

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22906

研究課題名(和文)海水中ナノプラスチックの限外濾過法による捕集と化学的手法による同定・特徴づけ

研究課題名(英文)Analytical method development for nano-plastics in seawater: Concentration by using ultra-filtration and chemical characterization

研究代表者

高田 秀重(Hideshige, Takada)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70187970

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文): 検討の結果確立した測定法を以下に示す。海水をステンレス製容器に採水し、加圧型ステンレス製大型ろ過器を用いガラス繊維ろ紙GF/F(平均保持粒子径0.7 $\mu$ m)でろ過し、ろ液(700 nm以下)100Lを得た。ろ液を中空糸膜(APH-1013D公称分画分子量50000)での限外ろ過、凍結乾燥により、100mL程度に濃縮した。過酸化水素による酸化分解、水酸化カリウム溶液による加水分解で有機物を除去し、ヨウ化ナトリウム飽和溶液とヘキサンで分配し、ナノプラスチックをヘキサン相に抽出・分配した。ヘキサン相はゲルクロマトグラフィーで精製し、熱分解GC-MSに注入し、ポリスチレンとポリエチレンの測定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノプラスチックの計測法を開発して、今後の実試料での測定の可能性を示した。東京湾の海水100Lを分析した場合、ナノポリスチレンのピークは観測されたが、ブランクに対して有意ではなく、ナノポリスチレンが存在したとしても濃度は0.4 ng/L以下ということが推察された。今後の環境試料での実測を進める上で意義がある成果と考えられる。

研究成果の概要(英文): Analytical method of nanoplastics in seawater has been developed as follows.

One hundred liter of seawater was collected in stainless-steel container, transported to laboratory, and filtered by glass fiber filter (GF/F). The filtrate was ultra-filtered by using hollow fiber membrane and concentrated by freeze-dryer down to ~ hundreds mL. The colloidal aqueous solution was subjected to oxidation with hydrogen peroxide and hydrolyzed with potassium hydroxide. Nanoplastics were partitioned into hexane and subjected to gel-permeation chromatography. Polymer fraction was injected to pyrolysis-GC/MS and polyethylene (PE) and polystyrene (PS) was monitored on SIM mode at  $m/z = 83$  and  $m/z = 91$ , respectively. No nanoplastics were significantly detected ( $PS < 0.4$  ng/L) in the 100 L of seawater.

研究分野：環境化学

キーワード：プラスチック汚染 ナノプラスチック マイクロプラスチック 限外ろ過 熱分解GC-MS

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プラスチックによる海洋汚染は1970年代から観測されてきたが、21世紀に入り「マイクロプラスチック」問題として新たな展開を迎えた。マイクロプラスチックとは5mm以下のプラスチックの総称である。プラスチック製品が廃棄されて海に流入し、紫外線と風波により破碎され、微細化したものが起源の一つである。加えて、マイクロビーズのように製品に練り込まれているプラスチック粒子が、排水を通して、海洋へ流入するものもある。現在では5兆個以上のマイクロプラスチックが世界の海洋に浮遊していると推定されている。マイクロプラスチックはその大きさから、低次栄養段階の生物に取り込まれ、物理的異物としての影響(粒子毒性)や添加剤や吸着している化学物質による毒性影響が懸念されている。

水環境中のマイクロプラスチックの測定は、海洋表層水中に浮遊する粒子をプランクトンネットに捕集した粒子や、生物体内や堆積物中から抽出した粒子を、顕微鏡での観察とフーリエ変換型赤外分光光度計(FTIR)を組み合わせた同定により行われている。プランクトンネットの目合いやFTIRの感度から1 $\mu$ m以上の粒子が環境中での計測の対象であり、1 $\mu$ m以下のプラスチック粒子(ナノサイズのプラスチック:以下ナノプラスチック)については、海水中での存在自体確認されていない(Sugiura et al., 2021)。一方で、紫外線や風波による破碎によるマイクロプラスチックの微細化、すなわちナノプラスチックの生成が予想されている。さらに、化粧品等ナノサイズのプラスチックを練り込んでいる製品も存在し、排水を通じた水環境の汚染も懸念される。ナノプラスチックは原生動物やバクテリアのような微細な生物に取り込まれ、食物連鎖を通して生態系全体に広がる可能性がある。20nm以下の粒子は細胞膜を通過して、微粒子としての影響を細胞に与える可能性も指摘されている。医薬品の体内での輸送にナノ粒子(ドラッグデリバリーシステム)が使われていることから、ナノプラスチックは添加剤や吸着性の化学物質を生体内深部に運び込む可能性も考えられる。ナノプラスチックの計測手法を確立し、その汚染実態を解明し、影響調査を進めることが急務である。

