

— 総説 —

海洋マイクロプラスチックの採取・前処理・定量方法*

中嶋 亮太^{1**}・山下 麗²

要旨

海洋マイクロプラスチック汚染は、海洋が直面する地球規模課題の1つであり、近年、海洋マイクロプラスチック (MPs) に関する膨大な数の論文が出版されている。MPs をモニタリングする重要性が増す一方で、MPs の調査・計測手法は発展途上の段階にあり、多くの研究者が最適な手法を模索している。海洋 MPs の主な調査・計測する手順は、(1) 海水・堆積物・生物などの試料の採取、(2) 夾雑物 (有機物・無機物) を除去することで MPs を分離と精製、(3) 検鏡と化学判別の組み合わせによる MPs の識別と同定からなる。それらの手法は多岐にわたり複雑である。本総説では海洋 MPs の採取、前処理、同定、定量化の様々な手法について紹介するとともに、各手法の特徴と問題点を整理した。さらに今後の MPs 計測手法の方向性を述べる。

キーワード：マイクロプラスチック、海洋環境、計測、同定、分離

1. はじめに

マイクロプラスチック (microplastics, MPs) は、浅海から深海まで海洋環境において普遍的に存在している。MPs は生態系や海洋動物だけでなく人間社会にも負の影響をおよぼす可能性があることから、環境中や生物体内の MPs をモニタリングし、その時系列変化、分布の広がり、生物への暴露状況など、プラスチック汚染の状

態を知ることは重要である。プラスチックごみが海洋へ漏出することを防ぐための各国の政策の効果を検証するうえでも、可能な限り海洋の広い範囲において定量的に MPs をモニタリングしなければならない。

海洋の MPs を分析・計測する手順は、(1) 試料の採取、(2) 分離・精製、そして (3) MPs の識別・同定からなり、手法について英文総説も多数発表されている (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Löder and Gerdtts, 2015; Rocha-Santos and Duarte, 2015; Song *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2016; Hanvey *et al.*, 2017; Ivleva *et al.*, 2017; Shim *et al.*, 2017; Zobkov, 2018; Mai *et al.*, 2018; Prata *et al.*, 2019)。MPs はサイズのレンジが広く (たとえば 1 μm -5 mm)、形状や材質が多様である。採取する場所も海表面から海底まで広く、試料も海水、堆積物や生物と多岐にわたる。2010年代当初は、MPs の採取法や計量単位に統一性はなく、様々な海域から MPs の定量的な報告がされてきた

* 2020年5月15日受領 2020年7月21日受理

著作権：日本海洋学会, 2020年

1 海洋研究開発機構 地球環境部門

〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15

2 東京大学大気海洋研究所

〒277-8564 千葉県柏市柏の葉5-1-5

** 連絡著者：中嶋亮太

e-mail : nakajimar@jamstec.go.jp

が、代表値をだすことは容易ではなかった。その後、MPsの採取・分析についてEU (Galgani *et al.*, 2013) や米国海洋大気庁 (NOAA) (Masura *et al.*, 2015) が先行してガイドラインを作成し、最近、国連が組織する専門家会合 Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP) は、国際的な標準法として推奨するプラスチックの採取・分析方法をまとめた (GESAMP, 2019)。環境省からも海表面に浮遊するMPsの採取・分析方法の指針が発表され (Michida *et al.*, 2019)、海洋におけるMPsの状況把握手法の標準化や調和化が進みつつある。しかしMPsの調査・定量手法は未だ発展途上の段階にあり、多くの研究者が最適手法を模索している。本稿では、上記総説に記載されていない新しい手法も含めながら海洋MPsの計測手法に関するこれまでの研究をまとめ、今後の研究進展の一助となることを期待する。

2. 精度保証 (信頼性) / 精度管理

MPsの採取、前処理、分析のいずれの工程においても、プラスチックフリーもしくは可能な限りプラスチックの混入がない状態を確保する必要がある。よく使われるプラスチック製品を排除し、使用する道具や試料を保存する容器は、金属、ガラス、シリコンといった別の道具に置きかえる。ただし分析の対象とならない、あるいは環境中からはほとんど検出されないようなプラスチック (フッ素樹脂など) の利用はかまわない。また採取の項目で述べるように、プランクトンネットのメッシュ地などプラスチックの代替素材がない場合もその利用はかまわない。その場合は、調査機材に利用しているプラスチックの材質を調べておき、その材質の粒子数だけ過大評価している可能性があることを認識すればよい。

衣服からの繊維の混入や船の塗装の混入にも注意を払う。分析中は木綿100%の白衣を着用する。空気中に浮遊する繊維状のMPsが混入する可能性は常にあるため (Dris *et al.*, 2016)、実験室での操作は、可能な限りラミナーフローのクリーンベンチで行う。蓋を開けて水をいれたガラスシャーレなどのプランクを用意し、採取、前処理、分析のそれぞれの工程で混入のチェックはかかせない。

前処理や分析の工程においては、MPsの混入リスクよりも、MPsを見落とすリスクとMPsを紛失するリスクのほうがずっと大きい (Isobe *et al.*, 2019; Cadiou *et al.*, 2020)。近年の論文では精度保証 (信頼性) / 精度管理 (QA/QC) について記載されており、使用する前処理や分析法において、可能であれば異なるサイズや密度の市販のマイクロビーズや繊維を添加してMPsの回収率と再現性を調べ、前処理や分析の精度を示すことが望ましい。添加したMPsの回収率や再現性を80%以上にすることが望ましいとされている (Löder *et al.*, 2017)。なお、プラスチック製品の利用 (とくに容器) は、静電気によって微小なMPsを紛失するリスクを増大させる。そのため前処理と分析では極力プラスチック製品を排除するほうがよい。

3. マイクロプラスチックの採取

MPsの採取は、海洋環境のどこで採取するか、すなわち海表面または水柱 (水試料) か、あるいは海底 (堆積物) または海岸 (砂浜) かで用いる手法が異なる。

3.1. 海表面

海表面に浮遊するMPsは見た目にはわかりやすく、多くの研究の調査対象になってきた。MPsのうち、材質がポリエチレン (PE) やポリプロピレン (PP) は比重が海水よりも小さく、発泡ポリスチレンは空気を含んでいるため海表面を浮遊する (Table 1)。海表面に浮くMPsの採取には主にニューストーンネットとマンタネットが使われるが、大気と海洋の境界面の薄い膜に含まれるMPsの採取には海面マイクロ層サンプラーが用いられる。

3.1.1. ニューストーンネット・マンタネット

海表面MPsの採取に広く使用されるのはニューストーンネットとマンタネットである (Fig. 1)。どちらもネットの開口部 (フレーム) が一部水没し、海表面をすくうように曳網して、水深0-0.5 mに浮遊するMPsを採取する (Eriksen *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2017; Michida *et al.*, 2019)。

マンタネットは、開口部の左右に翼型の浮きがつき、海面の一定の深度を安定して曳網できる。ただし波が高くなると容易に飛び跳ねて開口部が海面を飛び出し、そ

Table 1. Densities of various common plastic polymers.

Polymer type		Density (g/cm ³)	sink or float
Expanded polystyrene (発泡ポリスチレン)	EPS	0.02-0.64	
Polypropylene (ポリプロピレン)	PP	0.85-0.92	
Low density polyethylene (低密度ポリエチレン)	LDPE	0.89-0.93	float
High density polyethylene (高密度ポリエチレン)	HDPE	0.94-0.97	
Styrene-butadiene rubber (スチレン-ブタジエンゴム)	SBR	0.94	
Seawater (海水)		1.02-1.03	
Polystyrene (ポリスチレン)	PS	1.04-1.09	
Acrylonitrile butadiene styrene (ABS 樹脂)	ABS	1.06-1.08	
Polyamide (ポリアミド (ナイロン))	PA	1.13-1.15	
Polymethyl methacrylate (アクリル樹脂)	PMMA	1.18	
Polyvinyl chloride (ポリ塩化ビニル)	PVC	1.16-1.41	sink
Polyurethane (ポリウレタン)	PU	1.2	
Bakelite (フェノール樹脂)		1.3	
Polyethylene terephthalate (ポリエチレンテレフタレート)	PET	1.38-1.41	
Polyacetal (ポリアセタール)	POM	1.41	

の間試料を採取できない。ニューストーンネットは、マンタネットよりも開口部の縦長が長く、開口部の中間に海面がくるように左右に浮きをつけ調整する。ニューストーンネットは多少波があっても開口部が海面から跳びはねることは少ないが、開口部が水没している深さ(m)の変動が大きく、曳網中は開口部がどのくらい深く潜っているか記録する必要がある (Michida *et al.*, 2019)。

ニューストーンネットもマンタネットも、メッシュの目合い(網目の大きさ)は100-500 μm と幅があるが、目合いが小さいと目詰まりしやすいため、目合い330 μm 程度のネットが最も使用されている (GESAMP, 2019)。1回の曳網は船速1-3ノットで15-30分間であることが多い (GESAMP, 2019; Michida *et al.*, 2019)。曳網距離を正確に求めるために、ネット開口部に流量計(フローメーター)が取り付けられる。船の舷から離れるようにネットを海面におろし、船の航跡流を避けるように曳網する。航跡流に巻き込まれたMPsは水面から下方向に潜ってしまうためMPs数の大幅な過小評価につながるからである (GESAMP, 2019)。

ニューストーンネットまたはマンタネットで採取されるMPs密度の単位は、曳網した面積あたりのMPs個数(number/km²)、または面積あたりのMPs重量(mg/km²)で示される。また曳網した体積あたりの個数(number/m³)、もしくは体積あたりの重量(mg/m³)でも示される。曳網した面積(km²)は、ネット開口部の横幅長(m)×曳網距離(m)から算出され、曳網距離は(1)船の対水速度(例2knot)×曳網した時間(例0.5h)で求めるか、(2)流量計の値(曳網距離に対する回転数)から求める。ネットの目が詰まると濾水量が落ちてしまうため、流量計で求めた曳網距離のほうが正確である (Michida *et al.*, 2019)。一方、曳網した体積(m³)は、ネット開口部の水没している深さ(m)×ネット開口部の横幅長(m)×曳網距離(m)から算出される。一般的なニューストーンネット(横幅0.75m)を2ノットで20分間曳網すると、曳網される面積はおよそ1,000m²となり、体積は200-500m³になる (Michida *et al.*, 2019)。

流量計から曳網距離を計算するために、流量計は事前にキャリブレーションを行う。すなわち、ネットなしの

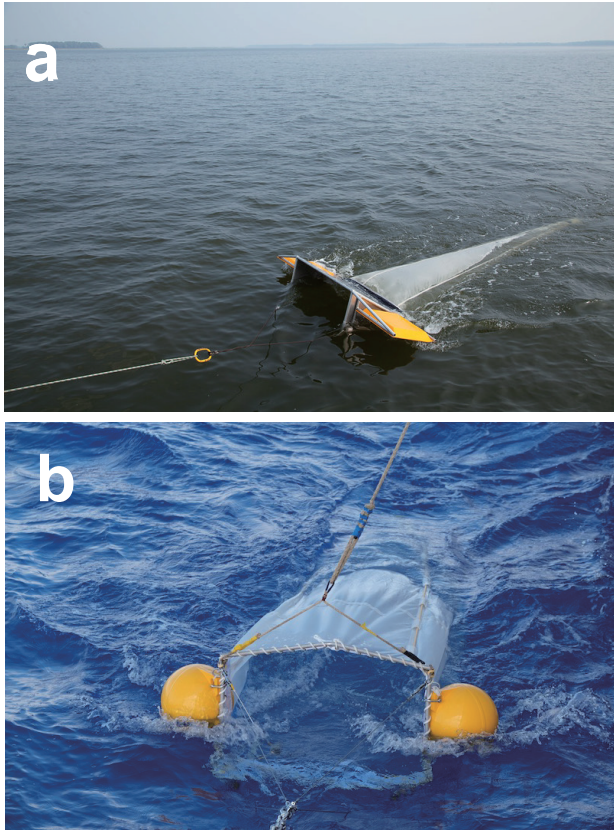


Fig. 1. Two types of nets are used for sampling microplastics in surface seawater— (a) manta trawl and (b) neuston net (Image a: Chesapeake Bay Program, <https://flic.kr/p/FRwowH>, CC BY-NC 2.0).

