

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

研究予算：運営費交付金

研究期間：平成 29～令 3

担当チーム：流域水環境研究グループ（水質）

研究担当者：山下洋正、小川文章、北村友一、
對馬育夫、村田里美、鈴木裕識

【要旨】

本研究では、下水に含まれるナノ物質の水生生物影響と下水処理過程での挙動、繊維状マイクロプラスチックの分析法の構築、それらの下水処理過程での挙動、化学繊維製タオルの洗濯実験による繊維の発生量調査および水生生物に与える影響について調査した。

ナノ物質のうち銀ナノ粒子については、サイズ分画を行った下水流入水および処理水に銀ナノ粒子を添加した培地でムレミカツキモを用いた藻類増殖阻害試験を行った。その結果、10 kDa より大きい画分では、銀ナノ粒子が下水中に含まれる溶存化合物と共存することで、銀ナノ粒子の持つ毒性が軽減されることが示唆された。酸化チタンについては下水処理場で実態調査を行い、下水中の酸化チタン濃度は処理過程で 91.3%低減し、汚泥に移行することが示された。

繊維状マイクロプラスチックの分析法については、フェントン反応と比重分離で夾雑物を除去した後にプラスチックを蛍光染色観察する方法を取りまとめた。実態調査からは、繊維状マイクロプラスチックの下水処理場での除去率は 98.9%以上で、放流水中の濃度は 0.4～13.2 本/L となり、ポリエステルやナイロンと考えられる赤色蛍光繊維が大部分を占めることを明らかにした。化学繊維製タオルの洗濯実験からは、ポリエステルでは 200 μ m 以下、ナイロンでは 200～500 μ m の長さの繊維が多く検出された。

マイクロプラスチックの水生生物への影響については大きさや種類の異なる 8 種の MPs を用いて、ムレミカツキモの増殖に与える影響を検討し、ナイロン 6 粒子が静電的に吸着することで、ムレミカツキモの増殖に影響を与えることを明らかにした。また、蛍光ポリエステル布を実際に洗濯することでポリエステル繊維を調製し、それらを孵化直後のヒメダカに曝露することで、生理学的、オミックス解析の両面から影響を明らかにした。

キーワード：ナノ物質、繊維状マイクロプラスチック、分析法、実態調査、洗濯、ムレミカツキモ、メダカ

1. はじめに

近年、ナノテクノロジーの進歩により、炭素粒子や金・銀、チタン等の金属粒子の特性を利用したナノ粒子工業品が年間数%の生産量の伸び率で増加し、下水道を介し、水環境中へ放出され得ることが懸念されている。また、プラスチック製品が劣化し細かくなったものや洗顔料などに使用されるマイクロビーズなどのマイクロプラスチックも、水生生物の成長等に影響を及ぼす等の研究結果が報告されている。2016 年 5 月の G7 環境大臣会合では海洋ゴミ（マイクロプラスチック）について、「陸域を発生源とする海洋ゴミの発生抑制と削減」「マイクロプラスチックの生態系への影響評価のための科学的な研究」などの施策の実施が約束された。これらの物質は毒性が高いことがラゴ実験から明らかになっているが、様々な物質が共存する自然環境において、その影響は明らかにされていない。特

に、下水に含まれるナノ物質・マイクロプラスチックの挙動や影響については、研究手法すら確立されていない。下水道の技術開発に関する中長期的な計画・方向性を示す「下水道技術ビジョン」ロードマップに「環境中における微量汚染物質の測定技術の確立と影響評価」が示されており、学術的にも行政的にも研究開発が求められている。

本研究では、ナノ物質については、下水に含まれるナノ物質の水生生物影響の評価、マイクロプラスチックについては、繊維状マイクロプラスチックの分析法の構築と、それらの下水処理過程や放流先における挙動、化学繊維製タオルの洗濯実験による繊維の発生量調査および水生生物に与える影響を明らかにすることを目的として、平成 29 年度から令和 3 年度にかけて実施された。

2. ナノ物質について

2.1 研究背景

近年、ナノテクノロジー産業の発展につれて、ナノ材料が環境中へ流出することが問題視されつつある。ナノ粒子は粒径が 100 nm 未満の物質の総称で、有機物・無機物を問わず数多くの種類が存在する¹⁾。その中でも、今後、使用量の増加が見込まれる銀ナノ粒子と酸化チタン (TiO₂) に着目し、研究を行った。銀ナノ粒子は、化粧品や洗剤に含まれており、抗菌作用や導電性、易加工性を持ち、応用性が高く使用用途は多岐に渡る²⁾。酸化チタン(TiO₂)は紫外線散乱機能を有するため、粒径 100 nm 以下に設計された TiO₂ ナノ粒子は日焼け止め化粧品等に多く使用されている。

家庭や工場で使用された銀ナノ粒子は下水に流入し、下水処理場へ運ばれ、下水処理過程で大部分が汚泥系に移行する。しかし、一部の銀ナノ粒子は除去されずに放流され、水生生物に影響を与える可能性が指摘されている^{3),4)}。

これまでに銀ナノ粒子の水生生物への単独影響についてはいくつか研究報告例がある。一方で、製品から漏出した銀ナノ粒子は、環境中においては、水中に含まれる化学物質と共存していると考えられることから、共存する化学物質と銀ナノ粒子の水生生物への複合影響を評価しなければならない。そのような研究は、魚類 (*Danio rerio*) に対して行った既往研究例⁵⁾を除きほとんどないのが現状である。生物毒性試験では、試験に使用した生物によって、別々の化学物質と反応している可能性が指摘されており、同じ下水と銀ナノ粒子を用いた複合影響試験でも、試験に使用する生物が異なれば、異なる影響が確認される場合がある⁶⁾。また、複合影響を引き起こす下水中の化学物質の探索を行った研究も存在しない。そこで、本研究では下水と銀ナノ粒子の複合影響 (相加・相乗・相殺) を評価すること、及び、銀ナノ粒子と複合影響を引き起こす下水中に含まれる化学物質について知見を得ることを目的とした。

TiO₂ ナノ粒子は人間の皮膚は通過しないが、藻類細胞に付着した TiO₂ ナノ粒子が日光を遮断し、成長を阻害する可能性が示唆されるなど、水環境中に放出された TiO₂ ナノ粒子が水生生物に与える影響が懸念されはじめています。既に国外では消費者製品から TiO₂ ナノ粒子が水環境中へ流出していることが確認されており、夏場になると多くの行楽客が水浴びをしに訪れる河川では、行楽客の増加と共に河川水中の Ti 濃度が上昇することが明らかになっている⁷⁾。日本国内での TiO₂

ナノ粒子使用量は平成 18 年時点でナノ物質の中では 2 番目となっており、今後も使用量の増加が見込まれている。

事業所や家庭などから排出された TiO₂ ナノ粒子は一般に下水処理場を経由して環境中に放流される。TiO₂ ナノ粒子の環境影響を評価するためには、下水実放流水中に含まれる TiO₂ ナノ粒子量の他、下水処理過程における除去・低減挙動を明らかにする必要がある。特に国内の公共下水を対象として TiO₂ ナノ粒子を定量した事例は未だに存在せず、実態把握が急がれる。そこで本研究では国内の下水処理場におけるチタンの物質収支を算出すると共に、粒径 100 nm 未満の TiO₂ ナノ粒子に着目した流入・流出挙動の解明を試みた。

2.2 銀ナノ粒子と下水の複合影響の検討

2.2.1 実験方法

2.2.1.1 下水の採取とサイズ分画、本研究で用いた銀ナノ粒子

工場排水を主流入源とする下水処理場の流入原水と処理水 (塩素注入前) をコンボジット採水し、各試料を 0.1 μm、0.02 μm、0.01 μm、50 kDa、10 kDa の順に膜ろ過を行うことで、流入原水と処理水の各サイズ分画を得た。サイズ分画フロー図を図-1 に示す。ろ過方式はクロスフローとした。0.1 μm、0.02 μm、0.01 μm の膜はポリスルホン製中空糸膜 (マイクロザ UF 膜 : 旭化成ケミカルズ)、50 kDa、10 kDa の膜はポリスルホン製平膜 (ULTRAFILTER : ADVANTEC) を使用した。また、超純水を同様の分画方法でろ過することで、装置由来の化学物質を含むブランク試料を採取した。

実験で用いた流入原水、処理水中に含まれる金属イオンを ICP-MS (X7CCCT : サーモフィッシャーサイエントフィック) を用いて分析したところ、流入原水・処理水中の溶存態銀濃度は定量下限未満 (<0.05 μg/L) であった。そのため、本試験では銀ナノ粒子標準液 (10 nm particle size (TEM), 730785, SIGMA-ALDRICH[®]) を添加して行った。この銀ナノ粒子は表面に有機物などのコーティングがなされていないため、下水中に含まれる化学物質と銀ナノ粒子以外の生物影響はないと仮定した。

2.2.1.2 水質分析項目

2.2.1.1 で分画された試料の水質分析を行った。DOC、DN については、TOC 計 (TOC-L : 島津製作所) を用いて測定した。UV254 については、紫外可視分光光度計 (UV-1800 : 島津製作所) を用いて測定した。

2.2.1.3 単独影響試験による実験条件の決定

サイズ画分試料を得た際に、ろ過を行った装置から溶出する化学物質が藻類生長阻害に影響しているのかの確認を行うために、超純水を 2.2.1.1 と同様にサイズ画分して、得られたブランク試料について生物影響試験を行った。対照区と比較して、特定の試料割合で影響が確認された場合、影響が確認されなかった試料割合を最大試料割合とした。次に、銀ナノ粒子、流入原水、処理水の各単独影響試験を行い、試料割合や濃度と、阻害率の関係を評価し、複合影響試験時の実験条件を決定した。

2.2.1.4 藻類生長阻害試験

生物影響試験は「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」⁸⁾を参考に緑藻ムレミカツキモ (NIES-35) を用いて行った。対照区は AAP 培地とし、各下水試料には AAP 培地作成時と同等の栄養塩を添加した。各試料は孔径 0.22 μm のフィルターでろ過滅菌を行った。容量は 10 mL/容器とし、対照区は 6 連、各試験区は 3 連とした。初期細胞濃度 1.0×10^4 cells/mL、温度 24 °C、光強度 40 μmol/m²/s 連続照射、回転振とう速度 100 rpm とした。開始から 72 時間後に対照区と各試料の細胞濃度を求め、藻類生長速度 (day⁻¹) と藻類生長阻害率 (-:無次元)を、それぞれ式(1), (2)により算出した。

$$\text{生長速度}[\text{day}^{-1}] = \{\ln(72 \text{ 時間後の藻類濃度}[\text{cells/mL}]) - \ln(\text{初期藻類濃度}[\text{cells/mL}])\} \div 3[\text{day}] \quad (1)$$

$$\text{阻害率}[-] = \frac{(\text{対照の平均生長速度} - \text{試験区の平均生長速度})[\text{day}^{-1}]}{(\text{対照の平均生長速度})[\text{day}^{-1}]} \quad (2)$$

2.2.1.5 複合影響評価

複合影響予測モデルを用いて複合阻害率の予測値を算出し、複合阻害率の実測値との比較を行った。複合影響予測モデルは化学物質同士の相乗・相殺効果を考慮せず、相加効果であることを仮定したモデルのため⁶⁾、予測モデルにより算出した複合阻害率の予測値と実測値を比較することで、相加効果や相乗効果、相殺効果といった複合影響評価が可能となる。複合阻害率の予測値よりも実測値のほうが高ければ相乗効果、低ければ相殺効果、同等であった場合は相加効果とした。複合阻害率の予測値 (-:無次元) は、下式(3)により算出した⁹⁾。

$$\text{予測値}[-] = 1 - (1 - R_{Ag}) \times (1 - R_{Ef}) \quad (3)$$

R_{Ag} : 銀ナノ粒子単独阻害率[-], R_{Ef} : 下水単独阻害率[-]

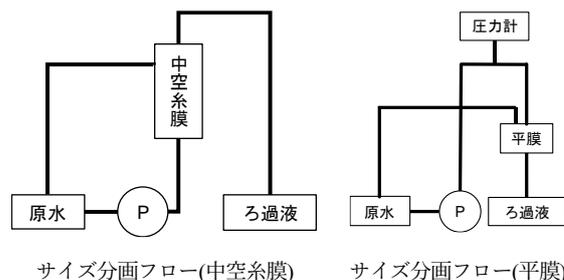


図-1 サイズ分画時のフロー

表-1 処理水の水質データ

流入原水 DOC、DN [mg/L]					
項目	0.1 μm 未満	0.02 μm 未満	0.01 μm 未満	50 kDa 未満	10 kDa 未満
DOC	27.9	26.7	26.0	21.7	17.3
DN	23.3	19.1	19.5	18.9	13.8
UV ₂₅₄	0.517	0.473	0.500	0.462	0.353
処理水 DOC、DN [mg/L]					
項目	0.1 μm 未満	0.02 μm 未満	0.01 μm 未満	50 kDa 未満	10 kDa 未満
DOC	13.3	11.1	11.3	11.9	12.2
DN	15.3	13.8	13.0	14.7	14.1
UV ₂₅₄	0.342	0.340	0.329	0.316	0.293

また、得られた生長速度について、流入原水、もしくは処理水の各サイズ画分間に有意差の有無を確認するために、R version 3.3.0¹⁰⁾を用いて、統計解析を行った。等分散性の検定のために Bartlett 検定を行い、等分散性を検討した。等分散性を仮定できる場合は、Tukey-kramer 検定を行い、試験区間の有意差の有無を確認した。等分散性を仮定できない場合は、Steel-Dwass 検定を行い、試験区間の有意差の有無を確認した。なお、有意水準は p=0.05 とした。

2.2.1.6 複合影響要因物質探索

2.2.1.5 において、流入原水や処理水の各サイズ画分+銀ナノ粒子の複合影響試験で、サイズ画分間で生長速度に有意差が確認された範囲について、励起蛍光マトリクス (EEM) を測定した。測定励起・蛍光幅は 220 nm~600 nm、励起・蛍光サンプリング間隔は 5 nm、励起・蛍光スリット幅は 10 nm、ホトマル電圧を 400 V とした。また、測定前に 450 μg/L の硫酸キニーネ (C₄₀H₄₈N₄O₄·H₂SO₄) を使用して、標準化を行った。測定後、得られた EEM について、グラフ描写ソフト (Origin Pro 2016J) により、縦軸を励起波長、横軸を蛍光波長、高さ軸を蛍光強度として、3 次元等高線図を作成した。

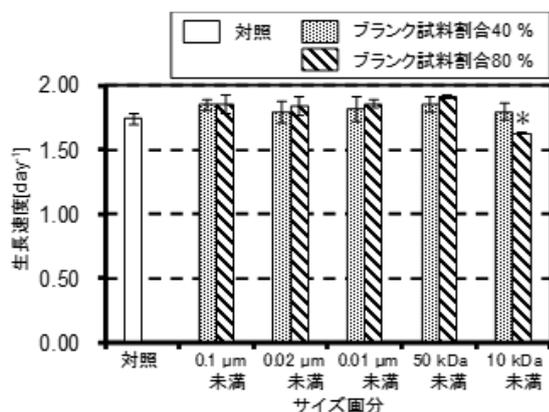


図-2 緑藻ムレミカツキモに対するブランクによる生長速度変化

* : 対照区よりも有意な低下を確認 (p<0.05)

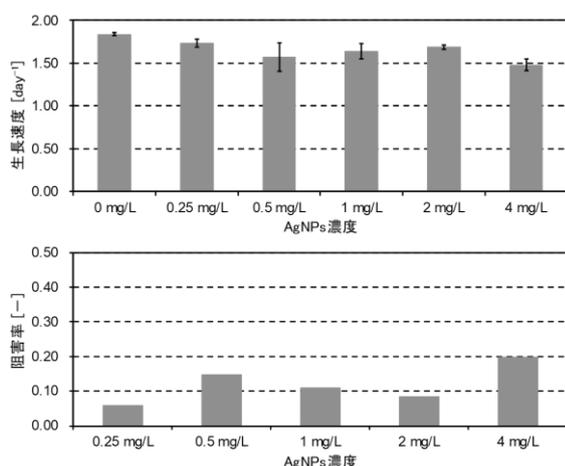


図-3 銀ナノ粒子濃度を変えた単独影響試験による生長速度および阻害率の変化

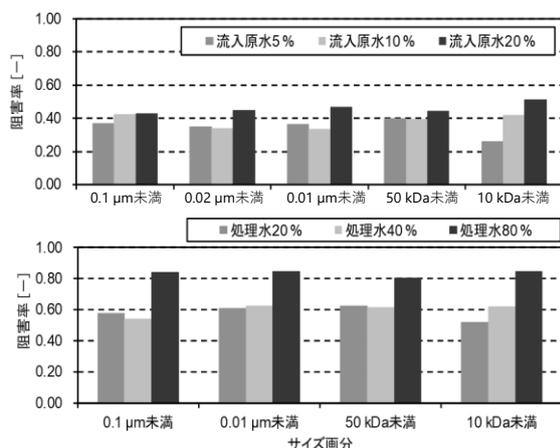


図-4 流入原水および処理水の濃度を変えた単独影響試験による阻害率の変化

2.2.2 結果と考察

2.2.2.1 単独影響試験による実験条件の決定

流入原水と処理水の各サイズ画分の水質 (DOC, DN, UV₂₅₄) を表-1 に示す。また、ブランク試験の結果を図-2 に示す。図-2 より、10 kDa 未満のブランク試料を80%混合させたとき、藻類の生長速度の低下が観察された。したがって、10 kDa の試料を80%混合した培地では、毒性評価試験で影響が出たとしても、下水に含まれる化学物質が原因なのか、装置そのものから溶出した化学物質が原因なのかが不明となる。そのため、複合影響評価試験では10 kDa のサイズ画分においては、混合割合を最大40%とした。また、銀ナノ粒子、流入原水、処理水の各単独影響試験の結果を図-3 および図-4 に示す。本実験条件では、銀ナノ粒子は濃度と阻害率に明確な関係が確認されなかったため、1 mg/L で実験をすることにした。流入原水を用いた単独影響試験では、混合割合が5%の場合でも、阻害率が約0.4と生長阻害が起こることを確認した。また、混合割合が5%、10%の場合は、小さい画分において阻害率が低下する場合があったが、20%の場合はやや増加する傾向が見られた。よって、複合影響評価試験時の評価の簡易性を考慮して、混合割合を20%とすることとした。処理水を用いた単独影響試験では、混合割合が80%の場合は、阻害率が0.8と大きく、複合影響が評価しにくくなると判断した。また、混合割合が20%と40%においては顕著な差はなかったため、複合影響評価試験では、処理水の試料割合を20%で行うこととした。

