

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K13934

研究課題名(和文) 光計測技術を複合的に用いた海底その場粒子化学イメージング手法の開発

研究課題名(英文) Development of a chemical imaging method of marine particles using optical sensing techniques

研究代表者

高橋 朋子 (Takahashi, Tomoko)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭技術開発プログラム)・Young Research Fellow

研究者番号：20806301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、深海浮遊粒子の現場測定への応用に向け「水中を流れる粒子の化学イメージング計測による連続モニタリング手法の開発」を目指した。コヒーレント反ストークスラマン散乱分析(CARS)によるラインスキャンにより、高速で流れる数十マイクロメートルのマイクロプラスチック(MP)を選択的に検出し、サイズ・速度・数密度を計測できることを示した。また、二光子励起自家蛍光とCARS光の同時取得により、流れる有機粒子(緑藻)とMPの瞬時の分類にも成功した。さらに、3次元画像撮影法のホログラフィとラマン分光分析の統合分析を実現し、画像と化学分析を組み合わせることで大容量の水中粒子を測定できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主たる海中粒子である有機物は深海の貴重な栄養源だが、一方で生態系に影響を及ぼしうるマイクロプラスチックも深海で多く発見されている。現状では海中粒子の種類ごとの分布はサンプリングでしか得ることができず、微小粒子や特に存在密度の少ない深海粒子については限られた情報しかないが、本研究により数十マイクロメートルの微小粒子を流れの中で連続的に化学モニタリングする計測手法を提示でき、深海環境影響評価の革新的なツールとして期待できる。今後手法を海中現場での調査に応用することにより、今までよりはるかに高い空間・時間分解能での調査が可能になり、栄養塩循環への新たな知見やプラスチック汚染のコントロールにつながる。

研究成果の概要(英文)：In this project, chemical imaging techniques of flowing particles in water were investigated aiming at in-situ continuous monitoring of deep-sea micro particles. For fast in-flow detection of microplastics and microalgae with high spatial and temporal resolutions, a method based on coherent anti-stokes Raman scattering (CARS) detection, was proposed. Different plastic particles with sizes of several tens of micrometers were selectively detected in a high-speed flow. In-flow classification of microplastic and alga particles was also successfully performed by the simultaneous detection of CARS and two-photon excited auto-fluorescence signals. In addition, an integrated method of digital holography and Raman spectroscopy was investigated, and the morphological and chemical analysis of plastic, organic and inorganic particles was demonstrated in a large volume of water using a compact system.

研究分野：水中分光

キーワード：コヒーレント反ストークスラマン散乱 マイクロプラスチック 動的粒子化学イメージング 海中粒子

### 1. 研究開始当初の背景

海中を漂う粒子は、数 nm から mm サイズまでの大きさで海中に遍く存在し、海の物質循環に重要な役割を果たしている。有機化合物でできた粒子は、海表面から移動・沈降したり食物連鎖の中で生物に食べられ排出されたりすることを繰り返し、深海まで運搬される。これらの有機粒子の海中存在割合、物質循環への寄与率は、海洋化学分野において重要なトピックで、海洋の広い範囲での分布を知る必要がある。海表面ではサンプリングが容易であり調査が進んでいるが、深海では極度に濃度が少なくなるため、セジメントトラップ等で長時間をかけサンプリングを行わなくてはならず、深海での粒子分布は現状で詳しくわかっていない。しかし、深海では特に有機物質が貴重な栄養源となり、深海の生態系・物質循環を支えるため、有機物質分布の調査方法確立が急務である。一方で、近年、有機粒子と同程度のサイズのマイクロプラスチック粒子の海洋汚染が問題となっている。マイクロプラスチックは有機粒子と海中で似たような振る舞いをするため、深海まで運搬され広範囲で広がり、マリアナ海溝でも発見され全海洋で汚染が広がっているとされている[1]。しかし、やはり深海での詳細分布はほとんどわかっていない。マイクロプラスチックの生態系・海洋環境影響が深刻化し手遅れとなる前に、マイクロプラスチックの深海での分布状況を詳細に調べなければならない。

### 2. 研究の目的

本研究では、深海浮遊粒子の現場測定への応用を目指し「水中を流れる粒子の化学イメージング計測による連続モニタリング手法の開発」を目的とした。現状ではサンプリングによる分析しか化学計測方法がない浮遊粒子に対し、コヒーレント反ストークスラマン散乱分析（CARS; Coherent Anti-stokes Raman Spectroscopy）などを応用して、深海その場での計測に応用できる、迅速な粒子化学計測手法を考案した。深海での粒子数密度は少ないため[2]、一定の濃度まで捕集をしたところで効率的にイメージング計測を行えるよう、