フレームに流量計を取り付け、既知の距離を曳き、濾過効率 100%における曳網距離あたりの流量計の回転数を求める (Michida *et al.*, 2019)。フレームにネットを取り付けて曳網すると、ネットの抵抗により一部の水がフレーム外にあふれるため濾過効率 100%にはならない。ネットが目詰まりすると濾過効率はさらに小さくなる (= 濾水量が落ちる)。ネットの開口部 (フレーム) に流量計を取り付けて曳網することで、流量計の回転数から「実際の」曳網距離を知ることができる。

ニューストンネットでは目詰まりによってネット開口部の水没深度が大きくなるため、曳網時に水没深度を写真やビデオ撮影等で記録することが推奨される (Michida *et al.*, 2019)。ただし、浮力の高い浮きを使うことで目詰まりしても開口部の水没をある程度は防ぐことができる。

ニューストンネットで採取されるような比較的サイズが大きな MPs (>300 μm) の密度 (単位体積あたりの MPs 個数) は、通常、海表面で高く深度が増すにつれて低くなる。しかし、波が高いと海表面の MPs が深くまで潜り込みやすくなり、MPs 密度の過小評価につながる (Reisser *et al.*, 2015)。そのためネットの曳網は海況が穏やかな時が望ましい。Isobe *et al.* (2015) は、ネット曳網時の波高と風速を計測し、波高と風速に依存した MPs の鉛直分布を推定して (Kukulka *et al.*, 2012)、これを鉛直積分し MPs 数を補正することを推奨している。

ネットは使用する前に必ず内部をよく流し洗いし、MPs の混入を最小限にする (Michida *et al.*, 2019)。夜間にニューストンまたはマンタネットを曳くと大量の動物プランクトンが採取される。MPs の前処理のことを考えると、動物プランクトンが少ない日中に曳網したほうが良い。また、生活排水 (調理場の排水、洗濯排水など) からの混入を避けるため、ネットの曳網中は船舶からの排水を止める。

ネット採取の問題点は、メッシュ目合いよりも小さな MPs がネットをすり抜けし、MPs 数を過小評価することである。たとえば、目合い 333 μm メッシュのマンタネットで採取した MPs 数と、ポンプでくみ上げた海水を 100 μm もしくは 300 μm のメッシュで濾して採取した MPs 数とを比較すると、100 μm メッシュで得られた MPs 数のほうが多い (Setälä *et al.*, 2016)。バケツ採水された海水中の MPs 数のほうが目合い 333 μm のマンタネットで採取された MPs 数よりも数桁オーダー高いという報告もある (Brandon *et al.*, 2020)。そのためネット採取に平行して、2.2 で述べる採水も行われることが多い。

3.1.2. 海面マイクロ層サンプラー

海面マイクロ層とは、大気と海洋の境界面にある非常に薄い層 (厚み数百 μm ~ 数 mm) のことで、この境界面に微生物や粒状態物質が濃集する (Nakajima *et al.*, 2013)。海面マイクロ層の MPs 採取には金属メッシュや回転ドラム式のサンプラーが使用される (Ng and Obbard, 2006; Song *et al.*, 2014)。しかし、得られる (時間あたりの) 水量は極めて少なく、MPs の広範囲な調査には向いていない。海面マイクロ層の採取に必須の条件として、波の影響を排除する必要がある。そのため海況が穏やかな時にしか採取できないうえ、小さなボートなどを用いて、

岸や大きな船からなるべく遠く離れた場所で採取する必要がある。このように海面マイクロ層の採取は容易ではないが、海面マイクロ層のMPs数はマンタネットや後述するポンプで得られる濃度よりも多いことが示されている (Song *et al.*, 2014)。海面マイクロ層サンプラーで得られた水試料はフィルターに濾過してMPsを捕集する。

3.2. 水柱

水柱のMPsの採取には、プランクトンネット (Doyle *et al.*, 2011)、ニスキンボトルなどの採水器 (Norén and Naustvoll, 2010)、ポンプ (Ng and Obbard, 2006; Dubaish and Liebezeit, 2013; Enders *et al.*, 2015)、連続プランクトン採集器 (Continuous Plankton Recorder, CPR) (Thompson *et al.*, 2004) が用いられる。このうちポンプとCPRは、比較的海表面に近い表層 (水深~10 m) のMPs採取に用いられる。水柱から採取されるMPs密度の単位は、体積あたりの個数 (number/m³)、もしくは体積あたりの重量 (mg/m³) で示される。

3.2.1. プランクトンネット

海表面より深い水深のMPsは、ボンゴネットなどのプランクトンネットの斜め曳きまたは鉛直曳きによって採取する。MPsの鉛直分布を調べるには、Multiple Opening/Closing Net Environmental Sensing System (MOCNESS) や Vertical Multiple-opening Plankton Sampler (VMPS) など多層式開閉プランクトンネットが用いられる (Brunner *et al.*, 2015)。ニューストーンネットと同様、MPsの混入を最小限にするため、ネット曳網の直前にネット内部をよく洗い流す。開口部には流量計を取り付け、曳網した海水の体積を計算する。

3.2.2. 採水器・バケツ

プランクトンネットの目合いをすり抜けてしまう微小なMPsを採取するにはバルクの海水を採水してフィルターに濾過する。金属製バケツを使えば最も簡単に海表面に近い海水を採水できるが、1度のサンプリングで得られる水量は小さい。目的の水深における海水をピンポイントに採水するにはニスキンボトルなどの採水器を用いる (Di Mauro *et al.*, 2017; Dai *et al.*, 2018)。

3.2.3. ポンプ

ポンプ採水では、ホースを取り付けたポンプ (Enders *et al.*, 2015)、または船底にある取水口から海水を取り込

む冷却水ポンプが使われる (Lusher *et al.*, 2014)。ホースを取り付けたポンプ採水には、ポンプをデッキ上に設置してホースを海面下に垂らし海水をくみ上げる、または水中ポンプを海面下に下ろして海水をくみ上げる方法がある。ポンプをデッキ上に設置し、ホースで海水をくみ上げ、海水がポンプを通過する前にメッシュ (プランクトンネットやステンレス篩など) に濾過するほうが、混入のリスクと脆いMPsが壊れるリスクを減らすことができる (GESAMP, 2019)。

船底の取水口から海水を取り込む場合、その採水深度は数m程度が一般的である。船底から取り込まれた海水は熱交換器などを通過してくるが、一部の海洋調査船 (たとえば、みらいや白鳳丸) では、研究用に生海水を実験室まで直接くみ上げており、そこからMPs試料を得ることができる (Fig. 2a, b)。

ポンプ採水した海水は、ステンレス製フィルターやガラス繊維フィルター、ナイロンフィルターなどに濾過してMPsを捕集する (Enders *et al.*, 2015; GESAMP, 2019; Zobkov *et al.*, 2019)。目合いの異なる複数のフィルターに通過させることで (たとえば 500, 300, 30 μm)、MPsのサイズ分画試料を同時に得ることができる (Fig. 2c, d)。

ポンプ採水は、ネット採取に比べて (時間あたりに) 濾過できる水量が少ない。そのため密度の薄いMPsを集めるためには、海水をフィルターに数十分~1日濾過し続けることが多い。ポンプ採水では流量計を用いて、流速 (L/min) とポンピング時間 (h) から採水した海水の量 (積算流量) を求めるが、夾雑物の影響でフィルターが目詰まりするにつれてサンプラーを通過する海水の流速が落ちるため、積算流量を記録できるデジタル流量計を使用する。

近年ではMPsを直接海中で濾過する現場濾過ポンプも使われている (Karlsson *et al.*, 2020; Schönlaue *et al.*, 2020)。現場濾過ポンプでは、1時間で2万リットル程度の海水を濾過することができ、ニスキンボトルなどの採水器よりも目的の水深でより多くのMPs試料を採取できる。

3.2.4. 連続プランクトン採集器 (CPR)

連続プランクトン採集器 (CPR) は、船の後部から曳航 (水深およそ 10 m) することで、その海水流入口 (1.27 cm²) に入るプランクトンを採集する装置である。CPR

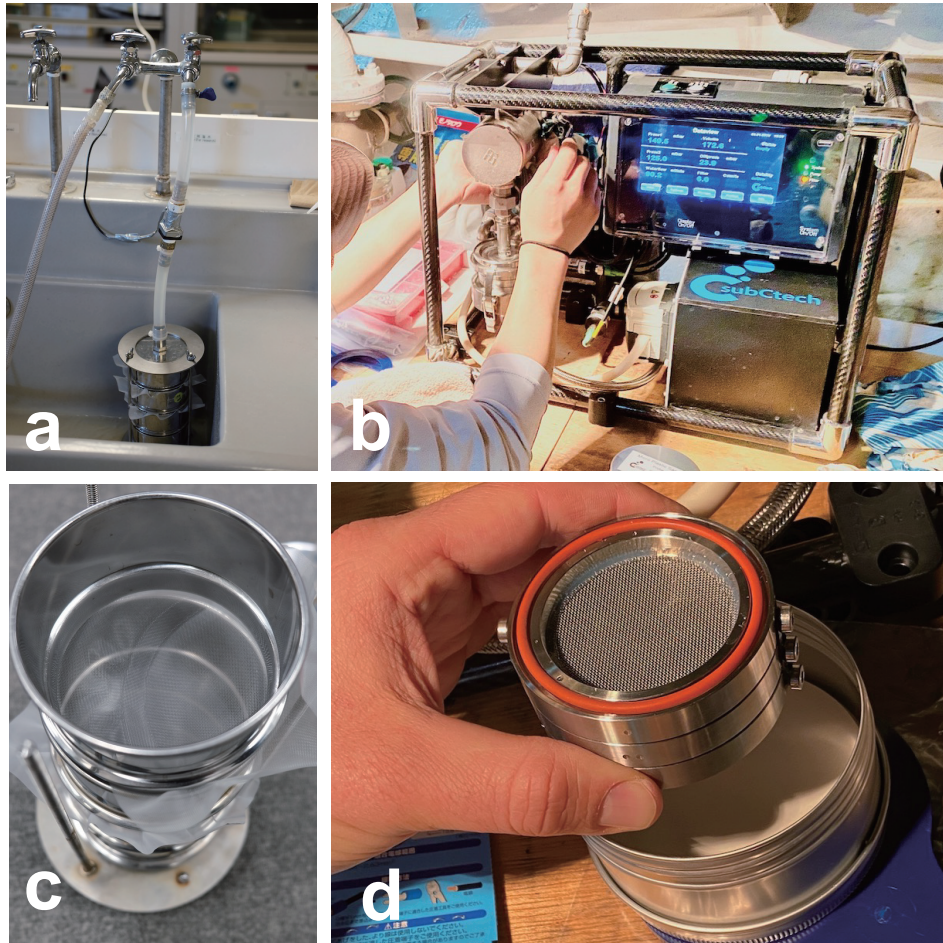


Fig. 2. Examples of microplastic samplers using ship intake water— (a) sampler developed by the authors, (b) sampler developed by SubCtech GmbH (Germany). Multi-stage samplers with different mesh sizes allow for collection of size-fractionated microplastic samples. Microplastic samples are collected using either (c) a nylon mesh or (d) a stainless-steel mesh. The integrated volume of water that is filtered and the flow rate are recorded using a digital flowmeter (Images b and d: photographed by Dr. Sanae Chiba).

に取り込まれたプランクトンはシルク製のメッシュ生地（目合い $270\ \mu\text{m}$ ）に捕集され、船が1マイル（1,852 m）航走するとメッシュが1 cm 巻き取られていくので、プランクトン群集の水平分布を知ることができる。観測船だけでなく同一航路を頻繁に行き来しているフェリーやコンテナ船などの商船にCPRを取り付けることで、プランクトン群集の定期的な広域観測が可能である。CPRにはプランクトンだけでなくMPsも捕集される（Galgani *et al.*, 2013）。Thompson *et al.* (2004) は、1931年から北太平洋で運用されているCPRのアーカイブ試料に含まれる

MPsを調べ、MPsの最初の記録は1960年代であることを報告している。

3.2.5. セディメントトラップ

上記で述べたネットや採水装置に加えて、水柱を沈降するMPsの採取にはセディメントトラップが用いられる（Law *et al.*, 2010; Enders *et al.*, 2019）。セディメントトラップで採取されるMPsは、単位時間あたり、単位面積あたりに沈降するMPs数（e.g., number/m²/d）、または重量（e.g., mg/m²/d）で示される。

3.3. 海底 (堆積物)

ポリ塩化ビニル (PVC) やポリエチレンテレフタレート (PET) など海水よりも比重の大きなプラスチックはただちに海底に沈む (Table 1)。一方で、海表面を浮遊する軽いプラスチックも、藻類の付着などによって比重が重くなりやがて沈む (Michels *et al.*, 2018)。そのため海底に沈降した MPs を採取するには、まず堆積物ごと採取する。堆積物の採取には、一定面積の採取に適したボックスコアラーや底質成層を乱さずに採取する柱状のプッシュコアラーまたはマルチプルコアラーが広く利用される。ボックスコアラーでは採取した堆積物を地上に引き揚げてから改めて柱状の筒 (チューブ) を差し込み一定量の堆積物が採取されることが多い。採取した堆積物

コアを、層別 (たとえば 0.5-1 cm 間隔) に切り出し、各層に含まれる MPs を調べる。

堆積物コアをとるための筒はポリカーボネート製や PVC 製などプラスチックでできているため、筒を堆積物に差し込むとプラスチックが削れ、混入が生じる (Tsuchiya *et al.*, 2019)。Fig. 3 に使用前と 1 度使用済みの堆積物コアチューブの内壁写真を示した。1 度利用するだけたくさんの傷がつくことがわかる。そのため堆積物コアの MPs を調べる前には、金属製のヘラを用いてコアの周囲 1-2 cm をそぎ落とし、プラスチックに触れていない内側の堆積物を使う (Matsuguma *et al.*, 2017; Brandon *et al.*, 2019)。しかし周囲をそぎ落とすことで貴重なコア試料の大部分を失うことになるため、混入を心配することがない金属製の柱状チューブも提案されてい