しかし、実際の環境中においてナノプラスチックの同定はほとんど行われておらず、存在量の実測のための手法も開発されていない。手法開発が進まないネックは、1) ナノサイズの粒子の捕集・濃縮技術の難しさ、2) 天然の懸濁微粒子とナノプラスチックの分離の困難さ、3) ナノプラスチックの同定・定量法の欠如である。

### 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、海水中のナノプラスチックの同定と計測手法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

検討の結果確立し海水に応用したナノプラスチックの分析法を以下に記す。検討用の海水を2020年8月4日(品川埠頭)、2020年11月19日(東京湾多摩川河口沖)、2020年12月14日(東京海洋大学船着き場)で採取した。海水10L~100Lをステンレス製のバケツ(5L)を用い、蓋付きステンレス製タンク(20L容)に採水した。試水は自動車です研究室へ輸送し、ガラス繊維濾紙(Whatman GF/F:平均保持粒子径0.7 $\mu$ m)でろ過し、ろ液を得た。ろ液は蓋付きステンレス製タンク(20L容)に採取し、次の操作まで低温保存した。ろ過時に大気からの微細マイクロプラスチックの混入がないように、ろ過は窒素ボンベによる加圧式ステンレス製フィルターホルダーにより行った。ろ液は中空糸膜を用いて限外ろ過しコロイド画分を濃縮した。中空糸膜として旭化成 AHP-1013D(ポリアクリロニトリル製、分画分子量50,000)を用いた。送液にはダイヤフラムポンプを使い、流速600mL~700mLで、8時間程度通水し、コロイド画分を濃縮し、蒸留水を使つての塩抜きも行い、最終的には300mL程度のコロイド濃縮水溶液を得て、蓋付きステンレス製ビーカーに捕集し、次の工程まで冷凍保存した。

コロイド濃縮水溶液はステンレス製ビーカーに入れたまま、5L容の凍結乾燥器にかけ、水分を昇華させ、50mL以下まで濃縮した。凍結乾燥減圧解除時の大気からの微細プラスチックの混入がないように、凍結乾燥器の大気開放バルブにはガラス繊維フィルターを挟めるように、凍結乾燥器の改良を行った。凍結乾燥濃縮コロイド水溶液は50mLのメスフラスコで定容し、5mLを有機炭素測定用に分取し、残りの45mLをナノプラスチックの分析に供した。

濃縮コロイド水溶液45mLを500mL容蓋付きガラス瓶に入れ、そこに過酸化水素水50mLを加えて2日間静置し、有機物の酸化分解を行った。3日目にガラス瓶中の水溶液に20%水酸化カリウム水溶液をゆっくり加えていき、有機物の加水分解を行った。水酸化カリウム水溶液添加直後は発熱したため、ガラス瓶の外から氷冷した。過酸化水素の分解の反応が収まった後に、ガラス瓶を摂氏40度の恒温槽に入れて、2日放置し、有機物の加水分解を進めた。3日目にコロイド水溶液にゆっくりとヨウ化ナトリウム飽和水溶液を加えた。最終的には300mLのヨウ化ナトリウム飽和水溶液を試料に加えた。この溶液をガラス製1L分液ロートに移し、ガラス瓶の内側に残った試料溶液は100mLのヨウ化ナトリウム飽和水溶液により洗い、全てガラス製1L分液ロートに移した。分液ロートにヘキサン100mLを加え、振とう攪拌し、一晚静置し、ヘキサン相と水相に分離させた。ヘキサン相は無水硫酸ナトリウムで脱水しながら、300mLナス型フラスコに捕集した。ヘキサンによる抽出(ヘキサン相への分配)をもう一度繰り返し、ヘキサン相は合わせてからロータリーエバポレーターで蒸発乾固し、残渣をジクロロメタン(DCM)に溶かし、4mLガラスバイアルに移し、蓋をしてシールテープで密閉し次の工程まで冷凍保存した。蓋の