2.2.2.2 複合影響評価

複合影響試験で得られた各サイズ画分における生長速度を図-5 に示す。流入原水を用いた場合、全ての画分において、銀ナノ粒子を添加した系では添加していない系と比べ生長速度の低下が見られた。処理水を用いた場合、10 kDa 未満の画分では、銀ナノ粒子を添加した系では添加していない系と比べ生長速度は低下したが、それ以外の画分では、銀ナノ粒子を添加した系の方が生長速度は大きかった。

図-5 の結果から算出した流入原水と処理水における複合阻害率予測値と実測値を表-2 に示す。全て画分において、複合阻害率は、予測値よりも実測値が低くなったが、処理水の10 kDa 未満の画分では、実測値と予測値がほぼ同等であった。したがって、既往研究⁹⁾の判定式に当てはめると、処理水の10 kDa 未満のサイズ画分では、予測値と実測値がほぼ同じため相加効果、それ以外の画分では相殺効果と判定された。

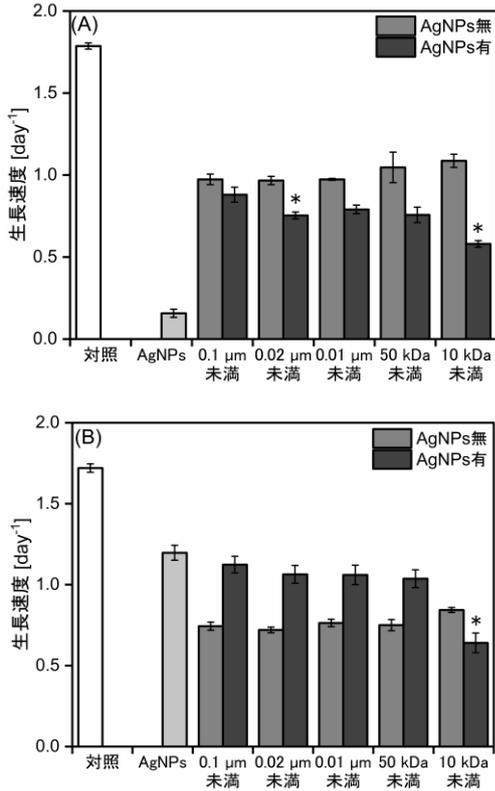


図-5 緑藻ムレミカツキモに対する下水+銀ナノ粒子による生長速度変化
(A) 流入原水、(B) 処理水
* : 一つ大きいサイズ画分よりも生長速度の有意な低下を確認 (p < 0.05)

表-2 銀ナノ粒子の単独阻害率、流入原水と処理水の各画分の単独阻害率及び単独阻害率から算出された複合阻害率予測値と実測値. (A): 流入原水、(B): 処理水

(A)

サイズ画分	AgNPs 単独阻害率 [-]	流入原水 単独阻害率 [-]	複合阻害率 予測値 [-]	複合阻害率 実測値 [-]
0.1 μm 未満	0.912	0.455	0.952	0.507
0.02 μm 未満		0.459	0.952	0.578
0.01 μm 未満		0.455	0.952	0.558
50 kDa 未満		0.414	0.948	0.576
10 kDa 未満		0.392	0.946	0.675

(B)

サイズ画分	AgNPs 単独阻害率 [-]	処理水 単独阻害率 [-]	複合阻害率 予測値 [-]	複合阻害率 実測値 [-]
0.1 μm 未満	0.304	0.568	0.699	0.347
0.02 μm 未満		0.581	0.708	0.382
0.01 μm 未満		0.556	0.691	0.384
50 kDa 未満		0.564	0.697	0.397
10 kDa 未満		0.51	0.659	0.628

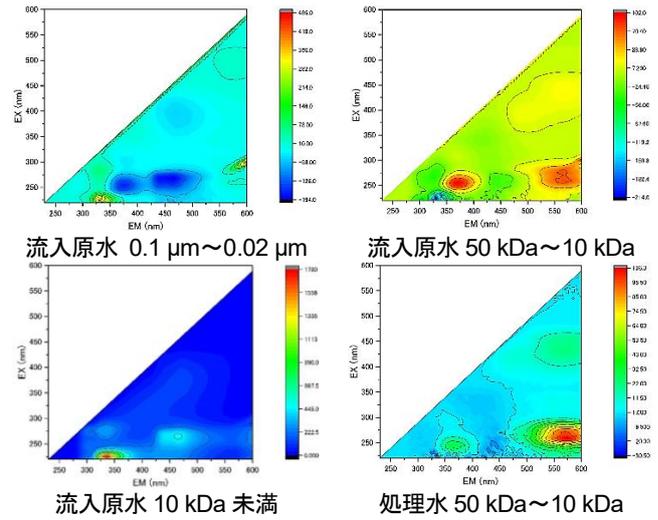


図-6 流入原水・処理水の EEM データ

2.2.2.3 複合影響要因物質の詳細分析

各サイズ画分について EEM 測定を行った。そのうち、特徴的なピークが見られた、流入原水中の 0.1 μm~0.02 μm の画分、50 kDa~10 kDa の画分、10 kDa 未満の画分、処理水中の 50 kDa~10 kDa の画分の結果を図-6 に示す。既往研究と比較した結果、これらのピークは表-3 のような有機物であると推定された。

Elke らが行った研究では、*Danio rerio* において、銀ナノ粒子と下水の複合影響は相殺効果であることが示唆されている⁹⁾。Chappell らは、市販のフミン質に銀ナノ粒子を添加することで、キレート反応により、銀ナノ粒子の毒性が低減されることを確認した¹¹⁾。本研究においても、流入原水・処理水ともにフミン質様物質の存在が確認された。流入原水に関しては、キレート反応により、銀ナノ粒子の毒性が低減したと考えられる。推定された有機物は、フミン質様物質の他に、フルボ酸様物質やタンパク質様物質も検出され、これらの有機物もキレートを作る可能性があることが示唆された。また、処理水に関しては、流入原水とは異なる現象が考えられ、今後、研究を深めていく必要がある。

表-3 図-6 より推定されたサイズ毎の有機物

	サイズ	観測された物質(EX/EM)
流入原水	0.1 μm~0.02 μm	トリプトファン様物質(225/325)
	50 kDa~10 kDa	タンパク質様物質(250/375) フルボ酸様物質(275/570)
	10 kDa 未満	トリプトファン様物質(225/330) チロシン様物質(275/330) フミン質様物質(275/450)
処理水	50 kDa~10 kDa	フルボ酸様物質(250/575) タンパク質様物質(250/375) フミン質様物質(450/575)

2.2.3 まとめ

サイズ分画した下水試料と銀ナノ粒子を用いて藻類生長阻害試験を行った。その結果、流入原水中に銀ナノ粒子を添加した場合、含まれる物質により銀ナノ粒子の毒性を相殺される場合があることが確認された。特に、流入原水に関して、 $0.1\ \mu\text{m}$ ~ $0.02\ \mu\text{m}$ 、 $50\ \text{kDa}$ ~ $10\ \text{kDa}$ 、 $10\ \text{kDa}$ 未満の範囲に含まれるタンパク質様物質等の有機物が銀ナノ粒子の影響を相殺している可能性が示唆された。

2.3 酸化チタンの下水処理場における挙動解明

2.3.1 実験方法

平成30年6月14日13時から6月15日13時にかけて処理区域に多数の化学工場が存在する国内の下水処理場において採水を実施した。下水処理工程における6箇所（流入原水、最初沈殿池流入水、最初沈殿池流出水、反応槽流出水、最終沈殿池流出水、放流水）から2時間毎に4L採水し（図-7）、採水地点別に13種類の試料を1Lずつ混合することで6種類のコンポジットサンプルを作成した（試料A）。返送汚泥は2時間毎に1L採水し、13種類の試料を0.5Lずつ混合した。汚泥以外の6種類の試料を採水毎に50mLずつ保存（試料B）すると共に、遠心分離した試料の上澄みを1.5Lずつ混合することで過用のコンポジットサンプル（試料C）を作成した。Tiは環境中においてほとんどが TiO_2 として存在するため、試料B及び試料Cに含まれる全量のTi成分を全 TiO_2 粒子とみなし、懸濁態を含むTiを全Tiとした。また、孔径 $0.1\ \mu\text{m}$ のPVDF膜でろ過することで懸濁成分を除去したろ液に

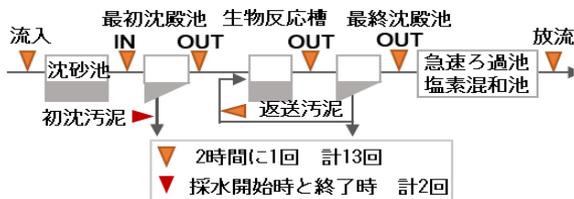


図-7 採水地点

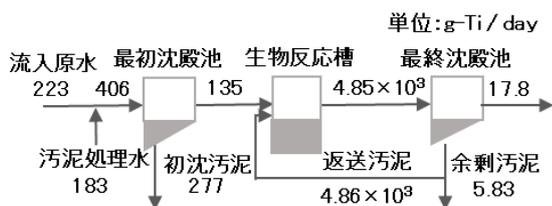


図-8 下水処理場内のTi物質収支

含まれるTi成分を TiO_2 ナノ粒子とした。なお、初沈汚泥は採水開始時と終了時に採泥した2試料を混合し、コンポジットサンプルとした。全ての試料についてTi濃度を高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-OES）（iCAP7000, Thermo scientific）により測定した。前処理として、試料A及びCは試料22.5mLに対し硝酸2mLと塩酸0.5mLを添加、試料Bは試料5.4mLに対し硝酸0.48mLと塩酸0.12mLを添加、返送汚泥及び初沈汚泥は試料1mLに対し硝酸3mLと塩酸1mLを添加し、マイクロ波前処理装置（Multiwave GO, Anton Paar）を用いて試料の酸分解を行った。物質収支は各地点のTi濃度と処理流量から算出した。

2.3.2 実験結果

各処理工程における下水の全Ti濃度は流入時に $36.1\ \mu\text{g-Ti/L}$ であったが、放流時に $3.14\ \mu\text{g-Ti/L}$ にまで減少した。これにより下水処理工程を経ることで処理水の全Ti濃度は91.3%減少することが明らかとなった。処理工程におけるTiの低減理由を明らかにするために、各処理工程における全Ti濃度と処理水流量から処理場内の物質収支を計算した。結果を図-8に示す。最初沈殿池に流入した全Ti量の68.3%が初沈汚泥に、最終沈殿池に流入した全Ti量の約100%が汚泥に移行することが明らかとなった。生物反応槽での全Ti濃度の上昇は最終沈殿池で引き抜かれた汚泥の99.9%が返送汚泥として生物反応槽に流入したことが要因であった。処理工程から引き抜かれた汚泥は自然沈殿や遠心分離による濃縮、脱水等の汚泥処理を経て焼却される。汚泥処理工程で発生した排水は最初沈殿池前に逆流され、流入原水に合流した後に最初沈殿池に流入する。流入原水に合流する返流水には流入原水の82.1%にあたる

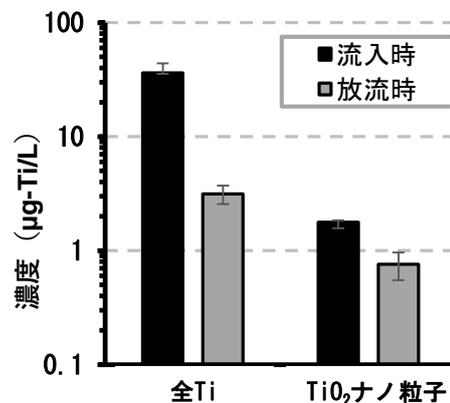


図-9 粒径別流入時及び放流時に含まれるTi濃度

量の全 Ti が含まれており、返流水の流入原水への合流が処理水の全 Ti 濃度増加につながったと考えられる。

流入原水と放流水に含まれる全TiO₂粒子の粒径別のTi濃度を図-9に示す。流入時の全TiO₂粒子の全Ti濃度は36.1μg-Ti/Lであったのに対し、TiO₂ナノ粒子のTi濃度は1.77 μg-Ti/Lであり、流入原水中の全TiO₂粒子に占める粒径100 nm未満のTiO₂ナノ粒子の存在割合は4.91 %であった。同様に放流水中の全TiO₂粒子に占める粒径100 nm未満のTiO₂ナノ粒子の存在割合は24.1 %であった。全TiO₂粒子は流入から放流までに91.3 %減少した一方で、TiO₂ナノ粒子は流入時が1.77 μg-Ti/Lに対し、放流時には0.757 μg-Ti/Lとなり、濃度は57.3 %しか減少しなかった。このことから、粒径によって減少率が異なることが明らかとなった。

2.3.3 まとめ

下水中の TiO₂ ナノ粒子は流入時の 1.77 μg-Ti/L から放流時には 0.757 μg-Ti/L にまで低減されており、現在の下水处理工程でも TiO₂ ナノ粒子は汚泥に移行することによって低減されていることが明らかとなった。一方で、粒径によって低減挙動は異なり、粒径が小さい粒子ほど汚泥に移行しにくく処理水中に残存することが明らかとなった。本研究では、放流水に含まれる TiO₂ ナノ粒子の濃度を明らかにすることができた。

3. マイクロプラスチックについて

3.1 背景

粒径 5 mm 以下の微細なプラスチックはマイクロプラスチックと呼ばれ、海洋、湖沼¹²⁾、河川¹³⁾など水環境中から広く検出されている。下水処理場に流入するマイクロプラスチックの形状は様々であるが、繊維状のものが 57%を占めるとの報告¹⁴⁾がある。M. A. Browne ら¹⁵⁾は、繊維状マイクロプラスチックが化学繊維製品の洗濯で発生することや、下水処理場が排出源の1つになっていることを報告している。

マイクロプラスチックの下水処理場における除去率は、海外の報告^{16), 17)}では 92.1~97.2%、国内の報告¹⁸⁾でも 76.3~99.9%の除去率が得られている。しかし、既往の調査は主に粒子状のマイクロプラスチックを対象とした調査手法で実施されており、下水処理場における繊維状マイクロプラスチックの流入、放流実態は明らかでない。

本研究では繊維状のマイクロプラスチックに着目し、分析方法の構築と下水処理場における実態調査及び、洗濯実験から洗濯時の繊維の発生状況を調査し、

さらに、マイクロプラスチックが水生生物に及ぼす影響を曝露実験から評価した。

3.2 下水中の繊維状マイクロプラスチックの分析法の構築

環境省の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¹⁹⁾では、マイクロプラスチックの調査手法としてプランクトンネットによる試料採集、夾雑物除去、比重分離、実体顕微鏡による観察と計数、FT-IR によるプラスチックの材質の分析が挙げられているが、繊維状のマイクロプラスチックは抽出して FT-IR 分析を行うことが困難であることなどの問題がある。本研究では、平成 29 年度から令和 2 年度にわたって下水中の繊維状のマイクロプラスチックの分析方法を検討した。

