

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17903

研究課題名（和文）ナノプラスチック定量分析法の開発

研究課題名（英文）Development of Quantitative Analysis Methods for Nanoplastics

研究代表者

田中 厚資（TANAKA, Kosuke）

国立研究開発法人国立環境研究所・資源循環領域・研究員

研究者番号：10896327

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ナノプラスチックによる汚染が世界的に進んでいる可能性が示唆されているが、環境中での存在量は未解明の状況である。本研究では、熱分解GC/MSを基礎とする分析法に、信頼性を評価する添加回収試験と、誤差等を補正する内部標準法の導入を行ったほか、ポリマーの有機溶媒への溶解性に基づく分画法を作成した。環境試料を模擬した水試料を用いて回収率等を確認し、ナノプラスチックの信頼性の高い定量分析法として確立した。

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熱分解GC/MS等の分析において、添加回収試験、内標準法の導入、前処理での分画手法の導入により、信頼性の高い定量を可能とすることができた。この成果は、環境中の汚染状況の正確なデータの取得の基盤となるものであり、プラスチック汚染のリスクの評価と管理における貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：It has been suggested that contamination by nanoplastics may be increasing worldwide, but the amount present in the environment is still unknown. In this study, we developed an analytical method based on pyrolysis-GC/MS, incorporating a spiking recovery test to evaluate reliability and an internal standard method to correct for errors. Additionally, we established a fractionation method based on the solubility of polymers in organic solvents. Using water samples simulating environmental samples, we confirmed recovery rates and other parameters, establishing an accurate quantitative analysis method for nanoplastics.

研究分野：環境化学

キーワード：ナノプラスチック 海洋プラスチック汚染 定量分析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海洋にはすでに大量のプラスチックゴミが存在し、現在も年間数百万トンずつ増え続けているとされる。こうした海洋プラスチックは、環境中で紫外線などの影響により劣化、脆化することで破碎し、多数の小片を生じる。こうして生じる 5 mm 以下の小片はマイクロプラスチックと呼ばれ、近年の研究により、海洋での世界的汚染の広がりに加え、河川や生活排水等、様々な媒体中の存在が明らかとなっている。

マイクロプラスチックを生じる劣化の過程では、さらに小さいナノプラスチック (<1 μm) も生成することが実験的に明らかになっている。このことは、ナノプラスチックによる汚染が、マイクロプラスチックと同様に世界的規模で進行している可能性を示唆するものである。しかしながら現在のところ、海水などの環境試料中のナノプラスチックを定量的に分析できる手法は確立されていない。そのため、環境中におけるナノプラスチックの存在量については未だ未解明の状況である。

ナノプラスチックの生物への影響はマイクロプラスチックとは異なる機構が考えられている。環境中でこれまで報告の多い、数百マイクロメートル以上のマイクロプラスチックでは生物に摂食されても消化管を通過して排泄されるのに対し、ナノプラスチックでは消化管から体内へ吸収されることで、生体内のシステムに直接的に影響を与える可能性がある。実際に生物へ曝露する毒性試験も行われ危険性が指摘されてきているが、環境中の定量データが存在しないが故に、これまでの毒性試験で設定されている曝露濃度の妥当性については根拠がない状況である。実際の環境に即した毒性試験を行い生態系へのリスクを評価していくために、環境中ナノプラスチック存在量の把握は急務となっている。

ナノプラスチック分析法の開発を試みた研究はこれまでにいくつかあり、熱分解 GC/MS (ガスクロマトグラフィー/質量分析計) を用いた手法が検討されている。概要としては、試料に含まれる粒子を濾過等でサイズごとに分け、それぞれの画分を熱分解 GC/MS の加熱炉で 600 程度に熱し、ポリマーが分解されて気体として出てくる分解産物を GC/MS で定量する、という流れである。しかし、これまでの研究では、次の問題のために、定量的データの獲得には至っていない。

問題 1: ナノプラスチックの標準粒子が存在しない

定量分析法の確立には、分析対象のポリマーそれぞれのナノサイズの標準粒子を用いた添加回収試験 (分析前に添加した標準物質の回収率が 100% 付近になることを確認する試験) が必要であるが、市販で入手できる標準粒子はポリスチレン、低密度ポリエチレンに限られ、環境中で重要な高密度ポリエチレンやポリプロピレンを含め他のポリマーのものがなかった。

問題 2: 分析中のロスなどによる誤差が大きい

分析前の処理過程における意図せぬ吸着や、機器分析時の夾雑物質による影響によって、定量値は大きく変動する可能性がある。例えば Mintenig らは、球状ポリスチレン粒子を用いて検討を行い、サイズ分画操作でのロスが 50% 近くになる結果を報告している。定量的データの取得には、こうした誤差を補正する手法の導入が必要である。