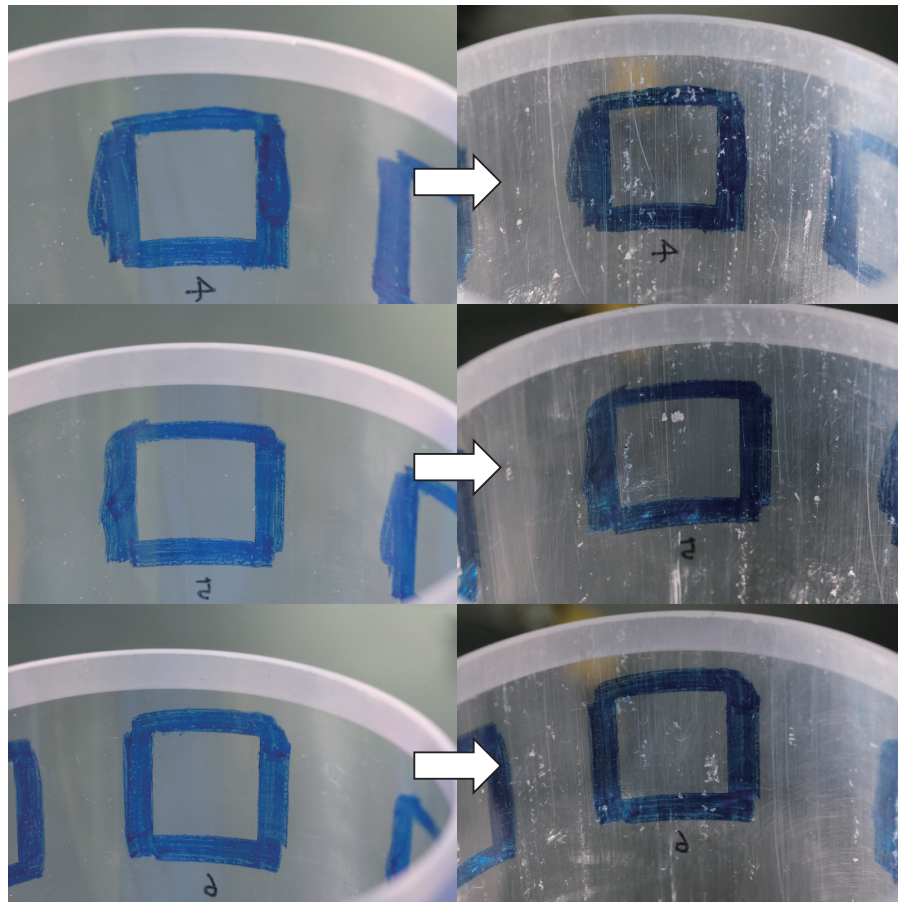


Fig. 3. Inner wall surface of the polycarbonate tube of a push corer— (a) new tube; (b) tube that has been used for retrieving a core from a sandy bottom at Sagami Bay, at 855-m depth; Tsuchiya *et al.* (2019) (CC BY 4.0).

る (Fig. 4) (Tsuchiya *et al.*, 2019)。

堆積物 MPs 密度の単位表記は、論文によって異なり、堆積物の湿重量あたり、乾燥重量あたり、面積あたり、体積あたりの MPs 数や重量で示される。また堆積物の採取深度も研究間で異なり、結果の比較は困難である。GESAMP では、堆積物から採取される MPs 密度の単位は、堆積物の乾燥重量あたりの MPs 数 (number/kg dry weight) または重量 (mg/kg dry weight) で示すことが推奨されている (GESAMP, 2019)。

堆積物コア試料では、放射性核種 ($^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$, ^{137}Cs) による堆積物の地質年代と照らし合わせることで MPs の蓄積過程を知ることができる。たとえば、堆積速度が高いサンタバーバラ沖合のある海底から採取された堆積物コアを調べた研究では、第二次世界大戦後から MPs 数が 15 年ごとに 2 倍増加していることを報告している (Brandon *et al.*, 2019)。

3.4. 海岸 (砂浜)

海岸の MPs は誰でも簡単に採取できるため、世界中

のモニタリングプログラムに採用されている。通常、コドラート (正方形の枠) を砂上に設置し、コドラート内の砂を採取し、含まれる MPs を調べる。採取する深度は 5 cm が標準とされる (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; GESAMP, 2019)。コドラートはランダムまたは満潮線沿いに均等に設置して採取する (Liebezeit and Dubaish, 2012; Van *et al.*, 2012)。サンプルの代表性を担保するため、1 地点でコドラートを 5 つ以上、5 m 間隔で設置することが望ましい (Galgani *et al.*, 2013)。

3.5. 生物

MPs は多くの海洋動物に誤食されており、生物体内の MPs の数や重量も海洋プラスチック汚染の指標となる (Kühn *et al.*, 2015)。たとえば MPs 汚染のモニタリングには、魚、二枚貝、動物プランクトンなどが使われている (Setälä *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Peters and Bratton, 2016)。通常、生物は解剖して消化管を取り出すが、対象とする生物が小さい場合、解剖せずにまるごと処理する (Galgani *et al.*, 2013)。その場合、試料表面に MPs

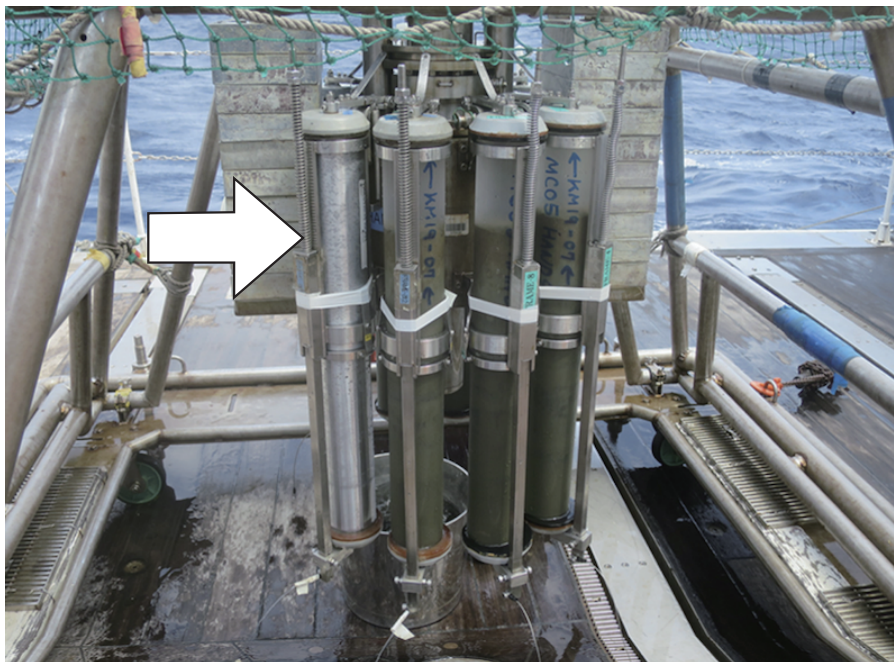


Fig. 4. Corer equipped with an aluminum tube (arrow) and conventional polycarbonate tubes—the metal tube is not transparent, which means that it is impossible to observe the sampled sediment from the outside. Nevertheless, the tube allows minimal contamination of microplastics. Tsuchiya *et al.* (2019) (CC BY 4.0).

が付着している可能性があるため、試料をよく洗浄する必要がある。生物体内から採取されるMPsは、個体あたりのMPs数(number/individual)や重量(mg/individual)で示される。

3.6. 試料の保存と分割

自然環境から採取されるMPsには過度に劣化したものが少なくない。劣化したMPsは脆く、水分が付着したまま冷凍すると破損する恐れがあるため、試料は可能な限り冷蔵または常温で保存することが望ましい。海水・ネット試料は、ホルマリンまたはエタノールで固定することで、生物の腐敗を防ぎ、異臭の発生を抑えることで実験室でのMPsの取り出し作業を円滑にできる。ただしMPsに含まれる化学物質を分析する際はホルマリンやエタノールで固定せずに冷蔵保存する。プラスチック容器は汎用性の高いポリマー(PE, PP, PVCなど)で作られているため、採取した試料はガラス瓶や金属製の容器に保管することを推奨する。やむを得ずプラスチックボトルに保管する場合は、新品を良く水洗いして使用し、ブランクを用意するのが望ましい。水試料では、フィルター等に濾過したのち、ただちに乾燥しない場合は冷蔵または常温で保存する。堆積物コア試料は冷蔵保存する。

MPsを大量に含んだ試料(特にネット試料)を分割せずにすべて分析することは研究を遅らせる要因になる。後述するが、MPsの識別・同定は極めて時間がかかる。試料の分割には、フォルサム式などのプランクトンスプリッターが用いられる(Michida *et al.*, 2019)。あらかじめ比較的大きなMPsや形に特徴があり比較的数が少ないMPs(たとえば樹脂ペレットや漁網の繊維など)を取り除いてからプランクトンスプリッターを活用する。しかしPEやPPなど比重の軽いMPsは水面に浮いてしまい、分割中にMPsがプランクトンスプリッターの壁面に吸着し、正確な分割ができない。そのためMPs試料をエタノールで置換し(PEとPPはエタノールに沈む)、エタノールごとスプリッターに注ぎ込んでMPsの分割を行う。

4. マイクロプラスチックの分離と精製(前処理)

MPsの分離と精製の目的は、夾雑物を可能な限り除去して、MPsの識別・同定を容易にすることである。いわ

ゆるMPs試料の前処理である。とくに非プラスチック粒子が大量に含まれる試料の場合、前処理なしにMPsを検出することは容易ではない。MPsの見落としを防ぐために、できる限り非プラスチック粒子を取り除くことが肝要である(Qiu *et al.*, 2016; Hanvey *et al.*, 2017; Roch and Brinker, 2017; Prata *et al.*, 2019)。前処理に標準化された方法は今のところないが、ここでは一般的に広く使われている前処理の方法を中心に述べる。

4.1. 篩

最もシンプルなMPsの分離方法は、試料を篩(ふるい)で濾して、その場で肉眼もしくは顕微鏡下で観察しながらピンセットで拾い出すことである。ネット試料には、MPsよりも大きな生物(クラゲ・魚など)や木片、海藻、海草などが混入する。これらを効率よく取り除くため、目合5mmメッシュのステンレス篩に試料を通し、それを目合300 μ mメッシュの篩で受ける(Masura *et al.*, 2015)。MPsを採取するネットのメッシュ目合は標準で330 μ m程度なので、篩の目合も300 μ mあればよい。もちろんより細かい目合のネット(例えば100 μ m)を使用した場合はそれに応じて篩の目合も小さくする。目詰まりを防ぐために間に1mmや500 μ mメッシュの篩をかませる場合もある。

500 μ m以上のMPsは肉眼でも識別が容易であるため、MPsまたはMPsらしき粒子(MP様粒子)もこの時点で拾い出すことができる(Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012)。しかし肉眼による識別と拾い出しは非常に時間がかかる上に、取りこぼしも多いため、別途以下に述べる化学処理や密度分離もあわせて行うのが望ましい。5mmメッシュ上に残ったプラスチック片はMPsよりも大型のメソプラスチック(5-25mm)またはマクロプラスチック(25mm \sim)として扱う。海底堆積物の試料でも篩を使えるが、堆積物中のMPsは非常に小さなサイズの粒子が多いため、細かい目合の篩を使うと詰まりしやすい。そのため次に述べる密度分離をまず行うのが望ましい。

4.2. 密度分離

MPsを海底の堆積物や砂から分離するためには、MPsの密度(0.9-1.5 g/cm³)と堆積物の密度(>2.5 g/cm³)の差を利用した密度分離法がよく使われる(Dillon, 1964;

Chubarenko *et al.*, 2016; Hanvey *et al.*, 2017)。ネット試料でも後述する化学処理の後に密度分離するケースもある。密度分離には、MPs よりも密度が大きいが堆積物よりは密度が小さい塩類溶液が主に使われる。MPs を含んだ堆積物をこれらの溶液に入れて攪拌・静置すると、軽いMPs が浮き、重たい堆積物が沈む。上澄みを回収することで堆積物からMPs を効率よく分離できる。

MPs の密度分離に最も古くから使われてきたのは飽和塩水 (NaCl) である (Fries *et al.*, 2013)。安価で安全であり、比重は 1.2 g/cm^3 があるため、PE や PP を浮かせることができる (各プラスチック材質の比重は Table 1 を参照)。オリーブオイルを飽和塩水に一滴いれると、プラスチック粒子が上澄みに集まるのを助け回収率も上がる (Karlsson *et al.*, 2017)。しかし、PET やポ PVC などの比較的比重の大きなMPs 粒子を浮かせることはできない。またPE やPP 粒子でも付着物があると飽和塩水に沈んだままの場合がある。

そこで、より密度の大きな塩化亜鉛 (ZnCl_2 , 密度: $1.6\text{--}1.7 \text{ g/cm}^3$), 臭化亜鉛 (25% ZnBr_2 密度: $\leq 1.7 \text{ g/cm}^3$), 臭化ナトリウム (NaBr, 密度: $1.4\text{--}1.6 \text{ g/cm}^3$), ヨウ化ナトリウム (NaI, 密度: $\leq 1.8 \text{ g/cm}^3$), 塩化カルシウム (CaCl_2 , 密度: 2.15 g/cm^3), ポリタングステン酸ナトリウム (SPT: $3\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 9\text{WO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 密度: $\leq 3.1 \text{ g/cm}^3$) などが使われる (Corcoran *et al.*, 2009; Imhof *et al.*, 2012; Liebezeit and Dubaish, 2012; Claessens *et al.*, 2013; Crawford and Quinn, 2017; Quinn *et al.*, 2017; Nakajima *et al.*, 2019a)。SPT は安全だが高価であり、塩化亜鉛や臭化亜鉛は安価だが毒性が高いなどの理由で、やや高価だが安全なヨウ化ナトリウムがよく利用されている。

堆積物の密度分離を行う前に、水と堆積物試料を混ぜてエアレーションし、軽いMPs を含む粒子を上層へ浮かせて回収し、大部分の堆積物を取り除いた後に密度分離を行う場合もある (Claessens *et al.*, 2013)。

密度分離には、ガラス製のピーカーや活栓 (バルブ) 付き漏斗 (または分液漏斗) が主に用いられる。ピーカー法では上澄み回収の際に堆積物の再懸濁を防ぐのが難しく、またガラス壁面にMPs が残るため、工程を3-5回ほど繰り返す必要がある (Masura *et al.*, 2015)。堆積物の再懸濁を防ぐためには、活栓付き漏斗 (または分液漏斗)