3.2.1 下水試料中の繊維状マイクロプラスチック検出のための前処理方法の最適化

3.2.1.1 実験方法

a) 蛍光染色による繊維状マイクロプラスチックの検出と比重分離の方法の検討

繊維状マイクロプラスチックは抽出しての FT-IR 分析が困難なことから、繊維状マイクロプラスチックの蛍光観察の適用性及び比重分離の条件について検討した。

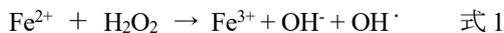
A 浄化センターで採取した最初沈殿池汚泥（初沈汚泥）を用いて、繊維状マイクロプラスチックの分析方法の内、蛍光観察法については Nile Red 染色の適用性、比重分離については比重分離回数の最適化を検討した。夾雑物分解と染色は既往研究^{20), 21), 22)}を参考にした。すなわち初沈汚泥 200 mL を乾燥させ、30% H₂O₂（精密分析用、富士フィルム和光純薬）を加えて 60°C で 4 時間加熱し夾雑有機物を分解した。ろ過（孔径 10 μm）後の残渣をエタノールに懸濁させて遠心分離（x710g, 10 分）し、沈殿物を 5.3M NaI 溶液（比重約 1.5）に懸濁させて遠心分離した。NaI 溶液による懸濁と遠心分離は 5 回まで繰り返し、上澄みをそれぞれ別のポリカーボネートフィルター（孔径 0.2 μm）にろ過して、Milli-Q 4 mL と Nile Red 溶液（1mg/mL-Acetone, Sigma-Aldrich）200 μL を加えて染色し、スライドガラスに移して観察試料とした。観察には落射型蛍光顕微鏡（BX51, Olympus 製）の B 励起モードを用いた。分析方法の回収率を評価するため、標準ナイロン繊維（Nylon 6,6, 長軸径約 500 μm、短軸径約 10 μm, GoodFellow 製）を 56 本添加した試料を分析し、回収率を求めた。

b) 過酸化水素 (H₂O₂) のみを使用した分解方法の検討

下水試料中の夾雑物を効果的に除去するため、A 浄化センターで採取した最初沈殿池汚泥（初沈汚泥）を用いて、過酸化水素分解の温度、繰り返し回数の最適化を行った。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に汚泥試料を一定量入れて 30% H₂O₂ を加え、異なる温度条件で 1 時間分解する実験を行った。また、30% H₂O₂ を加えて 60°C で 1 時間分解し、残った試薬を吸引ろ過で除去して新しい 30% H₂O₂ を加えて分解するサイクルを繰り返し、その繰り返し数による残留物量の違いを検討した。汚泥の分解状況は、分解後の乾燥重量を測定して残存率を求めて評価した。

c) フェントン反応による分解方法の検討

過酸化水素 (H₂O₂) のみによる分解方法では、下水試料中の夾雑物を十分に分解できていなかったため、A 浄化センターで採取した流入下水を用いて、より分解力が強いフェントン反応²³⁾による夾雑物分解条件を検討した。二価鉄化合物を H₂O₂ に混合したフェントン試薬では、式 1 の通り、ヒドロキシルラジカルが発生し、強力な酸化力を発揮する。このフェントン反応を用いて、下水試料中の夾雑物除去の効果を検討した。検討した手順を表-4 に示す。



実験では、流入下水試料を 500 mL 取り、孔径 10 μm のポリカーボネートフィルターでろ過した。その後、試薬の添加や反応操作をせずにそのまま染色作業に供したものを系 A とし、30% H₂O₂、30% H₂O₂+FeCl₂、30% H₂O₂+FeSO₄ の 3 種の異なる添加試薬を加える系を各々系 B、系 C、系 D とした。30% H₂O₂ の添加量は 10 mL とし、系 C と系 D ではそれぞれ 0.5M に調整した FeCl₂ 水溶液と FeSO₄ 水溶液を 100 μL 添加した。反応は 60°C で行い、1 時間経過時点の残留溶液はろ過し、残渣に再度同じ試薬を添加して 60°C で 1 時間反応させ

表-4 検討した下水試料 (500mL) の前処理手順

系	ろ過	添加試薬	温度 (°C)	反応回数	追加処理
A		-	-	-	
B	ポリカーボ	30%H ₂ O ₂			なし
C	ネット製	30%H ₂ O ₂ +FeCl ₂			
D	ろ紙	30%H ₂ O ₂ +FeSO ₄	60°C	2回	
E	(孔径10μm, Φ47mm)	30%H ₂ O ₂ +FeCl ₂			
F		30%H ₂ O ₂ +FeSO ₄			で洗浄

た。最後に、残留溶液をろ過し、Milli-Q 水で洗浄、ろ過した残渣を染色操作前試料とした。また、系 E と系 F では、系 C と系 D と同様に分解操作を行った後に、2 M の HCl を 5 mL 添加して、反応沈殿物の除去を試行した。夾雑物除去効果は、反応・後処理の前後の乾燥重量の減少率 (%) で評価した。

重量測定後の試料 A~F は、フェントン反応による分解で繊維が観察しやすくなることを確認するため、Nile Red 染色による蛍光観察を行った。

フェントン反応によって繊維状マイクロプラスチックが分解しないことを確認するため、ナイロン 6,6 糸とポリエステル糸の標準品を短く切って容器に入れ、30% H₂O₂ と FeSO₄ を加えて分解し、処理の前後で実体顕微鏡を用いた観察と FTIR (FT-IR 6300、日本分光) を用いた分析を行い、前処理による物性変化の有無を確認した。

d) 簡易計数法の提案

Nile Red で蛍光染色した後の繊維状マイクロプラスチックは、観察用フィルターをろ過して蛍光顕微鏡で 1 本ずつ長さを計測して本数を集計するが、繊維の本数が多くなるほど作業時間が増えるという問題がある。繊維の計数は一部分だけ行い、その結果をもとにフィルター全体の繊維の本数を推計する簡易計測法について

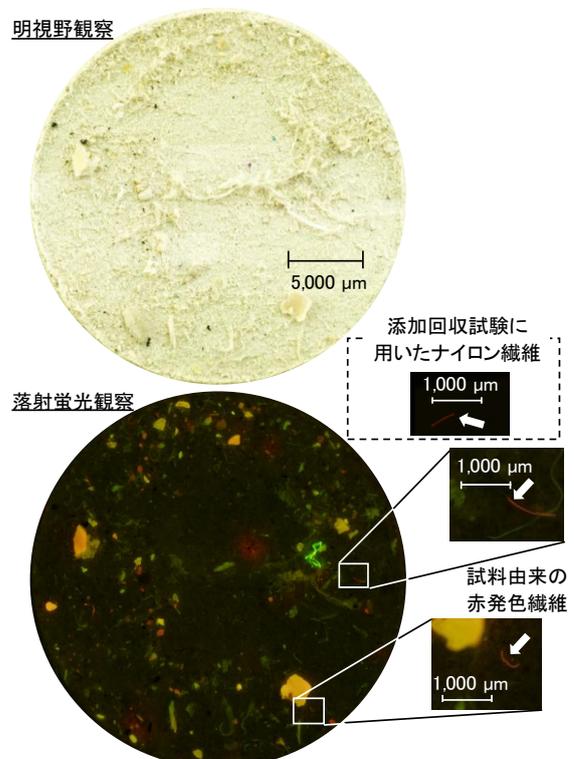


図-10 落射型蛍光顕微鏡による初沈汚泥の観察の様子

て有効性を検討した。ポリエステル繊維を前処理、染色、蛍光撮影して得たフィルター全体の蛍光像を用いて、フィルターに乗っているすべての繊維を計数した場合と一部分だけを計数した場合を比較し、推計の誤差を評価した。一部分のみを計数する場合、計数領域を正方形で設定することも考えられるが、フィルターが円形であることから扇形の計数領域を設定した。扇形の中心角は全体の16分の1にあたる22.5°とした。部分計測の場合、計測本数と計測面積から全体の繊維の本数を推定することになるが、扇形の計数領域を繊維が多い場所に設定した場合は推定本数が多くなり、繊維が少ない場所に設定した場合は少なくなる。そこで、計数領域の配置を変えながら集計を繰り返して、計数領域の配置に起因するばらつきを調べた。

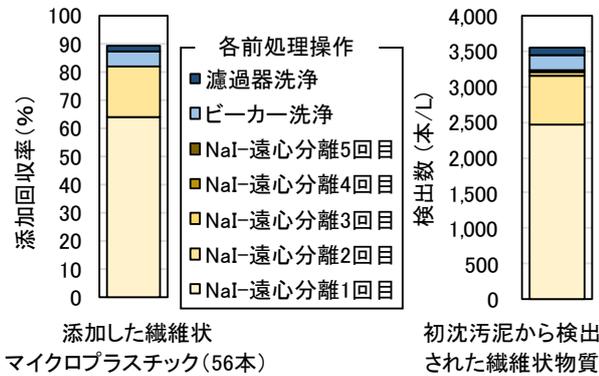


図-11 蛍光観察時における赤発色繊維の検出結果

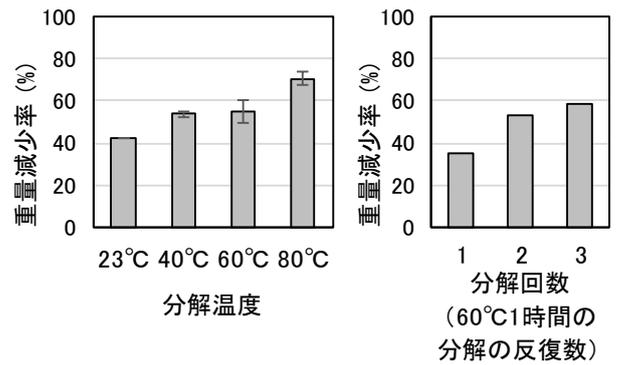


図-12 H₂O₂のみを使用した、汚泥分解後の重量減少率の比較

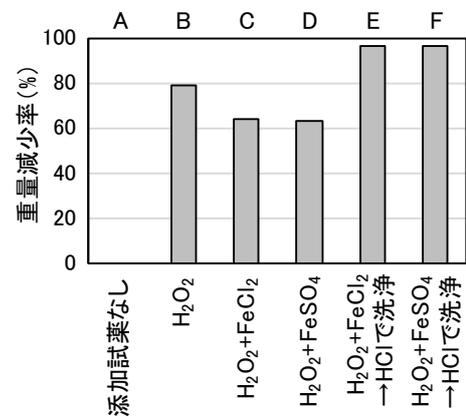


図-13 フェントン反応の検討実験における前処理手順別の重量減少率

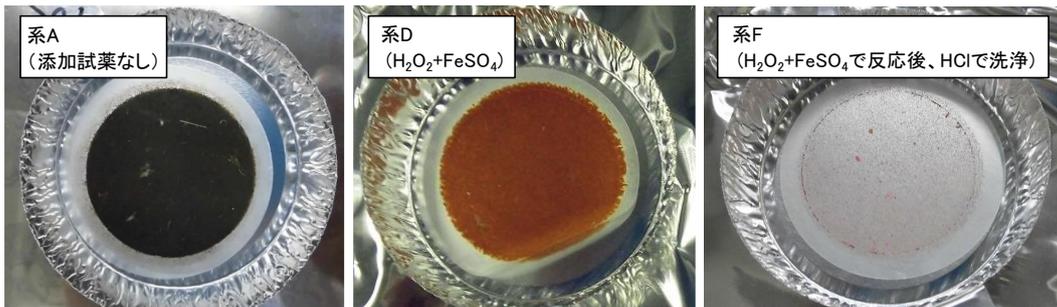


図-15 系A、系D、系Fにおける下水試料の前処理後の写真

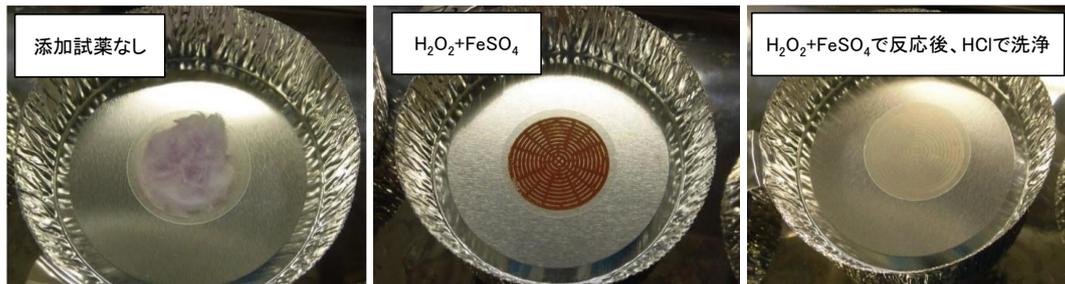


図-15 各実験系における木綿の前処理後の写真

3.2.1.2 実験結果

a) 蛍光染色による繊維状マイクロプラスチックの検出と比重分離の方法

顕微鏡により観察された初沈汚泥試料の様子を図-10に示す。明視野観察では、前処理で除去されずに残留した夾雑物により全体が白色っぽく、識別が容易ではなかった。一方、落射蛍光観察では、赤、黄、緑に発色した粒子や繊維が観察された。Nile Red 染色観察法では、観察される蛍光の色はプラスチック素材の疎水性の度合いを反映して異なり、材質の区別の目安になる²²⁾。標準品のプラスチック粒子を用いた検討では、疎水性のポリエチレン (PE) とポリプロピレン (PP) は緑色、ポリスチレン (PS) は黄色、親水性のポリエチレンテレフタレート (PET) は赤色の蛍光を示した。標準品として添加したナイロン繊維は赤色に発色しており、試料由来の赤発色繊維も観察された。発色繊維の検出結果を図-11に示す。添加したナイロン繊維の回収率は 89.2%であった。前処理操作の繰り返しによる回収率や使用器具への残留を検討した結果、NaI 添加と遠心分離の繰り返し操作では、1回目に 64.3%、2回目に 17.9%が回収され、3回目以降は回収されなかった。また、使用したビーカーの洗浄液から 5.4%、ろ過器の洗浄液から 1.8%が回収された。初沈汚泥由来の赤発色繊維は全部で 3,560 本/L (274 本/g-dry) が計測され、下水試料由来の繊維状マイクロプラスチックの可能性が考えられた。比重分離の操作ごとの検出本数を全体に対する割合でみると、比重分離 1回目で 69.5%、2回目で 19.2%が回収されていた。添加したナイロン繊維と初沈汚泥由来の繊維のどちらの場合においても、比重分離で回収率を上げるためには、試料を NaI に懸濁させて遠心分離する操作を 2回以上繰り返す必要があることがわかった。

b) 過酸化水素 (H₂O₂) のみを使用した分解方法

H₂O₂のみを使用した分解実験の、条件ごとの汚泥の重量変化を図-12に示す。汚泥を H₂O₂のみで 1時間分解する実験では、温度を上げるほど分解後の重量減少率が高くなったが、80℃1時間の条件でも減少率は 70%であり、完全な分解には至らなかった。60℃で 1時間の分解を繰り返す実験では、分解回数を増やすと減少率が高くなったが、分解回数の増加に対して減少率の増加幅が小さくなっており、4回以上の分解を行っても分解効果は低いと考えられる。

c) フェントン反応による分解方法

フェントン反応を用いた実験の、前処理手順別の重量減少率を図-13に示す。重量減少率は、H₂O₂のみで

処理した系 B では 79.8%であった。H₂O₂+FeCl₂ (系 C)

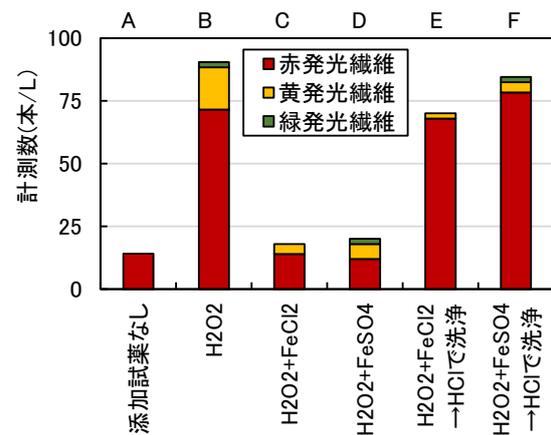


図-16 前処理手順別の各色発光繊維の計測数
系B: フェントン反応なし (30% H₂O₂)

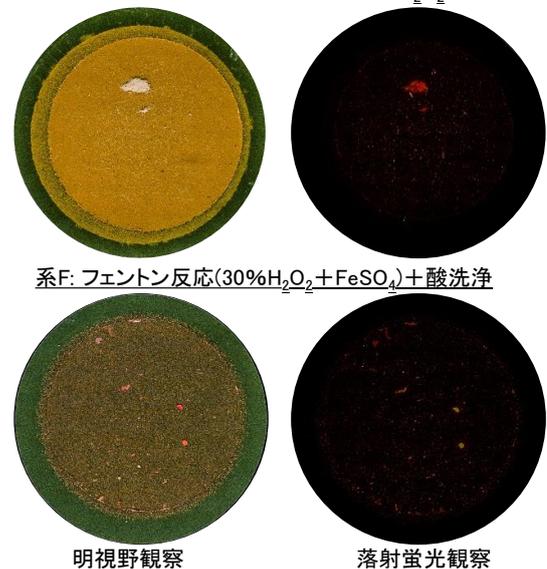
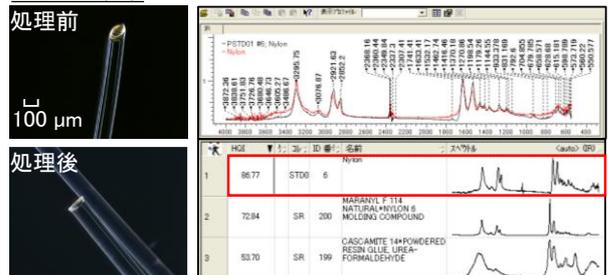


図-17 前処理方法が異なる下水試料の観察像の比較

ナイロン6,6系



ポリエステル系

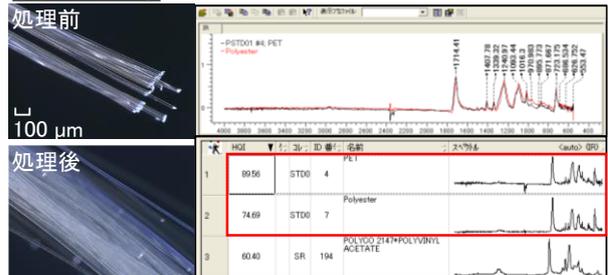


図-18 フェントン反応+酸洗浄による物性変化の確認

と $H_2O_2+FeSO_4$ (系 D) のフェントン反応の系では、それぞれ 64.3%と 63.8%の減少率であり、 H_2O_2 のみの系と比較して減少率が低くなった。

