

下水中に含まれるマイクロプラスチックの検出と挙動に関する
共同研究報告書

—下水中の繊維状マイクロプラスチックの分析マニュアル—

令和 4年 6月

国 立 大 学 法 人 京 都 大 学
国 立 研 究 開 発 法 人 土 木 研 究 所

Copyright © (2022) by P.W.R.I.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced by any means, nor transmitted, nor translated into a machine language without the written permission of the Chief Executive of P.W.R.I.

この報告書は、国立研究開発法人土木研究所理事長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部又は一部の転載、複製は、国立研究開発法人土木研究所理事長の文書による承認を得ずしてこれを行ってはならない。

下水中に含まれるマイクロプラスチックの検出と挙動に関する 共同研究報告書

ー下水中の繊維状マイクロプラスチックの分析マニュアルー

国立大学法人京都大学大学院 地球環境学堂

准教授 田中 周平

国立研究開発法人土木研究所 流域水環境研究グループ 水質チーム

上席研究員 山下 洋正

主任研究員 北村 友一

研究員 鈴木 裕識※

概要

本報告書は、国立大学法人京都大学と国立研究開発法人土木研究所との共同研究「下水中に含まれるマイクロプラスチックの検出と挙動に関する共同研究」の中で開発した下水試料中の繊維状マイクロプラスチックの測定法について共同研究報告書としてとりまとめたものである。下水道分野では、下水処理工程での繊維状マイクロプラスチックの挙動説明が求められているものの、検出方法が確立されていない状況であった。本資料中の下水試料中の繊維状マイクロプラスチックの検出法は特別な装置を用いない方法とし、試料中の繊維状マイクロプラスチックの夾雑物を含めた回収、夾雑物の分解処理、蛍光試薬（Nile Red）によるマイクロプラスチックの蛍光染色、蛍光顕微鏡による計測と集計の工程としてとりまとめた。

キーワード：下水道、繊維状マイクロプラスチック、蛍光染色、蛍光顕微鏡、計測

※研究員在職期間（平成29年6月～令和2年11月）

下水中に含まれるマイクロプラスチックの検出と挙動に関する共同研究報告書
ー下水中の繊維状マイクロプラスチックの分析マニュアルー

目 次

	頁
第 1 章 はじめに	1
第 2 章 測定方法と測定対象	2
2.1 測定方法	2
2.2 測定対象とする繊維状マイクロプラスチックの材質とサイズ	4
2.2.1 材質	4
2.2.2 長さ と 太さ	4
第 3 章 採水方法	6
3.1 繊維状マイクロプラスチックの回収方法の概要	6
3.2 採水量の目安	6
3.3 小容量採水の方法	7
3.4 大容量採水の方法	7
3.4.1 揚水ポンプを用いる採水	7
3.4.2 採水設備からの採水	9
3.5 試料の輸送と保存	9
第 4 章 前処理方法	10
4.1 前処理方法の概要	10
4.2 コンタミネーション防止のための留意事項	10
4.2.1 作業環境	10
4.2.2 器具の洗浄方法	11
4.3 試料の回収とろ過	11
4.3.1 流入下水	11
4.3.2 処理水	12
4.4 夾雑物の分解方法	14
4.4.1 分解方法の概要	14
4.4.2 操作手順	14
4.5 分解残渣の酸洗浄	16
4.5.1 操作手順	16
4.6. 比重分離	17

4.6.1	比重分離の概要	17
4.6.2	比重分離試薬	17
4.6.3	ヨウ化ナトリウム法による比重分離	18
4.6.4	操作手順	18
第 5 章	蛍光染色方法	19
5.1	Nile Red 染色法の概要	19
5.2	染色方法	19
5.2.1	操作手順	19
5.3	染色後の顕微鏡観察準備	20
5.3.1	スライドガラス作成の操作手順	20
第 6 章	蛍光画像撮影方法	22
6.1	概要	22
6.2	実体顕微鏡用蛍光ユニット	22
6.3	連続撮影の方法	23
6.3.1	励起強度の調整	24
6.3.2	連続撮影の操作	25
6.4	試料の保存方法（蛍光の退色についての説明）	25
第 7 章	計測と集計方法	26
7.1	計測方法の概要	26
7.2	画像連結処理とコントラスト調整	28
7.3	繊維状マイクロプラスチックの計測方法	32
7.4	繊維状マイクロプラスチックの集計方法	40
第 8 章	補足事項	45
8.1	概要	45
8.2	添加回収試験実施例	45
8.3	前処理操作がプラスチックの赤外吸収スペクトルに及ぼす影響	46
8.4	繊維状マイクロプラスチックの簡易計測法	48
8.5	繊維状マイクロプラスチック分析使用器具等の一覧	52
謝辞		55

1. はじめに

2015 年の G7 エルマウ・サミット首脳宣言附属書¹に「海洋ごみ問題に対処するための G7 行動計画」が示され、その中の「陸域を発生源とする海洋ごみに対処するための優先行動」において「海洋環境に流出するマイクロプラスチックを含む廃棄物について、下水及び雨水を経由するものを削減し、及び予防するための持続可能かつ費用対効果の高い解決策の研究」が明記された。

2016 年に富山で開催された G7 環境大臣会合において、「海洋ごみ問題に対処するための G7 行動計画」に関して、今後の効率的な実施の重要性について再認識された²。

2019 年に大阪で開催された 20 カ国・地域首脳会議（G20 大阪サミット）でもマイクロプラスチック問題は主要議題の一つに挙げられ、海洋プラスチックごみによる新たな汚染を 2050 年までにゼロにすることを目指す「大阪ブルー・オーシャン・ビジョン」³が掲げられた。

通常の水中のマイクロプラスチック測定法は、粒径 5 mm 程度までの主に粒子状のプラスチックをプランクトンネットなどにより捕捉し、分解や比重分離によって夾雑物を除去し、ピンセットで粒子をピックアップし、FT-IR などで材質を同定するもので、漂流マイクロプラスチックのモニタリング手法調和ガイドライン⁴や、河川マイクロプラスチック調査ガイドライン⁵が環境省によって取りまとめられている。しかしながら、ピンセットでピックアップできない小さな繊維状プラスチックのカウントや同定が難しいのが現状である。

国土交通省が所管する下水道分野において、着目すべきマイクロプラスチックの一つに洗濯時に衣服などから発生する繊維状マイクロプラスチックがある。その下水処理過程での挙動解明が必要とされている。しかしながら、下水試料中の繊維状マイクロプラスチックは、検出方法が確立されておらず、繊維状マイクロプラスチックの下水処理場への流入、放流実態、および、下水処理過程での挙動解明が進んでいないのが現状である。

本資料は、下水処理場における繊維状マイクロプラスチックの挙動解明のために必要不可欠となる下水試料中の繊維状マイクロプラスチックの分析法について、とりまとめたものである。なお、本資料は、本研究グループの作業手順をそのまま記述したものであるため、詳細な作業については実験環境等に合わせて適宜変更できるものとする。

¹ 外務省 G7 エルマウ・サミット首脳宣言 平成 27 年 6 月、https://www.mofa.go.jp/mofaj/ecm/ec/page4_001244.html

² 環境省 G7 富山環境大臣会合の結果について 平成 28 年 5 月、<https://www.env.go.jp/press/102546.html>

³ 外務省 G20 大阪首脳宣言 令和元年 6 月、https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/g20/osaka19/jp/documents/final_g20_osaka_leaders_declaration.html

⁴ Ministry of the Environment, Japan : Guidelines for Harmonizing Ocean Surface Microplastic Monitoring Methods Version 1.1 (June 2020). <http://www.env.go.jp/press/files/jp/114043.pdf>

⁵ 環境省水・大気環境局水環境課 河川マイクロプラスチック調査ガイドライン 令和 3 年 6 月、http://www.env.go.jp/water/marine_litter/mat21_031.pdf

2. 測定方法と測定対象

繊維状マイクロプラスチックは、洗濯などによって化学繊維から断片化して発生する繊維状のプラスチックのうち、長さ 5 mm 程度までのものを指す。繊維状マイクロプラスチックは短軸が細く、FT-IR による材質の同定が困難であるため、本試験方法では蛍光試薬 (Nile Red) によってマイクロプラスチックを蛍光染色し、蛍光実体顕微鏡で観察、計測する。

2.1 測定方法

本試験方法における繊維状マイクロプラスチックの測定フローを図-2.1 に示す。繊維状マイクロプラスチックは、試料を採水し、懸濁物をろ過し、フェントン反応によって夾雑物を分解し、必要に応じて比重分離による夾雑物除去を行い、蛍光試薬 (Nile Red) で蛍光染色する。そして、蛍光観察装置を取り付けた実体顕微鏡で撮影し、ソフトウェアを用いて繊維の長さと同数を計測する。

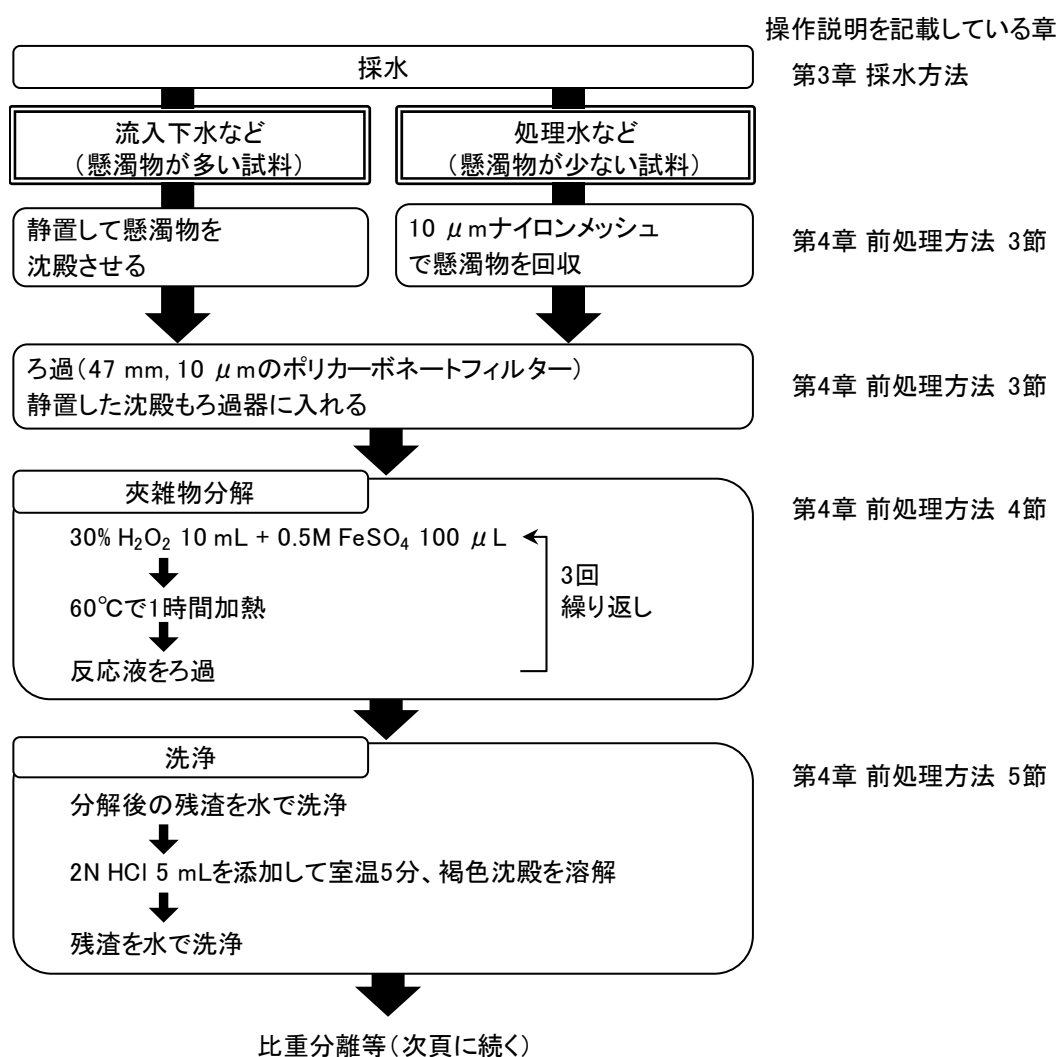


図-2.1 本試験操作のフロー図

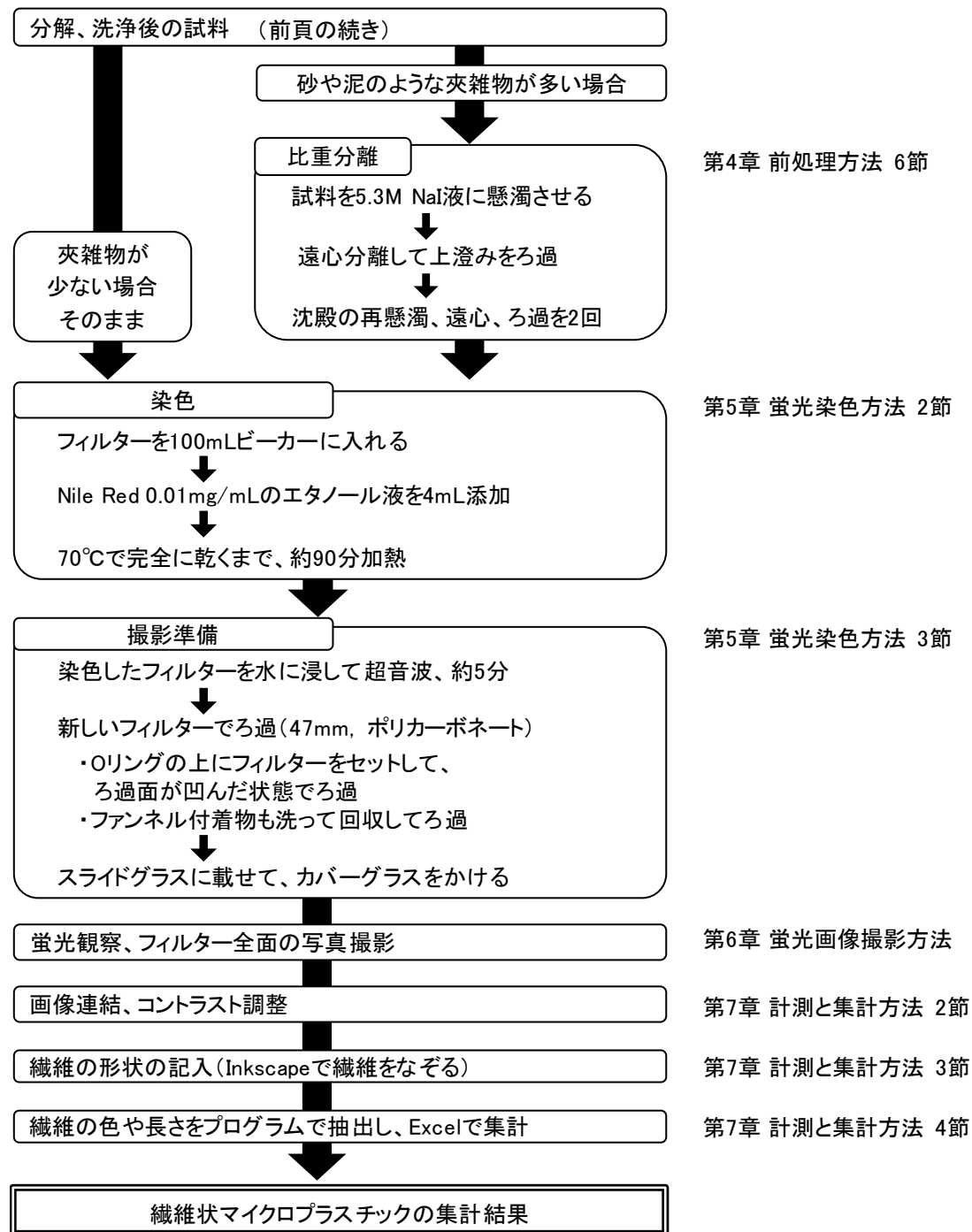


図-2.1 本試験操作のフロー図（続き）

2.2 測定対象とする繊維状マイクロプラスチックの材質とサイズ

2.2.1 材質

蛍光染色（蛍光試薬名：Nile Red）で検出可能なプラスチックの種類を表-2.1に示す⁶。

表-2.1 蛍光染色（Nile Red）で検出可能なプラスチックの種類⁶

材質	蛍光顕微鏡(B 励起)で観察される色
ポリエチレン(PE)	緑
ポリプロピレン(PP)	緑
ポリスチレン(PS)	黄
ポリエチレンテレフタレート(PET)	赤
ポリエステル(PET 繊維)	赤
ナイロン	赤

Nile Red は生理学分野で脂質などの染色に用いられている蛍光染色試薬であり⁷、分子の疎水性の部分に選択的に結合することからマイクロプラスチックの染色にも使用されている。Nile Red は結合する分子の疎水性の度合いによって赤、黄、緑色の異なる蛍光を発する（solvatochromism）特性があり、プラスチックの素材によって観察される蛍光色が変わる⁶。本法の測定対象は表-2.1 の材質のプラスチックであり、観察される蛍光色の違いからプラスチックの材質を推定する。

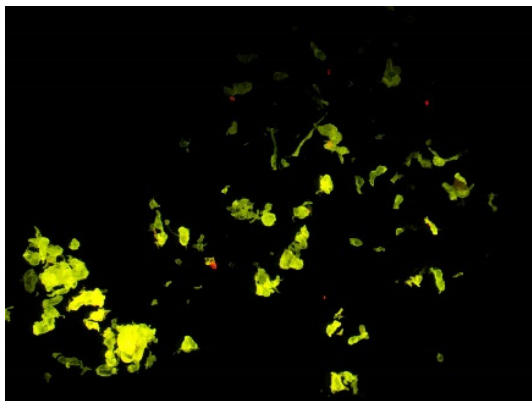
主要なプラスチック素材（市販品）を Nile Red で蛍光染色したときの観察像を図-2.2に示す。

2.2.2 長さ と 太さ

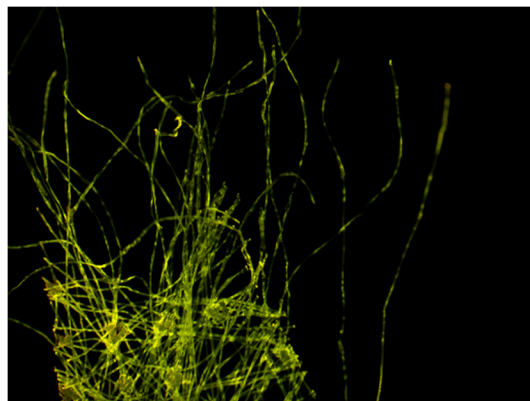
本試験方法では、総合倍率 x10～x40 程度の実体顕微鏡で観察可能な繊維を測定することから、繊維状マイクロプラスチックの太さは 5 μm 程度以上、長さは 100 μm 程度～5 mm 程度となる。なお、蛍光観察では繊維が発光して実際より太く観察されるため、太さ 5 μm に満たない繊維も測定される可能性がある。長さについては、蛍光観察で繊維状であると判断できる長さの目安として、100 μm 程度以上の繊維を測定する。長さの上限は目安であり、試料中に 5 mm を超える長さの繊維が存在する場合に測定を制限するものではない。

⁶ Thomas Maes, Rebecca Jessop, Nikolaus Wellner, Karsten Haupt, Andrew G. Mayes ; A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. Sci. Rep. 7, 44501; doi: 10.1038/srep44501 (2017).

⁷ 樋口 ゆり子：細胞膜、細胞小器官の蛍光標識試薬, Drug Delivery System, 2017, 32 巻, 3 号, pp. 219-222.