問題 3: 熱分解 GC/MS では、分解産物が共通する物質を分離して定量することが難しい

例えば、ポリ塩化ビニルと PET 樹脂、自然由来の物質のうちキチン (プランクトンの殻等)、ウール、ブラックカーボンなどでは、いずれも熱分解によってベンゼンが生成されてしまう。これらのポリマーを分けて定量するには、阻害となる自然由来物質を取り除き、ポリマーごとに分画する必要があるが、こうした分画を検討した研究はこれまでに存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、上記 3 つの課題を解決し、環境試料中のナノプラスチックの正確度、精度の担保された定量分析法を開発することを目的とする。問題 1、問題 2 として挙げた課題の解決のために、申請者がこれまでの研究で作成法を開発してきた、各種ポリマーの球状ナノ粒子を用いる。

問題 3 として挙げたポリマーの分画については、ポリマーごとの有機溶媒への溶解性の違いから分画する手法を検討する。

3. 研究の方法

2021 年度には、まず分析法の開発に必要なナノプラスチック標準粒子を作製した。加えて、水素の安定同位体でラベルしたポリマー (重水素化ポリマー) を購入し、同様の手法で重水素化ラベルナノプラスチック粒子を作製した。作製した標準粒子の形状評価には、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて行った。

2022 年度には、標準粒子を用いたナノプラスチック分析方法の開発を行った。作製した粒子を用いて、まず水試料について濾過等による試料採取から熱分解 GC/MS での定量までの手法を検討し、再現性、添加回収率の確認を行った。さらに、前処理におけるナノプラスチックのポリマーの分画法の検討を行った。

2023 年度には、劣化したプラスチックに、水と砂を用いて波を模した物理的作用を加えて作成したナノ・マイクロプラスチックの分散液に含まれるナノプラスチックの定量分析方法を作成し、定量を行った。

4. 研究成果

分析法の開発に必要なナノプラスチック標準粒子を、5種のポリマー（高密度ポリエチレン、低密度ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル）について、課題代表者が過去に作製したナノプラスチック粒子作製法によって作製し、分子量分布、結晶化度等の分析を行い、一般的なプラスチック製品と同等の組成、物理・化学的性質を持つことを確認した。この結果は作製粒子がナノプラスチックの標準粒子として妥当であることを示すものであり、定量分析への利用に留まらず、毒性試験等への応用においても重要な意義がある。この結果は国際学術誌での報告を行ったほか、特許出願を行った。

加えて、内部標準法をナノプラスチックの定量分析に導入するために必要な安定同位体ラベルしたナノプラスチック粒子を作製するため、水素の安定同位体でラベルしたポリマー（重水素化ポリマー）を購入し、上記で確立した手法で重水素化ラベルナノプラスチック粒子を作製した。安定同位体ラベルしたポリエチレンのナノプラスチック粒子を作製するため、さまざまな原料を試みたものの、正常に作製できなかった。この原因については明確ではないが、原料における着色の状況等から原料由来の不純物に起因することなどを考え、精製を検討した。具体的には、市販の重水素化ポリエチレンでナノプラスチック粒子を作製したところ、通常の方法では粒子が形成されず、塩酸を用いた洗浄方法によって精製を行い、ナノプラスチック粒子が作製可能となることを明らかとした。

ポリプロピレンについては、市販の重水素化ポリマーが非常に高額であったことから、重水素化プロピレンの重合による重水素化ポリプロピレンの合成を外部研究機関に依頼し、原料を得た。手法としては、重水素化プロピレンをメタロセン触媒によって重合し、懸濁溶液をメタノール 100 mL/濃塩酸 5 mL の混合溶液に滴下し、白色の粘性のあるポリマーを得た。デカンテーションでポリマーのみを得た後、メタノールで3回洗浄して重水素化ポリプロピレンを得た。得られたポリマーについては、¹³C NMR スペクトルと DSC（示差走査熱量測定）でポリプロピレンが合成されたことを確認した。その後、これを原料としてナノプラスチック粒子作製を検討した。合成した重水素化ポリプロピレンをそのまま用いると、細かい不定形の粒子が形成されるなど、不純物による影響が考えられた。そのため、塩酸等を用いた洗いを検討し、ナノプラスチック粒子が作製できる条件を確立した。

重水素化ポリエチレンテレフタレートを購入し粒子作製に取り組んだものの、通常のポリエチレンテレフタレートで作製した粒子に比べ、形状の安定性が低いものしか作製できなかった。購入する材料からの再検討が必要と考えられたため年度内の作製は断念し、これまでに作製できている安定同位体ラベル粒子によって代替することとした。

ポリスチレンについては、市販の重水素原料を用いることで、通常の方法でナノプラスチック粒子作製方法で作製が可能だった。

熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析装置（GC/MS）を用いたナノプラスチックの定量手法に関しては、まずキューリーポイント式と加熱炉方式の加熱による熱分解装置での比較、ナノプラ粒子の分析用試料の調整と分析条件の検討を行った。ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリウレタン、ポリエチレンテレフタレート、ナイロン6、ナイロン66、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）、天然ゴム、スチレンブタジエンゴムでの分析条件を検討し、検量線の確認を行った。保有する機器でナノグラムオーダーのナノプラスチックの検出が可能であることを確認した。