系 A (添加試薬なし)、系 D、系 F の前処理後の試料の写真を図-14 に示す。分解を行っていない系 A では下水試料由来の黒褐色の SS 成分がろ紙上で層状に残渣となって存在したのに対し、フェントン反応に供した系 D では、系 A と比べ SS 成分の厚みは薄いものの、元の黒褐色とは異なり茶褐色の残渣が存在していた。これは、鉄イオンと試料中の成分が反応して酸化鉄塩がろ紙上で生成したためであると推察され、このために試料中の有機成分の重量の減少率が過小評価されたと考えられた。

上述の結果を受け、反応後の試料に HCl を添加することで酸性条件とし、酸化鉄塩を再溶解させた後、残った溶液をろ過して排除した (系 E および系 F)。その結果、SS 重量除去率が系 E ($H_2O_2+FeCl_2$) では 96.7%、系 F ($H_2O_2+FeSO_4$) では 97.0% となり、顕著に上昇した。 $FeCl_2$ か $FeSO_4$ に関わらず、フェントン反応後に HCl で洗浄する手法が有効であることが見出された。

洗濯排水から下水道に流入する繊維状物質には、プラスチック繊維だけではなく木綿繊維も多く含まれていると考えられる。木綿を下水試料と同様に前処理した際の写真を図-15 に示す。フェントン反応 ($H_2O_2+FeSO_4$) のみで処理した場合には、下水試料と同様に茶褐色塩の沈殿がみられたが、HCl による洗浄

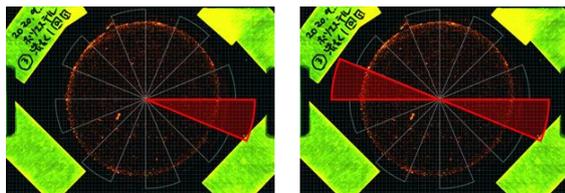


図-19 繊維の載ったフィルターの蛍光写真と計数領域の配置の例

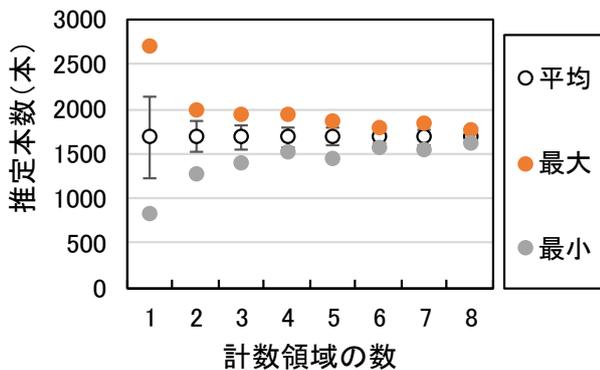


図-20 計数領域の数ごとの本数推定結果の違い

を経ると残留物は目視では確認されなかった (重量減少率 99.8%)。木綿が前処理で除去されない場合、Nile Red 染色後の落射蛍光観察では赤色に発光してみえるために誤計測につながるが、酸洗浄を行うフェントン反応処理では、前処理後の木綿から赤発光繊維は確認されなかった。

各前処理手順における流入下水中の各色発光繊維を図-17 に示す。分解反応を行わなかった系 A で計測されたのは赤発光繊維 14 本/L であり、6つの前処理で最少であった。続いて、 $H_2O_2+FeCl_2$ 処理 (系 C) で合計 18 本/L、 $H_2O_2+FeSO_4$ 処理 (系 D) で合計 20 本/L であった。これらで計測数が少なかった原因として、繊維が残留夾雑物や発生した酸化鉄塩に埋没する等により見落としがあった可能性が考えられた。一方で、重量減少率が高かった系 E ($H_2O_2+FeCl_2$) と系 F ($H_2O_2+FeSO_4$) では、各々合計計測数が 70 本/L と 84 本/L であった。また、 H_2O_2 処理のみでは合計計測数が 90 本/L であり、6つの前処理で最多であった。

以上の結果からフェントン反応 (+酸洗浄) の有無にかかわらず、 H_2O_2 処理を行った場合に計測数が多くなる傾向が示されたが、実際の観察・計測において両者は作業効率が異なっていた。二つの前処理後の下水試料の観察像 (明視野観察および落射蛍光観察) を図-17 に示す。 H_2O_2 処理のみの系 B では重量減少率は 79.8% であり、フェントン反応+酸洗浄の系 F の 97.0% よりも低かったが (図-14)、繊維状物質の確認・計測作業も、残留物の量が多い系 B の試料では系 F の試料と比べて容易ではなかった。さらに系 B では、系 F ではみられない繊維状物質の塊のようなものが観察され

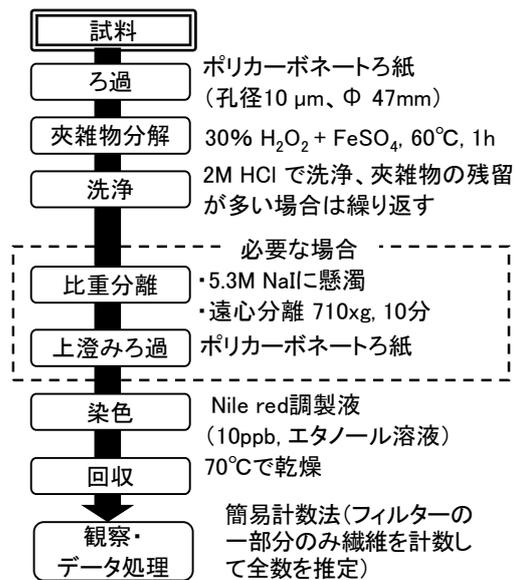


図-21 構築した下水試料の前処理フロー

た。

Nile Red 染色観察法による繊維状マイクロプラスチックの検出では、分解が不十分で夾雑物が多い試料の場合には繊維の見落としや誤計測の可能性が生じることに留意する必要がある。

標準プラスチックにフェントン反応+酸洗浄の操作をする前後の実体顕微鏡観察と FTIR 測定結果を図-18 に示す。下水からの検出数が比較的多いと考えられるナイロン6,6糸とポリエステル糸の両者において、顕微鏡観察時における操作前後の顕著な変化はみられなかった。また、IR スペクトルもほぼ一致し、データ解析後に同じプラスチック材質であると同定された。

d) 簡易計数法の提案

染色されたポリエステル繊維が乗ったフィルターの蛍光写真に計数範囲の扇形を表示した様子を図-19 に示す。フィルター全体の繊維の本数は1,688本であった。一部分のみを計数するにあたり、計数領域は扇形とし、中心角は全体の16分の1にあたる 22.5° とした。計数作業では、設定した扇形の範囲に重なる繊維を計数した。扇形の計数領域を配置する数、すなわち計数する面積を変えたときの繊維の計測本数の推定結果の違いを図-20 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と考えられた。また、扇形領域を増やすほど推定結果のばらつきが小さくなるが、作業の省力化の観点からは4領域以下が適当と考えられた。

3.2.2 下水中の繊維状マイクロプラスチックの分析法のまとめ

本研究では、下水中の繊維状マイクロプラスチックを Nile Red 染色による蛍光観察で分析する手法を構築し、効果的な前処理方法として比重分離方法とフェントン反応による夾雑物分解方法を検討した。さらに、観察作業を低減するため、簡易計数法についての提案を行った。本研究で構築した下水試料の前処理フローを図-21 に示す。フェントン反応後に、HCl による洗浄操作を適用することで、高い夾雑物除去効果が期待できる。有機物分解後も依然として残留物がみられる場合には、NaI 溶液を用いた比重分離を併用し、比重差のある無機成分等の分離を行う。観察時に繊維が多い場合は、簡易計数法により、計数作業の低減が可能



図-22 下水放流水取水設備からのろ過作業の様子



図-23 ナイロンメッシュからの懸濁物質の回収作業

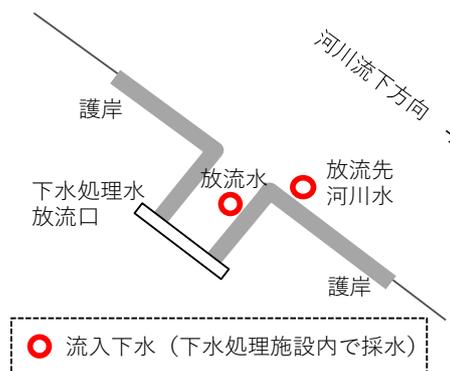


図-24 実態調査③の、B 浄化センターの採水地点

となる。試料中の繊維状マイクロプラスチックの回収、夾雑物の分解処理、比重分離、蛍光染色、蛍光顕微鏡による計測と集計からなる一連の作業の詳細は、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²⁴⁾としてとりまとめた。

3.3 下水処理場における繊維状マイクロプラスチック

クの実態調査

3.3.1 調査方法

下水処理場における繊維状マイクロプラスチックの除去特性や処理過程における挙動を明らかにするため、実態調査を計3回実施した。以下、それぞれの調査方法を個別に説明する。

実態調査①

平成30年6月14～15日に、処理人口24万人のA浄化センターにおいて、一部合流式、嫌気・無酸素・好気法+急速ろ過法の処理系列で通日調査を実施した。流入下水、初沈流入水、初沈流出水、生物反応槽、終沈流出水、放流水、初沈汚泥および返送汚泥を採取した。流入下水は2時間おきに1Lずつ採水し、それぞれ別の試料として分析した。放流水は2時間おきに1Lずつ採水し、コンポジット試料として分析した。処理工程ごとの水試料と返送汚泥試料は24時間のコンポジット採水を行い、初沈汚泥はスポット採水を行った。

試料の分析手順は、懸濁物の回収、乾燥、夾雑物分解、Nile Red染色、蛍光観察とした。懸濁物の回収は、ポリカーボネートフィルター（孔径10 μ m）で試料をろ過した。以降は、主に図-22のとおりであったが、分析法確立の前であったため、分解条件は以下の通りであった。

試料の分解は、ビーカーに入った沈殿試料に30% H₂O₂を加えて60 $^{\circ}$ Cで1時間加熱した。加熱後も夾雑物が残留していたため、分解液をろ過し、ろ過器上で30% H₂O₂を加え60 $^{\circ}$ Cで1時間加熱する操作を3～4回繰り返した。

実態調査②

平成30年11月20日にA浄化センターにおいて、流入下水と放流前の処理水を調査した。この調査では、繊維状マイクロプラスチックの検出本数を増やして長さ分布を調査するために、下水処理水の調査水量を増やす方法として現地ろ過を試みた。試料中の懸濁物質は、目開き10 μ mのナイロンメッシュに試料を通水した

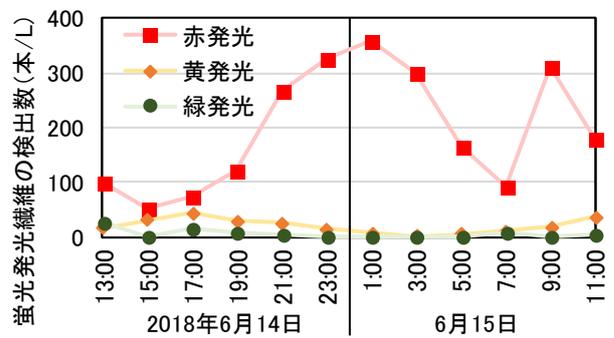


図-25 各蛍光発光繊維の下水処理場への流入状況の比較

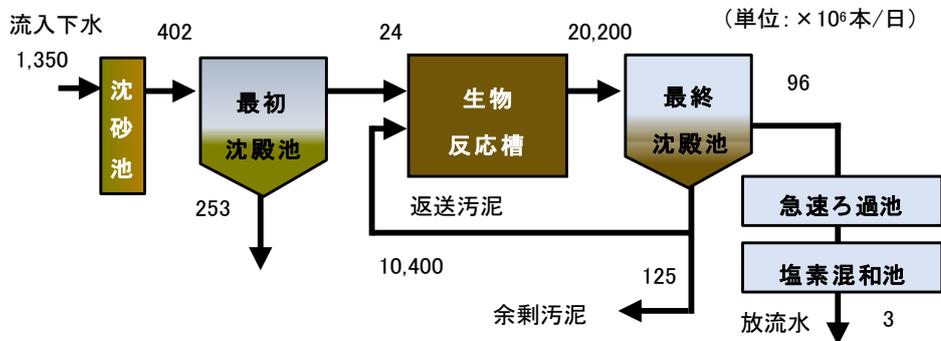
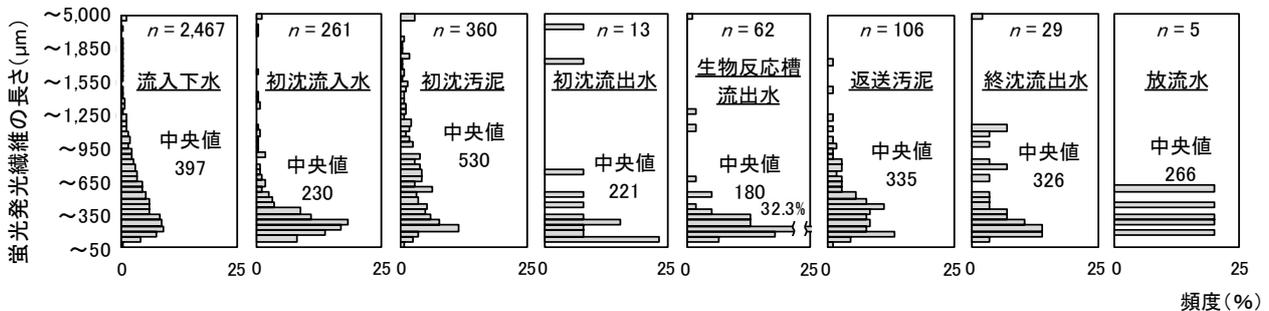


図-26 下水処理工程における蛍光発光繊維の日負荷量(数値は赤、緑、黄色の蛍光発光繊維の合計値)



※流入下水の長さ分布は、採水時刻の異なる12試料の検出繊維の長さデータを合算して求めた。

図-27 各下水処理工程から検出された蛍光発光繊維の長さ分布

て回収した。流入下水は 10L 容のステンレスタンクに採水して持ち帰り、実験室でメスシリンダーを使ってナイロンメッシュに通水した。処理水は、下水処理場の処理水採水設備にナイロンメッシュを被せたザルを設置して通水した。処理水のろ過作業の様子を図-22 に示す。処理水が出る蛇口に 1 L メスシリンダーを置いて満水になるまでの時間を計測した後、ナイロンメッシュに通水した時間を記録した。懸濁物質が捕捉されたナイロンメッシュは畳んで実験室に持ち帰った。ナイロンメッシュから懸濁物質を回収する作業の様子を図-23 に示す。ナイロンメッシュのふちから剥離した繊維の混入を避けるため、捕捉された懸濁物質は超純水で洗いながらナイロンメッシュの中央に集めて、ビーカーに移し入れた。分解の条件は実態調査①と同様であった。

実態調査③

嫌気好気活性汚泥法と循環式硝化脱窒法を併用している処理人口 155 万人の B 浄化センターで、令和 2 年 11 月 19 日に採水を行った。採水地点を図-24 に示す。試料は、流入下水、放流水、放流口下流側の河川水とした。

表-5 繊維状マイクロプラスチックの濃度と除去率

	繊維状マイクロプラスチック濃度(本/L)				除去率(%)
	赤色	黄色	緑色	計	
流入下水	327.2	29.4	52.6	409.2	
放流水	0.519	0.044	0.031	0.594	99.85

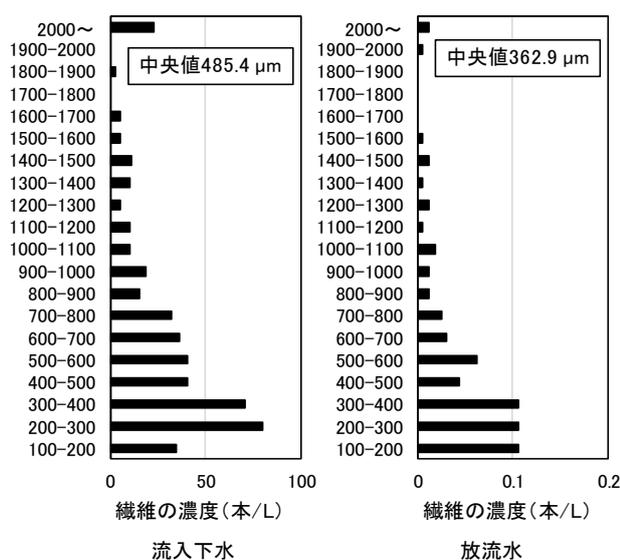


図-28 流入下水と放流水の繊維の長さ分布の比較

流入下水は 10 L ステンレスタンクに入れて持ち帰り、1L ガラス瓶に分注し、冷蔵庫で数日置いて懸濁物質を沈殿させた。流入下水は 1 L を 1 検体とし、上澄みをろ過したろ過器に沈殿を一緒に入れて、ろ過器上での夾雑物分解操作を行った。放流水と放流先の河川水は、ポンプで汲み上げて、現地で目開き 10 μm のナイロンメッシュに通水した。放流水の通水量は 100 L、河川水の通水量は 235 L であった。ナイロンメッシュは畳んで実験室に持ち帰り、超純水で洗いながら捕捉した懸濁物質をビーカーに移し、孔径 10 μm のポリカーボネートフィルターでろ過した。