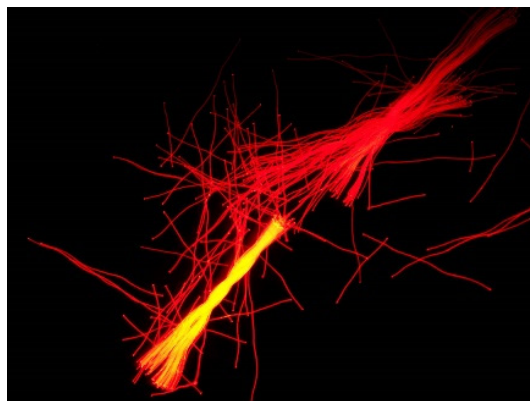
ポリエチレン(PE)



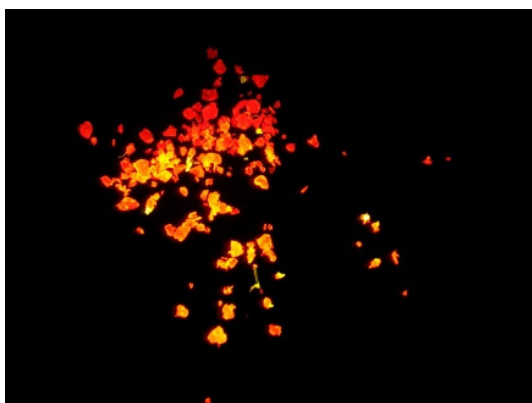
ポリプロピレン(PP)



ポリスチレン(PS)



ナイロン



ポリエチレンテレフタレート(PET)



ポリエステル

図-2.2 Nile Red で染色した市販のプラスチック製品の
蛍光顕微鏡 (B 励起) 観察像

3. 採水方法

3.1 繊維状マイクロプラスチックの回収方法の概要

下水試料中の繊維状マイクロプラスチックは、下水試料を孔径 10 μm のナイロン製メッシュフィルター（以下、ナイロンメッシュと表記）に夾雑物とともに捕捉し、夾雑物の分解操作を行い回収する。

流入下水は孔径 10 μm のポリカーボネートフィルターに直接捕捉されたものを回収してもよい。

器 具

ナイロン製メッシュフィルター（孔径 10 μm ）^{注1}

ステンレス製ザル^{注2}

ポリカーボネートフィルター（孔径 10 μm ）

揚水ポンプ（大容量採水の場合）

注1：事前に洗剤を展開した超音波洗浄機で洗浄し、水道水ですすぎ、畳んで乾燥する。

注2：ザルは超音波洗浄が望ましいが、洗浄機に入らない場合は水道水で洗うのみでもよい。

3.2 採水量の目安

1 試料あたりの検出本数を、おおよそ 50 本とする場合、初沈流出水は約 15 L、放流水の場合は約 100 L の採水が必要となる。

採水量の目安として、繊維状マイクロプラスチックの調査の一例⁸ではあるが、表-3.1 に下水の種類と採水量および検出された繊維の本数を示した。

表-3.1 試料の種類、採水量と検出した繊維の本数⁸

試料の種類	供試水量 (L)	繊維の検出数 (本)
流入下水	0.86～0.97	74～324
初沈流入水	4.7	269
初沈流出水	3.7	13
放流水	11.4	5

← 2時間間隔で24時間採水

流入下水は、約 1 L の試料から 74～324 本の繊維の検出例があり、採水量 1 L でも繊維を検出できると考えられるが、繊維状マイクロプラスチックは、採水時間により大きく変動する⁸ことを考慮して採水量を決定する必要がある。

1 日あたりの流入実態を把握したい場合は、試料水量が少ない流入下水については自動採

⁸ 国立研究開発法人土木研究所：下水に含まれるナノ物質等の挙動および影響把握に関する研究、pp.148-152、平成 30 年度下水道関係調査研究年次報告書集、（令和 2 年 3 月）より作成、<https://www.pwri.go.jp/team/suisitsu/seika/2020pwri.pdf>

水器によるコンポジット採水が望ましい。

試料の保存容器は、プラスチック容器で可能だが、コンタミネーションを防ぐため、中性洗剤液に浸漬して超音波洗浄した後、純水でよく洗浄しておく。空気中の繊維状マイクロプラスチックが付着しないよう清浄な雰囲気中で乾燥させること。

3.3 小容量採水の方法

試料水量 20 L 程度までの採水は、取手に十分な長さのロープを結び付けた 5 L バケツを水面に下ろして汲み上げる。バケツは金属製が望ましい。試料容器は 1 L ガラス瓶や 10 L ステンレス缶を用いる。プラスチック製の容器を用いる場合は、プラスチックの劣化やひび割れがない新しいもので、事前に洗浄したものを使用する。自動採水器を用いてもよい。

3.4 大容量採水の方法

10～20 L の採水量で放流水から検出されない場合や下水放流先河川水中の繊維状マイクロプラスチック調査は、100 L 程度やそれ以上の大容量の採水を行う必要がある。採水方法は以下がある。

- a) 揚水ポンプを用いる採水
- b) 採水設備からの採水

3.4.1 揚水ポンプを用いる採水

揚水ポンプを用いる方法は、放流口などに揚水ポンプを浸漬し、吸い上げ揚水する。揚水ポンプには、揚水量把握のために流量計を取り付けることが望ましい。流量計がない場合は、揚水ポンプで 10 L バケツなどの容器を満たすのに要する時間をストップウォッチで測定して時間あたりの揚水量を求め、試料の揚水時間から揚水量を計算する。ナイロンメッシュは大口のザルなどにクリップ等で固定する。揚水が溢れないように注意しながらナイロンメッシュへの通水を行う。孔径 10 μm のナイロンメッシュは目詰まりしやすいため、ザルを複数用意しそれぞれにナイロンメッシュを掛けておき、水の通りが悪くなったらザルごと交換して通水を続ける。揚水ポンプを用いた繊維状マイクロプラスチックの回収イメージを図-3.1 に、繊維状マイクロプラスチック回収機材の一例を図-3.2 に示す。

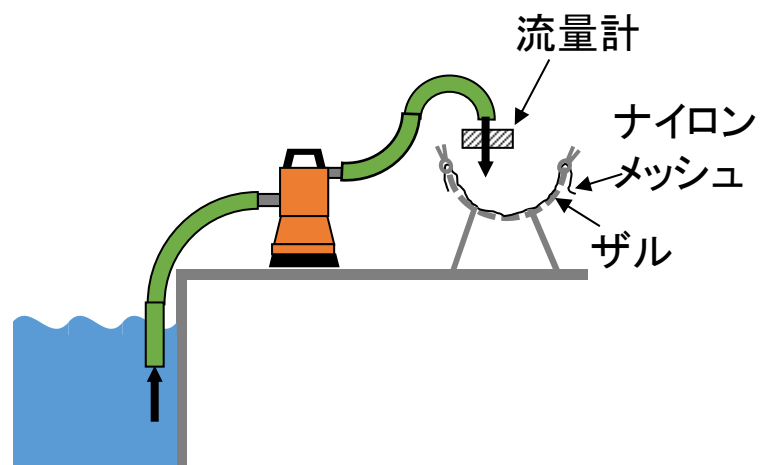


図-3.1 揚水ポンプを用いた繊維状マイクロプラスチックの回収方法



図-3.2 繊維状マイクロプラスチック回収機材の一例

3.4.2 採水設備からの採水

下水放流水の採水可能な設備（蛇口など）を備えている処理場では、**図-3.3** に示すように、ザルなどに固定した目開き $10\ \mu\text{m}$ のナイロンメッシュを採水設備の直下に設置してろ過する。1L メスシリンダーなどの容器を満たすのに要する時間から採水口の排水速度を求め、ナイロンメッシュを設置して通水した時間から通水量を計算する。



図-3.3 放流水の採水設備からの採水の例

3.5 試料の輸送と保存

採水した下水試料と、採取した懸濁物が捕捉されているナイロンメッシュは、コンタミネーションを防ぐため密閉し、冷蔵または常温で持ち帰る。ガラス容器に密閉して持ち帰ったナイロンメッシュの例を**図-3.4** に示す。ナイロンメッシュは試料を通水した面が内側になるように畳み、クリップ等で開かないように固定し、清浄なガラス瓶に密閉する。試料中のプラスチックは保存期間中には基本的に分解しないと想定されるが、水試料やナイロンメッシュに捕捉した懸濁物の腐敗を防ぐため、冷蔵保存する。

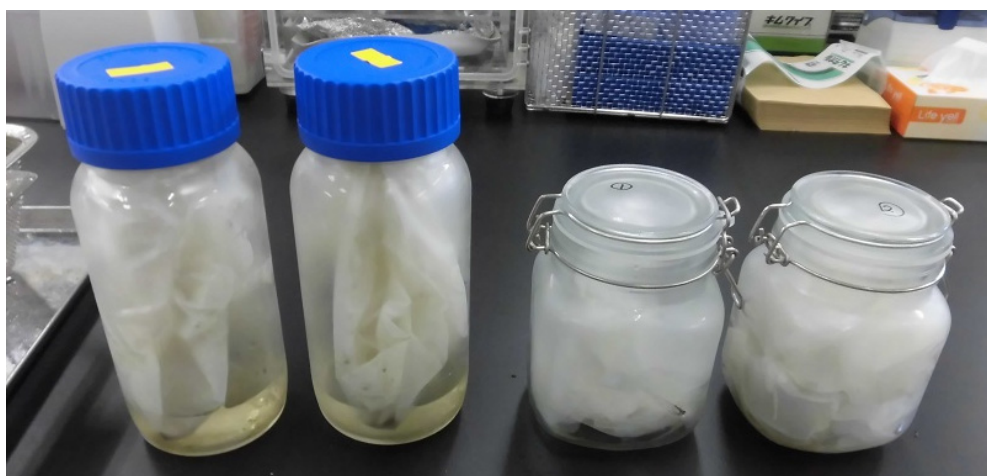


図-3.4 畳んでクリップで止め、容器に密閉して持ち帰ったナイロンメッシュ

4. 前処理方法

4.1 前処理方法の概要

顕微鏡観察により繊維状マイクロプラスチックを測定するためには、メッシュに捕捉された繊維状マイクロプラスチックが含まれる懸濁物から夾雑物を除去するために、セルロースなどの有機物の分解、砂などの無機物の分離の工程が必要となる。この操作は、作業環境や器具からのマイクロプラスチック汚染に留意する必要がある。

器 具

クリーンベンチまたはクリーンブース

4.2 コンタミネーション防止のための留意事項

4.2.1 作業環境

マイクロプラスチックは実験室の空気中にも漂っている⁹ことから、前処理操作は極力埃などの微粒子が少ない環境下で行うことが望ましい。実験室はあらかじめ埃を吸着するモップなどで清掃しておく。また、空調の風が直接当たる場所は避ける。作業前に、エタノールをしみ込ませた紙ワイパー等を用いて作業机や作業用ゴム手袋（手袋はパウダーフリーのもの）を拭き、埃を除去しておく。前処理操作はクリーンベンチ内で行うことが望ましいが、利用できない場合は代用として図-4.1 に示すような簡易なフード付き実験台を設置すると、フード内での埃の堆積や飛散を抑制できるため有効である。



図-4.1 フード付き実験台（正面、側面）

作業着は木綿の白衣の着用が望ましいが、用意できない場合は事前に洗濯したポリエステル白衣や作業着でもよい。セーターなどプラスチック繊維が離脱しそうな素材の衣服は

⁹ Alexandre Dehaut, Ludovic Hermabessiere, Guillaume Duflos : Current frontiers and recommendations for the study of microplastics in seafood, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 116, 2019, Pages 346-359.

避ける。

試料中の繊維等が飛散して装置を汚染する可能性を防ぐため、試料の前処理と、蛍光顕微鏡などの分析装置を置く部屋は分けることが望ましい。

4.2.2 器具の洗浄方法

実験器具はガラスまたはステンレス製のものを使用する。洗浄は中性洗剤に浸して超音波洗浄を 30 分程度行い、水道水ですすいだ後、純水でよく洗って乾燥棚などで乾燥させる。蛍光染色剤の Nile Red が付着した器具は、外見がきれいになるまでエタノールと水を交互に吹き付けて洗浄する。

4.3 試料のろ過と回収

器 具 47 mm 用ガラス製ろ過器（漏斗+ファンネル）

47 mm 親水性ポリカーボネートメンブレンフィルター 孔径 10 μm

1 L メスシリンダー

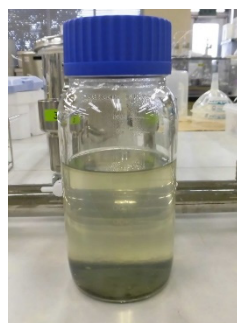
ビーカーなど

4.3.1 流入下水

懸濁物質を多く含む流入下水の前処理では、まず、ろ過を効率化するために、試料中の懸濁物質を事前に沈殿させておくといよい。ろ過作業の様子を図-4.2 に示す。流入下水を 10 L 容器などに採水した場合は、均一に混合しながらメスシリンダーで約 1 L を量り取り、液量を記録し、1 L ビーカーや広口 1 L ガラス瓶に移して冷蔵庫に置く。採水現場で 1 L を量り取って持ち帰った場合は、そのまま冷蔵する。冷蔵庫に静置する期間は 2~3 日とし、目視で懸濁物質が沈殿したことを確認する。大容量の遠心分離機が利用可能であれば遠心分離で懸濁物質を沈殿させてもよい。



a) 広口 1L 瓶に分注した
流入下水



b) 数日経過し懸濁物
が沈殿した状態



c) 上澄みをろ過してから
沈殿を入れた状態

図-4.2 流入下水のろ過作業の例

ろ過に使用するフィルターは、超音波でろ過物をフィルターから比較的容易に剥がせること、および耐薬品性にすぐれることから、親水性ポリカーボネートメンブレンを使用する。実体顕微鏡で観察できる粒子径が 10 μm 程度までであることから、孔径は 10 μm のものを使用する。フィルターのサイズは直径 47 mm が扱いやすいが、試料量が多い場合直径 90 mm のものでもよい。ろ過器はガラス製の漏斗とファンネルを用いることが望ましい。

ろ過作業では、事前に沈殿分離させていた試料のうち、まずは上澄水をろ過し、その後沈殿物を流し込み、さらにガラス瓶の内部を純水で洗浄し、洗浄液も流し込む。流入下水のろ過は時間を要する場合が多いが、上記方法で時間短縮が可能となる。ろ過後は、ろ過器から残渣を含むフィルターを取り外さずに、そのまま次節 4.4 の分解操作を行う。目詰まりが生じろ過が完了しない場合は、試料水がろ過器に溜まった状態で次節 4.4 の分解操作を行う。流入下水の夾雑物は主に有機物であるため、分解操作によって目詰まりの原因となる粒子が分解除去され、試料水の溜まった状態が解消される。

4.3.2 処理水

ナイロンメッシュでろ過した下水処理水試料は、捕捉した懸濁物の回収作業を行う。回収操作を図-4.3 に示す。初めに、ナイロンメッシュは金属製のザルの上に広げ、周囲をクリップ等で固定する（図-4.3①）。次に、洗ビンで純水をかけてナイロンメッシュを洗いながら、懸濁物を中央に集める（図-4.3②）。懸濁物を中央に集めた後、中央を袋状に窪ませる。筒状の物体（ろ過器のファンネルなど）を立てて、袋状に窪んだ部分がその中に入るようにする（図-4.3③）。そして、500 mL ビーカーなどの口が広い容器をかぶせる（図-4.3④）。この状態で逆さまにすると、ナイロンメッシュの試料が付着している部分が確実に容器に入る。その後、ナイロンメッシュに付着した懸濁物を洗ビンの水で洗い落とす。ナイロンメッシュの外周部分はほつれた繊維が剥離する可能性があるため、外周部と試料が接触しないように注意する。

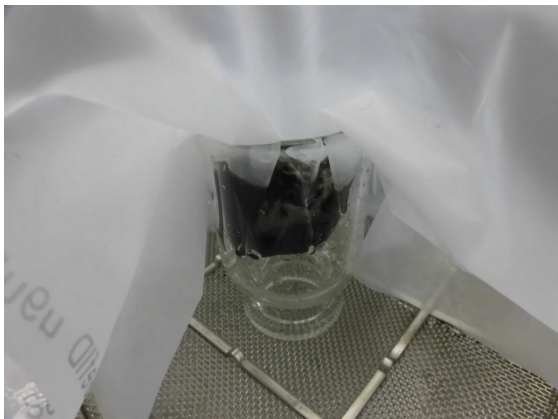
500 mL ビーカーなどの広口の容器に回収した懸濁物は、ろ過操作により水と固形物を分離し、フィルター上の固形物に対して分解を行う。ろ過作業は、上述の 4.3.1 項と同様に行い、ろ過器に残渣を含むフィルターを保持したまま、次節 4.4 の分解操作に供する。



①ナイロンメッシュで捕捉した懸濁物



②純水をかけて洗浄し、中央に集める



③懸濁物のある部分を窪ませて、筒状の物体(ここではろ過器のファンネルを使用)の中に入れる



④口が広い 500 mL ビーカーなどをかぶせ、この後逆さにすると、試料をビーカー内に移すことができる

図-4.3 ナイロンメッシュからの試料回収

4.4 夾雑物の分解方法

4.4.1 分解方法の概要

4.3 節で懸濁物をろ過で捕捉したフィルター上には、繊維状マイクロプラスチックの他に、トイレットペーパーなどに由来するセルロース系の有機物や、食品残渣などに由来するたんぱく質系の有機物、砂などの無機物が含まれる。繊維状マイクロプラスチックを残しつつ、有機物を分解する手法として、過酸化水素 (H_2O_2) と 2 価の鉄塩を用いた加熱分解法（フェントン反応）を用いる。分解操作は、簡易化および効率化のため、懸濁物を捕捉したろ過器をそのまま分解容器としても使用する方法とする。すなわち、試料をろ過した後、フィルターをろ過器から外さずに、そのまま分解試薬を添加して分解する方法とする。なお、過酸化水素は劇物であり、フェントン反応では発熱し白煙が生じることから、分解操作はドラフト内で行う。

器 具 47 mm 用ガラス製ろ過器（漏斗+ファンネル）

100 mL 容フラン瓶など（口部にろ過器のゴム栓がフィットするサイズのもの）

試 薬 30% H_2O_2

0.5M $\text{FeSO}_4 \cdots \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 139 mg を純水 1 mL に溶解する（用時調製）

4.4.2 操作手順

夾雑物分解の手順を図-4.4 に示す。フィルター上に懸濁物を捕捉したろ過器から、ガラス製ろ過器の漏斗のゴム栓部分を取り外して、栓を抜いた空の 100 mL フラン瓶などに挿すと、図-4.4①のように実験台に立たせることができる。これにより、次の工程で加える反応試薬の流出を防げる。流入下水を 4.3.1 項の手順でろ過した例を図-4.4②に示す。

分解試薬の添加は、始めにろ過器上部の試料に 30% H_2O_2 を 10 mL 加える。試料の反応が激しい場合、収まるまで静置する。反応しない場合は、0.5M FeSO_4 を 100 μL 添加し、フェントン反応を起こし、反応が収まるのを待つ。流入下水に 30% H_2O_2 と 0.5M FeSO_4 を添加した様子を図-4.4③に示す。

分解は、60℃に設定した乾燥機で 1 時間加熱して反応させる。乾燥機内にろ過器を並べた様子を図-4.4④に示す。

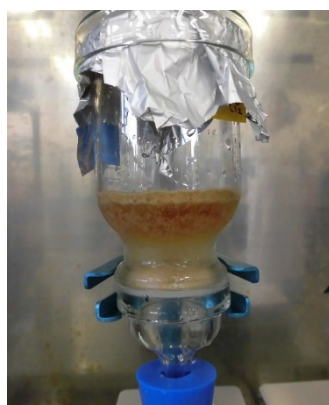
加熱後のろ過器は、乾燥機から取り出して、100 mL フラン瓶からガラス製ろ過器を外し、吸引ろ過器に取り付け、反応液を吸引ろ過する。ろ過の様子を図-4.4⑤に示す。ろ過中にフィルターが詰まり、反応液が残留する場合や、分解後残渣が多い場合、再び試料に 30% H_2O_2 を 10 mL と 0.5M FeSO_4 を 100 μL 加えて加熱分解する。分解とろ過のサイクル（30% H_2O_2 を 10 mL と 0.5M FeSO_4 を 100 μL 加える → 60℃で加熱 → 吸引）を通常 3 回程度繰り返す。これにより下水中夾雑物はおおよそ除去できる。分解が終了した試料は反応液をろ過し、吸引しながら純水で洗浄する。



- ①ろ過器をフラン瓶に立たせた状態(ビーカー等の別容器を使用せず、そのまま試薬を入れて加熱乾燥機に移すことで、反応液のろ過と試料追加の繰り返しを可能にし、コンタミネーション・ロスを軽減。)



