

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04283

研究課題名（和文）2次元分光イメージングを用いた革新的なマイクロプラスチック分析標準システムの開発

研究課題名（英文）Development of innovative standard system for microplastic analysis using 2-dimensional hyperspectral imaging.

研究代表者

池島 耕 (Ikejima, Kou)

高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・教授

研究者番号：30582473

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マイクロプラスチック分析のための2次元中赤外分光イメージングシステムを開発し、測定条件やプラスチック材の識別性を検証した。汎用マイクロボロメータを用い中赤外波長の吸収スペクトルデータを2次元的に測定するシステムを確立し、従来のFPA-FT-IRイメージング装置に比べ、コストと測定時間が大幅に小さい分析システムが構築できる可能性を示した。合わせて、分析プロセスにおけるマイクロプラスチックのコンタミネーションの原因を分析し、その結果に基づいて汚染対策プロトコルを作成し、1標本あたりの混入物数を1以下に抑え生物個体レベルのマイクロプラスチックの濃度評価が可能になることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロプラスチック汚染は世界的な環境問題として注目され、近年多くの研究が行われているが、汚染の実態とメカニズムについては未だ不明な点が多い。環境や生物体内のマイクロプラスチックの数や大きさを計測し、その種類を特定することはMP汚染の実態とメカニズムを明らかにする第一歩として極めて重要であるが、多くの手間と時間がかかり、種類の特定には高価な機器を必要としてきた。本研究では、2次元分光イメージング技術を用いてマイクロプラスチックを計測するシステムを構築した。本研究は、これまでより短時間に多数のマイクロプラスチックの数、大きさや種類を計測するシステムをより低コストで実現できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, a two-dimensional mid-infrared spectroscopic imaging system for microplastic analysis was developed and its measurement conditions and plastic material discrimination were examined. We established a two-dimensional measurement system for absorption spectra data at mid-infrared wavelengths using a general-purpose microbolometer, and demonstrated the possibility of constructing an analysis system with significantly lower cost and short measurement time compared to a conventional FPA-FT-IR imaging system. In addition, we analyzed the causes of microplastic contamination in the analysis process and developed a contamination minimizing protocol based on the results, showing that it is possible to reduce the number of contaminants per specimen to less than one and evaluate the concentration of microplastics at the level of individual organisms.

研究分野：水圏生態学

キーワード：マイクロプラスチック 2次元分光イメージング 中赤外分光 分析プロトコル コンタミネーション 防止 黒色プラスチック

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、マイクロプラスチック(Microplastics: 以下 MP と示す)汚染は世界的な環境問題として関心が高まり研究報告も急速に増えている。調査対象の拡大と分析技術の進歩に伴い、MP 汚染は河川・海岸・海表面から深海底まで、また、大型の魚類や鳥類から微小な動物プランクトンの体内まで広がること明らかになってきた。しかし、汚染の実態やメカニズムには不明な点が多く、環境中や生物体内に取り込まれた MP の大きさや数、その素材を明らかにすることは、MP 汚染がどのような環境や生物で進行しているか、さらに、MP がどのようにして環境中に広がり生物に取り込まれるのかなど、MP 汚染の実態とメカニズムを明らかにする第一歩として極めて重要である。

環境中や生物体内の MP は通常、標本中の天然物を目視や薬品で除去した後、顕微鏡観察、蛍光染色法やフーリエ変換赤外分光分析(FT-IR)により確認し計測される。顕微鏡観察は天然材の誤同定の可能性が大きく、蛍光染色法では天然材の誤認の可能性は低くなるが、プラスチック材の種同定はできない。これまで、MP 標本の一部を取り出しフーリエ変換赤外分光分析(FT-IR)によるプラスチック材の確認と種類同定が行われてきた。しかし、これらの分析には手間と時間がかかり、より迅速な分析手法の開発は喫緊の課題であった。さらに、これまで MP 分析の標準的な方法がなく、異なる研究報告に基づいた環境や生物間の比較に制約を与えてきた。

これまで、イメージング顕微 FT-IR により MP の種類の判別とサイズの測定を行う測定システムがいくつか提案されている。しかし、この方法は機器が高価で多くの研究者が用いることができず、測定時間が極めて長く大量の標本を分析することも難しい。これに対し、画像の 1 画素毎に、スペクトルデータを取得する分光イメージング装置(ハイパースペクトルカメラ)は、より速く、FT-IR と同様に素材によって異なるスペクトルを示すプラスチックの種類を判別することが期待できる。このような背景を踏まえ、2 次元分光イメージング装置を用いて、より安価で、迅速かつ高い精度を持つ MP 分析システムを開発し、それに基づく MP の標準的分析法を確立しようとする本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、石丸(研究分担者)らが開発した 2 次元赤外分光イメージング装置を基礎に、MP を含むサンプルの赤外線吸収スペクトルデータを 2 次元的に測定し、MP のプラスチック材の種類を分別し、画像解析ソフトウェアにより計数・計測するシステムを構築する。合わせて、環境および生物サンプル中の MP の分析におけるコンタミネーションの防止など、分析手順を検討する。そして、このシステムを沿岸環境における MP 分布の調査に用いて実用性を検証し、このシステムを用いた MP の標準的分析・測定プロトコルを確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は計測システムの確立、解析システムの構築、適用性の検証と分析プロトコル作成という 3 つのステップで、2 次元中赤外分光イメージング装置を用いた MP 標本の計測システムと分析プロトコルの確立を目指した。