前処理と分析は、本研究でとりまとめた繊維状マイクロプラスチックの分析マニュアル²⁴⁾に従って実施した。

3.3.2 実態調査結果

実態調査①

各蛍光発光繊維の下水処理場への流入状況の比較を図-25 に示す。各色発光繊維の日平均数は赤が 195 本/L、黄が 17 本/L、緑が 5 本/L であり、赤が全時間帯で黄、緑より多く検出された。赤発光繊維は流入数の時間変動が大きく、52 本/L(15:00)から 357 本/L(1:00)まで最大 6.9 倍の差がみられた。また、放流水中の各色発光繊維の日平均数は赤が 0.3 本/L、黄が 0.2 本/L、緑が N.D. (不検出) であった。以降は 3 つの蛍光発光繊維の合計値で議論を進める。

調査した処理系列の日負荷量の算出結果を図-26 に示す。流入水量は 6,173 m³/日であった。蛍光発光繊維の濃度の平均値を求め、流入水量を掛け合わせて日負荷量を算出したところ、流入水中には 13 億 5,000 万本/日の蛍光発光繊維が存在しており、最初沈殿池流入ま

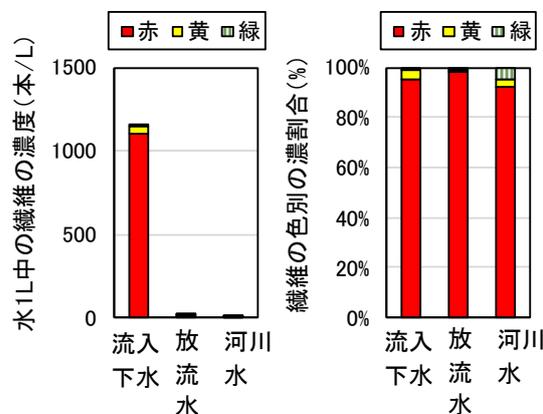


図-29 繊維状マイクロプラスチックの試料水 1L あたりの本数(左)と色別の割合(右) (流入下水は 3 試料の平均を表示)

で（主に沈砂池で）70.4%、最初沈殿池流出までに98.2%が除去されていた。最終沈殿池では9,620万本/日まで減少し、放流時には流入時の99.8%が除去されていた。一方で、生物反応槽では202億本/日となり、最初沈殿池流出水と返送汚泥からの反応槽流入時と反応槽流出時の前後の収支は合わなかった。

各下水処理工程で検出された蛍光発光繊維の長さ分布を図-27に示す。初沈汚泥中には全体的に大きな繊維が多く（中央値530μm）、比較的大きなものは最初沈殿池でトラップされやすいことが示された。一方で、生物反応槽流出水には長さ150μm程度の細かな繊維が多く検出された（中央値180μm）。人工のプラスチック繊維は日常で使用されているサイズのものであっても、元は細くて短い繊維が互いに撚って構成されてい

ることが知られている。一般的に下水処理場の現地調査における物質収支は変動等により一致しにくいことに留意が必要ではあるが、本調査結果から、生物処理中の曝気等で繊維状MPsの撚りが解れ、より微細化することで本数が増加していた可能性が示唆された。

実態調査②

放流水の現地ろ過作業では、放流水をナイロンメッシュに30分通水し、流量は0.089L/秒であったため、分析水量は160Lとなり、実態調査①の12Lと比べ10倍以上とできた。繊維の検出本数は、流入下水は669本、放流水は95本であった。流入下水と放流水の1Lあたりの繊維状マイクロプラスチック濃度を表-5に示す。繊維の濃度は、流入下水は409本/L、放流水は0.059本/Lであり、除去率は99.985%となった。また、

表-6 下水処理場における繊維状マイクロプラスチック濃度と除去率の実態調査結果

下水処理場と調査時期	処理方式	形状とサイズ	処理プロセス	検出濃度	除去率 (%)
A浄化センター 実態調査①_平成30年6月	嫌気無酸素好気法 +急速砂ろ過	繊維状, 10 μm~	流入下水	219 本/L	
			初沈流入水	58 本/L	73.5
			生物反応槽流入水	4 本/L	98.2
			最終沈殿池流出水	14 本/L	93.6
			放流水(砂ろ過)	0.4 本/L	99.8
A浄化センター 実態調査②_平成30年11月	嫌気無酸素好気法 +急速砂ろ過	繊維状, 10 μm~	流入下水	409 本/L	
			放流水(砂ろ過)	0.59 本/L	99.9
B浄化センター 実態調査③_令和2年6月	嫌気好気活性汚泥法 または循環式硝化脱窒法	繊維状, 10 μm~	流入下水	1160.2 本/L	
			放流水(放流口)	13.25 本/L	98.9

表-7 文献に基づく下水処理場におけるマイクロプラスチック濃度と除去率の調査事例

下水処理場, 出典	処理方式	形状とサイズ	処理プロセス	検出濃度	除去率 (%)
滋賀県内の4処理場 田中周平ら, 2019 ¹⁸⁾	多段硝化脱窒法 +急速砂ろ過	100 μm ~1 mm	流入下水	158~5000 (533) 個/m ³	
			初沈流入水	600~4000 (2000) 個/m ³	
			生物反応槽流入水	15~48 (20) 個/m ³	96.2
			最終沈殿池流出水	5~16 (6.5) 個/m ³	98.8
			放流水(砂ろ過)	0.3~2.2 (0.67) 個/m ³	99.9
The Detroit WWTP (U.S.) Michielssen et al., 2016 ¹⁶⁾	標準活性汚泥法	20 μm~	流入下水	125,000 個/m ³	
			初沈流入水	29,700 個/m ³	76.3
			生物反応槽流入水	133.0 ± 35.6 個/L	
			最終沈殿池流出水	55.1 個/L	58.6
			放流水	21.1 個/L	84.1
Northfield WWTP (U.S.) Michielssen et al., 2016 ¹⁶⁾	標準活性汚泥法+砂ろ過	20 μm~	流入下水	8.2 個/L	93.8
			初沈流入水	5.9 個/L	95.6
			生物反応槽流入水	91.5 個/L	
			最終沈殿池流出水	59.4 個/L	35.1
			高度処理水(砂ろ過)	10.6 個/L	88.4
Xi'an Beishiqiao (China) ZeyuanYang et al., 2021 ¹⁷⁾	膜分離活性汚泥法 オキシデーションディッチ法	20 μm~ 75 μm~	小規模MBR処理水	9.3 個/L	89.8
			流入下水	2.6 個/L	97.2
			一次処理水	0.5 個/L	99.4
			反応タンク流出水	288.5 ± 32.8 個/L	
			最終沈殿池流出水	108.4 ± 15.2 個/L	62.4
			放流水	162.0 ± 4.9 個/L	43.8
				30.1 ± 8.2 個/L	89.6
				22.9 ± 7.2 個/L	92.1

この日の下水処理水量は、77,747 m³/day であり、繊維状マイクロプラスチックの流入負荷量は 3.18×10¹⁰ 本/day となった。

流入下水と放流水の繊維状マイクロプラスチックの長さ分布の比較を図-28 に示す。流入下水と放流水の繊維の長さの中央値はそれぞれ 485.4 μm、362.9 μm であり、繊維が長くなるほど検出本数が少なくなる傾向であった。放流水の分析水量を増やした結果、濃度は低いものの 1000 μm 以上の長さの繊維も検出されるようになった。

実態調査③

繊維状マイクロプラスチックの 1L あたりの繊維の本数のグラフを図-29 に示す。繊維状マイクロプラスチックの濃度は、流入下水は平均 1160.2 本/L、放流水は 13.3 本/L、放流先の河川水は 1.5 本/L であった。なお、流入下水は、検出数のばらつきを見るため、10 L タンクで採水した同一の水試料から 1 L ずつ 3 試料を分取して分析した結果、912.4、1114.7、1453.5 本/L (平均 1160.2 本/L) となった。流入下水の平均と放流水から求めた繊維状マイクロプラスチックの除去率は 98.9% であった。放流先の河川水では放流水の約 1/10 であった。希釈等により低減されているものと推察されるが、放流地点より上流側の河川水の調査ができていないため、放流水の負荷割合等の定量化はできなかった。

検出された繊維状マイクロプラスチックの蛍光色は大部分が赤色であった。Nile Red 染色法では、ナイロンとポリエステルはどちらも赤色を示すことから、繊維の材質は特定できないが、これらの材質の繊維が下水中に多く含まれていたと考えられる。

本調査は晴天時に行われ当日の流入下水量は 544,880 m³/day であった。繊維状マイクロプラスチックの流入下水中の濃度は、平均 1160.2 本/L であり、これをもとに 1 日あたりの処理場への流入本数を概算すると 6,320 億本/day となった。

本研究で実施した下水処理場における繊維状マイクロプラスチックの実態調査結果を表-6 に、他の下水処理場のマイクロプラスチック全体の調査事例を表-7 に示す。平成 30 年 6 月の A 浄化センターの実態調査結果では、流入下水に対する処理プロセスごとの除去率は、最初沈殿池の後で 98.2%、A2O 法による処理後の最終沈殿池で 93.6%、砂ろ過を経た放流水で 99.8% であった。同じ処理場の同年 11 月の調査は流入下水と放流水のみの調査で、同様に高い除去率であった。令和 2 年 11 月の B 浄化センターの実態調査結果では、

除去率は 98.9% であった。

繊維に限らずマイクロプラスチック全体の調査では、生物処理+砂ろ過の処理場での総除去率は、100 μm～1 mm で 99.9%、10 μm～100 μm で 76.3% という報告¹⁸⁾があり、粒子のサイズによって除去特性が異なった。アメリカの Northfield の下水処理場の除去率¹⁶⁾は、最終沈殿池流出水で 89.8%、砂ろ過処理水で 97.2%、膜分離活性汚泥法の処理系列では 99.4% と、砂ろ過や膜処理が有効であることがわかる。中国のオキシデーションディッチ法で処理している下水処理場では、92.1% の除去率が得られている¹⁷⁾。Jing Sun ら²⁵⁾による下水処理場のマイクロプラスチックについてのレビュー論文によれば、下水処理場に流入するマイクロプラスチックは最初沈殿池の前までに 41～65%、高度処理の前までに 88～97% が除去されている。

文献の事例と比較すると、本研究で調査した A 浄化センターの繊維状マイクロプラスチックの除去率は高い値であり、砂ろ過処理が除去の向上に寄与していると推測された。B 浄化センターの除去率も高い値であったが、この調査はスポット採水であり、繊維状マイクロプラスチックの流入本数の変動などによって除去率が変動する可能性がある。

3.3.3 まとめ

平成 30 年から令和 2 年にかけて、下水処理場における繊維状マイクロプラスチックの実態調査を 3 回実施した。1 回目の調査では、流入下水を 2 時間おきに採水して分析した結果、ナイロンやポリエステルと考えられる赤発光繊維の濃度が 52 本/L から 357 本/L まで時間によって変動した。流入下水と放流水の濃度から求めた繊維状マイクロプラスチックの除去率は 99.8% であり、沈砂池と最初沈殿池による一次処理で 98.2% と大きく除去されることが分かった。

同じ処理場の 2 回目の調査では、目開き 10 μm のナイロンメッシュを使用して下水処理水の現地ろ過を行い、160 L の下水処理水から 95 本の繊維が検出され、長さの中央値は 362.9 μm で、1000 μm 以上の長い繊維も検出される結果となった。流入下水と下水処理水の濃度から求めた繊維状マイクロプラスチックの除去率は 99.85% であった。

3 回目の調査は 1、2 回目よりも処理人口の多い下水処理場を選んで実施し、下水処理場で繊維状マイクロプラスチックが 98.9% 除去され、放流先の河川水ではさらに濃度が低下することを示した。

3.4 洗濯における繊維状マイクロプラスチックの発

生挙動の検討

Nile Red 試薬を用いた蛍光染色観察法による下水処理場の実態調査では、流入下水中に含まれる赤発光繊維（ナイロンやポリエステルと考えられる繊維）の濃度は最大 357 本/L であり、黄色や緑色に発光する繊維も検出された。これらの繊維状 MPs は、元は化学繊維製品に由来し、家庭などから下水道に流入したものと考えられるが、どの材質の繊維製品からどれ程の大きさの繊維状 MPs がどれだけ発生するかについて、知見が不足している。そこで本研究では、実験用に準備した洗濯機を用いて、繊維状 MPs の発生挙動を調査した。

3.4.1 実験方法

本研究で実施した、洗濯繊維の発生実験の装置概要を図-30 に示す。洗濯槽（容量 3.6 kg）と脱水槽が分かれたパルセーター式の洗濯機を用い、排水先に目開き 10 μm のメッシュフィルター（ナイロン製）を設けて、発生繊維を回収する仕組みを構築した。対象材質は下水からの繊維状マイクロプラスチックの検出頻度が高いポリエステルとナイロンとし、各素材 100%製の市販タオルを入手して実験に用いた。また、木綿 100%製のタオルも同様に実験し、洗濯により微細化した繊維の発生挙動を比較した。

通り実施した。水道水 10 L を用い、合計約 15 分間の洗いとすすぎの操作（以降、洗濯 1 サイクルとする）を 3 回繰り返し、その後脱水操作を行った。メッシュで受けた発生繊維層は同水道水を用いて逆洗し、ポリカーボネート製ろ紙（孔径 10 μm、Φ47mm、Merck）上で洗浄水をろ過して回収した。なお、対象サンプルの洗濯前に水道水を用いた空洗濯を 5 サイクル実施してコンタミをなるべく排除するとともに、1 サイクルのブランク試料中の繊維の有無を確認する試験を実施した。微細化した繊維の発生量は、乾燥重量の測定により評価した。

発生した繊維の個数（本数）は Nile Red 染色による蛍光観察法により計数して評価した。前処理では、分析を阻害する夾雑物がないことから、分解工程を省略して実施した。染色操作では、調製済みの Nile Red 溶液を試料に 4 mL 添加し 70°C で 90 分反応させた。乾燥した試料は重量測定後に観察に供した。観察には実体顕微鏡（Leica）に蛍光ユニット（BioTools）を組み合わせた装置を使用し、落射蛍光条件下で短軸径 100 μm 以下、長軸径 100 μm 以上を目安に確認された繊維を計測した。落射蛍光条件下でポリエチレンテレフタレート（ポリエステル）、ナイロン等は赤色で観察されることから、本実験では観察された赤発光繊維はすべて洗濯実験で発生した繊維であるとみなして計数した。



図-30 洗濯繊維の発生実験の装置概要

洗濯繊維の発生実験は図-31 に示した操作フローの

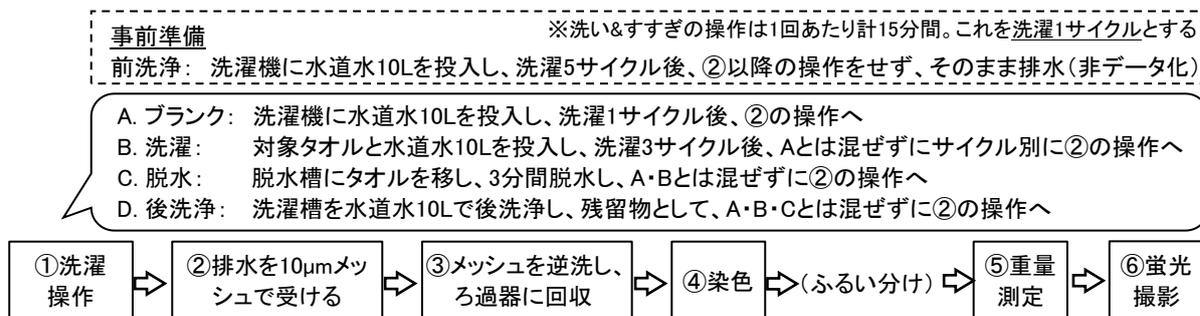


図-31 洗濯繊維の発生実験の操作フロー

表-8 洗濯繊維の発生実験における素材別の発生繊維重量

	ポリエステル			ナイロン			木綿
	第1回	第2回	平均	第1回	第2回	平均	
タオル1枚の投入重量(g)	94.0	91.1	92.6	24.1	24.3	24.2	135.4
洗濯操作ブランク (mg) <A>	0.06			0.09			N.A.
洗濯3回により発生した繊維の重量 (mg) 	2.40	4.27	3.34	1.82	1.11	1.47	148.8
脱水操作で発生した繊維の重量 (mg) <C>	0.33	0.11	0.22	0.78	0.24	0.51	6.4
全操作(洗濯3回+脱水1回)で発生した繊維の重量 (mg) <B+C>	2.73	4.38	3.56	2.60	1.35	1.98	155.2
洗濯装置内の残留量 (mg) <D>	1.73	0.34	1.04	0.86	0.89	0.88	14.9
タオル1gあたりの洗濯発生繊維重量 (mg/g) <B+C+D-A>/タオルの重量	0.046	0.051	0.049	0.14	0.09	0.12	1.3