- ②流入下水をろ過した例
(ろ過手順は 4.3.1 参照)



- ③ 30% H_2O_2 10 mL と
 FeSO_4 100 μL を添加
(フェントン反応)



- ④ 60°Cで1時間加熱

試薬添加→加熱分解→ろ過のサイクル
を通常3回繰り返すと、下水中の夾雑物
はおおよそ除去できる



- ⑤フラン瓶から外して吸引ろ過器に取り付け、フィルター上の反応液をろ過

図-4.4 ろ過器上での夾雑物の分解

4.5 分解残渣の酸洗浄

試 薬 2N HCl … 35%塩酸 40 mL を純水で 200 mL に希釈する

4.5.1 操作手順

30% H_2O_2 + FeSO_4 によるフェントン反応後の試料は、鉄イオンに由来する褐色の沈殿が生成し、顕微鏡観察時の妨害になるため、図-4.5 のようにこれを酸で溶解して除去する。分解作業後のろ過器に 2N HCl を約 5 mL 注ぎ、5 分静置してからろ過し、吸引しながら水で洗浄する¹⁰。酸洗浄を追加することで図-4.6 のように沈殿物が除去される。

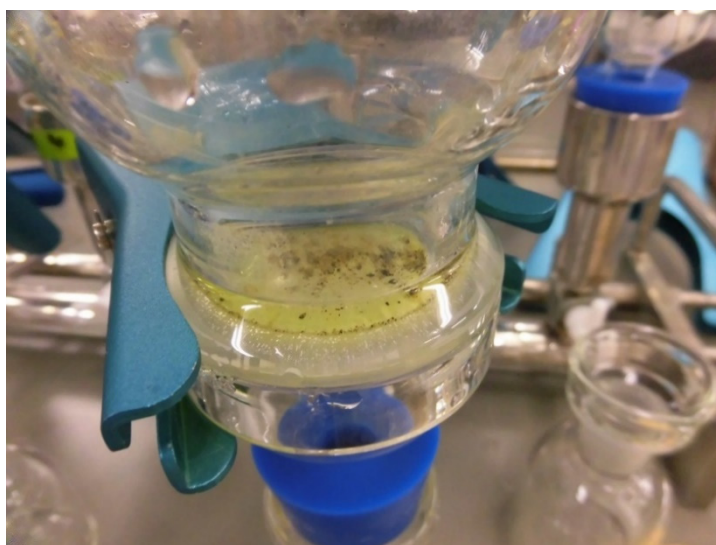
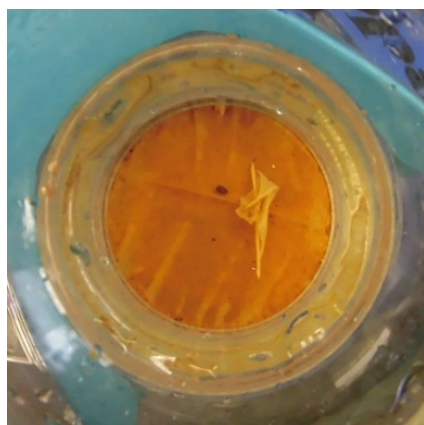
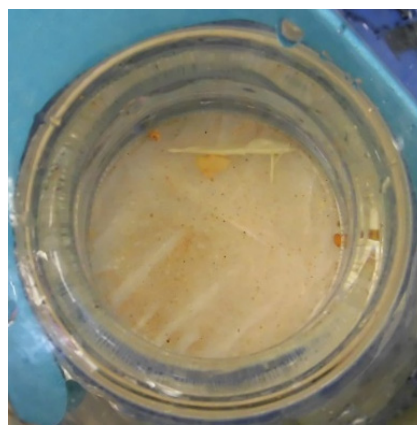


図-4.5 2N HCl で褐色沈殿を溶解している様子



フェントン反応のみの後



酸洗浄追加後

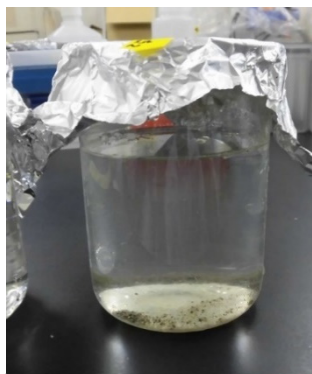
図-4.6 分解後の流入下水を酸洗浄した前後の比較

¹⁰ 鈴木裕識、村田里美、對馬育夫、北村友一、山下洋正、阿部翔太、田中周平：下水中の微細繊維状マイクロプラスチックの調査方法整備の検討、第 58 回下水道研究発表会講演集、pp.356-358、2021

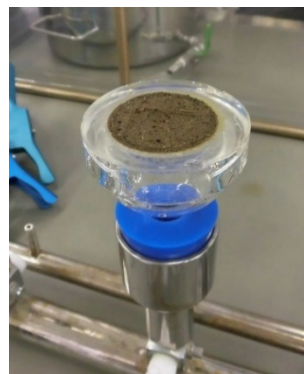
4.6 比重分離

4.6.1 比重分離の概要

4.5 節で示した分解残渣の酸洗浄を行った後でも夾雑物が多い場合は、比重分離を行う。比重分離が必要な試料の例を図-4.7 に示す。下水放流水を放流口で採水した場合（土砂の巻き上げ）や、雨天時に流入下水を採水した場合などは、試料中に砂や泥が多く含まれることがある。砂や泥は無機物で比重が大きい（石英で 2.7 g/cm^3 ）ため、適度な比重の溶液に試料を懸濁させると、プラスチックが浮上し、無機物が沈降して、分離が可能になる。



放流水試料をナイロンメッシュから回収した状態、砂が混ざっている



分解と酸洗浄の後も夾雑物が多い試料の例（下水処理水放流先河川の試料）

図-4.7 比重分離を要するサンプルの例

4.6.2 比重分離試薬

主要なプラスチック材質の比重^{11,12}を表-4.1 に、比重分離に用いられる主な溶液の比重¹³を表-4.2 に示す。飽和食塩水では PET の分離ができないこと、塩化亜鉛は毒物及び劇物取締法で劇物に指定されており取り扱いに注意を要するため、本手法ではヨウ化ナトリウム（NaI）を用いる。ヨウ化ナトリウムは室温 25°C で 64.8% (w/w) まで溶解するが¹³、主なプラスチックの比重が 1.5 以下であることから、比重 1.5 程度の溶液を用いる。

表-4.1 プラスチックの比重

材質	密度 (g/cm^3)
Polyethylene(PE)	0.91～0.93 ¹¹⁾
Polypropylene(PP)	0.90～0.91 ¹¹⁾
Polystyrene(PS)	1.05～1.07 ¹¹⁾
Polyethylene terephthalate(PET)	1.38～1.40 ¹¹⁾
Nylon6,6	1.09～1.24 ¹²⁾
ポリエステル	1.37～1.39 ¹²⁾

表-4.2 塩類水溶液の比重

水溶液	密度 (g/cm^3)
飽和食塩水	1.18 ¹³⁾
塩化亜鉛水	～1.81 ¹³⁾
5.3M NaI	1.52 (測定値)

¹¹ 岩波 理化学辞典 第5版第8刷, 岩波書店

¹² 繊維便覧 第3版, 繊維学会, 丸善, 2004

¹³ Mikaël Kedzierski, Véronique Le Tilly, Guy César, Olivier Sire, Stéphane Bruzard (2017): Efficient microplastics extraction from sand. A cost effective methodology based on sodium iodide recycling, Marine Pollution Bulletin, Volume 115, Issues 1–2, pp.120-129.

4.6.3 ヨウ化ナトリウム法による比重分離

器 具 50 mL ポリプロピレン製遠心管^{注1}

注1 新品を用いるか、事前に洗剤を展開した超音波洗浄機で洗浄しておく

試 薬 5.3 M NaI … NaI 397.2g を 1L ビーカーにとり、純水を約 400 mL 入れて攪拌して溶解し、500 mL メスフラスコに移して標線まで水を加える。試薬の溶解時に空気中から混入した微粒子を除去するため、孔径 0.2 μm のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) またはポリカーボネート (PC) のフィルターでろ過してガラス瓶に入れ、アルミ箔で遮光して冷蔵保存する。

4.6.4 操作手順

分解残渣の載ったフィルターを 100 mL ビーカーに入れ、5.3M NaI を駒込ピペットで約 5 mL 注ぐ。超音波洗浄機を用いて超音波を 5 分程度かけて、粒子を剥離させる。ビーカーを超音波浴槽に浸けながら、振って溶液を混ぜるとより剥がれやすい。フィルターから粒子が十分に剥がれたら、フィルターをピンセットでつまんで、フィルター表面と裏面を NaI 液をかけて洗う。この時、粒子がフィルターから上手く剥がれない場合には、金属製の薬さじ等を用いて粒子を剥がしてもよい。懸濁液を 50 mL 遠心管に移した後、ビーカーの内側も NaI 液で洗って、剥がれた粒子をすべて遠心管に移し入れる。必要に応じ複数本の遠心管に分けて入れる。遠心分離は、適切な条件を選ぶ (例：3,500 rpm (2,260 $\times$ g), 5 分)。NaI 液 30 mL 程度に対して純水 50 mL 程度で、バランスをとることができる。直径 47 mm、孔径 10 μm のポリカーボネートフィルターをセットしたろ過器を用意し、遠心管を静かに傾けて上澄みをろ過器に注ぐ。遠心管を回しながら注ぐと壁面に付着している粒子を出しやすくなるが、浮上している粒子を確実に全量排出することはできない。そこで、新しい NaI 液による再懸濁、遠心分離、ろ過の操作を後 2 回繰り返すことで回収率を高めることができる¹⁴。遠心管に残った沈殿物を NaI 液で再懸濁させ、遠心管が複数本の場合 1 本に移してまとめ、2 回目の遠心分離を行う。2 回目の遠心分離後の上澄みは 1 回目と同じフィルターにろ過する。沈殿を再懸濁させ 3 回目の遠心分離を行い、同様に 1 回目と同じフィルターでろ過する。ろ過後の NaI 溶液は廃液として適切に処分する。

¹⁴ 国立研究開発法人土木研究所：下水に含まれるナノ物質等の挙動および影響把握に関する研究、平成 29 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.121-127、H30 年 8 月
<https://www.pwri.go.jp/team/suisitsu/seika/2019pwri.pdf>

5. 蛍光染色方法

5.1 Nile Red 染色法の概要

本法は、蛍光染色試薬（Nile Red）で染色した繊維状マイクロプラスチックを蛍光顕微鏡で観察し、蛍光を示す繊維を計数することで、繊維状マイクロプラスチックの本数や長さ分布を測定するものである。

5.2 染色方法

器 具 ガラス製マイクロピペット（20～200 μ L 用、1～10 mL 用）

試 薬 Nile Red（Sigma-Aldrich, Technical grade, 100 mg）

Nile Red ストック液(1 mg/mL) … Nile Red 10 mg をアセトンに溶解して 10 mL にする。0.2 μ m のシリンジフィルター（フィルターの種類は問わない）でろ過してガラスバイアルに入れ、冷暗所で保存する。

Nile Red 染色液(0.01 mg/mL) … エタノール 9.9 mL に Nile Red ストック液 100 μ L を加える。シリンジフィルターは通さなくてもよい。

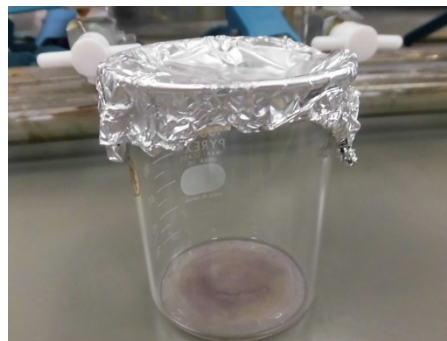
5.2.1 操作手順

4.5 節の分解残渣の酸洗浄を行ったフィルター、もしくは 4.6 節の比重分離を行い、上澄水を回収し、フィルターにろ過した試料を対象に染色操作を行う。初めに、フィルターをろ過器から外してそのまま、広げた状態で 100 mL ビーカーに入れる。次に、濃度 0.01 mg/mL の Nile Red 染色液 4 mL を入れて、フィルターが浸った状態にする。その後、容器のフタを少し開けてエタノールが揮発する状態で、70℃で完全に乾くまで乾燥する。乾燥器から取り出した時に乾燥が不十分である場合は戻して加熱を続ける。乾燥時間はおおよそ 90 分を要する。乾燥後は、次節の撮影準備作業を行うか、遮光して常温で保存する。染色前と染色後のフィルターが入っているビーカーの写真を図-5.1 に示す。



1) フィルターを Nile Red 染色液に浸す

70℃で加熱して
完全に乾燥



2) 完全に乾燥したフィルター
（染色が終了した状態）

図-5.1 Nile Red 染色の方法

5.3 染色後の顕微鏡観察準備

器 具 ろ過器

○ リング（内径 43 mm 程度、フィルターより小さいもの）

フィルター（直径 47 mm、孔径 10 μm 、ポリカーボネート製）

ろ紙用ピンセット 2 本

大型スライドグラス（52 mm×76 mm）

大型カバーグラス（50 mm×70 mm）

仮止め用テープ（黄色など、蛍光観察下でも見える色がよい）

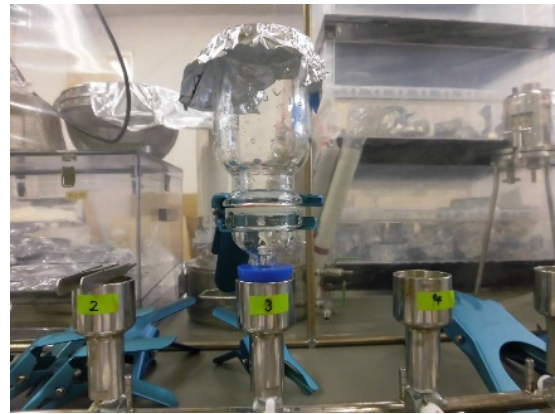
5.3.1 スライドグラス作成の操作手順

試料を Nile Red で染色すると、ポリカーボネートフィルター自体も染色されて蛍光を示すため、観察用の新しいフィルターに試料を移す必要がある。試料の観察準備操作を、図-5.2 に写真で操作順に示す。染色後のフィルターが入ったビーカーに約 10 mL の水を入れて超音波洗浄機を用いて、フィルターから試料を剥がす。別のろ過器を用意し、ろ過面に ○ リングを載せ、その上にフィルターを載せ、ファンネルを重ねて、クランプで固定して吸引し、剥がした試料を全量ろ過する。吸引したままファンネルを外し、内側と底面を洗って洗い液をビーカーに溜める。その後、○ リングによって窪んだフィルターの中央に静かに洗い液を注ぎ、試料すべてをフィルターにろ過する。

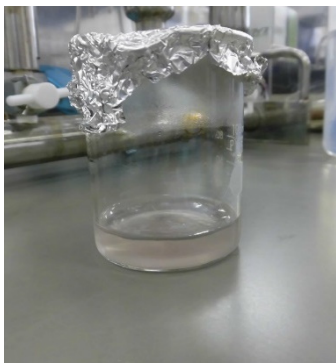
吸引操作により水分をできるだけ除去し（フィルターの乾燥機などでの乾燥はしない）、2 本のピンセットでフィルターの両端をつまんで持ち上げ、スライドグラス上にフィルターを移す。カバーグラスをフィルターが覆われるように載せ、テープで仮止めして撮影に供する。通常 1 試料につきスライドグラス 1 枚とするが、ろ過が目詰まりする場合は観察用のフィルターを追加して 1 試料でスライドグラス 2 枚にしてもよい。仮止め用のテープは蛍光で観察可能な色である黄色のものが望ましい。



1) ろ過器とOリング



2) 下から、漏斗／O リング／フィルター
(47mm, 孔径 10 μ m, ポリカーボネート)／
ファンネルの順でろ過器を組み立てる



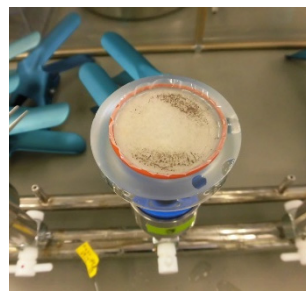
3) 染色したフィルターを水に浸して超音波で
繊維を剥がして、全量をろ過



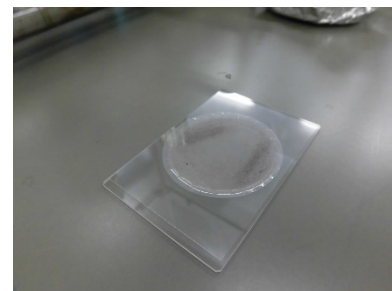
4) ファンネルの壁面を洗ってビーカー
に洗い液を溜める



5) こぼれないように洗い液を
ろ過(駒込ピペットなどで滴
下してもよい)



6) ろ過後の様子
(ろ過後も吸引を
続けて、できるだ
け水が残らないよ
うにする)



7) フィルターをスライドガラスに
載せ、カバーガラスをかぶ
せ、テープで止める(水気が
多い場合は室温で数日乾燥
させる)

図-5.2 染色後の撮影準備作業

6. 蛍光画像撮影方法

6.1 概要

デジタルカメラ撮影機能付きの実体蛍光顕微鏡でスライドガラス上のフィルターを撮影し、蛍光を示す繊維を目視で計数する。Nile Red 染色した試料は、B 励起 (450-510 nm⁶) 光源で、530 nm 以上の波長を通すハイパスフィルターを使用して観察すると、緑、黄、赤の蛍光をまとめて観察できる。試料が載ったフィルター全面を撮影して画像連結でフィルター1枚の全体写真を作成し、重複のない計数ができるようにする。

繊維状マイクロプラスチックの計数は、写真撮影を介さず、観察者が直接計数してもよいが、繊維が長く1視野に収まらない場合など、二重に計数するのを防ぐためや、繊維の長さを計測するために、また、後から繊維状マイクロプラスチックの FT-IR での材質の同定を行う際にフィルター上の位置を把握する目的で活用できることから、画像情報を残した方がよい。

器 具 実体顕微鏡 (対物レンズ倍率×1~×4 程度)

蛍光ユニット (B 励起光源、530 nm 以上の波長を通すハイパスフィルター)

デジタルカメラ (カラー撮影、2048 画素×1536 画素以上、撮影間隔 25 fps 以上、タイムラプス撮影ができるもの)

パソコンおよびカメラ撮影ソフトウェア (可能なら連続撮影機能付きのもの)

顕微鏡用 X-Y ステージなど

6.2 実体顕微鏡用蛍光ユニット

フィルター全体に分布した 5 μm 程度~5 mm 程度の繊維状マイクロプラスチックを効率的に観察するためには、10~40 倍などの対物レンズを用いる正立型蛍光顕微鏡は視野が狭くなり、用途には向かない。実体顕微鏡 (対物レンズ倍率 1~4 倍) に蛍光観察ユニットと撮影装置を装着することで、視野の広い蛍光写真が撮影できる。実体顕微鏡に蛍光ユニットを増設した一例を図-6.1 に示す。蛍光ユニットは、LED 光源で励起光を照射し、対物レンズ前に挿入したハイパスフィルターを介して蛍光観察可能な装置で、実体顕微鏡の対物レンズの下部に取り付けて使用する。光源は 485 nm 青色 LED と白色 LED の切り替えが可能になっている。

⁶ Thomas Maes, Rebecca Jessop, Nikolaus Wellner, Karsten Haupt, Andrew G. Mayes ; A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. Sci. Rep. 7, 44501; doi: 10.1038/srep44501 (2017).