ライナーとシールテープはテフロン製のものを用いた。

コロイド画分 DCM 溶液は窒素気流下で DCM を蒸発乾固し、テトラヒドロフラン(THF)2mL に溶解し、ゲルクロマトグラフに注入した。ゲルクロマトグラフのカラムは Shodex 社 CLN pak PAE-2000 (20 mm i.d. x 300 mm)を用いた。溶離液として THF を流速 4mL で流し、試料注入から 10 分 (40 mL), 10 分~12 分(8 mL)、12 分~30 分 (72mL) の 3 つの画分を得た。それぞれ第 1、第 2、第 3 画分と呼んだ。各画分へ流出するポリマーの分子量とモノマーの種類は予めポリスチレン製分子量分画用標準物質 (GPC/SEC Calibration kits S-M-10;アジレント社製) およびスチレントリマー標準物質とアルカン標準物質(アルキル炭素数 19~32)を使って検討した。第 1 画分には分子量 10000 以上のポリマー、第 2 画分には分子量 1000~10000 のオリゴマー、第 3 画分にはモノマーが流出するように設定した。ゲルクロマトグラフィーで分画した試料の各画分は、ロータリーエバポレーターで濃縮し、少量の THF に溶解させ、1mL アンプルに移し替え、熔封した。ゲルクロマトグラフィーで使用する THF は空気中の酸素により酸化され、不揮発性の分解産物を生成するため、開封後は窒素で曝気してから保管した。

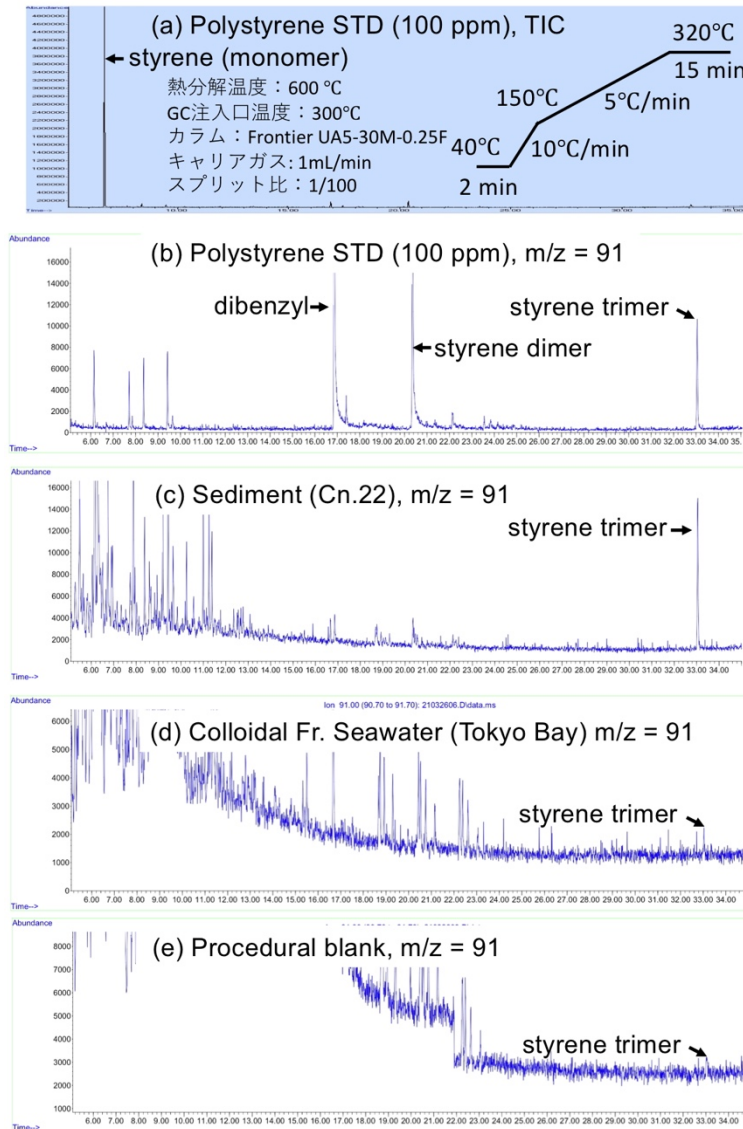


図 1. 標準物質(a,b)、堆積物試料(c)、海水試料(d)、および操作ブランク(e)の熱分解ガスクロマトグラム。

物をガラスアンプル中で 0.5M 水酸化カリウム/メタノール溶液 6mL に溶解させ、摂氏 80 度 2 時間加水分解を施し、その後 6mL の水と 20mL のヘキサンを加えて、50mL 遠沈管内でプラスチックをヘキサンに抽出・分配させ、1000 rpm で 1 分間遠心分離後、ヘキサン相を捕集した。堆積物試料についてゲルクロマトグラフィー以降の操作はコロイド水溶液試料と同様であった。

#### 4. 研究成果

検討の結果、海水中のナノサイズのポリスチレン粒子の分析法を確立した。ヘキサン抽出・分配の工程も含め、今回確立した方法の妥当性を上述の東京湾運河部堆積物で検討した。その結果、堆積物 1.02g の第 1 画分 (分子量 10000 以上の画分) 中から 3100 ng のポリスチレンが検出された。操作ブランクからのポリスチレンが検出量は試料よりも 2 桁少ない 58ng であったことから、堆積物試料におけるポリスチレンの検出は有意であると判断される (図 1 (c))。堆積物中