N.A.: 重量計測不可

3.4.2 実験結果と考察

3.4.2.1 洗濯により各種素材のタオルから発生した微細化繊維の重量の比較

タオル1枚を洗濯繊維の発生実験に供した時の素材別の発生繊維屑（以下、微細化繊維とする。）の重量を表-8に示す。ナイロンとポリエステルの結果の比較には2回の実験の平均値を用いた。なお、投入したタオル1枚の重量は、ポリエステルが92.6g、ナイロンが24.2g、木綿が135gであり、ナイロンと木綿では5.6倍の差があった。発生した微細化繊維の重量や本数の比較では、洗濯槽へ投入するタオルの重量や枚数の統一が望ましいが、次の理由で行わなかった。同様の重さやサイズの各素材100%製のタオルの入手が困難であり、裁断等による重量統一では解れが、異なる枚数での重量統一ではタオル同士の擦れが、それぞれ影響すると想定されたためである。

1枚のタオルから3回の洗濯操作で発生した繊維の重量は、ポリエステルでは3.34mg、ナイロンでは1.47mg、木綿では148.8mgであり、その後の脱水操作で発生した重量はそれぞれ0.22mg（洗濯操作の6.6%）、0.51mg（洗濯操作の34.8%）、6.4mg（洗濯操作の4.3%）であったことから、各素材で繊維の発生量や各操作による発生量の傾向が異なることが示された。

洗濯装置内での残留量に目を向けると、ポリエステルでは1.04mg、ナイロンでは0.88mg、木綿では14.9mgが残留していた。また、洗濯操作ブランク試験で検出された繊維屑は不検出～0.09mgであり、多い場合ではナイロンの実験の全操作後に検出された微細化繊維重量2.86mgの3.2%程度となり無視はできないと考えられた。そのため、洗濯装置中の残留分を含めつつ、

ブランク試験で検出された繊維屑の重量を差し引くことで、タオル1gあたりの1回の洗濯による微細化繊維の発生量を求めることとした。その結果、ポリエステルでは0.049mg/g、ナイロンでは0.12mg/g、木綿では1.3mg/gの微細化繊維が発生し、木綿からの発生重量が顕著に大であった（ナイロンの11.0倍、ポリエステルの25.7倍）。プラスチック繊維間を比較すると、ナイロンの微細化繊維の発生重量はポリエステルに比べ2.3倍大であった。自然繊維と人工繊維、また、人工繊維の間で発生挙動が異なることが示唆された。

ある既報では、ポリエステル布地の洗濯繊維の発生実験から0.025～0.1mg/gの繊維状MPsが発生したと報告しており²⁶⁾、本研究のポリエステルタオル1枚の洗濯からの発生重量0.049mg/gと同様であった。一方、他の報告では、フリースジャケットを含むポリエステル製の衣服を洗濯繊維の発生実験した際に洗濯量の0.3%（3mg/g）を超える重量の繊維状MPsが発生したとしており、本研究の結果とは大きく異なった²⁷⁾。本研究および既報の実験条件の比較から、同素材であっても、繊維の縫合や衣料品の製造手法によっても洗濯による微細化繊維の発生傾向が異なることが示唆された。

3.4.2.2 化学繊維製タオルの投入枚数および洗濯回数による発生重量の比較

タオル1gあたりの微細化繊維の発生量が少なかったポリエステルを対象に、洗濯装置への投入枚数および洗濯回数による発生繊維の重量の変化を比較した。繰り返し洗濯回数は31回までとした。その結果を図-32に示す。なお、タオル1枚の重量（平均値）は92.9gであり、5枚では464g、10枚では929gであった。

洗濯1回の時について、洗濯タオル枚数が異なる実験での発生繊維重量を比較すると、5枚洗濯時の発生重量が8.79 mgと最大であり、10枚の3.27 mgよりも2.7倍、1枚の14.9倍大きかった。洗濯物の洗濯数や重量が増加するほど微細化繊維の発生重量が増加するわけではなく、用いる洗濯装置の大きさや洗濯する衣料品の量との関係によって、微細化繊維が発生しやすい条件が異なることが示唆された。

次に、洗濯回数における発生繊維の重量を比較すると、洗濯枚数1、5、10枚のすべてのケースで、1回目が最も多く、洗濯回数が多くなるにつれて、発生繊維重量が減少する傾向がみられた。例えば、洗濯枚数5枚の時、繊維の発生重量は1回目の8.79 mgを基準とすると、洗濯2~11回(平均値)では0.46倍の4.02 mgとなり、その後12~21回(平均値)では0.14倍の1.19 mg、22~31回(平均値)では0.09倍の0.83 mgであった。つまり新品のポリエステル製タオルは、最初の洗濯での微細化繊維の発生重量が最大で、洗濯を重ねるにつれ発生重量が減少することが示唆された。31回の洗濯操作による累積繊維発生重量はタオル5枚洗濯時が最大で(69.2 mg)、10枚の時の発生重量48.5 mgの1.4倍、1枚の時の発生重量8.5 mgの8.1倍であった。

ポリエステルタオルの31回繰り返し洗濯繊維の発生実験において微細化繊維の累積発生重量が最大であった投入タオル5枚(464 g)の条件に対し、同様の条件下でのナイロンタオルからの繊維発生挙動との比較を試みた。その結果を図-33に示す。なお、投入したナイロンタオルは19枚で重量は448 gであった。1回の洗濯では微細化繊維が9.16 mg発生し、ポリエステル(5枚、464g)からの発生重量8.79 mgと比べ、1.04倍であった。一方で、31回の洗濯における累積繊維発生重量は、ナイロンタオルでは79.4 mgであり、ポリエステルタオルの1.15倍であった。繰り返し洗濯

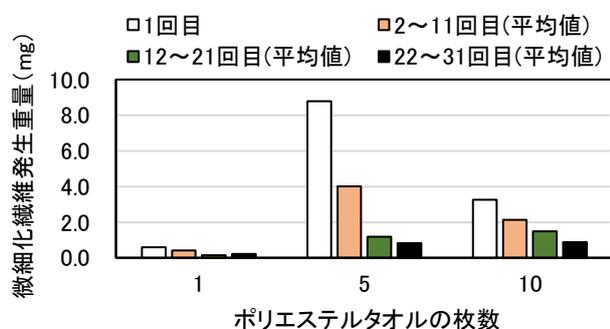


図-32 洗濯装置への投入枚数と洗濯回数別のポリエステルタオルからの発生繊維重量

回数に着目すると、ポリエステルと同様に1回目の発生重量が最大であったが、洗濯22~31回目(平均値)の発生重量3.73 mgが2~11回(平均値)の2.11 mgや12~21回(平均値)の1.18 mgよりも大であり、ポリエステルとは異なる傾向であった。以上より、洗濯枚数による洗濯槽中での擦れ等の条件が異なることは想定されるものの、材質によって洗濯回数と微細化繊維の発生重量との関係が異なることが示唆された。

3.4.2.3 化学繊維タオル1枚から発生した繊維状マイクロプラスチックの本数と長さ分布

洗濯実験で発生した繊維すべてを実体顕微鏡で観察することは現実的ではないため、得られた繊維サンプルの一部について重量の測定、本数の計数、繊維1本1本の長さの計測を行った。ナイロンタオルの場合、洗濯繊維1.82 mgから検出された繊維の本数は1,109本で、単位重量あたりでは609本/mgであった。ポリエステルと木綿の繊維1 mgあたりの本数は、1,350本/mg、18,500本/mgであった。

洗濯実験で発生した繊維の重量と単位重量あたりの本数を掛け合わせて、洗濯実験で発生した繊維の本数を求めた。そして、発生した繊維の本数を洗濯機に投入したタオルの重量で割り、材質が異なるタオル間で洗濯繊維の発生量を比較した。ナイロン、ポリエステル、木綿の各素材のタオル1 gあたりに換算した繊維発生本数はそれぞれ67.0本/g、66.2本/g、24,000本/gとなり、木綿で特に多い結果となった。

ポリエステル製、ナイロン製のタオル1枚から発生した繊維状MPsの長さ分布を図-34に示す(比較として木綿製タオルの結果も合わせて示す)。検出された繊維の長さの平均値はポリエステルでは440 μm、ナイロンでは748 μm、中央値はポリエステルでは236 μm、

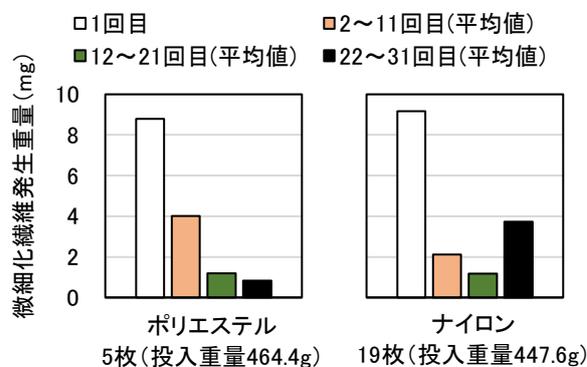


図-33 ポリエステルタオル5枚と、同重量にあたるナイロンタオル19枚からの微細化繊維の発生重量

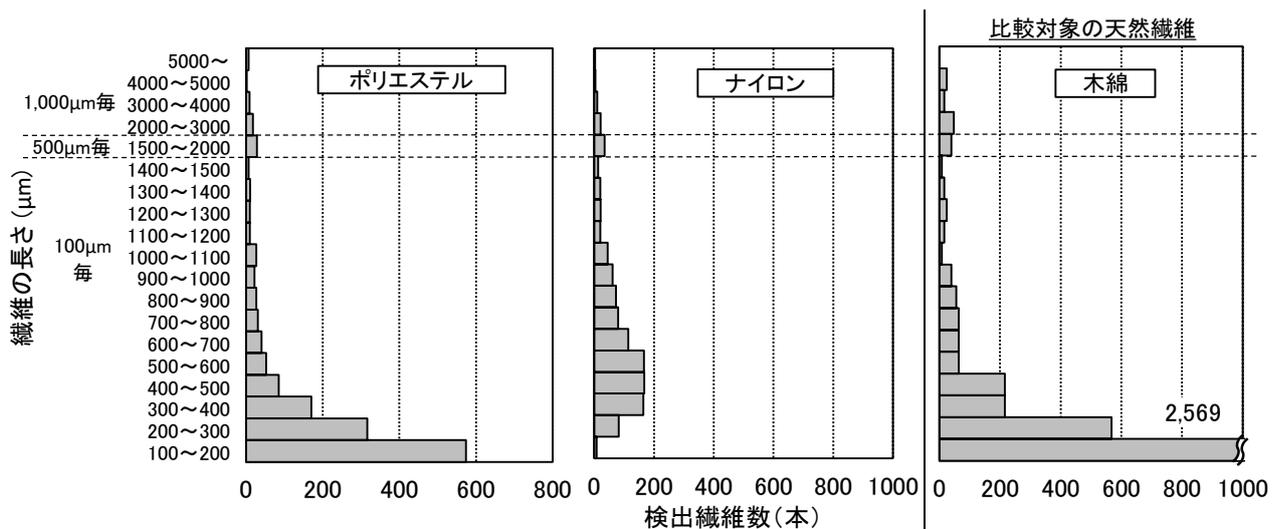


図-34 ポリエステル製、ナイロン製のタオル1枚から発生した繊維状マイクロプラスチックの長さ分布

ナイロンでは 575 μm であり、ポリエステルの方が全体的に短い繊維が多いことが示唆された。なお、2018年6月に実施した下水処理場調査において流入下水中から検出された赤発光繊維の長さの中央値は 397 μm であり、本実験結果のポリエステルとナイロンの中間程度であった。

ポリエステルでは長さが短くなるにつれて検出割合が高くなり、計測対象の最小範囲 100 μm -200 μm の長さの繊維の検出割合が 39.7% と最も高かった。一方、ナイロンでは検出割合が極大を示したのは 300 μm ~600 μm の範囲であり、これらの合計割合は全体の 44.9% であった。つまり、ナイロンよりもポリエステルのほうが、より微細な繊維状 MPs が発生しやすいことが示唆された。

木綿の長さ分布をみると、長さの平均値は 324 μm 、中央値は 162 μm であり、ポリエステルと同様に、より短い繊維の検出割合が高く、計測対象の最小範囲 100 μm -200 μm の長さの繊維の検出割合が 63.1% と顕著に高かった。

以上をまとめると、衣料品の一つであるタオルを用いた比較によると、繊維状 MPs の発生本数はポリエステルとナイロンと同様であるものの、ポリエステルのほうがより微細な繊維状 MPs が発生することが示唆された。さらに、木綿製タオルと比較すると、人工繊維製タオルでは、微細繊維の発生重量が小さく、本数が少なく、より微細な繊維の割合が低い傾向にあった。

3.4.2.4 洗濯排水からの繊維状マイクロプラスチックの排出原単位の推定

本研究で得られたデータを用いて洗濯排水からの繊維状 MPs の排出原単位の推定を試みた。一人一日の

洗濯量を 1.5kg と想定し、洗濯物が全てポリエステルタオルであったと仮定して本研究の実験結果をあてはめたところ、ヒト一人の洗濯により発生する繊維状 MPs を算出すると 99,300 本/人/日となった。この結果は、1 人 1 日分の洗濯物を想定して衣類の洗濯繊維の発生実験を行った既往研究による報告値 97,700 本/人/日²⁸⁾と同程度であった。また、前述の 2018 年 6 月の下水処理場調査結果に対し、流入下水量 80,336 m^3 と処理人口を用いて算出された値 74,300 本/人/日とも同程度であった。

3.4.3 まとめ

ポリエステル、ナイロン、木綿製のタオルを用いて洗濯繊維の発生実験を行い、洗濯における繊維状マイクロプラスチックの発生挙動を検討した。洗濯 3 回と脱水によるタオル 1g あたりの微細化繊維の発生量はポリエステルでは 0.049 mg/g、ナイロンでは 0.12 mg/g、木綿では 1.3 mg/g であった。ポリエステルタオルの洗濯枚数を変更した実験の結果、洗濯量が増加するほど微細化繊維の発生量も増加するわけではなく、洗濯装置の大きさや洗濯量との関係により、微細化繊維が発生しやすい条件が異なることが示唆された。一人あたりの洗濯による繊維状マイクロプラスチックの発生量を概算すると、99,300 本/人/日であった。

3.5 マイクロプラスチックの生物への影響

3.5.1 粒状マイクロプラスチックがムレミカツキモに及ぼす影響評価

3.5.1.1 はじめに

1950 年代以降、プラスチックの生産と使用は世界的

に増加し、その結果プラスチックが環境に与える影響が深刻な問題になっている。環境中に放出されたプラスチックは、風化等により劣化を受けることで直径 5 mm 以下のマイクロプラスチック (MPs) となり、水生生物に取り込まれることで影響を与えることが懸念されている。MPs が水生生物に与える影響は魚類、甲殻類、貝類を含め水生生物で多数報告されているが、藻類は食物連鎖の底辺に位置しており、MPs が藻類に与える影響を明らかにすることは、MPs が環境に与える影響を考える上で重要であると考えられる。本研究では、大きさや種類の異なる 8 種の MPs を用いて、モデル藻類であるムレミカヅキモの増殖に与える影響を検討した。

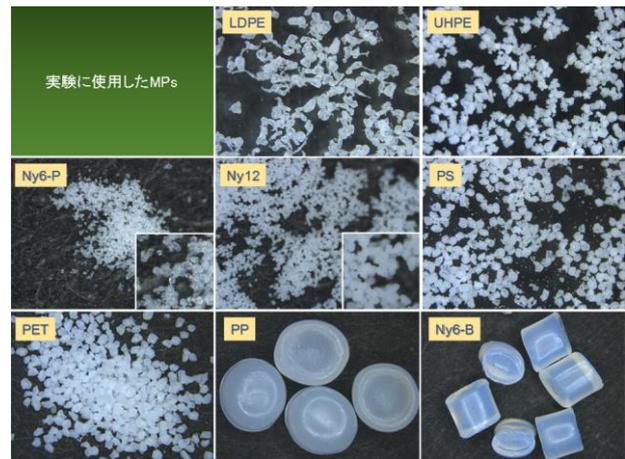


図-35 実験に使用した MPs

3.5.1.2 実験方法

3.5.1.2.1 使用プラスチック

実験には粉末状 MPs (6 種) とブロック状 MPs (2 種) を用いた (図-35)。粉末状 MPs は、ポリエチレンテレフタレート (PET)、ポリスチレン (PS)、低密度ポリエチレン (LDPE)、超高分子量ポリエチレン (UHPE)、ナイロン 6 (Ny6-P) とナイロン 12 (Ny12) を用いた。実験に使用する MPs はいずれも直径 53 μm \geq とした。PET、PS、LDPE、UHPE は粒形が < 300 μm であったことから、振るいを用いて粒径を 53 μm \geq に調製し、実験に供した。Ny6-P と Ny12 は、平均粒径がそれぞれ 15–20 μm と 25–30 μm であったことから、そのまま実験に用いた。ブロック状 MPs は、ポリプロピレン (PP、直径 3mm) とナイロン 6 (Ny6-B、一辺 3mm) を用いた。何れの MPs も透明、または白色であり、Goodfellow 社製を用いた。

3.5.1.2.2 使用藻類と生育阻害実験

ムレミカヅキモ (*Raphidocelis subcapitata*, NIES-35) は、(国研) 国立環境研究所から入手した。*R. subcapitata* は AAP 培地もしくは C 培地²⁹⁾を用いてフラスコで培養し、25°C、3000Lux で照射を行い (明期 18h/暗期 6h)、1 週間おきに継代培養を行った。