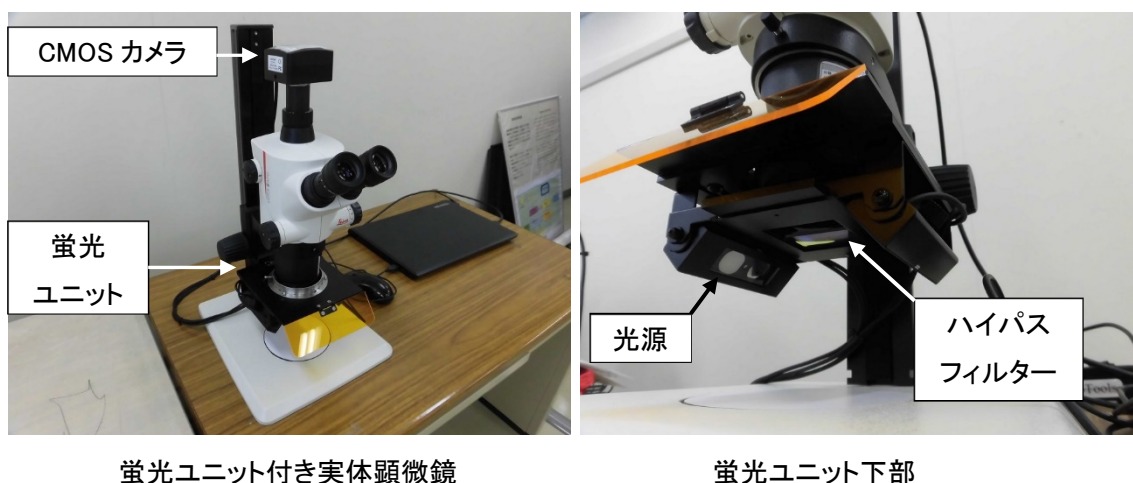


図-6.1 実体顕微鏡用蛍光ユニットの例

6.3 連続撮影の方法

試料全体を 1 枚の写真に合成するには、規則的にスライドグラスを縦横に移動させながら、互いに少しずつ撮影範囲が重なった多数の写真を撮る必要がある。スライドグラスのステージは顕微鏡用 X-Y ステージを使用してもよいが、手作りステージでも対応可能である。手作りステージの作成例を図-6.2 に示す。試料の載ったスライドグラスと黒い板（ここでは実体顕微鏡に付属していた黒色ステージを用いた）をマグネットクリップでまとめてレールに貼り付け、レールをステンレス板に固定し、ステンレス板の裏にナットを付けて傾き

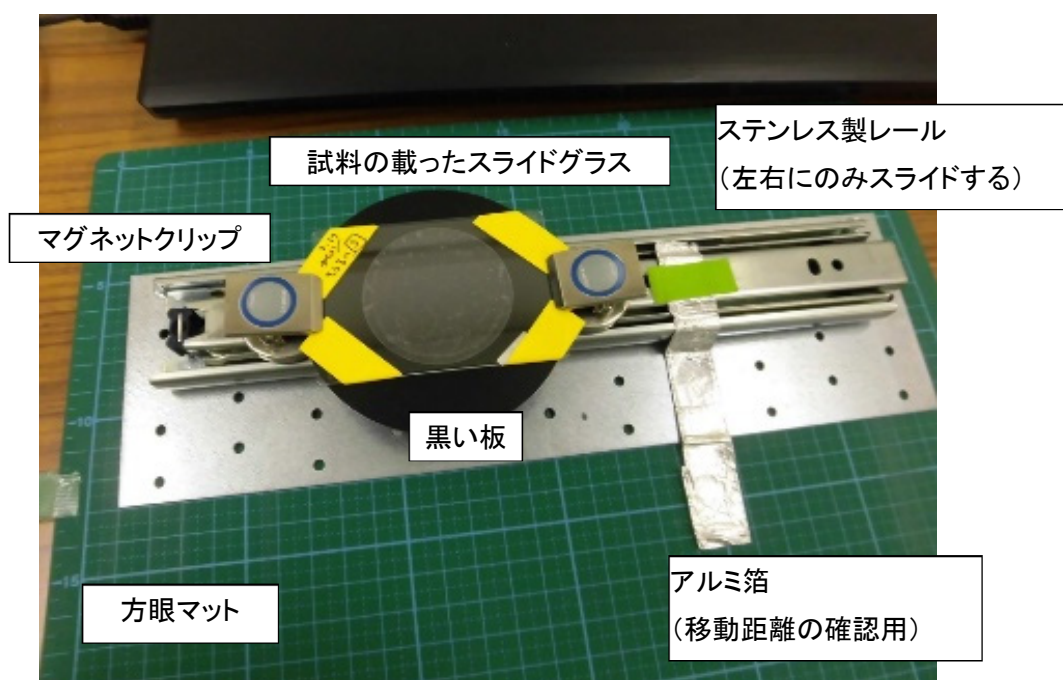


図-6.2 連続撮影装置の例（手づくりのステージ）

を調整して、視野全体にピントが合うようにしたものである。レール上のスライドグラス一式を左（または右）に1マス分移動させるごとに撮影を行い、さらに、方眼マットに沿ってスライドグラス一式を前後に移動することで、規則的にスライドグラス全体の画像を撮影できる。この実体顕微鏡で対物レンズを×1倍としたときのカメラの撮影視野はおよそ10mm×7mmの範囲であるため、5mm方眼に合わせるように装置を動かすことで、撮影範囲が適度に重なるように撮影ができる。

繊維が観察用のポリカーボネートフィルターの外側に存在する場合（作業工程でフィルターから繊維が落ちたり、カバーガラスをかけた際に繊維が移動したりする）もあるため、フィルター部だけでなくスライドグラス全領域（フィルター外部）を撮影することが望ましい。

6.3.1 励起強度の調整

Nile Red 蛍光はB励起で観察するが、染色した試料に強い励起光を当て続けると蛍光が失われるため、事前に励起光の強度を調整する必要がある。励起光の調整は、B励起点灯、ハイパスフィルター挿入、暗室、倍率×1の状態、黄色の蛍光色を示す板（黒い板にラベルプリンター用の黄色ラベルを貼ったもの）を写し、露出は300ms、ゲインは×1とし、ヒストグラムを見ながら青色光強度を調整する。黄色ラベルの蛍光画像と撮影ソフトウェアの画面に表示されたヒストグラムを図-6.3に示す。黄色ラベルは蛍光観察下で緑色に見えるため、ヒストグラムの緑色のピークが同じ位置に来るように青色光の強度を調整することで、同じ装置であれば撮影日時などが変わっても同じ強度の励起光で撮影できる。

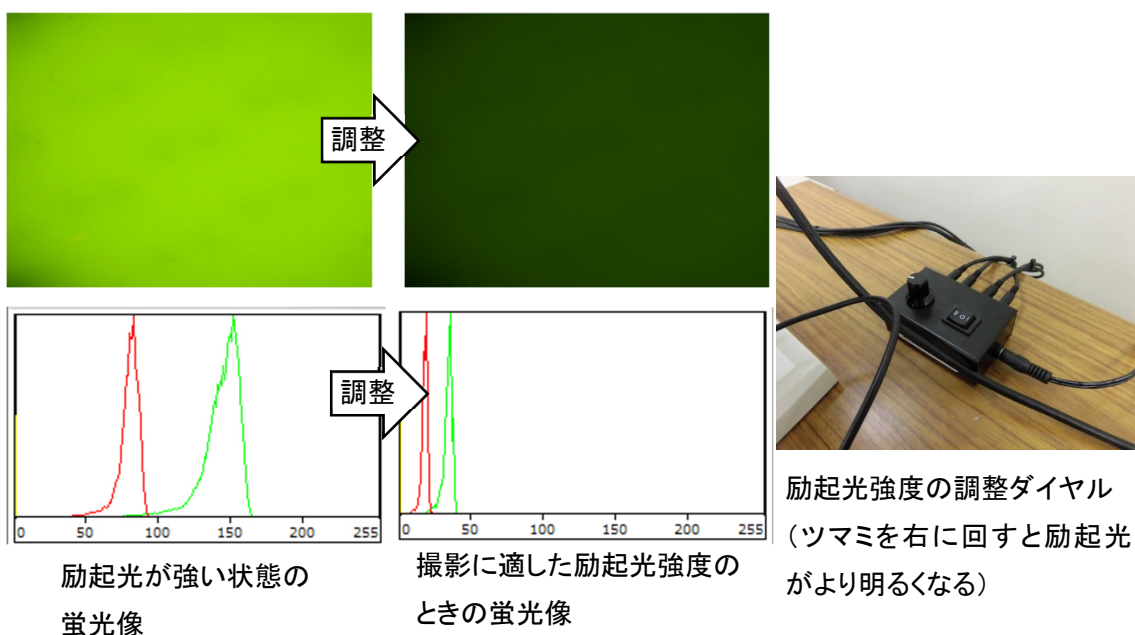


図-6.3 励起光強度を変えたときの黄色ラベルの蛍光像とヒストグラム

6.3.2 連続撮影の操作

励起光の強度を調整した後、一度青色光をオフにして、室内照明を点け、撮影装置一式を顕微鏡下にセットする。ピント調整を行い、装置を初期位置に移動させ、蛍光撮影条件（青色光点灯、フィルター挿入、暗室、倍率×1）に合わせて撮影する。撮影はタイムラプス機能を使い、撮影間隔は3秒に一回とする。保存場所とファイル名を指定してタイムラプス撮影を開始すると、指定時間（3秒）経過後に最初の1枚が撮影される。3秒に一回のペースで撮影され画面のカウントが増加するたびに、スライドグラスを約5mm横方向に移動させ、1行15枚でスライドグラスの端から端までを写真に収める。1行の撮影が終わったら、装置を5mm手前に移動させ、同様に端から1行15枚の撮影を行う。全11行でスライドグラスの全面を撮影できる。なお、ファイル保存形式はTIFFとする。

明視野撮影条件（白色光点灯、フィルターなし、室内照明点灯、倍率×1、ゲイン×1～×3）で同じ試料を続けて撮影すると、蛍光画像に対応した明視野画像を作成できる。

6.4 試料の保存方法（蛍光の退色についての説明）

染色したプラスチック粒子にB励起光を照射したときの蛍光像の10分間の変化を図-6.4に示す。励起光の強度によっては、特にポリエチレン（PE）の蛍光が2分ほどで失われることがわかる。室内光のあたる条件下でも徐々に蛍光が退色すると考えられるため、染色した試料は遮光して室温で保存する。

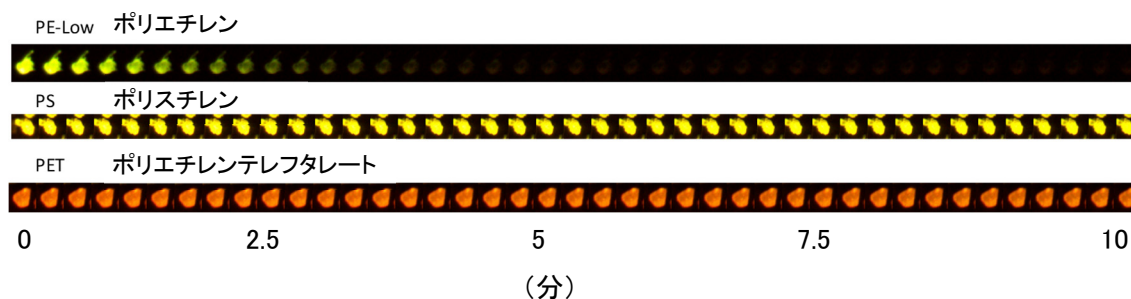


図-6.4 同じ粒子に励起光を照射し続けたときの10分間の蛍光の退色状況

7. 計測と集計方法

7.1 計測方法の概要

蛍光実体顕微鏡で撮影した画像をもとに、繊維状マイクロプラスチックを集計する手順の概要を図-7.1に示す。はじめに、1視野ごとに撮影した画像を画像連結処理でスライドガラス上のフィルター全体の蛍光写真に合成する。次に、画像モニター上で繊維状プラスチックを目視で確実に認識できるようにコントラストを調整する。繊維の本数はベクター画像編集ソフトである Inkscape を用いて、繊維の位置と形状を手動で記入した後に、記入した線を本数として求める。

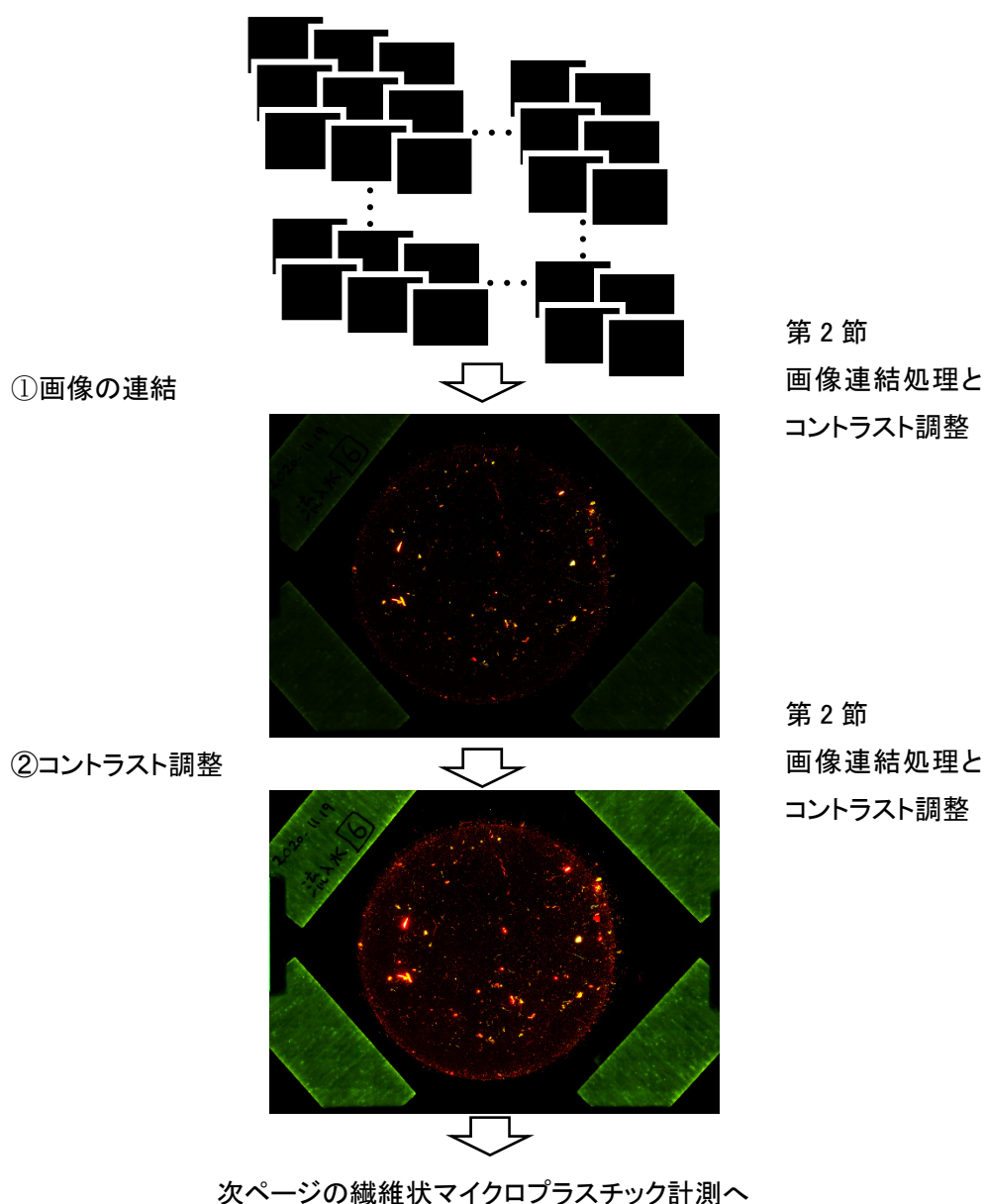
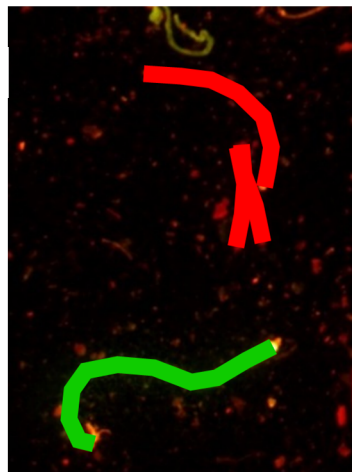
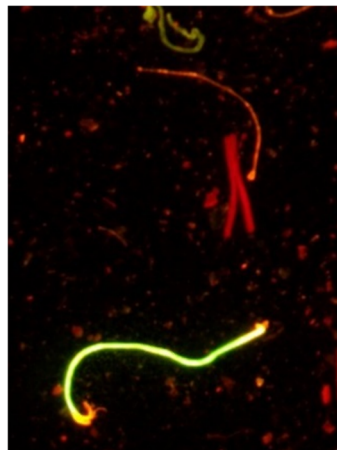
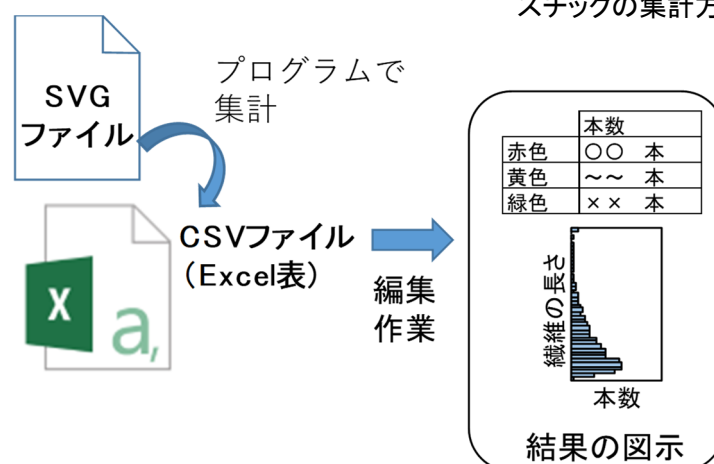


図-7.1 繊維状マイクロプラスチックの集計手順の概要

③繊維の位置と形状の記入
(Inkscape ソフトウェアを用い
て、画面上で繊維状マイクロプラ
スチックをペンツールでなぞる)



④繊維の本数の集計



第 3 節
繊維状マイクロプラ
スチックの計測方法

第 4 節
繊維状マイクロプラ
スチックの集計方法

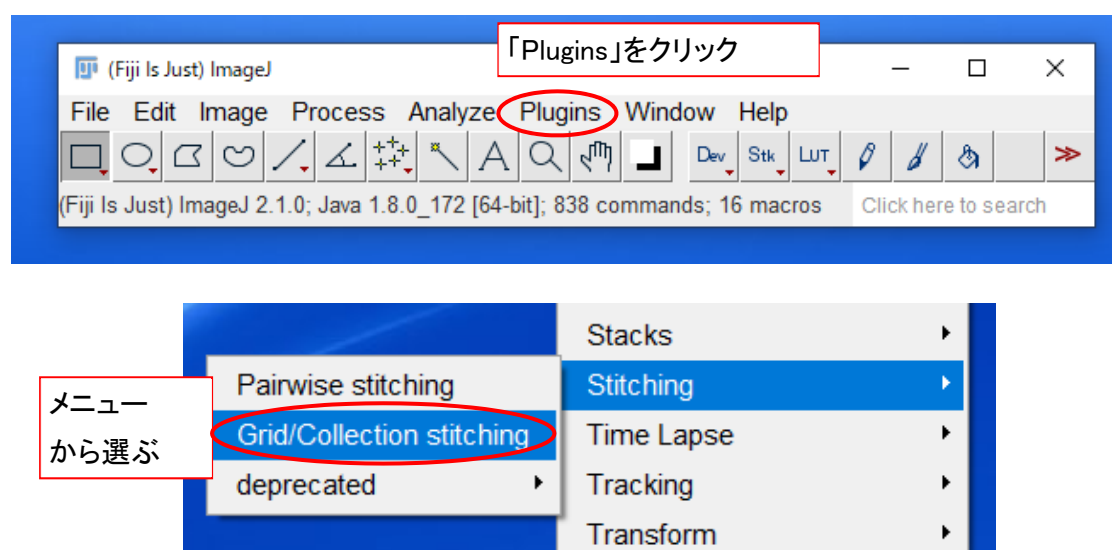
図-7.1 繊維状マイクロプラスチックの集計手順の概要 (続き)

7.2 画像連結処理とコントラスト調整

FIJI¹⁵ (<https://fiji.sc/>) はパブリックドメインの画像処理ソフトウェア ImageJ に様々な機能を持つプラグインが追加されたものである。撮影した蛍光画像の連結とコントラスト調整は FIJI を用いて行う。