が用いられる。漏斗の下に伸びる管状の足から沈殿させた堆積物を除去して、MPs を含む上澄みだけを残して回収する。しかし足が目詰まりしやすく、1度に処理できる堆積物は少ない (Masura *et al.*, 2015)。

これらの問題を解決するため活栓付き漏斗を上下逆さまにした形状の金属製分離器具 (Munich Plastic Sediment Separator, MPSS) が考案されている (Imhof *et al.*, 2012)。MPs の回収率は未使用のMPs で95-100%とされるが、劣化したMPs では20-40%と低い (Zobkov and Esiukova, 2017)。またMPSSは、大型で重く取扱が容易ではない他、サンプル処理間でバルブの洗浄をするために毎回分解洗浄が必要である (Zobkov and Esiukova, 2017)。MPSSと類似した機構でPVC製のポータルブルタイプも提案されているが (Sediment-Microplastic Isolation, SMI) (Coppock *et al.*, 2017)、やはり分解洗浄が手間であり、またPVC製のため劣化にともなうMPs混入の懸念がある他、回収したMPsの吸着化学物質の測定には不向きである。

上記の短所を解決するために、複雑な構造はなく洗浄が容易で、MPs と堆積物を1度の操作で分離できるガラス製の分離器具 (JAMSS) も開発されている (Nakajima *et al.*, 2019a)。JAMSSは、上板と下板の2枚のガラス板で構成され、上板には筒、下板にはカップがつく (Fig. 5)。上部と下部を重ね合わせると1つの筒となり、ここに堆積物と塩類溶液 (NaI 等) を入れて密度分離させる。ガラスコーティングされた攪拌子を用いてゆるやかに攪拌した後、静置させ、堆積物が完全に沈殿してから、上板と下板をスライドする。すると下部のカップ内に堆積物が閉じ込められるため、MPs を含む上澄みを容易に回収可能である。JAMSSは堆積物からMPsを最も簡単・効率よく (回収率: 97%) 密度分離できる器具の1つである。

4.3. 化学処理

夾雑物のうち無機物の多くは上述の密度分離法で取り除けるが、有機物は化学処理によって取り除かれる。有機物にはプランクトンやデトリタス、MPs に付着する藻類などが含まれる。ただし化学処理によって完璧に有機物を取り除けるわけではなく、甲殻類の外殻などのキチン質や細かな木くずなどは残る。

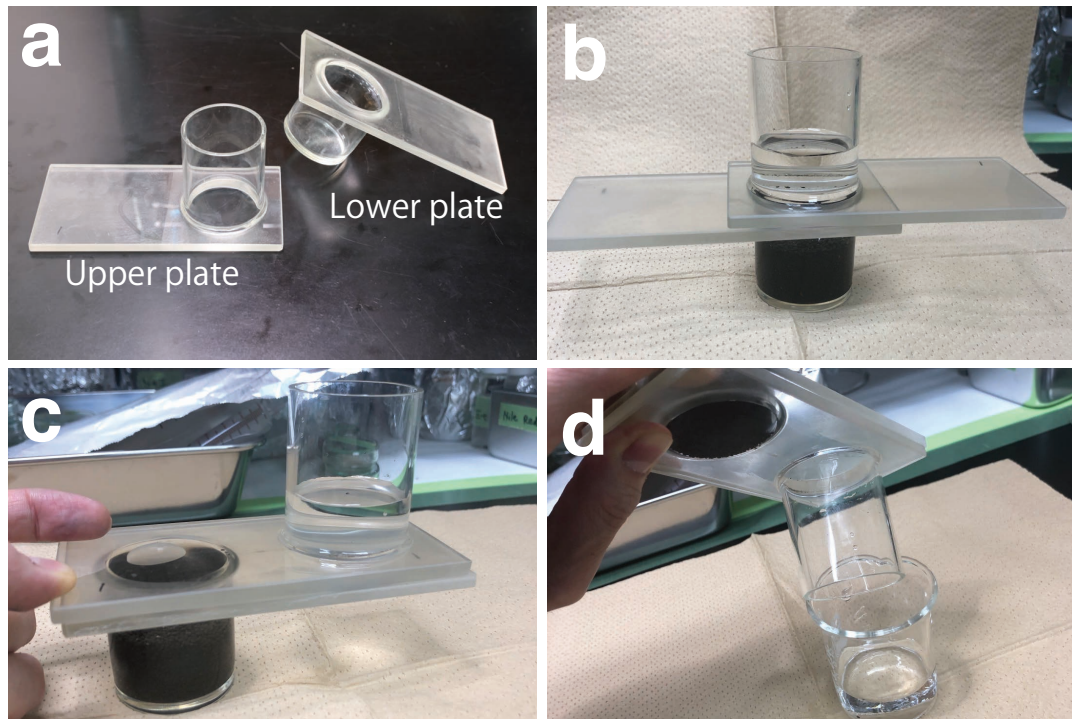


Fig. 5. Microplastic-sediment separator unit made of glass (JAMSS) — (a) the upper plate (left) incorporates an open glass tube, whereas the lower plate (right) incorporates a cylindrical glass container. (b) The two plates are set against each other during use, so that initially the lower container and the upper tube combine into a single, cylindrical container, where the sample can be poured into. (c) The plates can then slide against each other to separate the lower from upper half of the sample by introducing a lid and a bottom (the glass plate), respectively. (d) Microplastics in the supernatant of the upper tube are poured by rinsing the internal walls of the tube. Nakajima *et al.* (2019b) (CC BY 4.0).

4.3.1. 酸・アルカリによる有機物分解

酸とアルカリによる有機物の除去は広く試みられている方法である。二枚貝などの生物組織を分解してMPsを取り出すために、22.4Mの硝酸(HNO_3) (Claessens *et al.*, 2013) や、 HNO_3 と過塩素酸(HClO_4)の混合液(IC-ES, 2015)などが使われる。しかし強い酸はポリスチレンやポリアミドなど特定のプラスチックを壊してしまう(Nuelle *et al.*, 2014; Rocha-Santos and Duarte, 2015)。

水酸化ナトリウム(NaOH)や水酸化カリウム(KOH)によるアルカリ分解も試みられている。分解速度を速くするために NaOH と HNO_3 の混合液が用いられることもある(Roch and Brinker, 2017)。しかし強いアルカリ(たとえば10M NaOH)ではPEやポリアミドなどを壊してしまう(Dehaut *et al.*, 2016)。10%水酸化カリウム

(KOH)溶液ならMPsを壊すことはないが、魚類の消化管では完全な分解に2-3週間を要する(Foekema *et al.*, 2013)。強い酸とアルカリはMPsを壊してしまうなど予期せぬ結果を招く可能性があるため注意が必要である。

4.3.2. 過酸化水素による有機物酸化

過酸化水素(H_2O_2)による有機物の酸化は最もよく使われる方法で(Liebezeit and Dubaish, 2012), 30% H_2O_2 を60°Cや70°Cに加熱し有機物を分解する方法が様々な研究で行われている。30% H_2O_2 に硫酸鉄(II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)を混合するフェントン法も広く使われている(Masura *et al.*, 2015; Tagg *et al.*, 2017)。

一般的なフェントン法では溶液を70°C以上に加熱するが(Masura *et al.*, 2015), 60°C以上の発熱反応ではMPsが破壊される恐れがある(Munno *et al.*, 2018)。 H_2O_2 の

みによる処理も同様で、高い温度では熱に弱いプラスチックがダメージを受けやすい。

酸・アルカリによる有機物分解と過酸化水素による有機物酸化による処理方法を比較した研究もある (Hurley *et al.*, 2018)。(1) 30% H_2O_2 で 60°C 反応, (2) 30% H_2O_2 で 70°C 反応, (3) フェントン法で常温反応, (4) 1M NaOH で 60°C 反応, (5) 10% KOH で 60°C 反応, の 5 つの条件における有機物の除去率と MPs へのダメージを比較すると、常温フェントン法がもっと効率よく有機物を除去し、かつ MPs へのダメージが最も少なかった (Hurley *et al.*, 2018)。この研究では、いずれの試薬を用いるとも反応温度は 40°C を超えないことを推奨している (Hurley *et al.*, 2018)。

4.3.3. 酵素による有機物分解

酵素分解による有機物除去も試みられている (Cole *et al.*, 2014)。タンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) を用いて動物プランクトンを大量に含む試料を分解した実験では、試料重量の 97% 以上の分解と MPs の高い回収に成功している (Cole *et al.*, 2014)。同様に二枚貝と魚の消化管内容物をタンパク質分解酵素で分解する実験でも MPs の高い回収率を達成している (Catarino *et al.*, 2017; Courteney-Jones *et al.*, 2017; Karlsson *et al.*, 2017)。

酵素分解のメリットは、MPs にダメージを与えないこと、酸やアルカリ等とは異なり扱いが容易ということである。しかし処理時間は長く (試料によるが、プランクトン試料で 10 日程度) (Löder *et al.*, 2017)、また高価である。上述の酵素処理は生物のやわらかい組織を分解することを目的にしており、硬い組織や植物繊維などは分解されない。したがって酵素処理の後に過酸化水素による処理も推奨されている (Löder *et al.*, 2017)。

4.3.4. 化学処理の手順

化学処理にはビーカーやペトリディッシュなどガラス製の容器を用いる。環境試料をガラス容器に入れ、酸やアルカリ、過酸化水素などを加えて反応させ、反応終了後にフィルター上 (または篩) に濾して溶液を取り除く。

複数の化学処理を行う場合 (たとえば酵素処理の後に H_2O_2 処理)、試薬を変える度にフィルターに試料を集め、再び試薬の入った容器にフィルター上の試料を洗い流す (またはフィルターごと入れる) 行程を繰り返すことになる。その過程を繰り返さずと MPs を紛失するリスクが増

大し、紛失する MPs の数はサイズが小さいほど多い (Nakajima *et al.*, 2019b)。

そのような MPs 紛失のリスクを減らすために硝酸セルロース (cellulose nitrate, CN) フィルターを用いた方法や (Roch and Brinker, 2017)、ビーカーに直接挿入できる小型のステンレス篩が提案されている (Nakajima *et al.*, 2019b)。

CN フィルターでは、サンプルをフィルターに吸引る過後、フィルターごと 1M NaOH 溶液に漬け (温度 40°C)、有機物を分解させるとともに CN フィルターを溶かす。さらに HCl を加えて中和してから、 H_2O_2 を加えて酸化処理を行うことで、複数の化学処理を 1 つのビーカーで完結できる (Roch and Brinker, 2017)。その後、MPs の識別・同定のために試料を別途フィルターに濾過する。

小型のステンレス篩 (メッシュ目合い: 10-30 μm) では、中に試料を入れたまま、試薬の入ったガラスビーカーに直接挿入して反応させる。複数の化学処理を行う際は、取り出した小型篩をそのままを別の試薬が入ったビーカーに挿入すればよい。反応終了後にビーカーから篩を取り出すだけで精製済みの MPs を回収できるため、化学処理の度にフィルター上に MPs を捕集・洗い流す手間を省くと同時に、MPs を紛失するリスクを減らしている (Nakajima *et al.*, 2019b)。

4.4. その他の分離方法

4.4.1. オイル選別

プラスチックの親油性を利用し、試料から MPs を回収するオイル法も報告されている (Crichton *et al.*, 2017; Mani *et al.*, 2019)。乾いた試料を水とキャノーラ油 (またはヒマシ油) と混合し、十分によく混ぜた後、油、水、固層が完全に分離するまで静置する。MPs は油層に運ばれ、油層をフィルターに濾過すればよい。オイル法による MPs の回収率は未使用の MPs で 90-100% と報告されている (Crichton *et al.*, 2017; Mani *et al.*, 2019)。この方法は試薬に食用オイルを利用するだけで安価だが、回収した MPs を含む粒子は油まみれである。また有機物が多い試料では、有機物を除去するプロセスも別途必要になる (Möller *et al.*, 2020)。

4.4.2. 浮遊選別

疎水性の高い粒子には気泡が付きやすい性質を利用して、疎水性が高く比重の軽いMPsを浮かせ、疎水性が低い粒子と分離する方法も提案されている。浮遊選別はリサイクル施設では一般的な手法であるが、堆積物中の小さなMPsの回収率は60%以下と低い(Imhof *et al.*, 2012)。

4.4.3. 静電選別

静電気を利用して帯電させたMPsを特異的に回収する方法も報告されている(Felsing *et al.*, 2018)。静電選別では、MPs(63 μ m-5mm)の回収率90-100%と報告されているが、150gの試料を処理するのに3-4時間程度要する。また試料は完全に乾いている必要があり、濡れた試料や粘着性がある試料には適さない(Felsing *et al.*, 2018)。

4.4.4. 磁気選別

磁気によってMPsを集める手法もある。疎水化した鉄ナノ粒子をMPsに吸着させ、MPsを磁石で回収する(Grbic *et al.*, 2019)。鉄ナノ粒子に疎水性の炭化水素を付加させ、その鉄ナノ粒子をMPs表面に結合させる。するとMPsを磁石で回収が可能になる。ただしMPsに結合した鉄ナノ粒子がその後の材質分析に影響するかどうかは調べられていない。

5. マイクロプラスチックの識別・同定

試料の前処理(分離・精製)によって夾雑物を減らしたら、MPsおよびMPs様粒子の識別とポリマーの材質同定を行う。MPsおよびMPs様粒子の識別は目視(肉眼または顕微鏡)で行い、材質の同定には化学判別を用いる。MPsの識別と併せて、MPsの形状・サイズも記録することが望ましい。MPsの形状は、破片状(fragment)、発泡状(foam)、フィルム状(film or sheet)、糸状(line or fibers)、ペレット状(pellet)の5つに大別される(GESAMP, 2019)。