Ny6-P は 4 段階濃度で (6.25、12.5、25、50 mg/L)、Ny12 は 3 段階濃度 (150、350、750 mg/L) で試験を行った。他 4 種の粉末状 MPs (PET、PS、LDPE、UHPE) は 750 mg/L 濃度で試験を行った。ブロック状 MPs は 1 粒当たりの重量が大きく、Ny6-B では約 11.5 mg、PP では約 24.5 mg であることから、7500 mg/L 濃度で試験を行った (Ny6-G 粒子 13 個、PP 粒子 6 個)。対数増殖期のムレミカヅキモ (72 時間培養) を、AAP 培地を含

むフラスコに初期細胞密度 1×10^4 cells/mL で添加し、各 MPs を設定濃度で添加して、25°C、100rpm、4000Lux 条件下で 72 時間培養した。ムレミカヅキモのみ (MPs なし) の試料をコントロールとした。Ny6-P と Ny12 を添加したサンプルでは、セルカウンター (CDA-1000B、シスメックス株式会社製) を用いて、24 時間ごとに細胞数を測定した。72 時間暴露後、フィルターを用いてフラスコ中の細胞を回収し、クロロフィル a (Chl-a) 含有量を測定した。実験は n=3 で行った。

3.5.1.2.3 ナイロン粒子に対するムレミカヅキモの吸着試験

C 培地に Ny6-P または Ny12 (500 mg/L) を添加し、初期細胞密度 1×10^6 cells/mL とし、ムレミカヅキモ培養液を各フラスコに添加した。各サンプルは 25°C、100rpm、4000Lux で培養を行った。ナイロン粒子を含まないムレミカヅキモのみの培養試料をコントロールとした。またナイロン粒子のみを含む試料をネガティブコントロールとした。ムレミカヅキモとナイロン粒子の両方を含む上澄み液 (A) 中の粒子数を、セルカウンターを用いて 5 時点 (0、30、90、240、300 分) 測定した。また、ナイロン粒子のみを含む培地を調製し、この粒子の数 (B) を 5 時点それぞれで測定した。上清中の藻類細胞数は、(A) から (B) を差し引くことで算出した。300 分間培養した後、光学顕微鏡 (BX51、オリンパス株式会社製) を用いてフラスコ内の沈殿物を観察した。実験は n=3 で行った。

3.5.1.2.4 ゼータ電位測定

AAP 培地中にムレミカヅキモ (8×10^4 cells/mL) と 5 mg/L Ny6-P を添加し、1 分間攪拌後、1 分間静置し、ゼータ電位を測定した。各サンプル約 1mL をキュベットに注入し、ゼータ電位測定装置 (DelsaTM Nano HC、

ベックマン・コールター社製) を用いて、20°Cで測定した。実験は n=3 で行った。

3.5.1.2.5 メタボローム解析

Ny6-P (6 mg/L) とムレミカツキモ (1×10^4 cells/mL) を C 培地に添加し、25°C、4000 Lux、100 rpm 条件下で培養を行った。培養 0、6、24 時間後、Omnipore™ メンブレンフィルター (1.0 μm の親水性 PTFE、Merck Millipore 社製) を用いて細胞を回収し、Milli-Q 水で 2 回洗浄した。その後、フィルターを Milli-Q 水と内部標準物質 (H3304-1002、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社製) を含むメタノール 2.0 mL に浸し、30 秒間超音波処理を行った。細胞懸濁液は分析まで -80 °C で保存した。細胞破碎液を 2300×g、4°C、5 分間遠心分離し、上清を採取後、ミリポア 5kDa カットオフフィルターを通してタンパク質を除去した。濾液を遠心分離により濃縮後、50 μL Milli-Q 水に再懸濁し、CE-TOFMS (アジレント・テクノロジー株式会社製) を用いて代謝物の測定を行った。実験は n=1 で行った。

3.5.1.3 結果と考察

3.5.1.3.1 MPs がムレミカツキモの増殖に与える影響

ムレミカツキモの増殖に対する 6 種粉末状 MPs (PET、PS、LDPE、UHPE、Ny6-P、Ny12) の影響について検討した。Ny6-P を 6.25、12.5、25、50 mg/L 添加してムレミカツキモを増殖させると、6.25 mg/L 以上でムレミカツキモの増殖阻害が確認された (図-36-a)。72 時間後の細胞数をコントロールと比較した場合、

6.25 mg/L でムレミカツキモの細胞数は 54.2% 阻害され、12.5 mg/L 以上で 98% 以上の阻害が確認された (図-36-b)。72 時間後の Chl-a 量を検討した場合、細胞数と同様に、12.5 mg/L 以上で 95.4% 以上の阻害が観察された (図-36-c)。これらの結果からムレミカツキモは、6.25 mg/L 濃度の Ny6-P で影響を受けることが推察される。

一方、Ny12 を用いてムレミカツキモの増殖と Chl-a 量に対する影響を検討した場合、Ny12 の量に反比例して細胞増殖と Chl-a 量の減少が確認されたが、350 mg/L 以上の濃度が必要であり、Ny6-P と比較するとかなり多い量であることが明らかになった (図-37)。

他の 4 種の MPs 粒子を添加し、ナイロンと同様な実験を行った場合、72 時間後の細胞量と Chl-a 量は 750 mg/L 濃度でもほとんどコントロールと変わらず、LDPE の処理において 20~50% の阻害が見られる程度であった (図-38)。以上の結果から、今回用いた MPs の中で、Ny6-P が最もムレミカツキモの増殖に影響を与えることが明らかになった。

ムレミカツキモに対するブロック状 MPs (Ny6-B および PP) の効果を検討した場合、Ny6-B および PP 処理において、最高濃度 7500 mg/L でも成長および Chl-a 量の有意な低下は認められなかった。これらの結果から、ミリサイズの大きさの MP はムレミカツキモの生育を阻害しないことが示唆された。

3.5.1.3.2 Ny6-P とムレミカツキモの吸着の検討

他の MPs に比べ Ny6-P が突出してムレミカツキモに影響を与える要因を明らかにするため、吸着試験を行った。本試験では肉眼での観察を容易にするため、EC50 の 100 倍量に相当する 500 mg/L 濃度で試験を

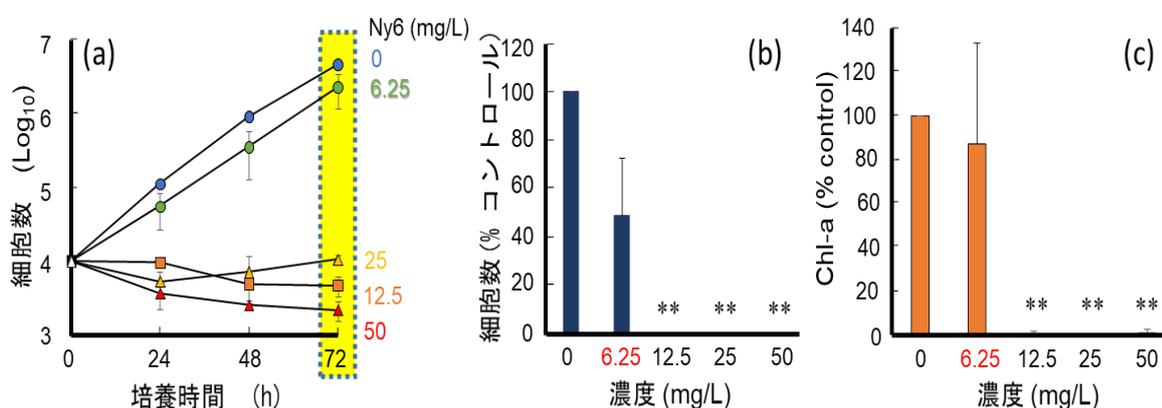


図-36 Ny6-P がムレミカツキモの増殖に与える影響

(a) Ny6-P 濃度とムレミカツキモの増殖の関係、(b) Ny6-P を暴露した際の 72 時間後の細胞数、(c) Ny6-P を暴露した際の 72 時間後のクロロフィル a 量

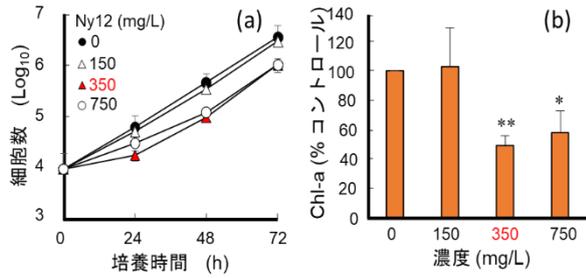


図-37 Ny12 がムレミカヅキモの増殖に与える影響 (a) Ny12 濃度とムレミカヅキモの増殖の関係、(b) Ny12 を暴露した際の 72 時間後のクロロフィル a 量

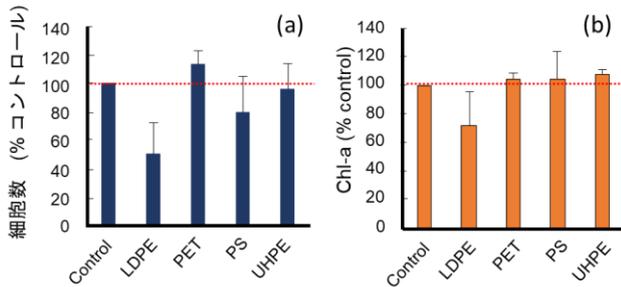


図-38 4 種 MPs がムレミカヅキモの増殖に与える影響 (a) MPs を暴露した際の 72 時間後の細胞数、(b) MPs を暴露した際の 72 時間後のクロロフィル a 量

行った。ナイロン粒子 (Ny6-P と Ny12) を添加した際の、上清中の細胞数を示したグラフを図 39-a に示す。コントロールにおけるムレミカヅキモの細胞数は、培養 300 分ではあまり変化は見られないが、Ny6-P を添加したムレミカヅキモの培養液では、添加後 30 分で上清中の細胞数が 40% 減少し、添加後 300 分で 86.7% まで減少することが明らかになった。この際、フラスコ底部に緑色の沈殿が確認され (図-39-c)、この沈殿部分を光学顕微鏡で観察すると、Ny6-P に吸着したムレミカヅキモが多数観察された (図-39-d)。Ny12 も同様な現象は確認されたが、Ny6 に比べて弱いことが明らかになった (図-39-a)。Ny6-P とムレミカヅキモの吸着を明らかにするため、ゼータ電位を測定した (図-39-b)。ムレミカヅキモのみではマイナスに帯電したが、Ny6-P ではプラスに帯電することが明らかとなった。一方 Ny6-P とムレミカヅキモを入れた溶液ではムレミカヅキモ単独よりもゼータ電位の増加が確認された。これまでの研究で、PS、PE、PP、PVC 等のプラスチックはマイナスに帯電し、ナイロンはプラスに帯電することが報告されている³⁰⁾。ムレミカヅキモはマイナスに帯電していることから、Ny6 とムレミカヅキモは静電的に吸着することが推察された。

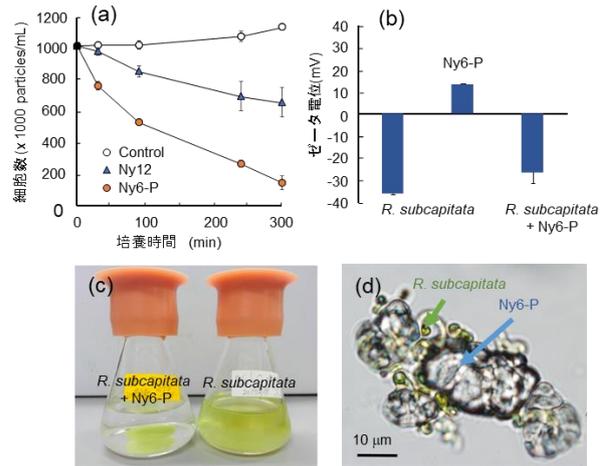


図-39 Ny6-P とムレミカヅキモの吸着の関係

(a) Ny6-P と Ny12 を暴露した際の細胞数の変化、(b) Ny6-P を暴露した際のゼータ電位、(c) Ny6-P を添加したムレミカヅキモの培養液、(d) Ny6-P に吸着したムレミカヅキモの顕微鏡写真

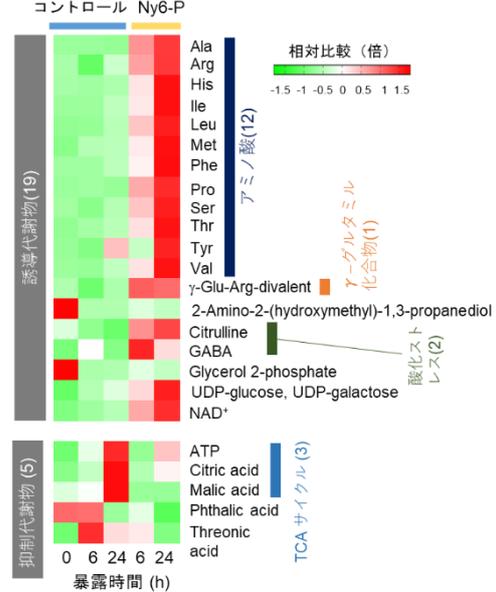


図-40 Ny6-P の 6h と 24 h 処理で誘導・抑制されたムレミカヅキモの代謝物

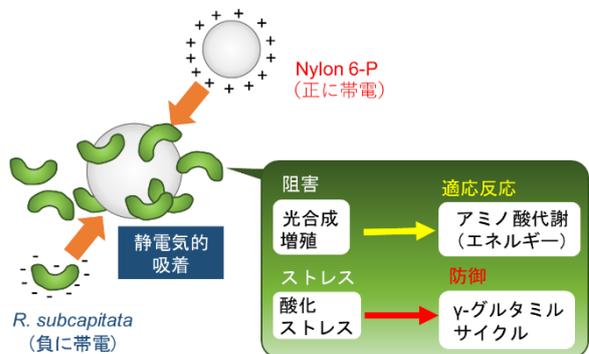


図-41 Ny6-P がムレミカヅキモに及ぼす影響のモデル図

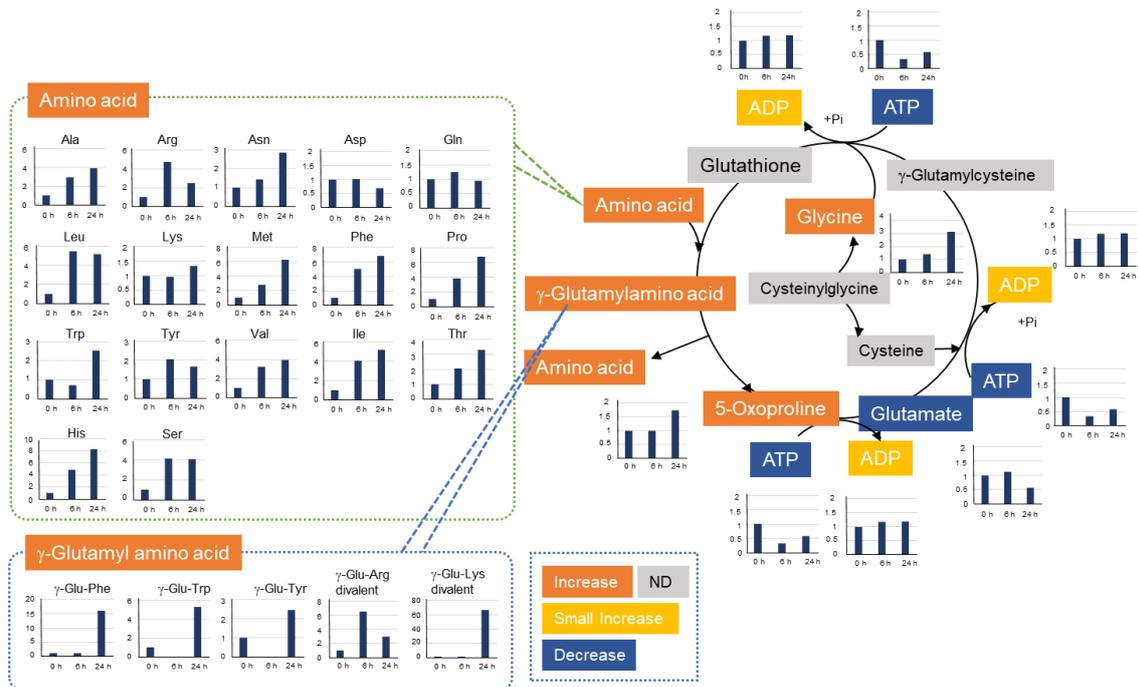


図-42 Ny6-P で誘導されたγグルタミルサイクル

3.5.1.3.3 Ny6-P に曝露したムレミカツキモのメタボローム解析

Ny6-P を曝露することでムレミカツキモの代謝にどのような影響が生じるか明らかにするため、CE-TOFMS を用いて、メタボローム解析を行った。その結果 177 代謝物が検出された。Ny6-P を処理したムレミカツキモにおいて 6h と 24 h の両方で誘導・抑制が検出された代謝物質は、誘導が 19 物質、抑制は 5 物質であった (図-40)。誘導する代謝物のうち、12 物質はアミノ酸に關与する代謝物であり、抑制される代謝物のうち 3 物質は TCA サイクルに關与する代謝物であった。ムレミカツキモに Ny6 が吸着すると、それにより呼吸や光合成が阻害され、アミノ酸代謝によるオートファジーシステムが代わりに誘導されることが推察された (図-41)。これは TCA cycle によるエネルギー合成が抑制されたことを反映している可能性が考えられる。