撮影した蛍光画像は、撮影ソフトによって連番が付けられており、そのまま画像連結に使用できる。しかし、撮影ミスなどで連番の途中に不要な写真がある場合は、削除して連番を付け直す必要がある。連結しようとする画像は1つのフォルダにまとめて入れておき、FIJI を起動する。

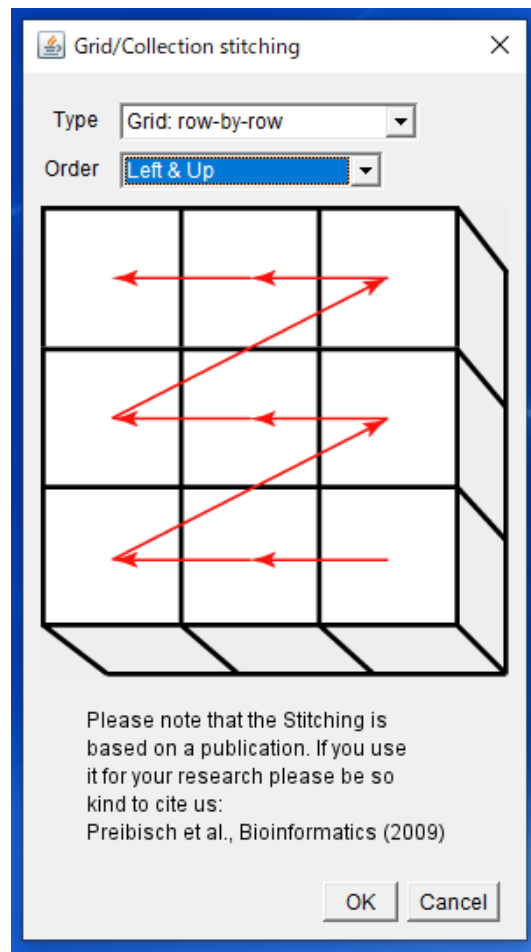
画像の連結までのパソコン画面上的操作を図-7.2 に示す。操作パネルの Plugins メニューにある「Stitching」で画像を連結できる。撮影した順番や縦横の枚数、フォルダの位置やファイル名などを指定して、画像連結を実行する。合成された画像は、スタックと呼ばれる独自のファイル形式になっているため、RGB Color 形式の画像に設定を変更する。その後、File メニューから画像を PNG 形式で保存する。



- 1) FIJI を起動すると表示される操作パネルで、Plugins メニューの中の「Stitching」を選び、Grid/Collection stitching を選ぶ

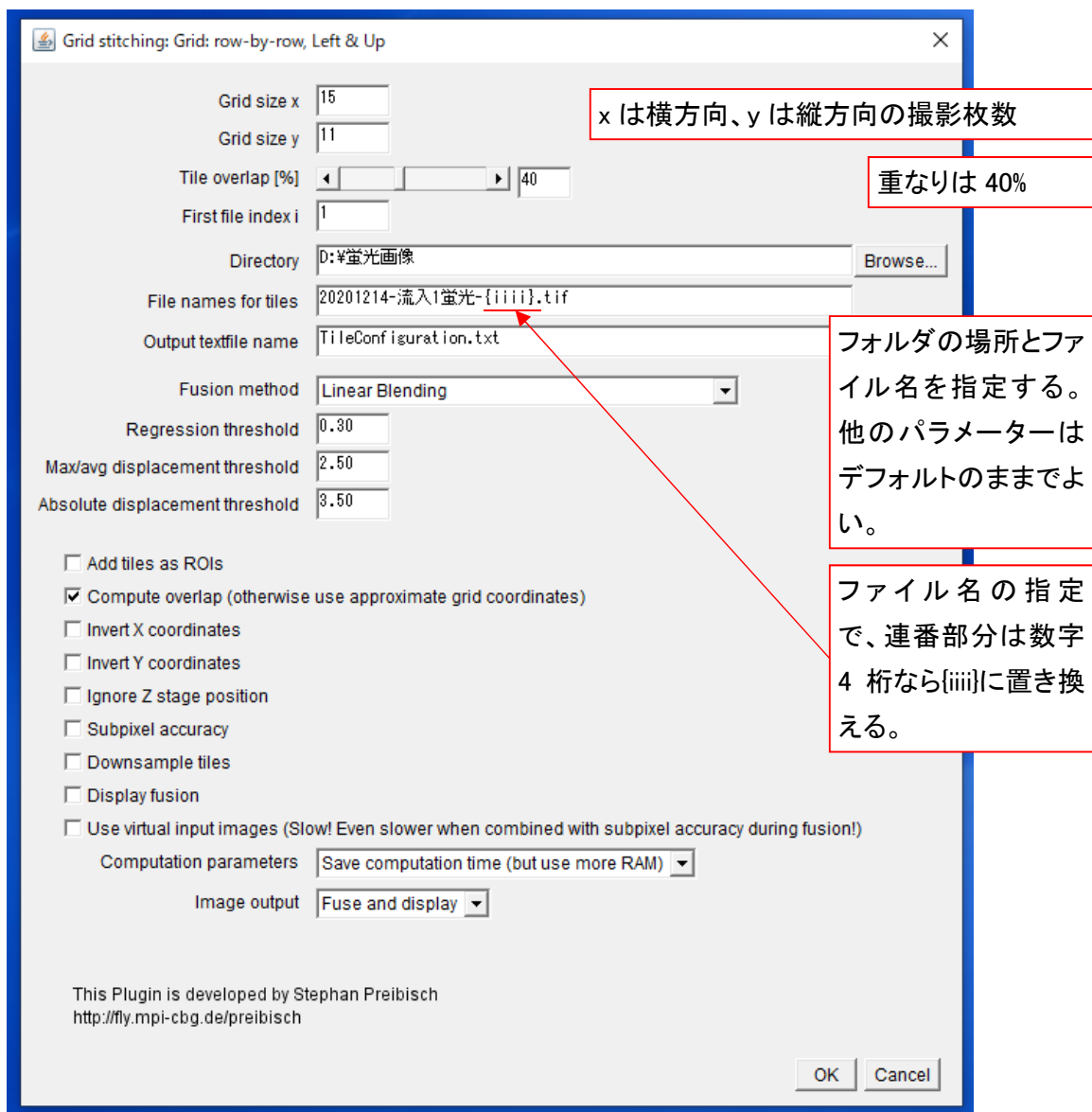
図-7.2 FIJI による画像連結手順の説明 (1)

¹⁵ Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A, et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods, 9(7), 676–682.

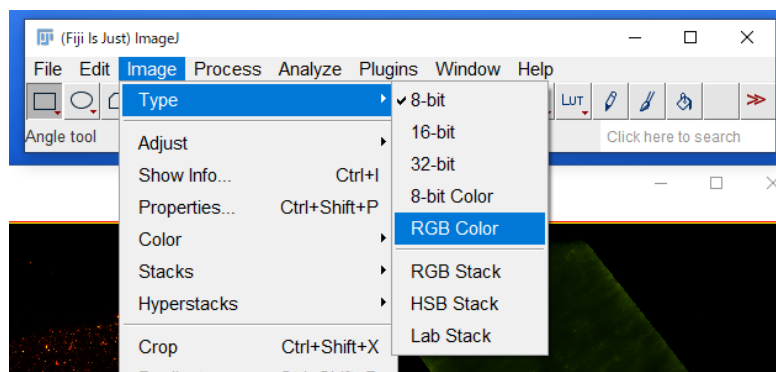


2) Grid/Collection stitching を選ぶと画像の並んでいる順序を指定する画面が表示される。実際に撮影した順番に一致するものを選択して OK で次に進む。

図-7.2 FIJI による画像連結手順の説明 (2)



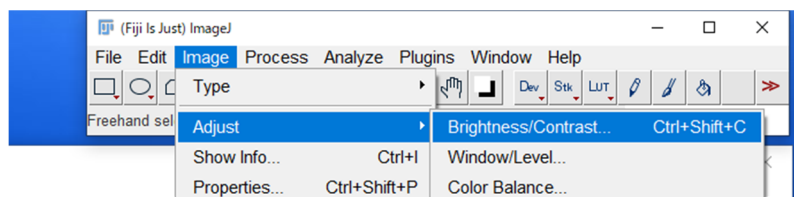
3) 画像連結のパラメーターやフォルダとファイルの設定画面



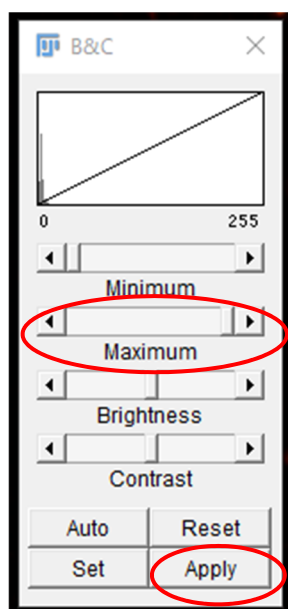
- 4) 合成された画像は、画像のタイプを RGB Color 画像に設定し直してから、PNG 形式で保存する。

図-7.2 FIJI による画像連結手順の説明 (3)

画像に写っている繊維が暗い場合は、適度に明るく見えるようにコントラストを調整する。画像のコントラスト調整操作を図-7.3に示す。コントラストは Image メニューの Adjust 内にある「Brightness/Contrast」で調整する。調整ウィンドウには Minimum、Maximum、Brightness、Contrast の4つのメーターがあるが、蛍光繊維の明るさを調整するには Maximum メーターで調整する。繊維が見えやすい明るさに調整したら、Apply で変更を確定し、その後、File メニューから画像を保存する。

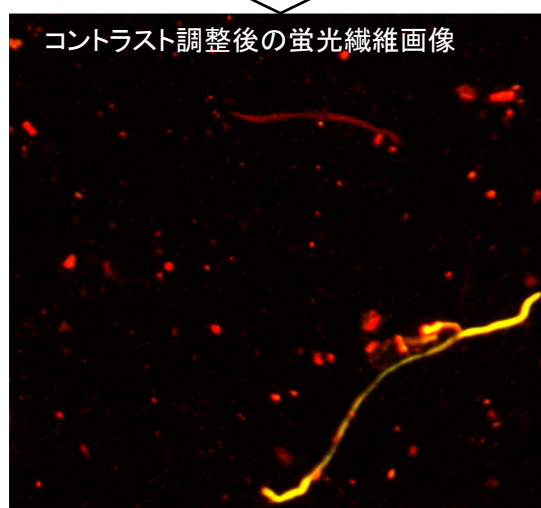
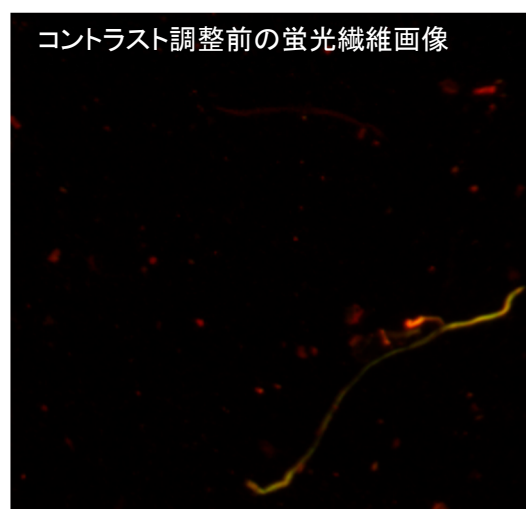


1) Image メニュー内の Adjust から、Brightness/Contrast を選択する

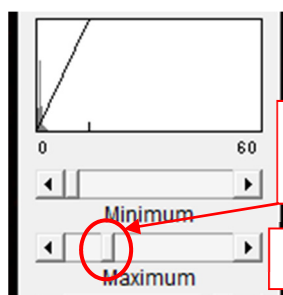


調整する箇所は
2段目 Maximum
メーターだけ

調整が終わったら
Apply ボタンで
変更を確定させる



2) コントラスト調整ウィンドウが表示される



ツマミをドラッグで
大きく調整

▶で1ずつ調整

3) Maximum メーターを下げて繊維が
明るく見えるように調整する

(暗い繊維を見る場合 Maximum = 60 程度)

4) Apply ボタンを押して変更を確定し、File メニューから画像を保存する

図-7.3 FIJI による画像のコントラスト調整手順

7.3 繊維状マイクロプラスチックの計測方法

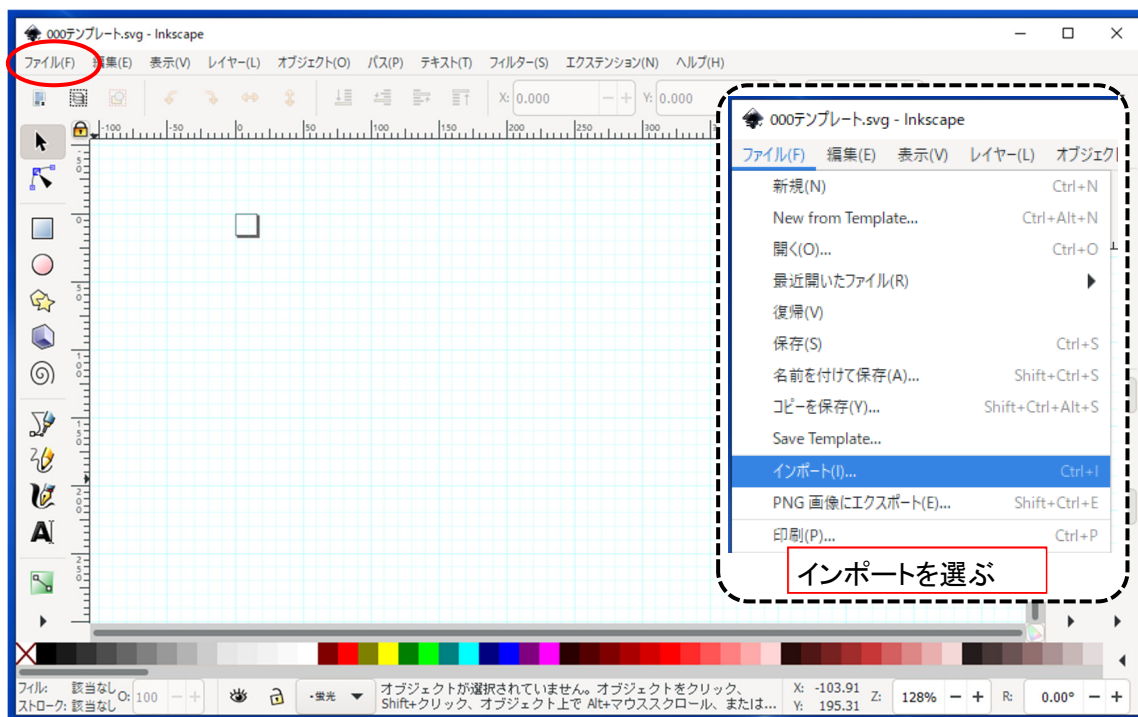
本法では、画像をモニターに表示し、目視により繊維の形状を電子記録して、記録状況をプログラムで集計する方法とする。繊維の形状の電子記録は、フリーのベクター画像編集ソフトである Inkscape¹⁶を用いる。Inkscape はホームページ (<https://inkscape.org/>) からインストーラーをダウンロードして、パソコンにインストールして使用する。

Inkscape のテンプレートとして、以下の 2 つのファイルが添付の CD に収録されている。

- 000 テンプレート.svg … この節で使用方法を解説
- 001 テンプレート_部分計数用.svg … 扇形図形付のファイル(第 8 章 4 節で解説)

Inkscape を起動して、ファイルメニューの「開く」から「000 テンプレート.svg」を選択して開くと、方眼の入った画面が表示される。以下に画像のインポート方法、繊維をなぞるパスの描画方法を順に説明する。

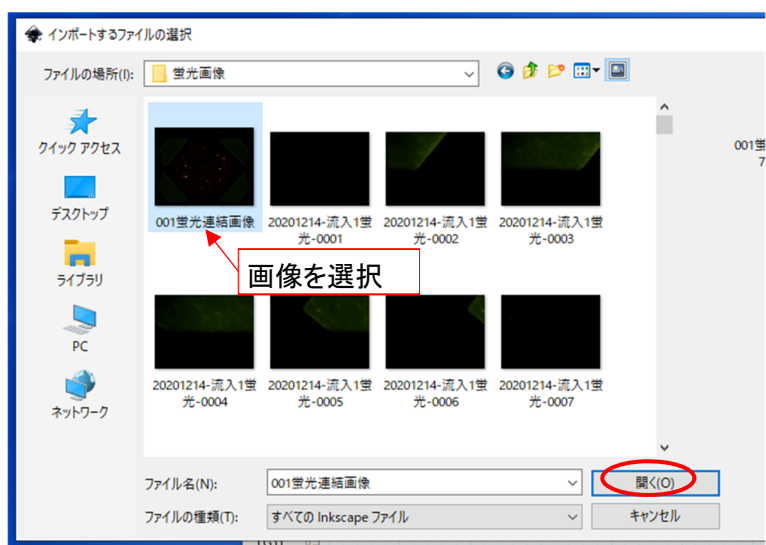
Inkscape に画像をインポートする手順を図-7.4 に示す。インポートメニューを開いて、連結してコントラストを調整した画像を選択し、貼り付ける。その後、画像の位置を示す座標値を $X=0, Y=0$ に設定して、ファイルメニューの「名前を付けて保存」から、別名で保存する。インポート時の設定は通常、「埋め込み」「ファイルから」「そのまま拡大」がデフォルトで選択されており、そのまま OK を押す。



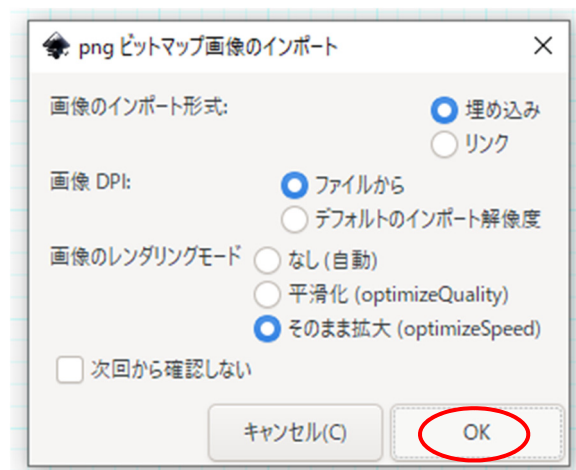
1) Inkscape 起動後の画面で、左上のファイルメニューを開き、インポートを選択

図-7.4 Inkscape への画像のインポート手順 (1)

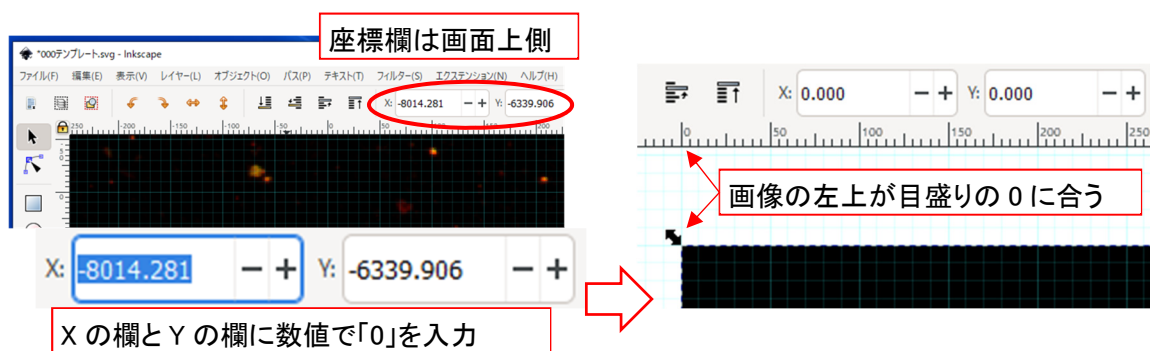
¹⁶ The Inkscape Project. May 24, 2021. Retrieved May 24, 2021. <https://inkscape.org/>