過去の調査によれば、目視で拾い出したMPs様粒子が実際にプラスチックであった確率は約20-70%であった(Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Eriksen *et al.*, 2013; Lenz *et al.*, 2015)。また合成繊維(ポリエステルなど)と天然繊維(色がついたコットン繊維など)の区別も顕微鏡だけ

では難しい(Lenz *et al.*, 2015)。そのため目視(肉眼・顕微鏡)だけでMPsを識別するのは過小評価または過大評価の原因となる。

5.1. 目視による識別

5.1.1. 肉眼

MPsのサイズが数百 μ m程度以上であれば、トレイやペトリディッシュ等によせ、肉眼により直接MPsをピンセットで摘出できる。とくに色がカラフルなMPsやレジンペレットなど形が特徴的なMPsはわかりやすく肉眼でも容易に識別できる。透明なガラス容器を使い、下に白色や黒色の紙を敷くことで見落としが少なくなる。粒子サイズが2mm以上の大きなMPs粒子であれば、肉眼でも分析者による検出誤差は小さく(Isobe *et al.*, 2019)、誰でも簡単なトレーニングを受けることで選別作業を行うことができる。しかしサイズが2mmよりも小さい粒子になると肉眼での識別は難しくなりエラーが増す(Isobe *et al.*, 2019)。また小さなMPsの色が非プラスチック粒子と似ていると、肉眼ではMPsを見落とす可能性が高まる(Mai *et al.*, 2018)。そのため小さなMPsの識別には顕微鏡を用いる。

5.1.2. 実体顕微鏡

実体顕微鏡は、サイズが数百 μ m程度のMPsの識別に使われる。顕微鏡で拡大することで、MPsとその他の粒子を見分けるために必須となる対象物の表面の質感や構造の情報を読み取ることができる。また、解剖用の針などを使った粒子の硬さの情報はMPsを識別するためのヒントにもなる(Masura *et al.*, 2015)。ニューストーンネットで採取される比較的大きなMPs(>300 μ m)は顕微鏡によって識別が可能である。しかし100 μ m以下の小さなMPsでは、色や形が他の粒子と似ていると顕微鏡下でも識別が困難である。さらに夾雑物が多いと識別はなお難しい。

5.1.3. 蛍光顕微鏡

蛍光染色と蛍光実体顕微鏡を組み合わせたMPsの識別法もある。蛍光染色の1つであるナイルレッド(Nile Red, NR)は中性脂肪の染色に使われるが、PEやPPなどの疎水性の高いMPsも染色することができる(Erni-Cassola *et al.*, 2017; Maes *et al.*, 2017)。前処理をした環境試料をNR染色し、蛍光実体顕微鏡で青色励起させ

オレンジの吸収フィルターを通して観察すると、MPsが赤や黄緑色に光るためMPsの識別が可能となる (Fig. 6)。プラスチックの劣化はNR染色に影響しないとされるが (Shim *et al.*, 2016), ポリカーボネート, ポリウレタン, PET, PVCといったプラスチックはNRに染まりにくい。また藻類や木片, 貝殻などはNRに染まらないが, 染まってしまう有機物もあるので (Maes *et al.*, 2017), 試料中の脂質や有機物は事前に十分に除去しておく必要がある。NR染色ではポリマーの材質は分からない, 必要に応じて後述する化学判別を別途行う。

プラスチックの自家蛍光からMPsを識別する方法もある (Brandon *et al.*, 2020)。数 μm -数十 μm の微小なMPsでは, 高倍率 (500-1,000倍) の蛍光顕微鏡をもちいて粒子の自家蛍光を観察できる (倍率が低いと自家蛍光も弱くなるため認識は難しい)。しかし一部の生物や無機粒子も自家蛍光を持つため, 非プラスチック粒子の特徴を熟知するとともに, 有機物・無機物の除去を事前に十分に行う必要がある (Brandon *et al.*, 2020)。

5.1.4. 電子顕微鏡

走査電子顕微鏡 (SEM) では, MPs様粒子の表面構造をクリアにそして高い解像度で観察することができる。粒子の表面構造を高倍率で観察することで, 他の有機物粒子との区別ができる。さらにエネルギー分散型X線分析装置 (EDS) を用いれば, 対象とする粒子の元素組成を知ることができ, プラスチックは炭素が多いため, 無機物との区別が容易となる。しかしSEM-EDSは高価で

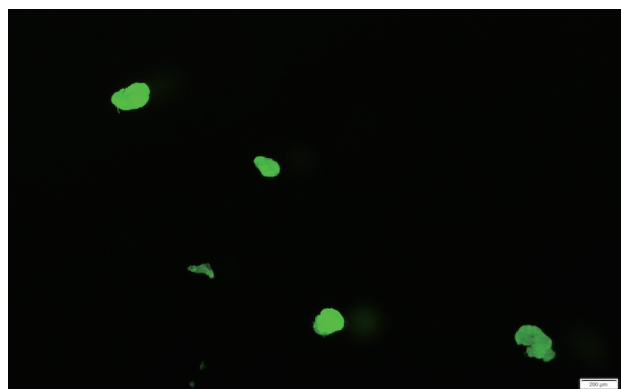


Fig. 6. Microplastics are fluorescently dyed using Nile Red and the scale bar indicates 200 μm .

あり, またサンプル試料の準備や観察に時間がかかるため, 大量の試料を処理するには向いていない (Mai *et al.*, 2018)。

5.2. 化学判別

化学判別とは, プラスチックポリマーの材質を調べ, MPsの種類を同定することである。プラスチックかどうかの識別だけでなく, PEやPPといった特定のポリマー材質の同定が可能となる。化学判別はおもに分光分析と熱分解分析に大別され, 分光分析には, フーリエ変換赤外分光 (FTIR), ラマン分光, ハイパースペクトルイメージングがあり, 熱分解分析には熱分解ガスクロマトグラフ-質量分析などがある (Table 2)。

5.2.1. フーリエ変換赤外分光法 (FTIR)

フーリエ変換赤外分光法 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) は, MPsの同定に最も広く使われている方法の1つである (Fig. 7)。FTIRは試料に赤外光 (おもに波長2.5-25 μm の中赤外光) を照射し, 透過または反射した吸収量を測定する。赤外光は分子結合の振動や回転運動のエネルギーとして吸収されるため, 試料を透過または反射する際の光の吸収を観察すると分子の構造や官能基の情報を知ることができる。

MPs様粒子の材質を特定する上でFTIRを用いればMPs粒子の誤検出を防ぎ, 一見プラスチックには見えない粒子を見逃してしまうリスクを減らせる。MPs様粒子のスペクトルを得たら, ライブラリ (データベース) を参照して, その粒子の材質を同定する。たとえば測定したMPsのスペクトルが, ライブラリにあるPEのスペクトルとのヒット率 (一致率) が98ポイントなどと表示され (表記の仕方はメーカーによって異なる), そのヒット率を参考にしながら材質を判定する。実際の現場から採取されるMPs試料は, 酸化などの劣化によりスペクトル形状が変化しているためライブラリ中のスペクトルとの一致率が低くなる傾向がある。低いヒット率では別の物質と誤同定する確率も高くなることから, ヒット率70%以上で材質を判断している研究者が多い (Thompson *et al.*, 2004; Obbard *et al.*, 2014; Primpke *et al.*, 2017)。Galgani *et al.* (2013) は, ヒット率70%以上でポリマー材質を判定し, ヒット率60-70%では既知ポリマーに特徴的なピークがはっきり見られない場合は判定結果を棄却,

Table 2. Summary of different methods for the detection of polymer type — FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy; ATR: attenuation total refraction; Pyr-GC-MS: pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry; and TED-GC-MS: thermal extraction-desorption GC-MS.

Characteristics	Spectroscopy				Pyrolysis analysis		
	FTIR	micro FTIR		Raman microscopy	Hyperspectral imaging	Pyr-GC-MS	TED-GC-MS
	ATR	trans/refraction	ATR				
Number of measurable particles per analysis	1	10^3 - 10^5	1	10^3 - 10^5	Undefined	1	Undefined
Time scale of analysis (including preparation for measurement)	min	hour-day	min	hour-day	min	hour	hour
Detection level of measurable size	$>100 \mu\text{m}$	10 - $100 \mu\text{m}$	a few μm - $100 \mu\text{m}$	1 - $20 \mu\text{m}$	$>50 \mu\text{m}$	—	—
Particle number, size, shape/morphology	×	○	×	○	○	×	×

ヒット率 60% 以下では判定結果を常に棄却することを推奨している。

MPs の FTIR 分析には、主に試料サイズの違いによって通常の FTIR か顕微 FTIR を使い分ける。およその目安だが、サイズが $100 \mu\text{m}$ 程度より大きい MPs の分析には通常の FTIR を (Fig. 7a), それ以下では顕微 FTIR を利用する (Fig. 7b)。

通常の FTIR 分析には透過法、反射法、全反射法 (ATR 法) などがあるが、 $>100 \mu\text{m}$ 程度の MPs を分析する際は ATR 法が一般的に使われる (ATR-FTIR, Fig. 7a)。ATR 法では赤外光が内部反射 (全反射) するプリズムの反射面に試料をのせ、試料をプリズムに押し当て密着させて分析するため、分厚い試料やいびつな形の試料の分析も得意である。プリズムには主にダイヤモンドが使用される。

透過法では赤外光を試料に透過させる必要があるため、試料の厚さを $10 \mu\text{m}$ 以下程度に前処理する必要がある。MPs を切片にすることは難しく、そのため (顕微ではない) 通常の FTIR の透過法は MPs 試料の分析に向かない。反射法も検出部が上を向いているため、一般的には MPs の分析には使われない。

ATR-FTIR は、肉眼で認識でき、ピンセットでつまめるサイズの MPs の分析に使われ、そのサイズ下限はおよそ $100 \mu\text{m}$ 程度である。しかし試料を検出部 (プリズム) に載せなければならない (Fig. 7c)。 $100 \mu\text{m}$ 程度の小さ

な粒子をピンセットでつまみ検出部まで持って行くのは大変な作業であり、熟練した技が必要になる。そのため ATR-FTIR で分析に適した MPs のサイズは (ピンセットでつまみやすい) およそ $500 \mu\text{m}$ 以上である (Löder and Gerdt, 2015)。ATR では MPs 試料を押さえつけて分析するため、その圧力によって劣化した MPs が砕けることはよくある。そのため MPs の形状やサイズの測定は ATR 分析の前に行う。

微小な MPs ($100 \mu\text{m}$ 程度以下) の検出・分析には顕微 FTIR が必要になる (Fig. 7b)。顕微 FTIR では粒子の可視観察並びに赤外測定ができる。環境中の微小な MPs を分析するには、試料をフィルターにのせた状態で観察するが、フィルター上には MPs に加え、多くの夾雑物が混在するため、どこにあるかわからない MPs を狙い撃ちで分析することは難しい。そのためフィルターを高速でスキャンするマッピング測定やアレイイメージング測定が必要になる。顕微 FTIR においても反射法、透過法、ATR 法があり、用いるフィルターの材質が PTFE, シリコン, アルミナなどでは透過法を、ステンレスメッシュ, 金コーティングなど金属フィルターでは反射法が用いられる。透過法または反射法で分析できる試料サイズの下限はおおよそ 10 - $20 \mu\text{m}$ である。

一方、顕微 FTIR の ATR 法では、ATR のプリズムに屈折率が 4.0 と十分に高いゲルマニウムを使うことで空間分解能を理論上 4 倍にできるため、 $10 \mu\text{m}$ よりも小さ

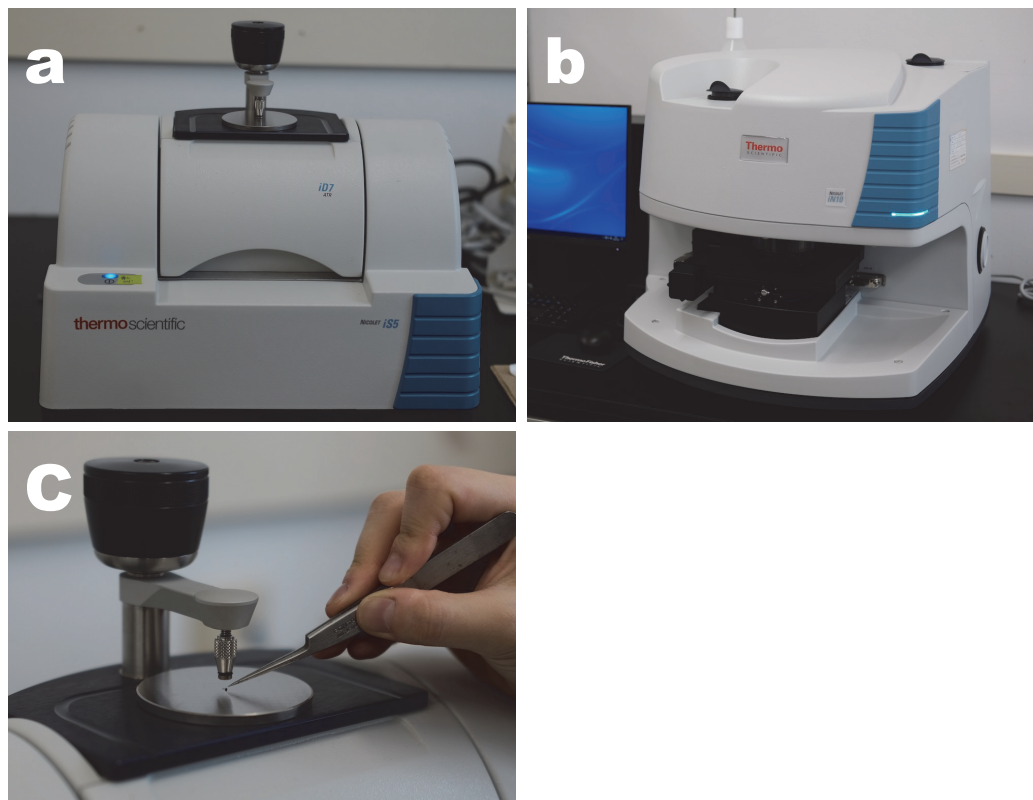


Fig. 7. Fourier-transform infrared (FTIR) analyzers—in general, (a) attenuated total reflectance (ATR)-FTIR is used for analyzing microplastic particles larger than $100\ \mu\text{m}$, and (b) micro-FTIR is used for microplastics smaller than $100\ \mu\text{m}$. (c) ATR unit of ATR-FTIR. The FTIR analyzers in the photographs are (a) Nicolet iS5 and (b) Nicolet iN10NX, Thermo Fisher Scientific.