- ・粒子数密度のモニタリング
- ・粒子の化学イメージングによる迅速な粒子種類判別・分類

の2つを一連の流れの中で行うことのできる手法の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

CARS は、レーザー光をターゲットに照射して分子を振動させて分光分析をするラマン分光分析をベースとした分子計測手法である。ラマン分光分析はすでに海洋調査で、海水・間隙水中の溶存物質の測定に応用されていて[4]、プラスチック計測も得意とする[5]。しかし、ラマン光は非常に弱く計測感度が良くない。そこで、2つの異なる波長の超短パルスレーザーを同時に照射することで起こる強い CARS 光を観測することで、 $\mu\text{m}$  オーダーの高解像度・高感度・高速な化学イメージングが可能となる。CARS は、生細胞の化学イメージング手法として発展している[3]が、プランクトン等有機粒子やマイクロプラスチックといった海中微小粒子の動的な計測に応用した例は非常に少ない。しかし、生細胞と測定条件が類似していることから、CARS を用いて流れの中で連続的に計測するという着想を得て、本研究で CARS を化学イメージング手法の核とした。CARS の実験は、バイオフォトンクス研究の第一人者である英国サウサンプトン大学の Sumeet Mahajan 教授のもとで外来研究員として行い、最適な実験セットアップ・条件を検討した。粒子数密度のモニタリングについては4にて詳述するが、CARS による測定方法の工夫によ

り数密度モニタリングと化学イメージング両方を CARS で行うこととした。また、化合物情報と光学画像を同時に取得することで計測のスピード・精度・効率性をあげられる可能性を見出し、対象物を数十 $\mu\text{s}$  で高速・3次元に撮影できるホログラフィとラマン分光分析の統合システムについても検討した。

#### 4. 研究成果

本研究により得られた主な成果は以下である：

- (1) ラインスキャンによる CARS の化学イメージング画像を再構築する解析を行うことで、検出した粒子数のカウント、粒径、粒子速度を計算することに成功した。よって濃度のモニタリングから化学イメージング測定まで、CARS のみで効率的に行えることがわかった。
- (2) CARS により、水圏環境でよく見られる代表的なマイクロプラスチック（ポリスチレン、アクリル、ポリエチレン）について、40 $\mu\text{m}$  程度のサイズで流路内を 4mm/s で流れる状態で選択的に検出することに成功した。
- (3) 二光子励起自家蛍光信号と CARS 光の同時取得によりマイクロプラスチックと緑藻（イカダモ）を同スピードの流れの中で瞬時に分類することに成功した。
- (4) 3次元空間を浮遊する粒子を、ホログラフィで高い空間・時間分解能で動画として撮影できることがわかった。さらに、ホログラフィとラマン分光分析を組み合わせることで、浮遊粒子の形状と化学分析両方ができることを示し、ホログラフィとラマン分光分析や CARS などを統合する実現性が高いことを示した。

(1) について、まず CARS を用いて海中に浮遊していることがわかっているマイクロプラスチック標準試料（ポリスチレン・アクリル）を空气中・水中でそれぞれ測定したところ、測定結果にほぼ違いがなく、信号強度に水の影響がないことがわかった。また、通常開口数 (NA; Numerical Aperture) が 0.5 以下の低倍率広画角レンズでは CARS が難しいと考えられていたが、ハイパワー出力レーザーの CARS システムのセットアップや流路を工夫し、NA が 0.3 の 10 倍率レンズで 0.5mm 角の画角で大きさ 10 $\mu\text{m}$  以上の粒子の流れの中で安定的に検出することに成功した。数密度のモニタリング手法として、当初はレーザー誘起破壊検出法（水中に一定出力以上のレーザーを照射し水中粒子中元素の誘起破壊を起こした時に発生するプラズマ光が水中粒子の大きさ・濃度と相関する現象を用いて数密度を計測）を用いる予定だったが、流れる粒子に対し 1 箇所 CARS によるラインスキャンを行い、得られた化学イメージング画像について再構築解析を行うことで、検出した粒子数のカウント、粒径、粒子速度を計算でき、スキャン速度とスキャンエリアの大きさから流れる粒子の数密度を推定できることがわかった。よって数密度のモニタリングから化学イメージング測定まで、CARS のみで効率的に行えることがわかった。