ゲルクロマトグラフィーで捕集した各画分は熱分解ガスクロマトグラフ-質量分析計(Py-GC/MS)でポリマーの分析を行った。Py-GC/MS 直前に試料の入ったアンプル中を開封し、窒素気流下で溶媒 THF を蒸発乾固し、残渣を 50 μL の THF に溶解させ、そこから 20 μL を Py-GC/MS に注入した。Py-GC/MS の運転条件は図 1 に記載の通りである。検討の結果、試料を SIM 分析し、m/z=91 で抽出したクロマトグラム上のスチレントリマーのピーク面積をポリスチレン標準物質 (図 1 (b)) のピーク面積と比較し、ポリスチレンを定量した。

試料の分析にあたっては、試料のろ過と並行して蒸留水をろ過して、全工程で同じ処理を施した操作ブランクも分析し、分析操作過程での微細マイクロプラスチックの混入(コンタミネーション)を評価した。また、今回確立した分析法でポリスチレンが捕集できているのかを確認するために、東京湾運河部の堆積物を 2020 年 12 月に Cn.22 という地点で採取し、開発した分析法で分析した。堆積物の分析にあたっては、堆積物を凍結乾燥し、1g を精秤し、加圧流体抽出装置 (ASE350) で DCM を溶媒にして摂氏 150 度で抽出し、抽出

の濃度は3.1 µg/g と計算された。

ポリスチレン以外のポリマーについても検討した。表層海水や堆積物中で高頻度に検出されるポリエチレンについても Py-GC/MS での分析条件は確立し、SIM モードで  $m/z=83$  でモニターすることによりポリエチレンピーズの分析により、アルカンの規則的なピークを得ることができた。しかし、堆積物試料の第 1 画分からはアルカンの規則的なピークを得ることができず、分子量 10000 以上のポリエチレンの存在は確認できなかった。同地点の堆積物からは 0.3mm-1mm の大きさのポリエチレンマイクロプラスチックの存在が確認されていること(Matsuguma et al., 2017)と整合性のない結果となった。おそらく、コロイドを濃縮し、酸化分解、加水分解後にヘキサンに抽出・分配しているが、ポリエチレンやがヘキサンに溶けにくいいため、ヘキサン抽出・分配の際に回収されなかった可能性が考えられる。今後この部分の抽出・分配溶媒や分配方法の検討が必要である。

今回確立した方法を東京湾の海水（2020 年 11 月 19 日、東京湾多摩川河口沖で採取）に適用した結果、100L の海水から捕集・検出できたナノポリスチレンが 42ng であった（図 1 (d)）。しかし、これは操作ブランクで検出された 59ng よりも少なく（図 1 (e)）、有意な検出ではない。この東京湾の海水試料中には多くても 0.4ng/L のポリスチレンしかないことを示唆している。今後、海水のろ過量を大きくして、ナノプラスチックの捕集量を増やして、海水中の濃度を把握していく必要がある。

#### 引用文献

Matsuguma, Y., Takada, H., Kumata, H., Kanke, H., Sakurai, S., Suzuki, T., Itoh, M., Okazaki, Y., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Weerts, S., Newman, B., 2017. Microplastics in sediment cores from Asia and Africa as indicators of temporal trend in microplastic pollution. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 230-239. 10.1007/s00244-017-0414-9

Sugiura, M., Takada, H., Takada, N., Mizukawa, K., Tsuyuki, S., Furumai, H., 2021. Microplastics in urban wastewater and estuarine water: Importance of street runoff. *Environmental Monitoring and Contaminants Research* 1, 54-65. 10.5985/emcr.20200006

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 高田秀重	4. 巻 85
2. 論文標題 マイクロプラスチック問題と分散型持続可能な社会の実現	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 公衆衛生	6. 最初と最後の頁 332-337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideshige Takada
2. 発表標題 Plastic and microplastic in aquatic environments : their role as sources and carrier of emerging and legacy pollutants and sedimentary proxy of anthropocene
3. 学会等名 2nd International Conference on Contaminated Sediments（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	小川 浩史  (Ogawa Hiroshi)  (50260518)	東京大学・大気海洋研究所・教授    (12601)	

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 協 力 者	森田 千晶  (Morita Chiaki)	東京農工大学・農学研究院・技術補佐員    (12605)	

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
---------	---------