なMPs粒子を検出できる。またアパーチャを絞ることで、数 μm の微小なMPs粒子も検出が可能となる。ただしATRは表面接触式の分析であるため、劣化したMPsを潰してしまう場合や、静電気によってATR検出部先端に試料がくっついてしまうことがある。またATR検出部がゲルマニウムの場合、砂粒子などの堅く尖った試料によって検出部がダメージを受けることや、フィルターを破損する恐れがある。

顕微FTIRの検出部1つでフィルター上のMPsをマッピングするには、空間解像度にもよるが、時間がかかるため限られたエリアしか分析できない。だが顕微FTIRに1次元配置(リニアアレイ)や2次元配置(フォーカルプレーンアレイ, FPA)の検出素子を導入すれば、スキャン時間も速くなり、空間解像度を妥協することもなくな

る。なお、Thermo Fisher Scientific社の顕微FTIR(Nicolet iN10MX, Fig. 7b)では、試料を載せたステージが干渉計の可動鏡の戻りに同期して10倍速で動くため、リニアアレイやFPAでなくとも、シングル素子で高速マッピングを可能にしている。

5.2.2. ラマン分光法

ラマン分光法はFTIRと同様にMPsの化学組成の同定に利用される(Van Cauwenberghe *et al.*, 2013; Lusher *et al.*, 2014)。物質にレーザー光を照射して発生した散乱光のうち、分子振動によって散乱するラマン散乱光の性質を調べると、物質の分子構造や結晶構造を知ることができる(Löder and Gerdt, 2015)。

MPsの研究においてラマン分光分析を使う一番の利点は、励起光源に可視光などのレーザー光を用いるため、

かなり小さな MPs まで同定可能なことである。顕微鏡と組み合わせたラマン顕微鏡では 10-20 μm 以下から 1 μm 程度の小さな MPs まで検出できる (Cole *et al.*, 2013)。また顕微 FTIR と同様、MPs 試料がのったフィルターをスキャンできるため、フィルター上の高解像度マッピング (またはイメージング) が可能となる。ラマン分光分析は試料に非接触のため、MPs を無傷のまま同定できるメリットがある他、FTIR と違い、水に濡れた試料でも分析が可能である (Takahashi *et al.*, 2020)。FTIR と同様、ラマン分光法でもライブラリ (データベース) を参照して MPs 様粒子の材質を同定する。その際もヒット率 70% 以上で材質を判定することが推奨される (Galgani *et al.*, 2013)。

ラマン分光法のデメリットは、MPs に含まれる添加剤や色素、付着する化学物質に敏感で、それがポリマーの材質同定を邪魔することもある (Qiu *et al.*, 2016; Shim *et al.*, 2017)。また自家蛍光を持つ夾雑物があるとうまく分析できない。そのため試料の前処理はとても重要である。ラマン散乱光は非常に弱く、高解像度で化学イメージングするには迅速性に欠けるため、分子振動を強制的に起こすことができるコヒーレント反ストークスラマン散乱 (CARS) を応用した MPs 検出技術の開発も進められている (Cole *et al.*, 2014)。

5.2.3. ハイパースペクトルイメージング

ハイパースペクトルイメージングは、カメラ撮影による 2 次元の画像に加えて、数百バンドの非常に細かい波長を同時に取得できる手法で、物質の材質や特性の判別に使われる。一般的なデジタルカメラは RGB カメラなので、1 ピクセルには単一の色と光強度が表現される。ところがハイパースペクトルカメラ (HSC) では、1 ピクセルに紫外光から赤外光までの分光された非常に細かい波長 (たとえば 5 nm 毎の波長) の情報が埋め込まれている。厳密には、2 次元の平面イメージが波長毎に層をなすように重なりあって、3 次元のデータキューブをつくりだす。

プラスチックの判別には、近赤外 (NIR, $\sim 1.7 \mu\text{m}$) または短波長赤外 (SWIR, $\sim 2.5 \mu\text{m}$) の波長帯をもつ HSC が用いられる。光源には近赤外域を含むハロゲンランプを用いて試料を照射し、プラスチックを HSC で撮影すると、材質毎に異なる反射スペクトルパターンが得られる (Fig. 8)。様々なプラスチック材質のハイパースペクト

ルパターンをデータベース化することで、HSC で撮影した未知プラスチックの材質を同定することができる (Zhu *et al.*, 2020)。

HSC によるプラスチック判別は比較的新しい技術であり、リサイクル業界ではプラスチックフレークの材質判別に HSC を導入するリサイクル工場もある。近年では HSC による MPs 検出の技術開発が進められている (Balsi *et al.*, 2018; Serranti *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020)。Zhu *et al.* (2020) は、HSC を用いてはじめて 100 μm サイズの MPs を検出・同定した。

HSC を利用する最大のメリットはその分析速度の速さにある (Table 2)。カメラで撮影 (ラインスキャン) するだけで、対象とする MPs の材質同定を可能にする。また HSC は波長と同時に画像も取得するため、MPs の材質に加えて、個数、形状、サイズといったモニタリングに必須の情報を得ることができる。分析できる MPs のサイズ下限はピクセルの大きさに依存する。仮に 1 ピクセルの空間解像度が 25 μm なら、理論上は 25 μm が分析できる下限サイズとなるが、MPs 粒子がびたりと 1 つのピクセルに当てはまることは稀である。そのためピクセル解像度が 25 μm なら、実際には 2-3 ピクセルに相当する 50-75 μm が MPs の検出下限サイズと思われる。

5.2.4. 熱分解分析

熱分解ガスクロマトグラフ質量分析 (Pyr-GC-MS) は、試料の熱分解生成物 (化合物) を分析することでポリマーの構造情報を得る方法である (Fries *et al.*, 2013; Nuelle *et al.*, 2014; Dris *et al.*, 2015; Dümichen *et al.*, 2015)。熱分解装置に MPs を 1 粒子を導入し、熱分解により発生したガス (熱分解産物) を GC-MS で分離検出する。得られた熱分解生成物のマススペクトルから化合物を同定し、試料中の熱分解産物の種類を把握する。熱分解生成物 (化合物) の種類は、ポリマー材質ごとに特徴があるため、既知のプラスチック試料の熱分解生成物のパターンと比較することで (同温度条件が好ましい)、未知試料がどのようなポリマーを含んでいたのか材質同定が可能になる。

この方法では材質の正確な同定だけでなくプラスチックに使われる添加剤 (有害な物質も含む) も同時に分析ができる (Fries *et al.*, 2013)。また MPs の材質とともにマス (質量) も測定が可能である。しかし、この方法では

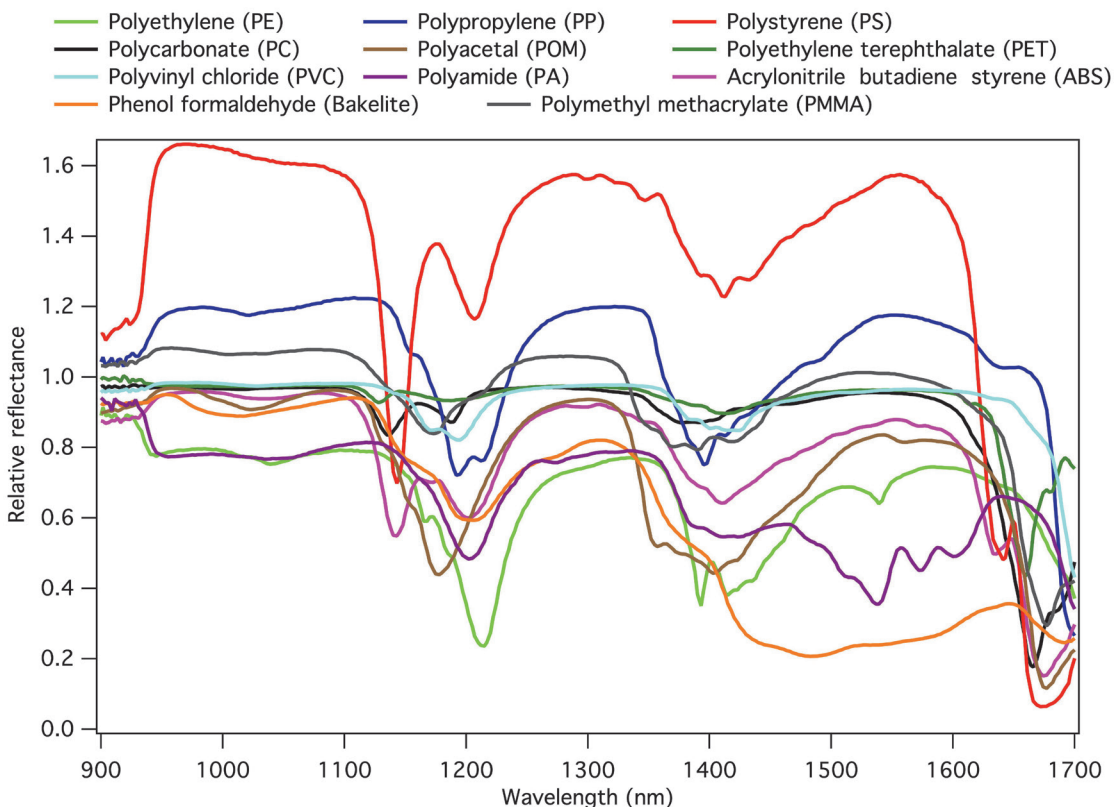


Fig. 8. Spectra of various common plastic polymers obtained by hyperspectral imaging with the wavelength range of 900-1,700 nm (Zhu *et al.* 2020) (CC BY 4.0).

基本的に1度に1粒子しか分析できないので大量の試料分析には向かない (Fries *et al.*, 2013)。1回に測定できるMPs試料はおよそ0.5 mgと少量である (Dümichen *et al.*, 2017)。またピンセットを用いてMPsを熱分解装置に導入するので、ピンセットでつまめる程度のサイズが、分析できるMPsのサイズ下限となる。そのサイズ下限は100 μm 程度とも言われるが (Dekiff *et al.*, 2014), 500 μm 以下のMPsをピンセットでつまむのはかなり大変である。またマトリックスが多い試料を分析した場合、次のサンプルに影響がでないように気を付けなければならない。

そこで、より大量で組成が複雑な環境試料を分析するには、熱抽出脱着-ガスクロマトグラフ-質量分析 (thermal extraction-desorption GC-MS, TED-GC-MS) が利用される (Dümichen *et al.*, 2015)。TED-GC-MSは、固相抽出付きの熱重量分析 (TGA-SPE) と加熱脱着-ガス

クロマトグラフ-質量分析 (TDS-GC-MS) を組み合わせた装置である。MPsを含む環境試料を熱重量分析の加熱炉で加熱し、生成物が抽出基質に吸着され、GC-MSへ熱脱着される。TED-GC-MSでは1度に100 mgの試料を分析可能で、試料を均一にする以外に前処理はいらぬ。分析は2-3時間程度で終わり、顕微FTIRによるマッピングに匹敵する速さである (Dümichen *et al.*, 2017)。

Py-GC-MSとTED-GC-MSも含めて、熱分解分析の欠点は、試料を破壊してしまうことである。そのため分析前にMPsのサイズや形、個数の情報を得る必要がある。

6. おわりに

いまやMPsは表層から深層まで全球の海洋から検出

され、MPs 汚染のモニタリングの重要性は国際的に増している。全球的な MPs の分布と時系列変化はまさにこれから明らかにされようとしている段階である (Shim *et al.*, 2018)。海表面に浮かぶ MPs の採取法・定量方法については標準化・調和化が進んでいる (Michida *et al.*, 2019)。一方で、水柱ならびに海底堆積物の MPs の採取・前処理・定量方法のいずれの工程においても、その手法は多岐にわたり複雑で、海表面の MPs に比べて標準化は進んでいない。たとえば、海水を濾過して MPs を採取する際に、ネットやフィルターの目合いサイズに統一性はなく、研究者によって異なるサイズ分画の MPs を採取している。堆積物中の MPs 分析においても堆積物のサンプリング深度に統一性はない。またミリメートルスケールの大きな MPs であれば比較的簡便で信頼できる方法は確率されつつあるが、サイズが小さくなるにつれ、試料の準備と同定に多くの時間がかかる。したがって今後は、手法のさらなる改良と統一性はもちろんのこと、MPs の同定時間と労力を軽減する手法の開発が望まれている。さらに MPs の材質同定に必須となるポリマー材質のライブラリーにおいては、劣化したポリマーの情報はいまだ乏しく、MPs 誤同定の原因になっている。そのためデータベースのさらなる充実が必要である。