(2)、(3) について、40 $\mu\text{m}$  程度のポリエチレン・ポリスチレン・アクリル粒子について、4mm/s の高速な流れの中でそれぞれに活性な波長と不活性な波長で測定をしたところ、活性な波長のみ粒子が流れていくのが検出され、不活性な波長では何も検出されない（偽陽性率 = 0）ことを確認し、CARS によって粒子の選択的な検出ができることを示した（図 1）。さらに、二光子励起自家蛍光信号と CARS 光の同時観測を加え、蛍光不活性のプラスチックは CARS 光（炭素水素結合）のみ発光する一方、植物プランクトンは自家蛍光も CARS 光（炭素水素結合）も発光することを利用し、有機物質（緑藻）とプラスチックが混じった流れでの粒子種類の瞬時分類に成

功した(図2)。これらの成果は、微小なマイクロプラスチックや有機粒子の連続モニタリング手法として画期的な Proof of concept であり、国際学会誌にて論文発表した[6]。

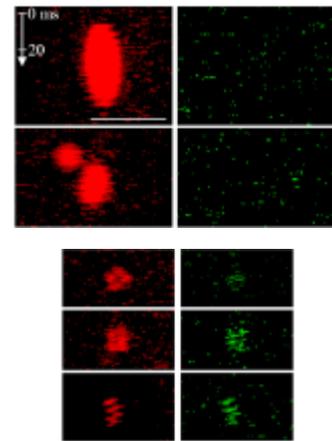
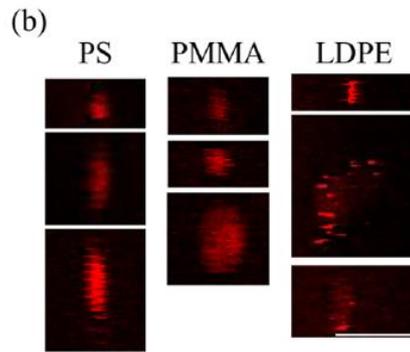
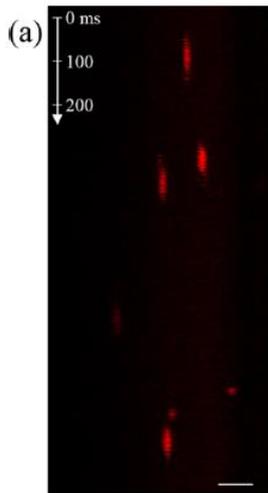


図1. CARS 化学イメージング例. (a) 流路を流れるポリスチレン粒子、(b) ポリスチレン、PMMA (アクリル)、低密度ポリエチレン粒子の選択的検出 (ズーム).スケールバーは 100 $\mu$ m. [6]

図2. CARS 光 (赤) と蛍光 (緑) の同時検出. 上はポリスチレン、下は緑藻. スケールバーは 50 $\mu$ m. [6]

(4) について、図3のような、ホログラフィとラマン分光分析を同時に行えるセットアップを製作し、代表的な海中浮遊粒子として数 mm 以下のサイズの有機粒子や数種類のプラスチックペレットを用いて計測を行い、ホログラフィ画像とラマン信号両方を取得して粒子の種類を識別できることを示した。コリメートレーザービームを用いた、ホログラフィとラマン分光スペクトルの同時取得は世界で初めての成果であり、特に図3に示すように、ホログラフィの画像だけではわからないプラスチック片もラマン分光分析と統合することで材質分析までできることを示した成果は画期的で、国際学術誌に論文を発表[7]し、The Optical Society of America のニューズリリース [8]、BBC Science Focus Magazine [9]などに掲載され、国内外のメディアから注目を集めた。

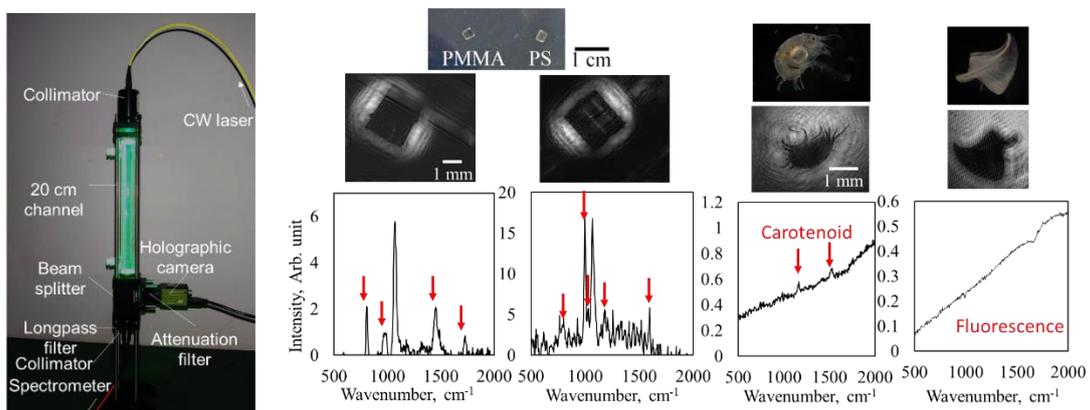


図3.ホログラフィ・ラマン分光分析を統合したセットアップとスペクトル例 (左からアクリル・ポリスチレン・動物プランクトン・その他生物由来有機物)