- 1) MP 計測のための 2 次元赤外分光イメージング装置の構築: マイクロボロメータを用いたイメージング型 2 次元分光計、拡大光学系、赤外線照明、撮影台(反射/透過)と PC から構成される MP 分析のための 2 次元中赤外イメージング装置を設計した。
- 2) スペクトルデータに基づく、MP 材の定量的解析システムの構築: 1) で確立した装置により日用品で用いられる数種のプラスチックの赤外吸収スペクトルを計測し、プラスチック材の識別性を検証した。また、標本の赤外光吸収スペクトルの測定方法として、反射光と透過光測定、MP の材の特徴を含んだスペクトルが得られる計測条件(サンプルの前処理、照明装置、撮影倍率と光学系の設定、サンプルを捕集するフィルター材の種類など)を検討した。
- 3) MP 分析システムの適用性の検証と標準的分析プロトコルの確立: 環境や生物中の MP 測定においては、分析中のコンタミネーションの防止が重要であり、分析の手順に沿って、各段階と用いる試薬からの夾雑物を定量的に計測するとともに、コンタミネーションの防止策を検討し、分析プロトコルを作成した。

### 4. 研究成果

- 1) これまで FT-IR のイメージングで用いられているブロードバンド FPA では広い波長帯を用いるために分別には有利であるが、計測に時間がかかり、また冷却装置を必要とし装置のコストも増加する。これに対し、より限られた範囲の赤外波長帯を検出する非冷却型マイクロボロメータを用いることで、FT-IR イメージングに比べ低コストの分光イメージング装置が構築できる。FT-IR に比較してマイクロボロメータで測定できる波長領域が限られるため、短波長赤外(SWIR)、中波長赤外(MWIR)と長波長赤外(LWIR)のそれぞれの波長帯におけるプラスチック

材の吸収スペクトルを比較した。その結果、プラスチックの分別により有効な波長帯は LWIR であることが明らかになった。そこで、LWIR 帯用の汎用マイクロボロメータを用いた長波長 (LWIR) 帯 2 次元分光イメージング装置を構築した。黒色のポリエチレン (PE), ポリスチレン (PS) およびポリプロピレン (PP) の破片を作成し、本装置で測定を行った結果、各プラスチックの判別 (同定) が可能であり、理論的には最小  $12\mu\text{m} \times 12\mu\text{m}$  の領域の赤外吸収スペクトルを取得でき、単位面積あたりの計測時間は FT-IR の約 1/6 の時間に短縮することが可能となった。