近年では、MPs の個数に加えてサイズ、形状、ポリマーの種類(材質)の3点を把握することが、正確な起源と影響評価、分布モデル作成のための必須条件となっている (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Gago *et al.*, 2016; Erni-Cassola *et al.*, 2019; GESAMP, 2019)。したがってこれら4つの情報を効率よく測定できるほうが良い。画像解析によって MPs の個数、形、サイズの情報を得ながら同時に材質の化学イメージング(マッピング)ができる完全または半自動的な方法が今後の主流になっていくと考えられる。

さらに今後は MPs の検出だけでなく、環境中からサブミクロン(1 μm 以下)のナノプラスチック粒子(nanoplastics, NPs)を同定・定量できる手法の開発を進めていくことも重要である。NPs はその小ささ故に容易に循環器系に入り込むと考えられ生物へのリスクが高い (Mattsson *et al.*, 2017)。NPs が海洋中に存在することに疑いの余地はないが、現在のところ、環境中の NPs を効果的に定量する分析手法はない。

最後に、研究者だけのマンパワーで広大な海洋に漂う MPs を網羅的に採取・分析することは難しい。商船など定期的に海を往復する船やレジャーボートなどに MPs サンプラーを取り付けるなど、市民サイエンスによる貢献も一層期待されている (Griffin and Chiba, 2020)。

謝辞

執筆段階において FTIR の解説は服部光生氏、澤田寛己氏、岡田耕作氏 (Thermo Fisher Scientific) に助言を頂いた。ラマン分光分析の解説は高橋朋子氏 (JAMSTEC) に、熱分解分析の解説は中國正寿氏 (香川大学) に助言を頂いた。2名の査読者には原稿に対する大変貴重な意見を頂いた。この場を借りて御礼申し上げる。本総説は、環境省環境研究総合推進費 (SII-2)、文部科学省海洋資源利用促進技術開発プログラム (JPMXD0618067484)、JSPS 科研費 JP19H04262, JP19K12307, および日本財団 FSI 基金による海洋ごみ対策プロジェクトによる成果の一部である。

References

- Anderson, P. J., S. Warrack, V. Langen, J. K. Challis, M. L. Hanson, and M. D. Rennie (2017) : Microplastic contamination in lake Winnipeg, Canada. *Environ. Pollut.*, **225**, 223-231.
- Balsi, M., S. Esposito, and M. Moroni (2018) : Hyperspectral characterization of marine plastic litters. *2018 IEEE Int. Work. Metrol. Sea; Learn. to Meas. Sea Heal. Parameters*, 28-32.
- Brandon, J. A., W. Jones, and M. D. Ohman (2019) : Multidecadal increase in plastic particles in coastal ocean sediments. *Sci. Adv.*, **5**, eaax0587.
- Brandon, J. A., A. Freibott, and L. M. Sala (2020) : Patterns of suspended and salp-ingested microplastic debris in the North Pacific investigated with epifluorescence microscopy. *Limnol. Oceanogr. Lett.*, **5**, 46-53.
- Brunner, K., T. Kukulka, G. Proskurowski, and K. L. Law (2015) : Passive buoyant tracers in the ocean surface boundary layer: 2. Observations and simulations of microplastic marine debris. *J. Geophys. Res. Ocean.*, **120**, 7559-7573.
- Cadiou, J.-F., O. Gerigny, Š. Koren, C. Zeri, H. Kaberi, C. Alomar, C. Panti, M. C. Fossi, A. Adamopoulou, and N. Digka (2020) : Lessons learned from an intercalibration exercise on the quantification and characterisation of microplastic particles in sediment and water samples. *Mar. Pollut. Bull.*, **154**, 111097.
- Catarino, A. I., R. Thompson, W. Sanderson, and T. B. Henry (2017) : Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environ. Toxicol. Chem.*, **36**, 947-951.

- Chubarenko, I., A. Bagaev, M. Zobkov, and E. Esiukova (2016) : On some physical and dynamical properties of microplastic particles in marine environment. *Mar. Pollut. Bull.*, **108**, 105-112.
- Claessens, M., L. Van Cauwenberghe, M. B. Vandegehuchte, and C. R. Janssen (2013) : New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, **70**, 227-233.
- Cole, M., H. Webb, P. K. Lindeque, E. S. Fileman, C. Halsband, and T. S. Galloway (2014) : Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Sci. Rep.*, **4**, 4528.
- Cole, M., P. Lindeque, E. Fileman, C. Halsband, R. Goodhead, J. Moger, and T. S. Galloway (2013) : Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ. Sci. Technol.*, **47**, 6646-6655.
- Coppock, R. L., M. Cole, P. K. Lindeque, A. M. Queirós, and T. S. Galloway (2017) : A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. *Environ. Pollut.*, **230**, 829-837.
- Corcoran, P. L., M. C. Biesinger, and M. Grifi (2009) : Plastics and beaches: a degrading relationship. *Mar. Pollut. Bull.*, **58**, 80-84.
- Courtene-Jones, W., B. Quinn, F. Murphy, S. F. Gary, and B. E. Narayanaswamy (2017) : Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Anal. Methods*, **9**, 1437-1445.
- Crawford, C. B. and B. Quinn (2017) : *Microplastic Pollutants*. Elsevier, Kidlington, UK, 336 pp.
- Crichton, E. M., M. Noël, E. A. Gies, and P. S. Ross (2017) : A novel, density-independent and FTIR-compatible approach for the rapid extraction of microplastics from aquatic sediments. *Anal. Methods*, **9**, 1419-1428.
- Dai, Z., H. Zhang, Q. Zhou, Y. Tian, T. Chen, C. Tu, C. Fu, and Y. Luo (2018) : Occurrence of microplastics in the water column and sediment in an inland sea affected by intensive anthropogenic activities. *Environ. Pollut.*, **242**, 1557-1565.
- Dehaut, A., A.-L. Cassone, L. Frère, L. Hermabessiere, C. Himber, E. Rinnert, G. Rivière, C. Lambert, P. Soudant, and A. Huvet (2016) : Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environ. Pollut.*, **215**, 223-233.
- Dekiff, J. H., D. Remy, J. Klasmeier, and E. Fries (2014) : Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney. *Environ. Pollut.*, **186**, 248-256.
- Di Mauro, R., M. J. Kupchik, and M. C. Benfield (2017) : Abundant plankton-sized microplastic particles in shelf waters of the northern Gulf of Mexico. *Environ. Pollut.*, **230**, 798-809.
- Dillon, W. P. (1964) : Flotation technique for separating fecal pellets and small marine organisms from sand I. *Limnol. Oceanogr.*, **9**, 601-602.
- Doyle, M. J., W. Watson, N. M. Bowlin, and S. B. Sheavly (2011) : Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific ocean. *Mar. Environ. Res.*, **71**, 41-52.
- Dris, R., J. Gasperi, M. Saad, C. Mirande, and B. Tassin (2016) : Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment? *Mar. Pollut. Bull.*, **104**, 290-293.
- Dris, R., J. Gasperi, V. Rocher, M. Saad, N. Renault, and B. Tassin (2015) : Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. *Environ. Chem.*, **12**, 592-599.
- Dubaish, F., and G. Liebezeit (2013) : Suspended microplastics and black carbon particles in the Jade system, southern North Sea. *Water, Air, Soil Pollut.*, **224**, 1352.
- Dümichen, E., P. Eisentraut, C. G. Bannick, A.-K. Barthel, R. Senz, and U. Braun (2017) : Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method. *Chemosphere*, **174**, 572-584.
- Dümichen, E., A.-K. Barthel, U. Braun, C. G. Bannick, K. Brand, M. Jekel, and R. Senz (2015) : Analysis of polyethylene microplastics in environmental samples, using a thermal decomposition method. *Water Res.*, **85**, 451-457.
- Enders, K., A. Käppler, O. Biniasch, P. Feldens, N. Stollberg, X. Lange, D. Fischer, K.-J. Eichhorn, F. Pollehne, and S. Oberbeckmann (2019) : Tracing microplastics in aquatic environments based on sediment analogies. *Sci. Rep.*, **9**, 1-15.
- Enders, K., R. Lenz, C. A. Stedmon, and T. G. Nielsen (2015) : Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10 \mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Mar. Pollut. Bull.*, **100**, 70-81.
- Eriksen, M., S. Mason, S. Wilson, C. Box, A. Zellers, W. Edwards, H. Farley, and S. Amato (2013) : Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Mar. Pollut. Bull.*, **77**, 177-182.
- Erni-Cassola, G., M. I. Gibson, R. C. Thompson, and J. A. Christie-Oleza (2017) : Lost, but found with Nile Red: a novel method for detecting and quantifying small microplastics (1 mm to 20 μm) in environmental samples. *Environ. Sci. Technol.*, **51**, 13641-13648.
- Erni-Cassola, G., V. Zadjelovic, M. I. Gibson, and J. A. Christie-Oleza (2019) : Distribution of plastic polymer types in the marine environment: A meta-analysis. *J. Hazard. Mater.*, **369**, 691-698.
- Felsing, S., C. Kochleus, S. Buchinger, N. Brennholt, F. Stock, and G. Reifferscheid (2018) : A new approach in separating microplastics from environmental samples based on their electrostatic behavior. *Environ. Pollut.*, **234**, 20-28.
- Foekema, E. M., C. De Gruijter, M. T. Mergia, J. A. van Franeker, A. J. Murk, and A. A. Koelmans (2013) : Plastic in north sea fish. *Environ. Sci. Technol.*, **47**, 8818-8824.
- Fries, E., J. H. Dekiff, J. Willmeyer, M.-T. Nuelle, M. Ebert, and D. Remy (2013) : Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environ. Sci. Process. Impacts*, **15**, 1949-1956.
- Gago, J., F. Galgani, T. Maes, and R. C. Thompson (2016) : Microplastics in seawater: recommendations from the marine strategy framework directive implementation process. *Front. Mar. Sci.*, **3**, 219.
- Galgani, F., G. Hanke, S. Werner, L. Oosterbaan, P. Nilsson, D. Fleet, S. Kinsey, R. C. Thompson, J. Van Franeker, and T. Vlachogianni (2013) : *Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas*. Publications Office of the European Union, 124 pp.
- GESAMP (2019) : Guidelines for the Monitoring and Assessment of Plastic Litter in the Ocean. *Rep. Stud. GESAMP*, **99**, 130.
- Grbic, J., B. Nguyen, E. Guo, J. B. You, D. Sinton, and C. M. Rochman (2019) : Magnetic extraction of microplastics from environmental samples. *Environ. Sci. Technol. Lett.*, **6**, 68-72.
- Griffin, H., and S. Chiba (2020) : Sailing towards a plastic-free ocean -action on SDG14 to increase understanding of ocean debris, p. 128-132. In *A Better World vol. 6 : Goal 14 Conserve and sustainably use the Oceans*. Human Development Forum, UK.
- Hanvey, J. S., P. J. Lewis, J. L. Lavers, N. D. Crosbie, K. Pozo, and B. O. Clarke (2017) : A review of analytical techniques for quantifying mi-