2) 画像を選択する画面が出るので、連結してコントラスト調整済みの蛍光画像を選択



3) インポート設定画面が表示されるので、OK で画像をインポート



4) 貼り付けた画像の座標を $x = 0, y = 0$ に設定し、ファイルに名前を付けて保存する

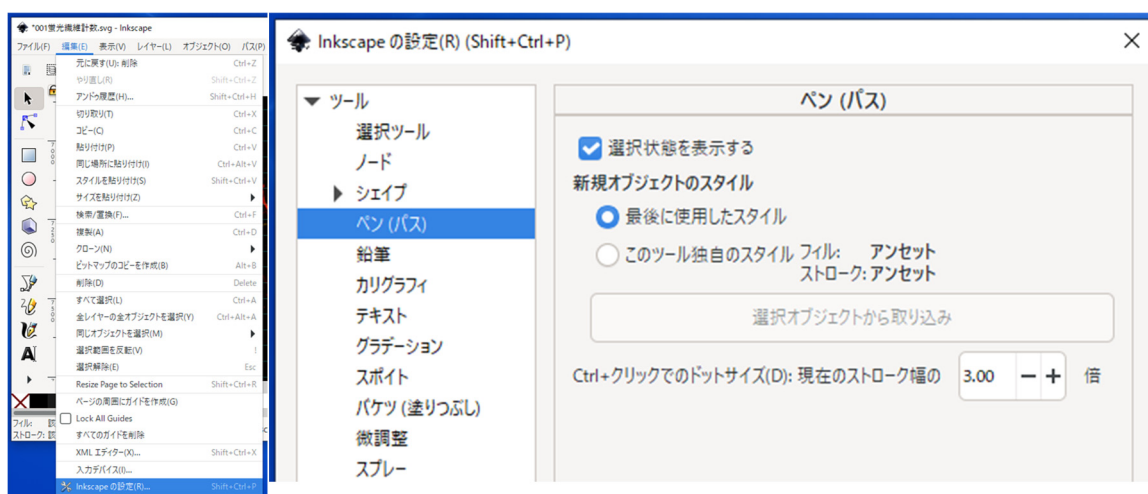
図-7.4 Inkscape への画像のインポート手順 (2)

Inkscape のレイヤーの設定方法の説明を図-7.5 に示す。繊維をなぞる作業中に画像が動かないようにするため、蛍光画像を貼り付けた「蛍光」レイヤーをロックして、繊維を記入する「記入用」レイヤーに切り替える。レイヤー切り替え操作ボタンは画面下側に配置されている。「記入用」、「蛍光」、「白色」のレイヤーがあるが、「白色」レイヤーは使用しない。



図-7.5 Inkscape のレイヤー操作（蛍光レイヤーの固定と記入用レイヤーに切替）の説明

Inkscape の設定の表示とパスの設定の説明を図-7.6 に示す。設定画面は、画面左上の編集タブの一番下の「Inkscape の設定」をクリックして開く。繊維をなぞる作業では、同じ色の線を続けて何本も引くため、直前に引いた線と同じ色の線を引く設定にすると便利である。ツールメニュー内のペン（パス）画面で、「最後に使用したスタイル」を選択して丸印が付いた状態に設定する。



編集タブの一番下に
Inkscape の設定がある

ツール→ペン(パス)を開き、「最後に使用したスタイル」を選択して、右上×で閉じる

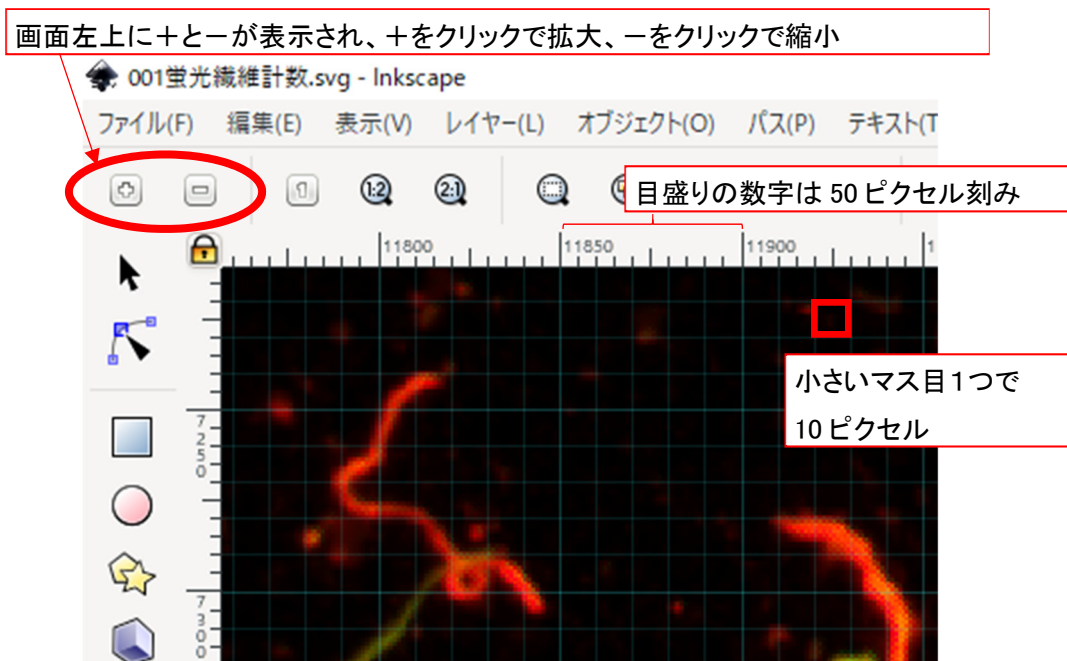
図-7.6 Inkscape の設定画面の場所と、パスの設定内容

繊維をなぞる作業は、Inkscape のペンツールを用いる。Inkscape の画面左側の、選択して使うアイコンのうち、線をなぞる操作で使用するアイコンを図-7.7 に示す。拡大／縮小ツールで、繊維をなぞりやすい大きさになるまで画面を拡大し、ペン（パス）ツールで繊維を折れ線でなぞる。引いた線は、後から選択ツールで選んで色と太さを変更することができる。

	拡大／縮小ツール	左上に+と-のボタンが表示され、+で表示を拡大、-で縮小する。拡大は画面クリックでもできる。
	ペン（パス）ツール	画面クリックを繰り返すことで折れ線を書く。ダブルクリックで線の形状を確定する。
	選択ツール	既にかいた線をクリックで選択する。移動や削除および線の色などの変更ができる。

図-7.7 画面左側の操作パネルのうち、繊維をなぞる作業で使用する主なアイコン

拡大／縮小ツールを用いた操作方法の説明を図-7.8 に示す。拡大／縮小ツールアイコンをクリックすると、画面左上に+と-のボタンが表示される。蛍光画像の表示サイズは、+をクリックで拡大し、-をクリックで縮小するので、繊維の形状が判別しやすい大きさで表示されるように調整する。



上の目盛りの数値が 50 ピクセル刻みで表示されるくらい（拡大率 181%）がよい。

図-7.8 拡大／縮小ツールを用いた拡大縮小操作の方法の説明

ペン（パス） ツールを用いて線をなぞる操作の説明を図-7.9 に示す。ペン（パス） ツールをクリックで選択した後、表示されている蛍光繊維の始点でクリックして線の描画を開始し、画像の繊維の形に沿うように中間点を適宜クリックして、終点でダブルクリックする。

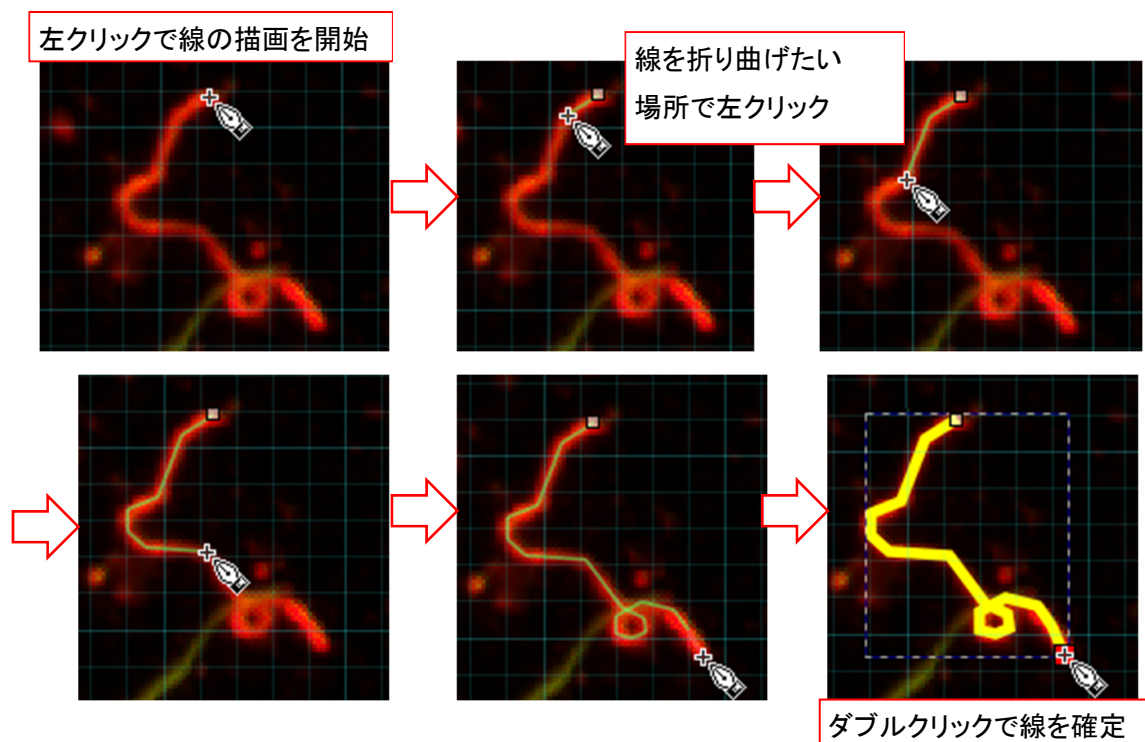


図-7.9 ペン（パス） ツールで繊維をなぞる作業の操作の説明

記入した線は、繊維の色に合わせて色を変更する必要がある。色の変更はカラーバーを用いて行う。カラーバーの説明を図-7.10 に示す。カラーバーは画面の下側に配置されており、通常は左端に×マークがあり、黒、灰色、白、赤、黄色、緑、青などの主要な色が順に並んでいる。記入した線の色は、繊維の蛍光色が赤、黄、黄緑の3色のうちどれに近い目視で判断し、近い色に設定する（カラーコードは、赤は#ff0000、黄色は#ffff00、黄緑色は#00ff00）。

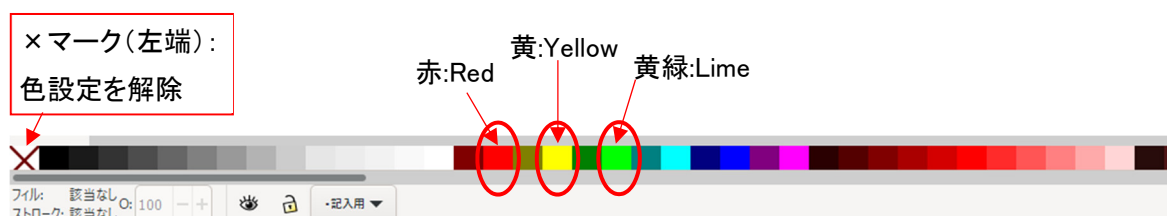


図-7.10 カラーバーの説明

線の色の変更方法の説明を図-7.11 に示す。線を書いた後は、その線が自動的に選択された状態になる。また、選択ツールを選んでいるときは、既に書いた任意の線をクリックで選択状態にすることができる。Shift キーを押しながら画面下のカラーバーを選択することで、選択状態になっている線の色が変更される。

Shift キー無しでカラーバーを選択すると線で囲まれた図形の塗りつぶしが実行される。塗りつぶし状態になったときは、カラーバー左端の×マークを Shift キー無しでクリックすると塗りつぶしを解除できる。



図-7.11 線の色の変更方法の説明

記入した線の太さの設定方法を図-7.12 に示す。Inkscape の画面左下に「ストローク」という表示があり、その右に現在選択されている線の色と太さの情報が表示されている。線の太さを表す数字の上で右クリックすると小さいウインドウが出現し、ここで 3 を選ぶと太さが 3.00 px になる。線の太さは見やすい太さ（例えば 3.00 px）に設定する。

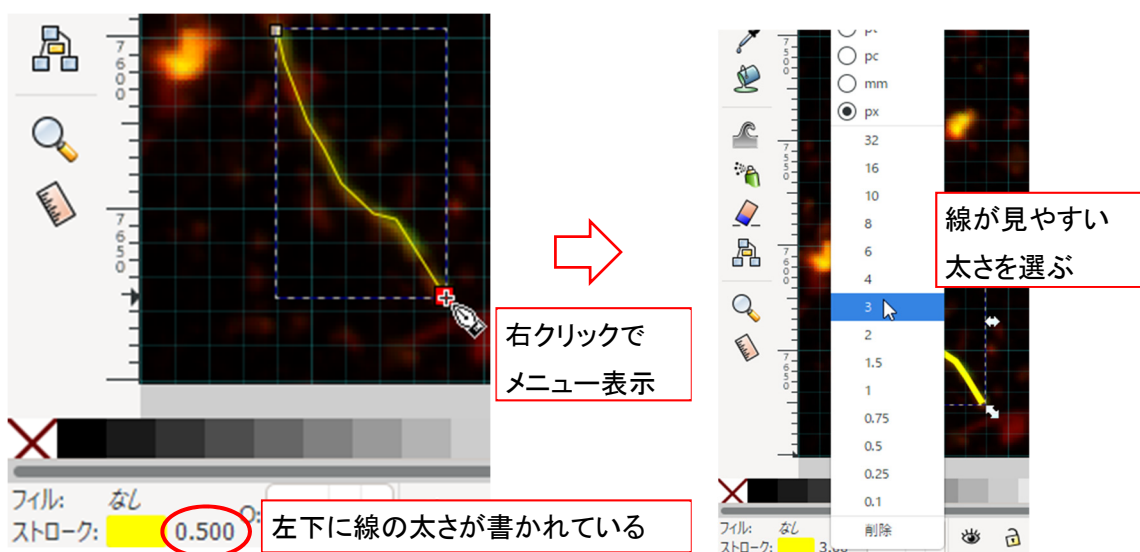
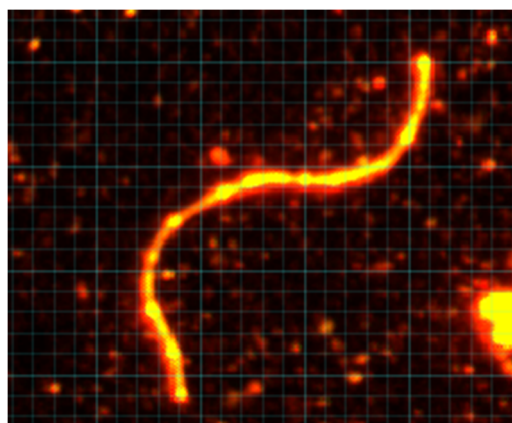


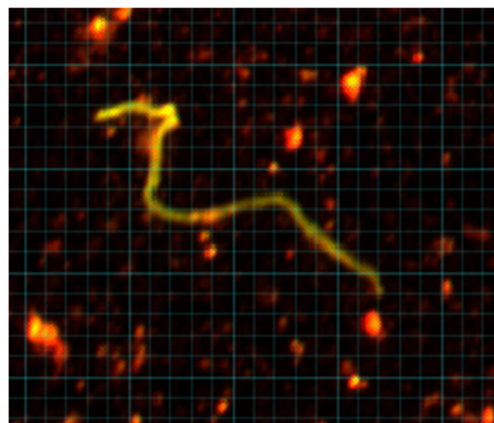
図-7.12 線の太さの設定方法の説明

線を記入する作業では、画面をスクロールさせて蛍光写真に映っている繊維を順序立てて探しながら表示し、それぞれをパスでなぞる。作業工程で繊維の一部がフィルターの外側に散らばる場合があるため、フィルターの外側に位置する繊維も線でなぞる。作業を終えたら、ファイルメニューから名前を付けて保存を選び、Inkscape SVG (.svg) 形式のファイルとして保存して、ファイルを閉じて、次節の 7.4 集計作業を行う。

赤色の繊維の蛍光が強い場合、画素値が飽和して、繊維の中心は黄色で輪郭だけ赤色に見えることがある。本来赤色の蛍光繊維が黄色く見えている例と、黄色い蛍光を示す繊維の例を図-7.13 に示す。このように、繊維をなぞる線の色を選ぶときは、明るく見える繊維が本来の色以外になることもあることに注意する。



赤い繊維であるが、明るさが飽和して黄色に見える例(輪郭は赤色)



黄色繊維(繊維の中心と輪郭がともに黄色を示す)

図-7.13 赤色繊維の画素値が飽和して黄色く見える例

7.4 繊維状マイクロプラスチックの集計方法

Inkscape で編集した SVG ファイルは、繊維を示すパスを XML タグで表現しており、テキストデータとして他のプログラムで編集可能である。そこで、繊維の始点、途中の経路、終点の座標値や色情報などを読み取る R 言語のプログラムを実行し、記入した繊維の本数と長さを集計する。

R 言語の実行には統計解析ソフトウェア R のインストールが必要である。配布サイト (<https://cran.ism.ac.jp/>) にアクセスし、Download R for Windows からインストーラーをダウンロードして、インストールする。

集計プログラムは、以下の 2 つのファイルで構成されている。プログラムは添付の CD に収録されている。

extractDataFromSVG.R … R スクリプトファイル (プログラム本体)
extractSVG_BatchFile.bat … プログラムを実行するためのバッチファイル

集計プログラム実行の流れを図-7.14 に示す。はじめに、集計したい Inkscape SVG ファイルと、上記の 2 つのファイルを同じフォルダに置く。そして、最初にプログラムを使用する前に、バッチファイルをメモ帳で開いて設定を書き換える。その後、バッチファイルをダブルクリックで実行すると、フォルダの中にある、最も更新日時の新しい SVG ファイルが集計され、CSV ファイルが生成される。

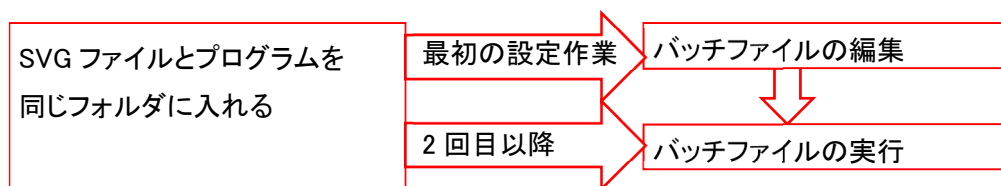
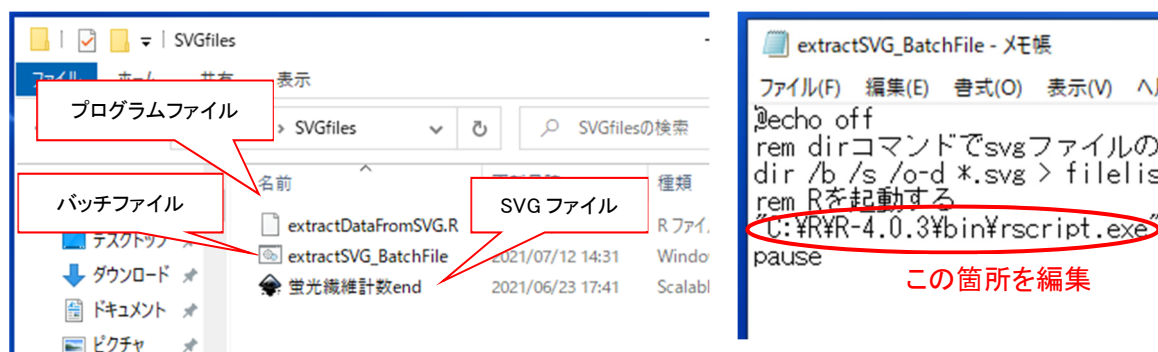
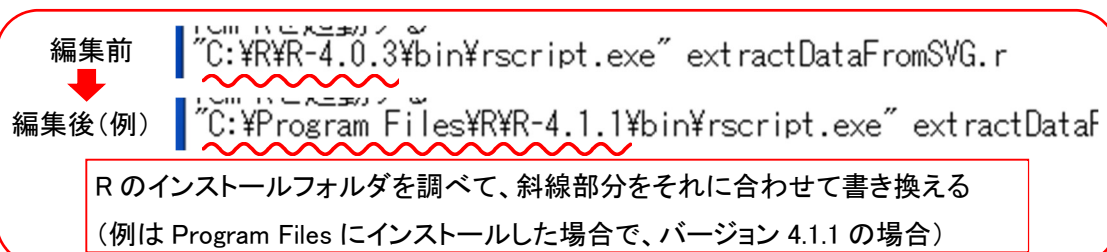