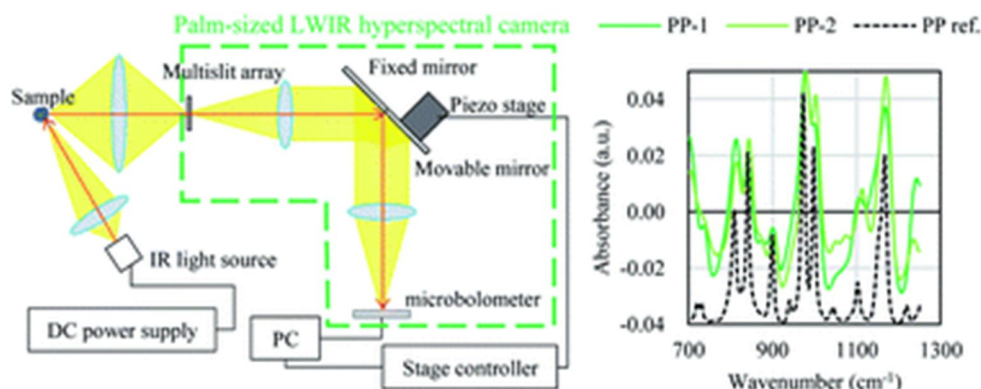


図1 マイクロプラスチック計測のための2次元中赤外分光イメージング装置の構造と、本装置により得られたプラスチック (ポリプロピレン, PP) のスペクトラムの例

2) 1) の成果に基づき、マイクロプラスチック分析のための2次元分光イメージング装置 (実機) を作成した。計測波長帯は  $8\text{-}14\mu\text{m}$  (LWIR) で波長分解能  $88\text{nm}$ 、空間分解能  $51 \times 51\mu\text{m}$  (3 pixel マージ) のシステムとなった。これを用いて、各種プラスチック (HDPE, LDPE, PE, PC, PS, PET, PVC, PP, PMMA) の日用品 (食品トレー、袋、梱包材、板、フィルム等) に赤外照明を試料の背面から照射し、透過法により赤外吸収スペクトルを測定した。同じプラスチック材 (ポリマー) を用いた異なる日用品の比較におけるスペクトルの相関係数はおよそ  $0.78 - 0.98$  と高く、異なるプラスチック材の比較ではそれよりも低く、各種プラスチックの分別が可能であった。ただし、PMMA は他のプラスチック数種と相関係数が高くなるなど、分別が困難な場合もあり、実用に向けて、データベースの構築と多変量解析・機械学習等を用いた判別システムの確立が必要であると考えられた。環境・生物中の MP 分析では濾過フィルターに捕集した MP サンプルを計測する必要がある。各種素材のフィルターによる測定を行い、透過法による測定においては PTFE (ポリテトラフルオロエチレン) フィルターには測定波長帯に特徴的な吸収スペクトルが見られず、MP 分析に適していること明らかになった。一方、測定標本を加熱することで放出される赤外発光のスペクトルを本研究の2次元分光イメージング装置で測定することができ、プラスチック材の分別も行える可能性が示され、今後より安価で汎用性のあるフィルターの使用が検討できることが明らかになった。

3) 生物サンプルの処理・分析プロトコルにおける MP 混入リスクを、水、試薬、グラスフィルターおよび実験室の空気中からの混入に分けて評価し、特に対策を取らない場合、MP および顕微鏡観察や蛍光染色法では MP と誤認される可能性の高い微粒子が混入することを示した。

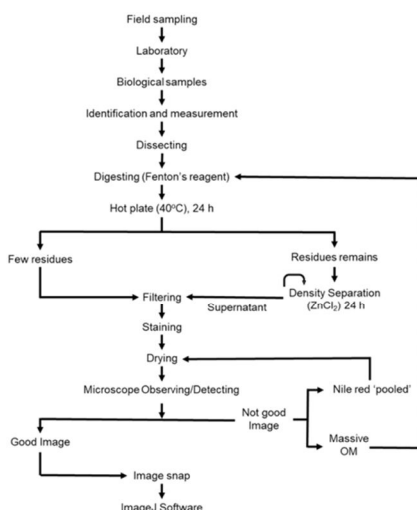


Table 1 Number of microplastics in various types of samples before and after measures to remove contaminants (mean  $\pm$  S.E.)

Samples sources (MP/sample <sup>a</sup> )	Before prevention taken	After prevention taken	Reduction rate (%)	No. of samples (FTIR analysed)	No. of polymers identified (type <sup>b</sup> )
Water (*MP/L <sup>-1</sup> )	Tap Water	6.6 $\pm$ 2.11	0	11	1 (CF), 1 (UI)
	Deionized Water	3.8 $\pm$ 1.69	0	9	1 (CF), 1 (UI)
	Plastic Tank Water	2.2 $\pm$ 0.74	0	6	2 (CF)
	Filtered Deionized Water	0	0	-	-
Chemicals (MP/sample 500 ml <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.6 $\pm$ 1.54	0.60 $\pm$ 0.60	76.92	9 (UI)
	FeSO <sub>4</sub>	3.2 $\pm$ 2.48	0	100	11 (UI)
	ZnCl <sub>2</sub>	2.2 $\pm$ 0.92	0	100	6 (PAN), 1 (PS)
Filter papers (MP/ (GF/F, C))	2.6 $\pm$ 0.81	0.60 $\pm$ 0.25	76.92	5	1 (CF), 1 (PET)
Airborne (MP/Filter paper)	1.4 $\pm$ 0.51	0.40 $\pm$ 0.25	71.43	7	5 (CF), 1 (PE)

<sup>a</sup>Sample size: Water, 1000 mL; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 500 mL; FeSO<sub>4</sub>, 2.5 g for 165 mL solution; ZnCl<sub>2</sub>, 1.6 kg for 1 L; and filter paper, one filter  
<sup>b</sup>Abbreviations: MP, number of microplastics; CF, cellulosic fibre; UI, unidentified polymer; PET, polyethylene terephthalate; PE, polyethylene; PAN, polyacrylonitrile; PS, polystyrene

図2 生物サンプルのマイクロプラスチック分析フロー (左) とマイクロプラスチック・コンタミネーションの分析と防止策の効果 (Reduction rate) (右)

