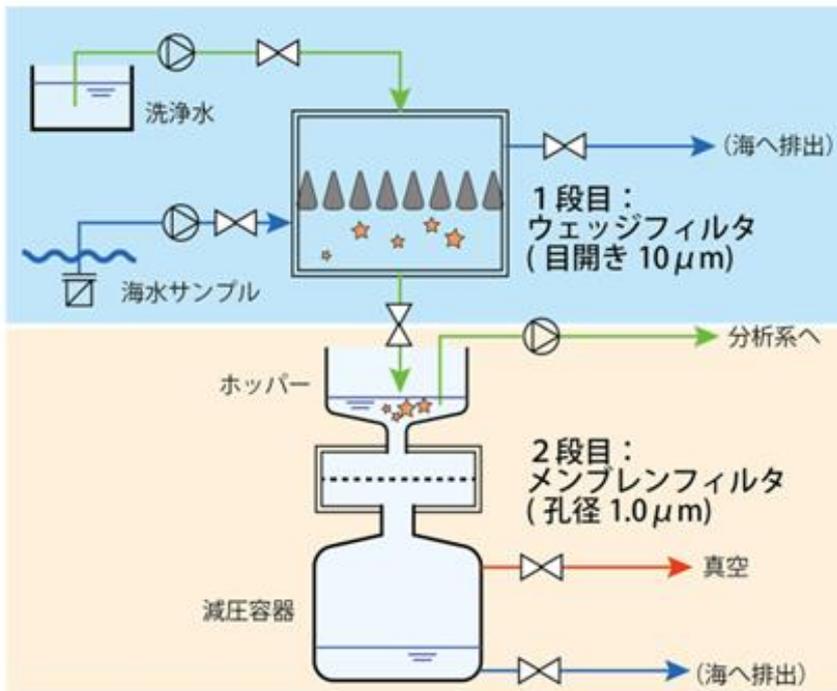
マイクロ流路の出口で正しく回収できた蛍光粒子の割合



マイクロ流路への導入前後での蛍光粒子の濃度比

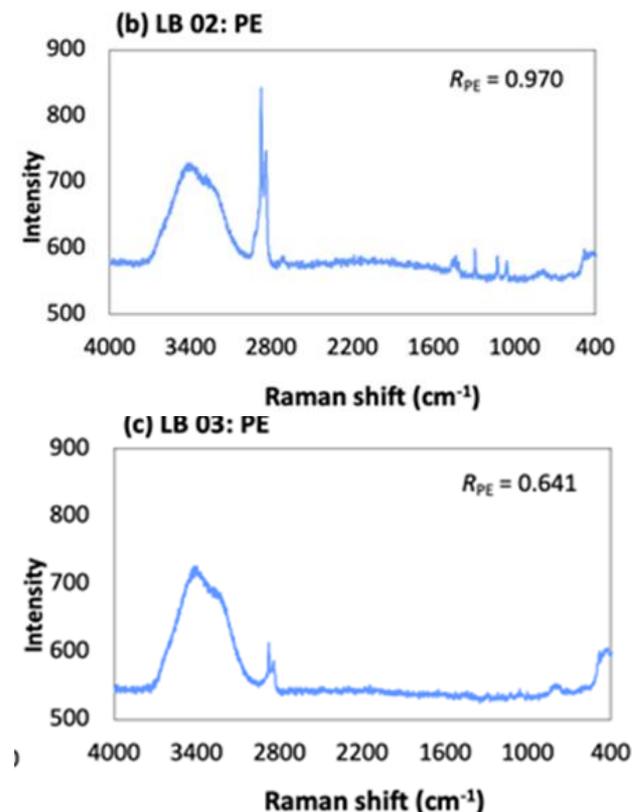
サブテーマ1&2

顕微ラマンを用いたSMP濃度計測システム



回収試験および環境中PE検出

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



- ・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。
- ・PE粒子の Cl_{Raman} は0.77-2.73 (M-15; X1/X2 = 1296/1460 ; Lenz et al., 2015; Phan et al., 2022)

6.研究の達成状況と環境政策等への貢献

(1) 達成状況

【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

○選択した自己評価:3.目標通りの成果を上げた。

○具体的な理由および根拠:ラマン光度計によるSMPの計測システムを完成し、実海域での濃度測定の手法を確立した。ラマン光度計システムによってMPs(PE)のCIを計測できることを確認し、この値がMPの劣化指標となることを確認した。

○設定した目標の達成状況

計測システムを構築し、MPの検出は確認できた。ろ過システムと共に運用し、安定してMP濃度を決定するためにさらなるMP濃縮が必要と考えられた。

6.研究の達成状況と環境政策等への貢献

【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達成状況

○選択した自己評価:3.目標通りの成果を上げた。

○具体的な理由および根拠:1000Lの海水からSMPをろ過し回収できるシステムを開発し,実海域での運用を可能とし,かつ回収試験により実用的な粒子回収率が得られることを確認した.

海水由来の夾雑物の多い粒子サンプルにおいてもMPらしき粒子のソーティングが可能なマイクロ流体システムを実証できた.

○設定した目標の達成状況:MP回収と分析の簡便な方法を確立できた.サブテーマ1(特にラマン装置)との接続に加えて,小規模でもより頻繁に実海域に出て調査できる機会が必要と考えられた.

6.研究の達成状況と環境政策等への貢献

(2) 環境政策等への貢献

＜行政等が活用することが見込まれる成果＞

○ラマン光度計によるバッチ計測による連続的なSMPの検出を実現し、その濃度推定が可能である。

○SMPの捕集法について新たな装置を提案した。蛍光染色およびマイクロ流体選別の組み合わせでSMPを選別することができることを示した。

○環境中MPについて、CIとMPサイズとの関連を見出した。すなわちCIがMPの劣化、細片化の指標とできることを示した。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表 <論文(査読あり)>

【サブテーマ1】 11件

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. <i>MethodsX</i> , 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. <i>Marine pollution bulletin</i> , 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, <i>Marine Pollution Bulletin</i> , 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. <i>Marine Pollution Bulletin</i> , 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, <i>MethodsX</i> , 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. <i>Marine Pollution Bulletin</i> , 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. <i>Marine Pollution Bulletin</i> , 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. <i>Marine Pollution Bulletin</i> , 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. <i>Marine Pollution Bulletin</i> , 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, <i>La mer</i> , 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, <i>Science of the total environment</i> , 2024, 927, 171871. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171871

【サブテーマ2】 1件

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

＜その他誌上発表（査読なし）＞

【サブテーマ2】 2件

口頭発表（国際学会等） 【サブテーマ1】 3件、【サブテーマ2】 7件

口頭発表（学会・査読無） 【サブテーマ1】 10件、【サブテーマ2】 20件

「国民との科学・技術対話」

【サブテーマ1】 9件、【サブテーマ2】 3件