図-7.14 集計プログラムの実行の流れ

バッチファイルの書き換えについての操作説明を図-7.15 に示す。バッチファイルには、R のインストール場所とバージョン番号が書かれている場所がある。バッチファイルを右クリックしてメモ帳で開き、該当部分を実際に使うパソコンの環境に合うように編集した後、上書き保存する。



書き換えた後は上書き保存する。名前を付けて保存を行う場合は、下の説明に従う。

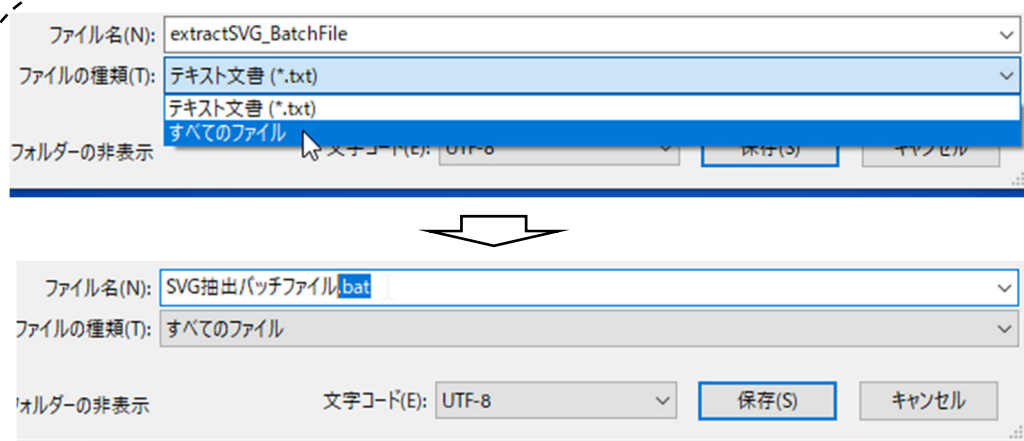


図-7.15 バッチファイルの書き換え方法の説明

集計プログラムが動作を完了した状態の画面を図-7.16 に示す。コマンドプロンプトが表示され、メッセージに「続行するには何かキーを押してください...」が表示されたら Enter キーなどを押して終了する。実行後のフォルダの内容と CSV ファイルを Excel で開いたときのイメージを図-7.17 に示す。フォルダに入っている最も更新日時が新しい SVG ファイル 1 つが読み取られて、同名の CSV ファイルが生成する。

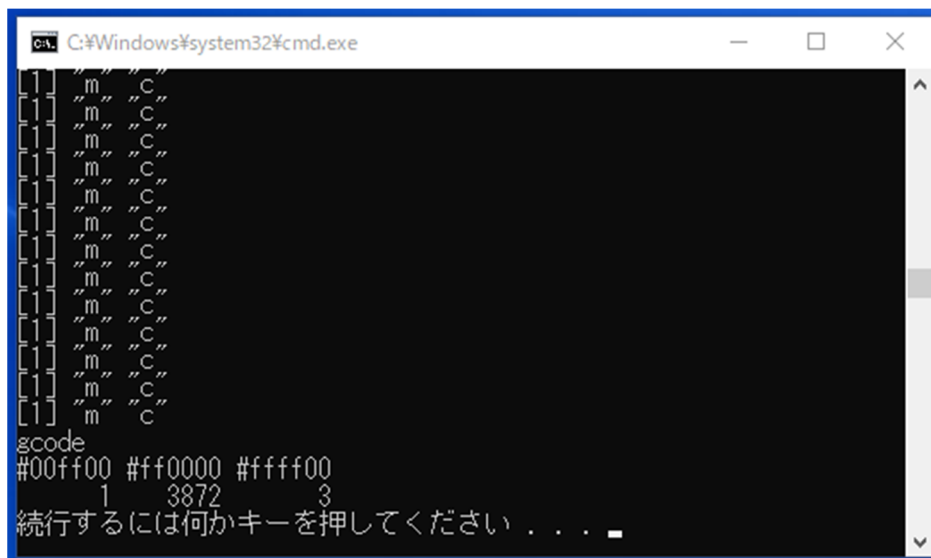
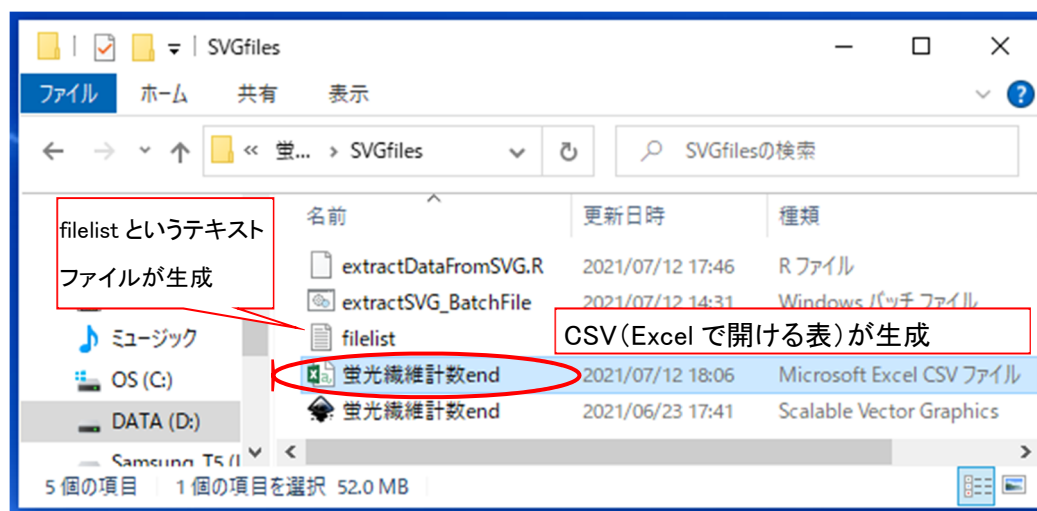


図-7.16 プログラムが最後まで実行され、集計が終了した状態の画面



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	N	path	code	color	length	startend	LocateInSeX	Y			
2	1	path867	#ff0000	Red	55.09089	42.48855	-	10812.62	1540.54		
3	2	path871	#ff0000	Red	45.94699	34.71628	-	10236.96	2071.313		
4	3	path875	#ff0000	Red	27.58829	22.83312	-	10273.92	2083.638		
5	4	path879	#ff0000	Red	29.9275	29.9275	-	10047.71	1840.696		
6	5	path883	#ff0000	Red	26.94781	20.07233	-	9891.03	1860.061		
7	6	path891	#ff0000	Red	18.59045	17.62558	-	10045.96	1928.717		
8	7	path895	#ff0000	Red	111.9596	79.28409	-	9494.05	1595.99		
9	8	path899	#ff0000	Red	92.1871	67.15701	-	9606.72	1581.031		
10	9	path907	#ff0000	Red	95.8646	62.54698	-	9575.036	1636.48		
11	10	path911	#ff0000	Red	65.4055	53.4713	-	9551.261	1644.407		
12	11	path919	#ff0000	Red	30.95947	25.20585	-	9611.999	1668.172		
13	12	path923	#ff0000	Red	193.4189	51.33037	-	9581.194	1699.866		

図-7.17 プログラム実行後のフォルダと、CSV ファイルを開いたときの画面の一部

CSV ファイルに記載されている表の各列の項目名と、その内容の説明を表-7.1 に示す。また、集計方法の説明を図-7.18 に示す。CSV ファイルには、繊維 1 本に対して 1 行のデータが、なぞった線の本数分だけ記載されている。線の色は、「color」列に Red、Yellow、Green と表記されている。列内でそれぞれの数を集計すると、赤、黄、緑色の繊維の本数が得られる。繊維の長さは、「length」列にある、折れ線のピクセル単位の長さから求める。あらかじめ実体顕微鏡で、蛍光写真撮影時と同じ条件で 1 ピクセルが何 μm に換算されるか、定規やノギスなどを撮影して求めておく。1 ピクセル 5 μm の場合には、「length」列の数値の 5 倍が繊維の長さになる。なお、繊維の太さについては、別途高倍率で繊維を観察し計測する必要があるため、本法では測定していない。

表-7.1 繊維の本数データが記載されている CSV ファイルの項目とその説明

記号	1行目にある 名前	説明	データの例
A	N	表の行数。1行が記入した線1本に対応する。	1
B	path	Inkscapeによって割り振られた線のID。	path867
C	code	線の色を表すカラーコード。	#ff0000
D	color	色名。Red, Yellow, Greenの3通り。Lime(#00ff00)で記入した線は、この欄でGreenと表記される。	Red
E	length	線(折れ線)の長さ(単位はピクセル)。	55.09088602
F	startend	線の始点から終点までの直線距離(単位はピクセル)。	42.48854518
G	LocateInSector	扇形図形が配置されている場合、その繊維が何番目の領域に入るかを1から8までの番号で記載。	1
H	X	線の始点のX座標。	10812.619
I	Y	線の始点のY座標。	1540.5401

繊維8本の場合A列が1~8になる

D列は線の色

E列は繊維の長さ(ピクセル数)

表の区切り

繊維の形を表す座標の配列

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	N	path	code	color	length	startend	LocateInSeX	Y		
2	1	path1 732	#ff0000	Red	363.7169	53.94586	-	4403.125	1403.125	
3	2	path1 734	#ffff00	Yellow	306.5611	106.25	-	4559.375	1450	
4	3	path1 736	#ffff00	Yellow	133.289	129.979	-	4600	1371.875	
5	4	path1 738	#ff0000	Red	121.9151	121.9151	-	4728.125	1306.25	
6	5	path1 740	#00ff00	Green	275.8716	220.6392	-	4609.375	1521.875	
7	6	path1 742	#ff0000	Red	1285.736	63.19921	-	4253.125	1412.5	
8	7	path27	#ff0000	Red	243.7466	121.875	-	4218.75	1265.625	
9	8	path29	#ffff00	Yellow	208.2479	32.62596	-	4193.75	1459.375	
10	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
11	1	path1 732	4393.75	1350						
12	1	path1 732	4393.158	1347.98						
13	1	path1 732	4391.357	1342.627						
14	1	path1 732	4388.312	1335.004						
15	1	path1 732		72						
16	1	path1 732		94						
17	1	path1 732	4371.338	1309.131						
18	1	path1 732	4362.946	1303.046						
19	--	--	--	--	--	--	--	--	--	

- ・繊維状マイクロプラスチックの総数は、A(N)の行数となる。
- ・色別に集計したいときは、D(color)ごとの行数を求める。

	色毎の本数
Red	=COUNTIF(\$D\$2:\$D\$9,N12)
Yellow	3
Green	1

- ・COUNTIF 関数などで色毎の集計ができる。

=E2*5.0

	D	E	F	G	H	I	J
	color	length	startend	LocateInSeX	Y		長さ(μm)
10	Red	363.7169	53.94586	-	4403.125	1403.125	=E2*5.0
11	Yellow	306.5611	106.25	-	4559.375	1450	1532.805
12	Yellow	133.289	129.979	-	4600	1371.875	666.4449
13	Red	121.9151	121.9151	-	4728.125	1306.25	609.5753
14	Green	275.8716	220.6392	-	4609.375	1521.875	1379.358

μm 単位の長さは別途式を追加して計算する

- ・繊維状マイクロプラスチックの長さ分布を求めたいときは E(length)を用いる。画像の 1 ピクセルと実際の長さの関係は事前に測定しておく。例えば 1 ピクセル当たり 5 μm の場合は、E(length)の 5 倍が μm 表記の長さになる。

図-7.18 CSV ファイルの内容と集計方法の説明（繊維が 8 本検出された場合）

8. 補足事項

8.1 概要

本章 8.2 に本試験での繊維状マイクロプラスチックの回収率試験の結果について、8.3 に分解操作を施した繊維状マイクロプラスチックおよび Nile Red 染色後の赤外吸収スペクトルの変化の有無について、8.4 に繊維状マイクロプラスチックの計測を一部分のみ行う簡易方法について記載した。

8.2 添加回収試験実施例

活性汚泥にナイロン繊維を添加し、分解処理と蛍光染色を行い、蛍光観察で繊維を計数した回収率試験の結果を表-8.1 に示す。74%程度の回収率が得られている。

表-8.1 ナイロン繊維を活性汚泥に添加した試験における回収率

番号	添加した 繊維 ^{注1} の (本)	活性汚泥の量 (mL)	分解方法 ^{注2}	分解回数	蛍光観察で確認さ れた繊維の数 (本)	回収率 ^{注3} (%)
1	54	50	H ₂ O ₂ 分解	3回	45	83.3
2	54	100	(硫酸鉄の添加	3回	35	64.8
3	56	200	無し)	3回	41	73.2

注1：添加回収試験に使用したナイロン繊維：GoodFellow 社の直径 10 μm のナイロン 6,6 を実体顕微鏡下で長さ約 500 μm になるようにハサミで切り、より（撚り）をほぐした、54 本または 56 本を使用

注2：分解方法は、H₂O₂ 分解のみ

注3：図-8.1 のように、赤色で長さ 500 μm 程度の直線状の繊維を添加した繊維とみなして計数した

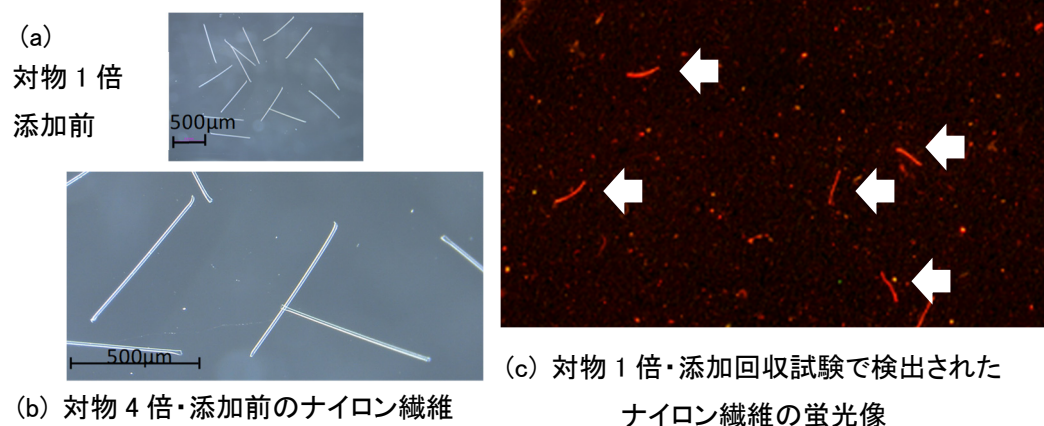


図-8.1 添加回収試験に使用したナイロン繊維の写真

8.3 前処理操作がプラスチックの赤外吸収スペクトルに及ぼす影響

検出された繊維状マイクロプラスチックの種類を判定するためには、FT-IR（フーリエ変換赤外分光光度計）により赤外吸収スペクトルを取得し、スペクトル形状を標準品と比較す

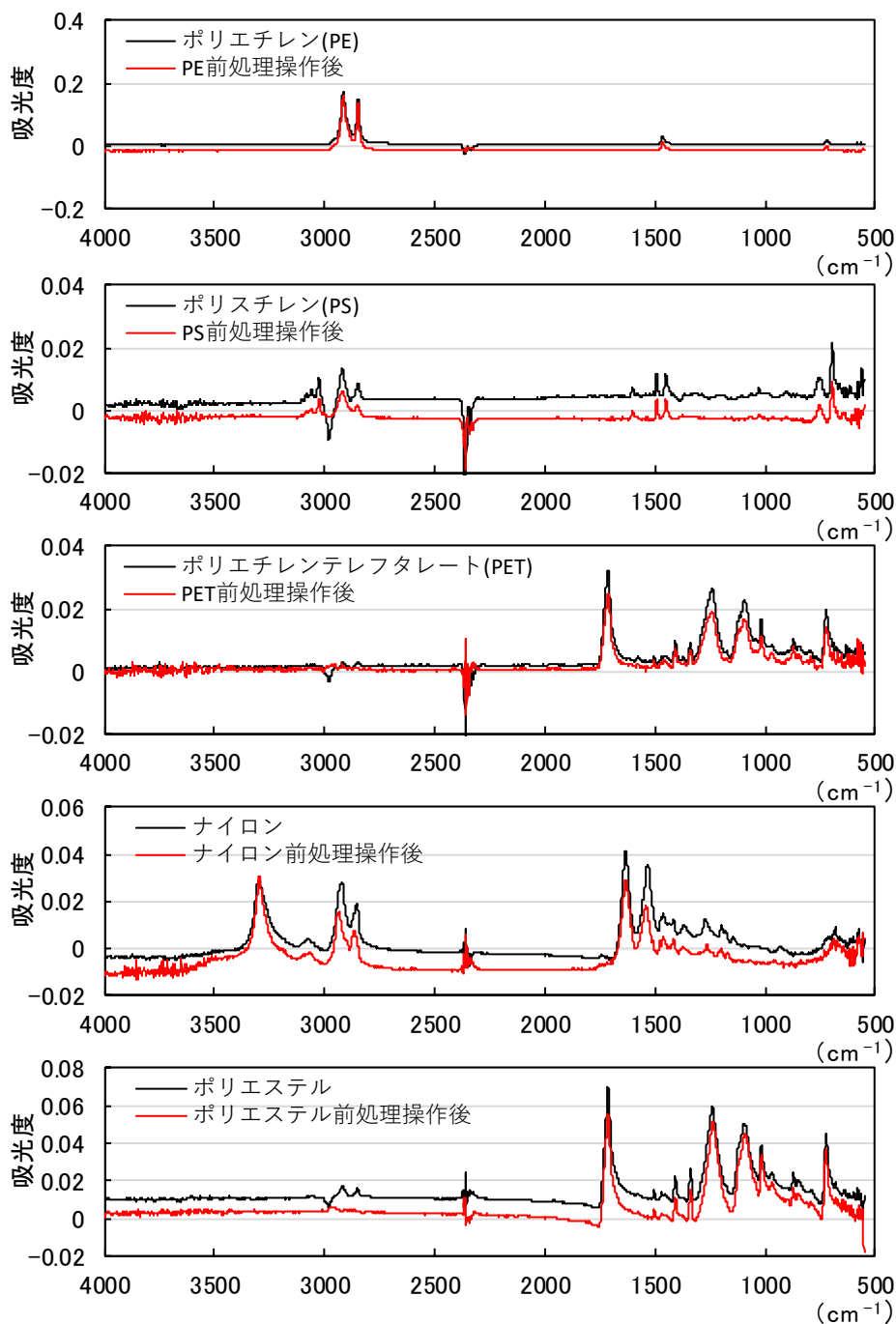


図-8.2 市販の PE, PS, PET, ナイロン, ポリエステル標準品のフェントン反応による分解前後の赤外吸収スペクトル（黒色：前処理操作前、赤色：前処理操作後、日本分光社製 FT-IR 6300 による ATR 法で測定）

る必要がある。そのためには、夾雑物分解の過程でプラスチックが変質せず、赤外吸収スペクトルに変化がないことをあらかじめ確認しておく必要がある^{注1}。

本試験では、30% H_2O_2 に硫酸鉄を添加して加熱しフェントン反応で夾雑物を分解する方法を採用している。PE, PS, PET, ナイロン, ポリエステルの、フェントン反応による分解を行った試料と分解を行っていない試料の赤外吸収スペクトルを図-8.2 に示した。FT-IR 測定は、FT-IR 6300（日本分光）にダイヤモンドプリズムを装着した ATR 装置を取り付け、PE, PS, PET は粒子粉末、ナイロンとポリエステルは素材の明記された市販の糸を ATR 法で測定し、得られたデータは ATR 補正を適用した。本分解操作でプラスチックの赤外吸収スペクトル形状が変わらないことを確認した。

ナイロン繊維の Nile Red 染色前後の赤外吸収スペクトルを図-8.3 に示す。Nile Red 染色で赤外吸収スペクトルに変化がないことも確認している。

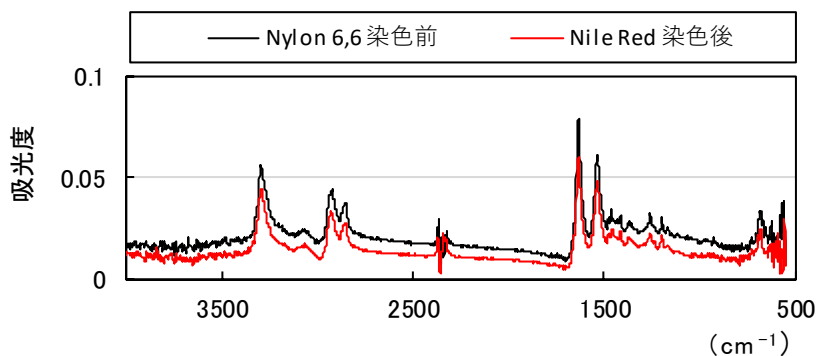


図-8.3 Nile Red 染色したナイロン繊維としていない繊維の赤外吸収スペクトルの比較（日本分光製 FT-IR 6300 による ATR 法で測定）

注1：実試料中の繊維状マイクロプラスチックは短軸 20 μm 以下のものが多く、赤外吸収スペクトルを取得するためには、高解像度のイメージング機能を有する顕微 FT-IR が必要となる。繊維状マイクロプラスチックの分析に 1 ピクセル 2.7 μm の解像度を有する focal plane array (FPA)検出器を備えたイメージング顕微 FT-IR 装置を用いた例¹⁷がある。

¹⁷ S.M. Mintenig, I. Int-Veen, M.G.J. Löder, S. Primpke, G. Gerdt (2017): Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging, Water Research, Volume 108, Pages 365-372, ISSN 0043-1354, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.015>.