さらに水、試薬についてはグラスフィルターによる濾過、グラスフィルターはマッフル炉による熱分解、空気中からの混入はHEPA フィルターを装着した簡易卓上フードを用いることで、それぞれ混入量を71%-100%減少させることができた。この混入防止策を行った生物標本分析のブランクテストにおけるマイクロプラスチックの検出数は平均±標準偏差( ):  $0.9 \pm 0.32$  となり、検出限界(Limit of Detection: LOD)を3 とすると、本分析法による検出限界は0.95 となり、生物1個体あたり数個程度の汚染濃度でも検出できることが示された。この成果は、使用する試薬についてもマイクロプラスチック混入について注意が必要であることを示し、また、広く一般的に使われる比較的安価な器具で混入を抑える方法と手順を示した。

#### <引用文献>

1. Nogo, K., Ikejima, K., Wei, Q., Kawashima, N., Kitazaki, T., Adachi, S., Wada, K., Nishiyama, A., Ishimaru, I. 2021. Identification of black microplastics using long-wavelength infrared hyperspectral imaging with imaging-type two-dimensional Fourier spectroscopy. *Analytical Methods*, 13, 647-659. DOI: 10.1039/D0AY01738H.
2. Nogo K., Ikejima, K., Qi, W., Kitazaki, T., Kanasaki, H., Hamada, K., Wada, K., Nishiyama, A., Ishimaru, I. 2021. Infrared Emission Spectroscopic Imaging of Microplastics Using Long-Wavelength Infrared Hyperspectral Camera with Imaging-Type Two-Dimensional Fourier Spectroscopy, *2021 11th Workshop on Hyperspectral Imaging and Signal Processing: Evolution in Remote Sensing (WHISPERS)*, pp. 1-5. DOI: 10.1109/WHISPERS52202.2021.9484030.
3. Ibrahim Siti Aminarh, Kou Ikejima. 2023. Potential sources of microplastic contamination in laboratory analysis and a protocol for minimizing contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*. 195:808. DOI:10.1007/s10661-023-11410-7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nogo Kosuke, Ikejima Kou, Qi Wei, Kawashima Natsumi, Kitazaki Tomoya, Adachi Satoru, Wada Kenji, Nishiyama Akira, Ishimaru Ichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of black microplastics using long-wavelength infrared hyperspectral imaging with imaging-type two-dimensional Fourier spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Methods	6. 最初と最後の頁 647 ~ 659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ay01738h	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nogo Kosuke, Ikejima Kou, Qi Wei, Kitazaki Tomoya, Kanasaki Hiroshi, Hamada Kazushi, Wada Kenji, Nishiyama Akira, Ishimaru Ichiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Infrared Emission Spectroscopic Imaging of Microplastics Using Long-Wavelength Infrared Hyperspectral Camera with Imaging-Type Two-Dimensional Fourier Spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 2021 11th Workshop on Hyperspectral Imaging and Signal Processing: Evolution in Remote Sensing (WHISPERS)	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/WHISPERS52202.2021.9484030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aminah, I.S., Ikejima, K.	4. 巻 195
2. 論文標題 Potential sources of microplastic contamination in laboratory analysis and a protocol for minimising contamination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Monitoring and Assessment	6. 最初と最後の頁 808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10661-023-11410-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kosuke Nogo, Kou Ikejima, Wei Qi, Tomoya Kitazaki, Hiroshi Kanasaki, Kazushi Hamada, Kenji Wada, Akira Nishiyama, Ichiro Ishimaru
2. 発表標題 Infrared Emission Spectroscopic Imaging of Microplastics Using Long-Wavelength Infrared Hyperspectral Camera with Imaging-Type Two-Dimensional Fourier Spectroscopy
3. 学会等名 11th Workshop on Hyperspectral Imaging and Signal Processing: Evolution in Remote Sensing (WHISPERS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池島 耕
2. 発表標題 マイクロプラスチック汚染研究における分光イメージングの可能性
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会 OPJ2019 -Optics & Photonics Japan 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 I. Siti Aminah, Kou Ikejima.
2. 発表標題 Potential source of microplastics contamination in laboratory analysis: The protocol for minimising the contamination
3. 学会等名 International Online Symposium on Environmental Microplastics, Online (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

論文報告: K. Nogo, K. Ikejima, W. Qi, N. Kawashima, T. Kitazaki, S. Adachi, K. Wada, A. Nishiyama and I. Ishimaru. 2021. Identification of black microplastics using long-wavelength infrared hyperspectral imaging with imaging-type two-dimensional Fourier spectroscopy. Analytical Methods. Vol.13. 647-659 は、「2021年 日本の光学研究」として日本光学会の編集委員会選定委員会により選定され、「光学」第51巻 第6号(日本光学会発行)に2021年の日本の光学研究を代表する成果として掲載された。

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石丸 伊知郎  (Ishimaru Ichiro)  (70325322)	香川大学・創造工学部・教授    (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------