- croplastics in sediments. *Anal. Methods*, **9**, 1369–1383.
- Hidalgo-Ruz, V., L. Gutow, R. C. Thompson, and M. Thiel (2012) : Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environ. Sci. Technol.*, **46**, 3060–3075.
- Hurley, R. R., A. L. Lusher, M. Olsen, and L. Nizzetto (2018) : Validation of a method for extracting microplastics from complex, organic-rich, environmental matrices. *Environ. Sci. Technol.*, **52**, 7409–7417.
- ICES (2015) : *OSPAR Request on Development of a Common Monitoring Protocol for Plastic Particles in Fish Stomachs and Selected Shellfish on the Basis of Existing Fish Disease Surveys*. ICES Special Request Advice, Northeast Atlantic and Arctic Ocean, 6 pp.
- Imhof, H. K., J. Schmid, R. Niessner, N. P. Ivleva, and C. Laforsch (2012) : A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. *Limnol. Oceanogr. Methods*, **10**, 524–537.
- Isobe, A., N. T. Buenaventura, S. Chastain, S. Chavanich, A. Cózar, M. De Lorenzo, P. Hagmann, H. Hinata, N. Kozlovskii, and A. L. Lusher (2019) : An interlaboratory comparison exercise for the determination of microplastics in standard sample bottles. *Mar. Pollut. Bull.*, **146**, 831–837.
- Isobe, A., K. Uchida, T. Tokai, and S. Iwasaki (2015) : East Asian seas: a hot spot of pelagic microplastics. *Mar. Pollut. Bull.*, **101**, 618–623.
- Ivleva, N. P., A. C. Wiesheu, and R. Niessner (2017) : Microplastic in aquatic ecosystems. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **56**, 1720–1739.
- Karlsson, T. M., A. Kärrman, A. Rotander, and M. Hassellöv (2020) : Comparison between manta trawl and in situ pump filtration methods, and guidance for visual identification of microplastics in surface waters. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **27**, 5559–5571.
- Karlsson, T. M., A. D. Vethaak, B. C. Almroth, F. Ariese, M. van Velzen, M. Hassellöv, and H. A. Leslie (2017) : Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: method development and microplastic accumulation. *Mar. Pollut. Bull.*, **122**, 403–408.
- Kühn, S., E. L. B. Rebolledo, and J. A. van Franeker (2015) : Deleterious effects of litter on marine life, p. 75–116. In *Marine anthropogenic litter*, edited by M. Bergmann, L. Gutow, and M. Klages, Springer, Cham.
- Kukulka, T., G. Proskurovski, S. Morét-Ferguson, D. W. Meyer, and K. L. Law (2012) : The effect of wind mixing on the vertical distribution of buoyant plastic debris. *Geophys. Res. Lett.*, **39**, L07601.
- Law, K. L., S. Morét-Ferguson, N. A. Maximenko, G. Proskurovski, E. E. Peacock, J. Hafner, and C. M. Reddy (2010) : Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. *Science*, **329**, 1185–1188.
- Lenz, R., K. Enders, C. A. Stedmon, D. M. A. Mackenzie, and T. G. Nielsen (2015) : A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. *Mar. Pollut. Bull.*, **100**, 82–91.
- Li, J., D. Yang, L. Li, K. Jabeen, and H. Shi (2015) : Microplastics in commercial bivalves from China. *Environ. Pollut.*, **207**, 190–195.
- Liebezeit, G., and F. Dubaish (2012) : Microplastics in beaches of the East Frisian islands Spiekeroog and Kachelotplate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **89**, 213–217.
- Löder, M. G. J., H. K. Imhof, M. Ladehoff, L. A. Löschel, C. Lorenz, S. Mintenig, S. Piehl, S. Primpke, I. Schrank, and C. Laforsch (2017) : Enzymatic purification of microplastics in environmental samples. *Environ. Sci. Technol.*, **51**, 14283–14292.
- Löder, M. G. J., and G. Gerdtts (2015) : Methodology used for the detection and identification of microplastics—A critical appraisal, p. 201–227. In *Marine anthropogenic litter*, edited by M. Bergmann, L. Gutow, and M. Klages, Springer, Cham.
- Lusher, A. L., A. Burke, I. O'Connor, and R. Officer (2014) : Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling. *Mar. Pollut. Bull.*, **88**, 325–333.
- Maes, T., R. Jessop, N. Wellner, K. Haupt, and A. G. Mayes (2017) : A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Sci. Rep.*, **7**, 44501.
- Mai, L., L.-J. Bao, L. Shi, C. S. Wong, and E. Y. Zeng (2018) : A review of methods for measuring microplastics in aquatic environments. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **25**, 11319–11332.
- Mani, T., S. Frehland, A. Kalberer, and P. Burkhardt-Holm (2019) : Using castor oil to separate microplastics from four different environmental matrices. *Anal. Methods*, **11**, 1788–1794.
- Masura, J., J. E. Baker, G. D. Foster, C. Arthur, and C. Herring (2015) : *Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for Quantifying Synthetic Particles in Waters and Sediments*. NOAA Tech. Memo. NOS-OR&R-48, 31 pp.
- Matsuguma, Y., H. Takada, H. Kumata, H. Kanke, S. Sakurai, T. Suzuki, M. Itoh, Y. Okazaki, R. Boonyatumanond, and M. P. Zakaria (2017) : Microplastics in sediment cores from Asia and Africa as indicators of temporal trends in plastic pollution. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **73**, 230–239.
- Mattsson, K., E. V. Johnson, A. Malmendal, S. Linse, L.-A. Hansson, and T. Cedervall (2017) : Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Sci. Rep.*, **7**, 11452.
- Michels, J., A. Stippkugel, M. Lenz, K. Wirtz, and A. Engel (2018) : Rapid aggregation of biofilm-covered microplastics with marine biogenic particles. *Proc. R. Soc. B*, **285**, 20181203.
- Michida, Y., S. Chavanich, A. C. Cabañas, P. Hagmann, H. Hinata, A. Isobe, P. Kershaw, N. Kozlovskii, D. Li, and A. L. Lusher (2019) : *Guidelines for Harmonizing Ocean Surface Microplastic Monitoring Methods*. Ministry of the Environment Japan, 71 pp.
- Möller, J. N., M. G. J. Löder, and C. Laforsch (2020) : Finding Microplastics in Soils: A Review of Analytical Methods. *Environ. Sci. Technol.*, **54**, 2078–2090.
- Munno, K., P. A. Helm, D. A. Jackson, C. Rochman, and A. Sims (2018) : Impacts of temperature and selected chemical digestion methods on microplastic particles. *Environ. Toxicol. Chem.*, **37**, 91–98.
- Nakajima, R., K. Tsuchiya, N. Nakatomi, T. Yoshida, Y. Tada, F. Konno, T. Toda, V. S. V. S. Kuwahara, K. Hamasaki, B. H. Ross Othman, T. C. T. C. Segaran, A. W. Mohd Effendy, B. H. R. Othman, T. C. T. C. Segaran, and W. A. M. Effendy (2013) : Enrichment of microbial abundance in the sea-surface microlayer over a coral reef: implications for biogeochemical cycles in reef ecosystems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **490**, 11–22.
- Nakajima, R., M. Tsuchiya, D. J. Lindsay, T. Kitahashi, K. Fujikura, and T. Fukushima (2019a) : A new small device made of glass for separating microplastics from marine and freshwater sediments. *PeerJ*, **7**, e7915.
- Nakajima, R., D. J. Lindsay, M. Tsuchiya, R. Matsui, T. Kitahashi, K. Fujikura, and T. Fukushima (2019b) : A small, stainless-steel sieve optimized for laboratory beaker-based extraction of microplastics from environmental samples. *MethodsX*, **6**, 1677–1682.

- Ng, K. L. and J. P. Obbard (2006) : Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. *Mar. Pollut. Bull.*, **52**, 761-767.
- Norén, F. and L. J. Naustvoll (2010) : Survey of microscopic anthropogenic particles in Skagerrak. *Rep. Comm. by KLIMA-Og Forurensningsdirektoratet*.
- Nuelle, M.-T., J. H. Dekiff, D. Remy, and E. Fries (2014) : A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environ. Pollut.*, **184**, 161-169.
- Obbard, R. W., S. Sadri, Y. Q. Wong, A. A. Khitun, I. Baker, and R. C. Thompson (2014) : Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. *Earth's Futur.*, **2**, 315-320.
- Peters, C. A. and S. P. Bratton (2016) : Urbanization is a major influence on microplastic ingestion by sunfish in the Brazos River Basin, Central Texas, USA. *Environ. Pollut.*, **210**, 380-387.
- Prata, J. C., J. P. da Costa, A. C. Duarte, and T. Rocha-Santos (2019) : Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: a critical review. *Trends Anal. Chem.*, **110**, 150-159.
- Primpke, S., C. Lorenz, R. Rascher-Friesenhausen, and G. Gerdtts (2017) : An automated approach for microplastics analysis using focal plane array (FPA) FTIR microscopy and image analysis. *Anal. Methods*, **9**, 1499-1511.
- Qiu, Q., Z. Tan, J. Wang, J. Peng, M. Li, and Z. Zhan (2016) : Extraction, enumeration and identification methods for monitoring microplastics in the environment. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **176**, 102-109.
- Quinn, B., F. Murphy, and C. Ewins (2017) : Validation of density separation for the rapid recovery of microplastics from sediment. *Anal. Methods*, **9**, 1491-1498.
- Reisser, J. W., B. Slat, K. D. Noble, K. Du Plessis, M. Epp, M. C. Proietti, J. de Sonneville, T. Becker, and C. Pattiaratchi (2015) : The vertical distribution of buoyant plastics at sea: an observational study in the North Atlantic Gyre. *Biogeosciences*, **12**, 1249-1256.
- Roch, S. and A. Brinker (2017) : Rapid and efficient method for the detection of microplastic in the gastrointestinal tract of fishes. *Environ. Sci. Technol.*, **51**, 4522-4530.
- Rocha-Santos, T. and A. C. Duarte (2015) : A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *Trends Anal. Chem.*, **65**, 47-53.
- Schönlau, C., T. M. Karlsson, A. Rotander, H. Nilsson, M. Engwall, B. van Bavel, and A. Kärrman (2020) : Microplastics in sea-surface waters surrounding Sweden sampled by manta trawl and in-situ pump. *Mar. Pollut. Bull.*, **153**, 111019.
- Serranti, S., R. Palmieri, G. Bonifazi, and A. Cózar (2018) : Characterization of microplastic litter from oceans by an innovative approach based on hyperspectral imaging. *Waste Manag.*, **76**, 117-125.
- Setälä, O., V. Fleming-Lehtinen, and M. Lehtiniemi (2014) : Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ. Pollut.*, **185**, 77-83.
- Setälä, O., K. Magnusson, M. Lehtiniemi, and F. Norén (2016) : Distribution and abundance of surface water microlitter in the Baltic Sea: a comparison of two sampling methods. *Mar. Pollut. Bull.*, **110**, 177-183.
- Shan, J., J. Zhao, Y. Zhang, L. Liu, F. Wu, and X. Wang (2019) : Simple and rapid detection of microplastics in seawater using hyperspectral imaging technology. *Anal. Chim. Acta*, **1050**, 161-168.
- Shim, W. J., S. H. Hong, and S. E. Eo (2017) : Identification methods in microplastic analysis: a review. *Anal. Methods*, **9**, 1384-1391.
- Shim, W. J., S. H. Hong, and S. Eo (2018) : Marine microplastics: abundance, distribution, and composition, p. 1-26. In *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*, edited by E. Y. Zeng. Elsevier.
- Shim, W. J., Y. K. Song, S. H. Hong, and M. Jang (2016) : Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Mar. Pollut. Bull.*, **113**, 469-476.
- Song, Y. K., S. H. Hong, M. Jang, J.-H. Kang, O. Y. Kwon, G. M. Han, and W. J. Shim (2014) : Large accumulation of micro-sized synthetic polymer particles in the sea surface microlayer. *Environ. Sci. Technol.*, **48**, 9014-9021.
- Song, Y. K., S. H. Hong, M. Jang, G. M. Han, M. Rani, J. Lee, and W. J. Shim (2015) : A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. *Mar. Pollut. Bull.*, **93**, 202-209.
- Tagg, A. S., J. P. Harrison, Y. Ju-Nam, M. Sapp, E. L. Bradley, C. J. Sinclair, and J. J. Ojeda (2017) : Fenton's reagent for the rapid and efficient isolation of microplastics from wastewater. *Chem. Commun.*, **53**, 372-375.
- Takahashi, T., Z. Liu, T. Thevar, N. Burns, S. Mahajan, D. Lindsay, J. Watson, and B. Thornton (2020) : Identification of microplastics in a large water volume by integrated holography and Raman spectroscopy. *Appl. Opt.*, **59**, 5073-5078.
- Thompson, R. C., Y. Olsen, R. P. Mitchell, A. Davis, S. J. Rowland, A. W. G. John, D. McGonigle, and A. E. Russell (2004) : Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, **304**, 838.
- Tsuchiya, M., H. Nomaki, T. Kitahashi, R. Nakajima, and K. Fujikura (2019) : Sediment sampling with a core sampler equipped with aluminum tubes and an onboard processing protocol to avoid plastic contamination. *MethodsX*, **6**, 2662-2668.
- Van, A., C. M. Rochman, E. M. Flores, K. L. Hill, E. Vargas, S. A. Vargas, and E. Hoh (2012) : Persistent organic pollutants in plastic marine debris found on beaches in San Diego, California. *Chemosphere*, **86**, 258-263.
- Van Cauwenberghe, L., A. Vanreusel, J. Mees, and C. R. Janssen (2013) : Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environ. Pollut.*, **182**, 495-499.
- Zhu, C., Y. Kanaya, R. Nakajima, M. Tsuchiya, H. Nomaki, T. Kitahashi, and K. Fujikura (2020) : Characterization of microplastics on filter substrates based on hyperspectral imaging: Laboratory assessments. *Environ. Pollut.*, **263**, 114296.
- Zobkov, M. B. (2018) : Microplastics in a marine environment: review of methods for sampling, processing, and analyzing microplastics in water, bottom sediments, and coastal deposits. *Oceanology*, **58**, 149-157.
- Zobkov, M. B. and E. E. Esiukova (2017) : Evaluation of the Munich Plastic Sediment Separator efficiency in extraction of microplastics from natural marine bottom sediments. *Limnol. Oceanogr. Methods*, **15**, 967-978.
- Zobkov, M. B., E. E. Esiukova, A. Y. Zyubin, and I. G. Samusev (2019) : Microplastic content variation in water column: The observations employing a novel sampling tool in stratified Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, **138**, 193-205.

Methods for sampling, processing, identification, and quantification of microplastics in the marine environment

Ryota Nakajima^{1*} and Rei Yamashita²

Abstract

Microplastic pollution in marine environments is an emerging global issue revealing the importance of microplastic monitoring. Although numerous papers have been published in recent years in relation to microplastics, the methods and techniques for identifying and quantifying them remain underdeveloped, and many researchers are working to develop optimal protocols. Some of the methods currently used include: (1) extraction from seawater, sediment, and organisms; (2) isolation and purification of microplastics from environmental matrices by removing non-plastic materials, both inorganic and organic; and (3) identification of microplastics using a combination of microscopy and chemical analyses. However, these methods are too diverse, often complicated, and they have not been standardized. In this review, we summarize the methods and techniques for sampling, processing, identifying and quantifying microplastics in marine environments and discuss the advantages and limitations of these techniques. We also comment on some future directions for analytical methods of microplastics.

Key words: microplastics, marine environment, analytical methods, identification, isolation

(Corresponding author's e-mail address: nakajimar@jamstec.go.jp)

(Received 15 May 2020; accepted 21 July 2020)

(doi: 10.5928/kaiyou.29.5_129)

(Copyright by the Oceanographic Society of Japan, 2020)

1 Research Institute for Global Change (RIGC), Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka, Kanagawa 237-0051, Japan

2 Atmosphere and Ocean Research Institute (AORI), The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8564, Japan

* Corresponding author: Ryota Nakajima
e-mail: nakajimar@jamstec.go.jp