また、上記で作製した安定同位体ポリマー粒子の検出が可能であること、通常のポリマー粒子と安定同位体ラベルポリマー粒子とで、検出される同位体の違いによる区別が可能であることを確認した（図1）。

ポリスチレンについては分析量が多くなるほど熱分解産物の検出強度が高まる傾向にあり、検量線は2次曲線に沿うことが観察された（図1）。このことは、ポリスチレンにおいて定量に用いることとした熱分解産物が、分析量が少ない範囲において、さらに熱分解が進んでいることが考えられた。このことから、本研究では、2次曲線によって定量することとした。

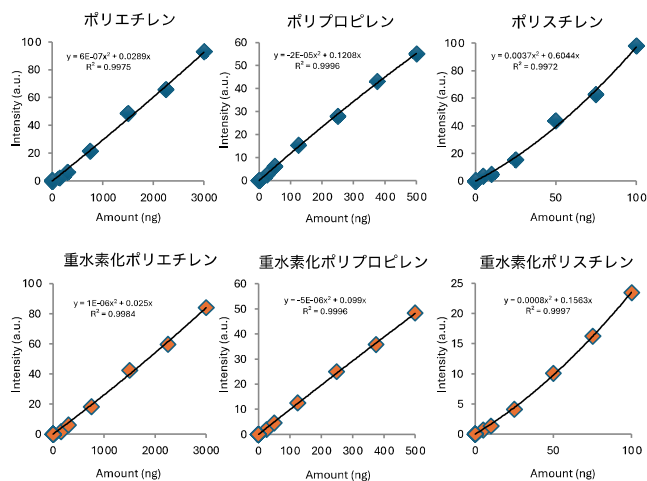


図 1. 作製した標準物質を用いて得られた検量線の例. 上段にポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンの検量線、下段に内標準物質として用いるための重水素化ポリエチレン、重水素化ポリプロピレン、重水素化ポリスチレンの検量線を示す。

分析の前処理手法については、コンタミネーションを防ぐために試料の大気への解放が少なく、かつ夾雑物質を除くため洗浄が可能な手法を目指して開発を行った。実際の海水試料を模擬した試料として、劣化したプラスチックを砂、水と共に攪拌して作成したプラスチック分散液を用いて検討を行った。最終的に作成した手法は、以下のとおりである。水試料から比重分離によって砂等を除き、ナノプラスチックとそれ以外のサイズのプラスチック粒子等を分画するためのフィルタリングののち、濾液を、シリンジを用いて 20 nm アルミナフィルターで濾過した。粒子を捕集したフィルターにエタノール等のプラスチックが溶けない溶媒を通して洗浄したのち、目的のプラスチックが溶解する溶媒で溶出させ、熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析計 (py-GC-MS) 用の試料カップへ捕集した。カップを乾燥させたのち、py-GC-MS で分析、定量した。ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレンでの検討を行い、安定同位体ラベルしたポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレン粒子を内標準物質として用いることで、それぞれの樹脂について良好な回収率が得られることを確認し、定量評価手法を作製できた。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Kosuke, Kuramochi Hidetoshi, Maeda Kouji, Takahashi Yusuke, Osako Masahiro, Suzuki Go	4. 巻 8
2. 論文標題 Size-Controlled Preparation of Polyethylene Nanoplastic Particles by Nanoprecipitation and Insights into the Underlying Mechanisms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 14470 ~ 14477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c08233	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 Tanaka Kosuke, Takahashi Yusuke, Kuramochi Hidetoshi, Osako Masahiro, Tanaka Shunsuke, Suzuki Go	4. 巻 17
2. 論文標題 Preparation of Nanoscale Particles of Five Major Polymers as Potential Standards for the Study of Nanoplastics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 2105781 ~ 2105781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.202105781	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中厚資, 高橋勇介, 倉持秀敏, 大迫政浩, 鈴木剛
2. 発表標題 ナノプラスチックの環境リスク研究のための標準粒子の作製
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 厚資, 高橋 勇介, 倉持秀敏, 大迫政浩, 鈴木剛
2. 発表標題 ナノプラスチックの環境リスク研究に必要な標準ナノ粒子の作成
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 厚資, 高橋 勇介, 倉持秀敏, 大迫政浩, 鈴木剛
2. 発表標題 マイクロ・ナノプラスチックの生成過程と環境中存在量の把握に向けた取り組み
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ポリマーナノ粒子の製造方法及びポリマーナノ粒子	発明者 田中 厚資、鈴木剛、倉持 秀敏、大迫 政浩	権利者 国立研究開発法人国立環境研究所
産業財産権の種類、番号 特許、J 4 4 3 3 0 A 1	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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