#### 参考文献

- [1] T. Galloway, L. Ceri. Marine microplastics, Current Biology 27, R445-R446, 2017.
- [2] D. Lindsay, A. Yamaguchi, M. Grossmann, Vertical profiles of marine particulates : a step towards global scale comparisons using an Autonomous Visual Plankton Recorder, Bulletin of the Plankton Society of Japan 61, 72-81, 2014.

- [3] I. Patel, C. Steuwe, S. Reichelt, S. Mahajan, Coherent anti-Stokes Raman scattering for label-free biomedical imaging. *Journal of optics* 15, 094006, 2013.
- [4] X. Zhang, W. Kirkwood, P. Walz, E. Peltzer, P. Brewer, A review of advances in deep-ocean Raman spectroscopy. *Applied spectroscopy* 66, 237-249. 2012.
- [5] K. Enders, R. Lenz, C. Stedmon, T. Nielsen, Abundance, size and polymer composition of marine microplastics  $\geq 10 \mu\text{m}$  in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Marine pollution bulletin* 100, 70-81, 2015.
- [6] T. Takahashi, K. P. Herdzyk, K. N. Bourdakos, J. A. Read, S. Mahajan, **Selective Imaging of Microplastic and Organic Particles in Flow by Multimodal Coherent Anti-Stokes Raman Scattering and Two-Photon Excited Autofluorescence Analysis**, *Analytical Chemistry* 93, 5234–5240, 2021, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c05474>
- [7] T. Takahashi, Z. Liu, T. Thevar, N. Burns, S. Mahajan, D. Lindsay, J. Watson, B. Thornton, **Identification of microplastics in a large water volume by integrated holography and Raman spectroscopy**, *Applied Optics* 59, 5073-5078, 2020, <https://doi.org/10.1364/AO.393643>
- [8] Optical Society of America News Release, 2020/6/2, <https://www.osa.org/en-us/about-osa/newsroom/news-releases/2020/light-based-system-lays-foundation-for-continuous/>
- [9] BBC Science Focus Magazine "Science Focus", The technology solving the ocean's greatest mysteries, 2020/08/26, <https://www.sciencefocus.com/planet-earth/the-technology-solving-the-oceans-greatest-mysteries/>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Tomoko, Herdzyk Krzysztof Pawel, Bourdakos Konstantinos Nikolaos, Read James Arthur, Mahajan Sumeet	4. 巻 93
2. 論文標題 Selective Imaging of Microplastic and Organic Particles in Flow by Multimodal Coherent Anti-Stokes Raman Scattering and Two-Photon Excited Autofluorescence Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5234 ~ 5240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.0c05474	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 該当する

1. 著者名 Takahashi Tomoko, Liu Zonghua, Thevar Thangavel, Burns Nicholas, Mahajan Sumeet, Lindsay Dhugal, Watson John, Thornton Blair	4. 巻 59
2. 論文標題 Identification of microplastics in a large water volume by integrated holography and Raman spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Optics	6. 最初と最後の頁 5073 ~ 5073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/AO.393643	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 高橋朋子
2. 発表標題 ホログラフィとラマン分光分析を統合した水中マイクロプラスチックのリ アルタイム判別手法の開発
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoko Takahashi
2. 発表標題 Identification of microplastics in water by hyphenated-Raman techniques
3. 学会等名 PacifiChem2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoko Takahashi
2. 発表標題 Development of in-situ LIBS and Raman spectroscopic analyzers for deep-sea surveys
3. 学会等名 Laser Solutions for Space and the Earth (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Takahashi
2. 発表標題 Development of in-situ LIBS and Raman spectroscopic analysers for exploration of deep-sea hydrothermal vent fields
3. 学会等名 SciX 2019 (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	マハジャン スミート (Mahajan Sumeet)	サウサンプトン大学(英国)・Institute for Life Sciences・Professor	

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		
英国	サウサンプトン大学		