8.4 繊維状マイクロプラスチックの簡易計測法

フィルター上に多量の繊維が載っている場合、Inkscape での繊維形状の記入に長時間を要する。一見して繊維の総数が 1,000 本を超えると考えられる場合に、フィルターの一部分のみ繊維の形状を記入して集計することで、集計時間を短縮しつつ全体の本数の推定が可能である¹⁰。

計数しようとする蛍光写真に中心角 22.5° の扇形を組み合わせた図形を配置して、図-8.4 のように中心から放射状に 16 の領域に分割する。Inkscape の円弧ツールで 16 分割になるように作成済みの図形オブジェクトを、蛍光写真の上に貼り付けて、マウスで位置を調整する。図形オブジェクトの中心を厳密にフィルターの中心に合わせることは難しいため、目視でろ過範囲のおおよその中心に図形の中心を合わせて配置する。計数は、16 領域のうち 2 領域を観察対象とする。数えようとする領域のフィルター内部およびフィルター外部（フィルター外部に繊維が存在するケースもある）を対象とし、7 章 7.3 の手順に従って折れ線で繊維を 1 本 1 本なぞる。線上（片側のみ）にある繊維もカウントする。扇形を延長した外側にある繊維も計数対象とする。対象繊維すべてに線を引いたら、集計プログラムで引いた線の本数、色、長さを集計し、本数については計数結果を 8 倍してフィルター全体の本数を求める。

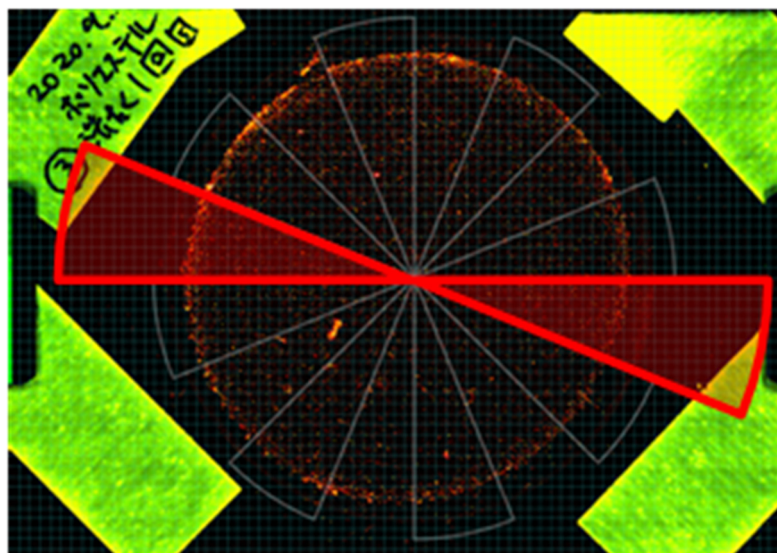


図-8.4 蛍光写真上に配置した図形と計数対象範囲

¹⁰ 鈴木裕識、村田里美、對馬育夫、北村友一、山下洋正、阿部翔太、田中周平：下水中の微細繊維状マイクロプラスチックの調査方法整備の検討、第 58 回下水道研究発表会講演集、pp.356-358、2021

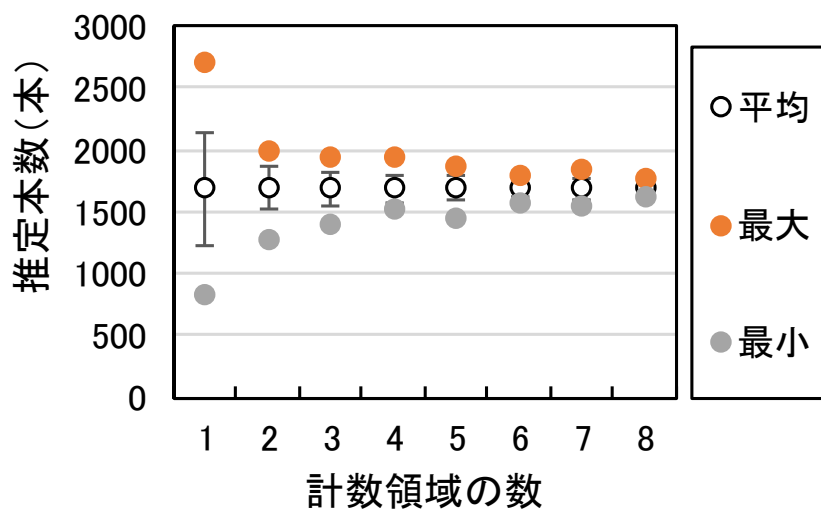


図-8.5 計数領域の配置角度による本数推定結果の変化^{注1}

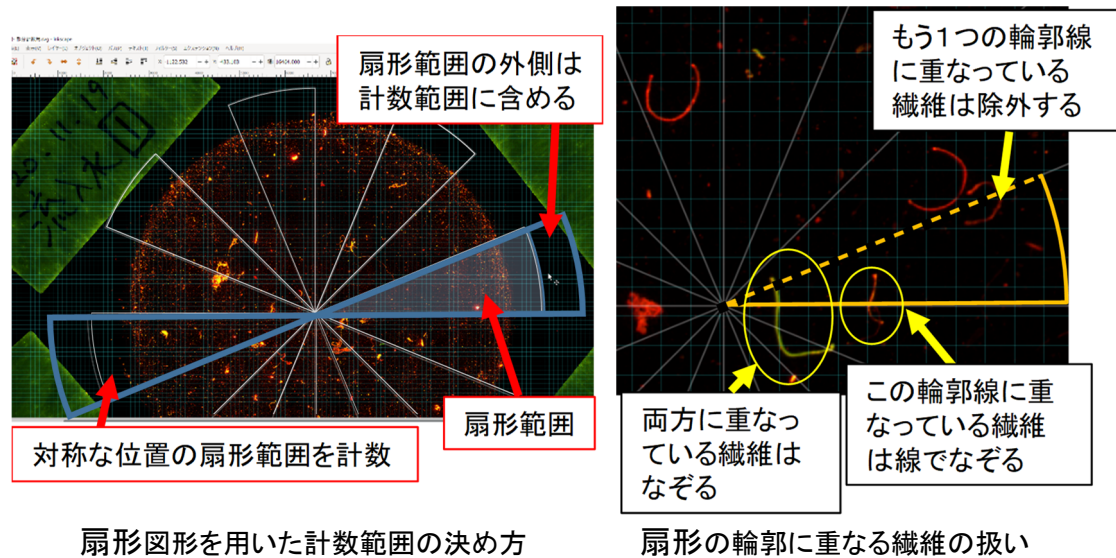
注1：扇形領域（ 22.5° ）を配置する数、すなわち計数する面積を変えたときの本数推定結果の変化を図-8.5に示す。扇形領域を1つ設定した場合、推定結果は最小で832本（計測本数52本）、最大で2704本（計測本数169本）であった。扇形領域を2つ設定した場合、推定結果は最小で1272本（計測本数159本）、最大で1984本（計測本数248本）であった。推定結果のばらつきを小さくするためには、扇形領域は1つではなく2領域以上を対称に配置する方法が望ましい。

蛍光画像のうち一部分のみの計数作業を実行するには、添付のCDに収録されている「001 テンプレート_部分計数用.svg」ファイルを使用する。蛍光画像の貼り付けと位置調整についての説明を図-8.6に示す。初めに、第7章3節の手順に従って「蛍光」レイヤーに蛍光画像を貼り付けて、画像のx, y座標を(0, 0)に設定する。画像の上には扇形を8枚組み合わせた図形が重なって表示される。次に、蛍光画像をマウスドラッグで移動して、蛍光粒子や蛍光繊維が画像に写っている範囲のおおよその中央と、扇形図形の中央が合うようにする。そして、「蛍光」レイヤーをロックして蛍光画像が移動しないようにする。扇形図形は「一部分計数用図形」レイヤーに貼り付けてあるので、ロック状態のまま、動かさないでおく。最後に、記入用レイヤーに切り替える。



図-8.6 一部分計測の場合の蛍光画像の貼り付けと位置調整の説明

繊維を線でなぞる作業は、第 7 章 3 節と同様に行うが、扇形領域 2 つを選んでその範囲と重なっている繊維だけをなぞるようにする。繊維をなぞる範囲についての説明を図-8.7 に示す。選んだ扇形の範囲内と、扇形を外側に延長した部分にある繊維をなぞる。扇形の輪郭の、中心から伸びる 2 本の線に重なっている繊維は、どちらかを決めて、その線に重なっている繊維はなぞり、もう一方の線はなぞらないようにする。集計プログラムには、繊維をなぞった線がどの扇形範囲と重なっているか判定する機能を付けてあるので、扇形の輪郭に重なるすべての繊維に線を記入した場合でも後から適切な本数推定が可能である。



扇形図形を用いた計数範囲の決め方

扇形の輪郭に重なる繊維の扱い

図-8.7 繊維をなぞる範囲と、扇形の輪郭に繊維が重なっている場合の説明

集計プログラムを実行した後の CSV ファイルでは、G 列に何番目の扇形と重なっているかが番号で出力される。扇形の番号についての説明を図-8.8 に示す。計数の対象とした扇形の輪郭線と重なる繊維をすべて線でなぞった場合は、計数対象の扇形に対応する番号の繊維だけを集計する。

2 つの領域を集計した場合は計数した繊維の数の 8 倍、4 つの領域なら 4 倍が、フィルタ一全体の推定本数となる。計数する領域の数の決定方法は、2 領域を数えた時点で 7 本以下のときは全領域、8 本～14 本のときは 8 領域、15～29 本のときは 4 領域、30 本以上のときは 2 領域を計数するなど、検出本数に応じて計測する領域を増減させる方法も考えられる。

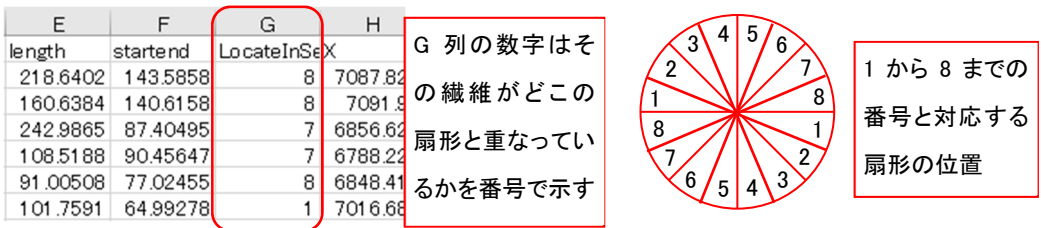


図-8.8 扇形図形の位置と CSV ファイルに出力される番号の関係

8.5 繊維状マイクロプラスチック分析使用器具等の一覧

装置

- ・クリーンベンチまたはクリーンブース
- ・実体顕微鏡（対物レンズ倍率×1～×4 程度）
- ・蛍光ユニット（B 励起光源、530 nm 以上の波長を通すハイパスフィルター）
- ・デジタルカメラ（カラー撮影、2048 画素×1536 画素以上、撮影間隔 25 fps 以上）
- ・パソコンおよびカメラ撮影ソフトウェア（可能なら連続撮影機能付きのもの）
- ・顕微鏡用 X-Y ステージ等

採水器具

- ・メッシュフィルター（孔径 10 μm ） … 金属製メッシュは高価であること、繰り返し利用の際にはコンタミネーションが生じる可能性、ザルに掛けるなどの作業性を考慮し、ナイロン製メッシュフィルターを用いる。ザルに被せるのに十分な大きさに切り、水道水でよく洗って汚れを落としたものを使用する。
- ・ステンレス製ザル … なるべく大きいものを用いる。30 cm × 45 cm の角形のザルを用いて、揚水ポンプで 50 L/min の流量で汲み上げた水を目開き 10 μm のナイロンメッシュに通すと、溢れずに通水が可能である。
- ・クリップ等（メッシュをザルに固定する道具）
- ・揚水ポンプ … 採水量を考慮して適切な揚水能力のポンプを選択する。
- ・ポータブル電源装置 … 屋外で揚水ポンプを動作させるのに十分な出力の電源。
- ・少量採水用の道具（ロープを結び付けた 5 L バケツ等）
- ・採水容器（10 L 容ステンレス缶、1 L ガラスビン等）

前処理器具

- ・47mm 用ガラス製ろ過器
- ・47mm 親水性ポリカーボネートメンブレンフィルター（孔径 10 μm ）
- ・吸引ろ過器具（ろ過器を複数同時に吸引できるマニホールド、吸引瓶、減圧ポンプ）
- ・100 mL 容フラン瓶等（口部にろ過器のゴム栓がフィットするサイズのもの）
- ・メスシリンダー（1 L）
- ・ビーカー（1 L、500 mL、100 mL）
- ・広口ガラス瓶（1 L）
- ・洗ビン（純水用、エタノール用）
- ・駒込ピペット（10 mL）
- ・マイクロピペット（20～200 μL 、100～1000 μL 、1～10 mL）
- ・50 mL ポリプロピレン製遠心管

- ・ O リング（内径 43 mm 程度、フィルターより小さいもの）
- ・ ろ紙用ピンセット 2 本
- ・ 大型スライドグラス（52 mm×76 mm）
- ・ 大型カバーグラス（50 mm×70 mm）
- ・ 仮止め用テープ

試薬

- ・ 30% H_2O_2 … 1 検体につき 30 mL 程度使用する。
- ・ 0.5M FeSO_4 … $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 139 mg を純水 1 mL に溶解する（用時調製）。
- ・ 2N HCl … 35%塩酸 40 mL を純水で 200 mL に希釈する。
- ・ 5.3M NaI … NaI 397.2 g を 1 L ビーカーにとり、純水を約 400 mL 入れて攪拌して溶解し、500 mL メスフラスコに移して標線まで水を加える。試薬の溶解時に空気中から混入した微粒子を除去するため、孔径 0.2 μm の PTFE またはポリカーボネートのフィルターでろ過してガラス瓶に入れ、アルミ箔で遮光して冷蔵保存する。
- ・ Nile Red ストック液（1 mg/mL） … Nile Red 10 mg をアセトンに溶解して 10 mL にする。0.2 μm のシリンジフィルター（フィルターの種類は問わない）でろ過してガラスバイアルに入れ、遮光して 5°C で保存する。1 年程度保存可能。
- ・ Nile Red 染色液（0.01 mg/mL） … エタノール 9.9 mL に Nile Red ストック液 100 μL を加える。シリンジフィルターは通さなくてもよい。遮光して 5°C で保存する。

水

試薬の調製や各種器具の洗浄には、純水製造装置の純水か、孔径 0.2 μm のフィルターでろ過して微粒子や繊維を除去した清浄な水を用いる。超純水は必ずしも必要ではない。水のブランクを正確に評価するのは大量の水が必要になるため困難であるが、簡易な評価として、孔径 0.2 μm のポリカーボネートフィルターで 1 L をろ過して、シャーレなどにフィルターを入れて実体顕微鏡でろ過面を白色光で観察し、繊維がないことを確認する。メッシュやザルなど、水道水で洗浄する器具もあるため、水道水についても事前に繊維の混入量を把握しておくことが望ましい。

データ解析

実体顕微鏡で撮影した画像データを解析するパソコンは、データ量約 1 GB の画像データを編集するため、RAM 8 GB 以上が望ましい。データ解析に使用するソフトウェアは、FIJI（ImageJ, <https://fiji.sc/>）、Inkscape（<https://inkscape.org/>）、R（<https://cran.ism.ac.jp/>）、Excel（Microsoft Office）である。

表-8.2 土木研究所で使用した装置や器具等の例 ^{注)}

装置	実体顕微鏡	Leica S8 APO
	蛍光ユニット	バイオツールズ BT-ExSMH
	デジタルカメラ	ToupTek E3CMOS03100KPB
採水器具	ナイロンメッシュザル	NYTAL 目開き10 μ mナイロンメッシュ NY10HC 丸形は直径25cm、角形は30cm×45cmを使用
	揚水ポンプ	ツルミポンプ 残水吸排水用スリープポンプLSP1.4S
	ポータブル電源装置	EcoFlow EFDELTA1300-JP
前処理器具 蛍光染色器具	ガラス製ろ過器	ADVANTEC 減圧ろ過用フィルターホルダー KG-47
	メンブレンフィルター	Millipore アイソポア (Isopore) メンブレン TCTP04700
	マニホールド	6連マニホールド
	吸引瓶	10L容の吸引瓶
	減圧ろ過用ポンプ	ULVAC ダイアフラムポンプ DA-40S
	フラン瓶	三商 定量ふらん瓶 ガラスカラー 100mL
	マイクロピペット	SIBATA 分注器ガラスデジフィット
	Oリング	ADVANTEC プラスチックホルダー PP-47から外して使用
	大型スライドグラス	MATSUNAMI 大型スライドグラス S091120
	大型カバーグラス	MATSUNAMI カバーグラス C050701
試薬	仮止め用テープ	アズワン カラーラベルCL-1 黄
	30%過酸化水素水	Wako 精密分析用 500mL 086-07445
	硫酸鉄(II)七水和物	Wako 特級 25g 094-01082
	ヨウ化ナトリウム	Wako 特級 500g 198-02275
	Nile Red	Sigma-Aldrich Technical grade N3013-100MG
	エタノール	Wako LC/MS用 1L 050-09221
	塩酸	Wako 試薬特級 500mL 080-01066
ソフトウェア	顕微鏡観察画像の撮影	ToupView version 3.7.10121
	画像連結処理	FIJI (ImageJ) version 1.53c
	繊維形状の記入	Inkscape version 1.0.2
	集計プログラム実行	R version 4.0.3
	表計算	Excel (Microsoft Office)

注：上記は一例であり、これらの製品を推奨するものではない。

謝辞

本分析マニュアルに掲載した、下水試料中の繊維状マイクロプラスチックの分析方法の最適化、画像処理技術の開発に当たっては、水質チーム派遣職員 阿部翔太氏、実験操作、顕微鏡による計測、集計は水質チーム非常勤職員 五味恭子氏により実施されたものである。ここに記して謝辞を表す。

また、採水にご協力いただいた自治体にここに記して感謝申し上げます。

共 同 研 究 報 告 書
Cooperative Research Report of PWRI
No.558 June 2022

編集・発行 © 国立研究開発法人 土木研究所

本資料の転載・複写の問い合わせは
国立研究開発法人 土木研究所 企画部 業務課
〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6 電話 029-879-6754