また Ny6-P を 6h と 24h 処理した場合のどちらかで検出された誘導代謝物は 72 物質であったが、そのうちの 29% はγグルタミルサイクルに關与する代謝物であった (図-42)。γグルタミルサイクルは細胞内に生成された酸化物を防御するシステムの 1 つであることが報告されている³¹⁾。今回の研究では、直接ムレミカツキモ内での活性酸素量は測定していないが、他の報告では藻類と MPs を共存させると酸化ストレスが

生じることが報告されている³²⁾。そのため、γグルタミルサイクルはNy6による酸化ストレスの防御に關与することが推察された。

3.5.2 洗濯により生じたマイクロプラスチック繊維がヒメダカの稚魚に及ぼす影響

3.5.2.1 はじめに

近年、衣服の洗濯により生じる繊維状マイクロプラスチック (MPs) の水環境への放出が懸念されている。繊維状 MPs が水生生物に与える影響については魚類を用いた調査報告があるが、用いられた繊維状 MPs は人工的に切断されたサンプルが中心であり、洗濯によ

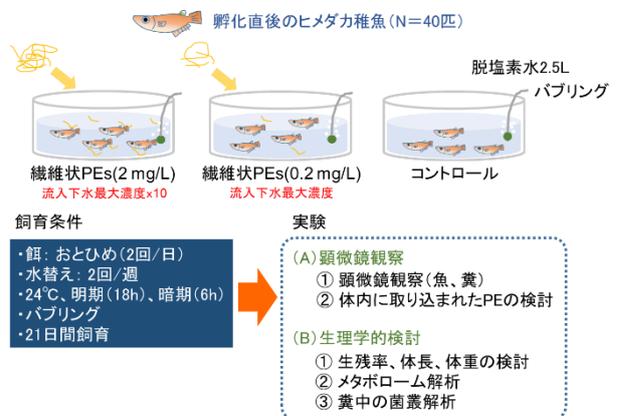


図-43 実験方法

り生じた繊維状 MPs による影響とは異なることが考えられる。そこで本研究では、蛍光ポリエステル布を実際に洗濯することでポリエステル（以下、PEs と表記）繊維を調製し、それらを孵化直後のヒメダカに曝露することで、生理学的、オミックス解析の両面から、繊維状 MP の影響を検討した。

3.5.2.2 実験方法

3.5.2.2.1 洗濯繊維の調製

市販の蛍光ポリエステル布（92 cm×200 cm）を 3-4 cm×3-4 cm に切断し、蒸留水（30 L）に入れ、2 時間洗濯を行った。洗濯排水を 10 μm メッシュでろ過し、蒸留水で洗浄後、PEs 繊維を 10 μm PC membrane で回収し、自然乾燥したサンプルを実験に用いた。また PEs 繊維は、蛍光ユニット（BioTools 社製）を組み合わせた実体顕微鏡（S8 APO Leica 社製）と電子顕微鏡（SEM、

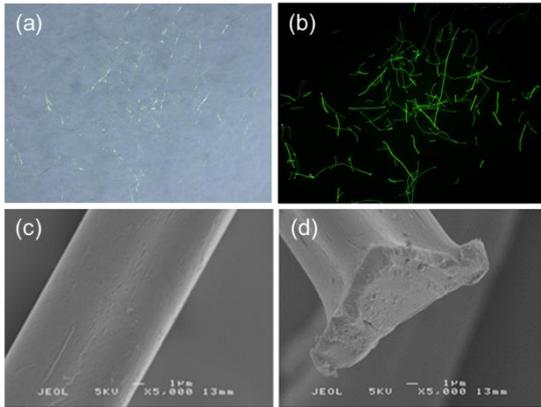


図-44 PEs 洗濯繊維の顕微鏡写真

(a) 実体顕微鏡写真（明視野）、(b) 実体顕微鏡写真（暗視野）、(c) (d) 電子顕微鏡写真（SEM）

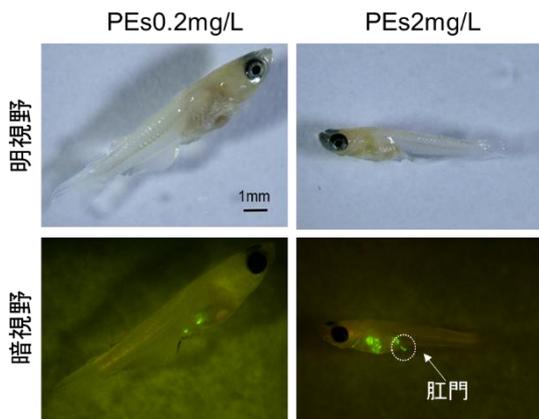


図-45 PEs 繊維を曝露したヒメダカの顕微鏡観察（21 日後）

BX40、OLYMPAS 社製）を用いて観察を行った。

3.5.2.2.2 ヒメダカを用いた PEs 繊維の曝露試験

魚類は（国研）国立環境研究所より分譲されたヒメダカ（*Oryzias latipes*、NIES-R 系統）を用いた。PEs 繊維の添加量は下水処理場の流入下水で検出された 1 時間当たりの繊維の最大量（ナイルレッドで赤色に発色した繊維：ナイロン、PET 等、357 本/L）を基準とした³³⁾。PEs100%タオルを洗濯した結果、1577.6 本/mg であったことから、流入下水に含まれる繊維量 357 本/L を 0.23 mg/L と換算し、本実験の PEs 繊維の曝露量を 0.2 mg/L、またその 10 倍量の 2 mg/L とした。実験方法を図-43 に示す。孵化直後のヒメダカ 40 匹（n=2）を 2.5L の脱塩素水に入れ、PEs 繊維 0.2 mg/L、2 mg/L を曝露した。飼育条件は、給餌はおとひめ 2 回/日、24℃、明期（18 時間）/暗期（6 時間）、バブリング条件下とし、21 日間培養を行った。水替えは 2 回/週とした。培養後のヒメダカ各 40 匹（飼育した稚魚の半数）を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、生残

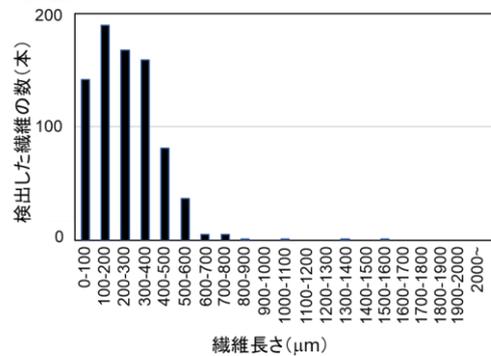


図-46 ヒメダカから検出された PEs 繊維の長さ分布

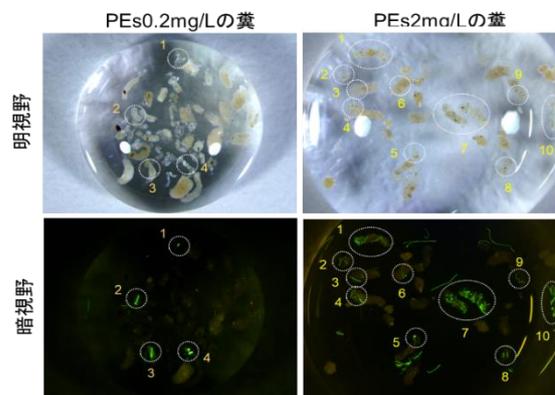


図-47 PEs 繊維を曝露したヒメダカ卵の顕微鏡観察（21 日後）

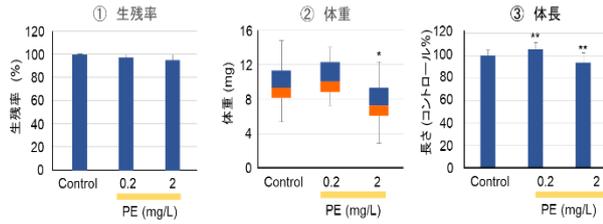


図-48 PEs 繊維を暴露したヒメダカの生理学的特徴

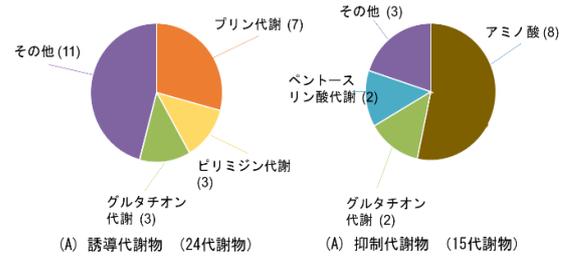


図-49 メタボローム解析で誘導・抑制された代謝物

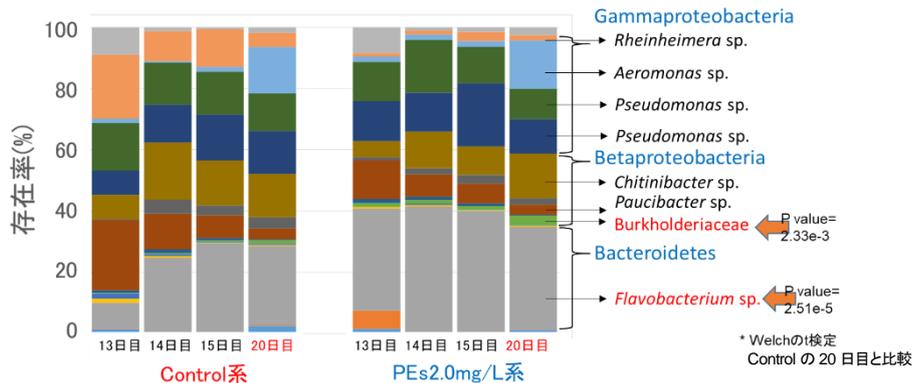


図-50 PEs2mg/L を暴露したヒメダカ糞中の菌叢解析

率、体長、体重、稚魚中の PEs 繊維の取り込みの検討に用いた。

残りの 40 匹は液体窒素で凍結後、CE-TOFMS system (アジレント・テクノロジー株式会社製) を用いてメタボローム解析を行った。検出された代謝物のうち、コントロールと比較して 1.5 倍以上、もしくは 1 倍以上かつ $p < 0.05$ の代謝物を誘導代謝物とした。また検出された代謝物のうちコントロールと比較して 0.75 倍以下、もしくは 1 倍以下かつ $p < 0.05$ の代謝物を抑制代謝物とした。

3.5.2.2.3 ヒメダカ糞中の菌叢解析

培養 14~21 日目の水槽底から毎日糞を回収し、16S rRNA 遺伝子配列に基づき糞中の菌叢解析を行った。DNA 抽出は土壤・活性汚泥等の環境試料から DNA を抽出・精製するための市販のキット (株式会社バイオダイナミクス研究所製) を用いた。また、細菌・古細菌を網羅的に検出できる 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマー (V3-V4 領域を対象) を用い、PCR 増幅を行い、次世代シーケンサー (イルミナ株式会社製) で塩基配列を取得した。取得した塩基配列情報は、参照データベースとして SILVA132 を用い、QIIME2 で解析し、近縁種の同定を行った。

3.5.2.2.4 稚魚中の PEs 繊維の取り込みの検討

10 mL の H_2O_2 溶液に稚魚 10 匹を添加し、 $60^\circ C$ 、3h インキュベートした。 $4^\circ C$ で一晩静置後、更に 10 mL H_2O_2 を添加し、 $60^\circ C$ 、3h インキュベートした。溶解後のサンプルをろ紙で回収した後、蛍光ユニットを組み合わせた実体顕微鏡で観察し、PEs 繊維数を計測した。

3.5.2.3 結果と考察

3.5.2.3.1 PEs 繊維の特徴

洗濯で得られた PEs 繊維は、末端が平なものが多く (図-44)、長さの中央値は $354.14 \mu m$ であった。下水処理場における流入下水中の繊維状 MPs の長さの中央値が $397 \mu m$ であったことから³³⁾、本実験で得られた PEs 繊維は下水処理水中で検出された繊維とほぼ同様な長さを示すことが推察された。

3.5.2.3.2 PEs 繊維を暴露したヒメダカの顕微鏡観察

調製された PEs 繊維をヒメダカ稚魚に 21 日間曝露した結果、PEs 繊維は主に消化管で観察され、PEs0.2 mg/L では 34.2%の稚魚に、PEs2 mg/L では 92.5%の稚魚に PEs 繊維の取り込みが確認された (図-45)。この際 PEs2 mg/L では 1 匹当たり平均 19.8 本の PEs 繊維の取り込みが確認され、最長約 1.6 mm の PEs 繊維の取り込みが明らかになった (図-46)。また顕微鏡観察に

より、糞中の PEs 繊維の存在も確認された (図-47)。これらの結果から、PEs 繊維をヒメダカ稚魚に暴露すると、体内に取り込まれ、その一部は糞として排出されることが推察された。

3.5.2.3.3 PEs 繊維を暴露したヒメダカの生理学的特徴

PEs を暴露した稚魚の生理学的特徴を図-48 に示す。PEs を暴露した稚魚は PEs0.2 mg/L、PEs2 mg/L ともに生残率に有意差は確認されなかった。一方、体長と体重は、PEs2 mg/L で有意差が確認された。

生理学影響が確認された PEs2 mg/L 曝露サンプルに対してメタボローム解析を行った結果、268 代謝物が検出され、誘導代謝物は 24 代謝物、抑制代謝物は 16 代謝物検出された (図-49)。誘導代謝物では、主にプリン・ピリミジン代謝に含まれる核酸合成に関与する 10 代謝物が検出された。抑制代謝物では、主にアミノ酸に関与する 8 代謝物が検出された。これらの結果から、PEs2 mg/L を暴露するとヒメダカに核酸の損傷が生じることが推察された。またアミノ酸に関する代謝物が抑制されたことから、ヒメダカの成長に影響することが推察された。

3.5.2.3.4 PEs 繊維を暴露したヒメダカ糞中の菌叢解析

PEs2 mg/L を暴露したヒメダカの糞中の菌叢解析を行った。主座標分析を行った結果、暴露 13 日目ではコントロールと PEs 暴露系での菌叢の類似度は低かったが、暴露 20 日目は菌叢が類似することが明らかになった。

暴露 20 日目において PEs2 mg/L で特異的に増加が見られる菌叢を検討すると、Burkholderiaceae および *Flavobacterium* sp. が有意に増加することが明らかになった (図-50)。Burkholderiaceae には病原性種に対する抗菌性が報告されている種もあり³⁴⁾、*Flavobacterium* sp. は淡水魚に対する病原性種やナイロン分解菌等の報告がされている³⁵⁾。これらの細菌種は、PEs がヒメダカの腸内細菌叢へ及ぼす影響を反映しやすい可能性が考えられ、今後詳細な検討が必要であることが考えられる。

3.5.3 まとめ

3.5.3.1 粒状マイクロプラスチックがムレミカヅキモに及ぼす影響評価

材質や大きさの異なる 8 種の MPs を用いて、ムレミカヅキモの増殖に与える影響を検討した。その結果、ブロック状と比較して粒子状の MPs の影響が大きい

こと、また、粒子状の MPs では Ny6-P の影響が最も大きく、6.25 mg/L で増殖を 54.2% 阻害することが明らかになった。この原因として、Ny6-P がプラスに帯電し、ムレミカヅキモがマイナスに帯電することによる、静電的吸着によるものであることが推察された。Ny6 を曝露したムレミカヅキモの細胞内代謝物質の経時的变化を検討した。その結果、アミノ酸、 γ -グルタミルサイクル、酸化ストレスに関与する代謝物の増加が顕著に確認された。Ny6-P はムレミカヅキモを吸着することで光合成や栄養の取り込みを阻害し、飢餓状態を引き起こすことが考えられるが、その回避のためにアミノ酸代謝経路が誘導されることが推察された。また Ny6-P はムレミカヅキモに酸化ストレスを誘導し、その防御から γ -グルタミルサイクルが誘導されることが推察された。

3.5.3.2 洗濯により生じたマイクロプラスチック繊維がヒメダカの稚魚に及ぼす影響

洗濯実験で発生させた PEs 繊維をヒメダカ稚魚に 21 日間曝露した結果、PEs 繊維は主に消化管で観察された。一方、糞中にも PEs 繊維の存在も確認されたことから、取り込まれた PEs 繊維の一部は糞として体外へ放出されることが明らかになった。PEs を曝露した稚魚は PEs0.2 mg/L、PEs2 mg/L ともに生残率に有意差は確認されなかったが、体長と体重は PEs2 mg/L で有意差が確認された。生理学影響が確認された PEs2 mg/L 曝露サンプルに対してメタボローム解析を行った結果、特に誘導代謝物では、核酸合成に関与する代謝物とグルタチオン合成に関与する代謝物が確認された。これらの結果から、PEs2 mg/L を曝露するとヒメダカに酸化ストレスが生じ、それにより核酸が損傷を受けることが推察された。一方、糞中の菌叢を解析した結果、PEs 曝露系とコントロールにおいて、細菌構成に大きな違いは見られなかったが、*Flavobacterium* 属と Burkholderiaceae 科に関しては、PEs 曝露系において、経時的に増加している傾向が確認された。PEs2 mg/L では生理学的影響が確認されたが、PEs0.2 mg/L では確認されなかったことから、下水中に放出される洗濯繊維量では、ヒメダカに与える影響は少ないことが推察された。

4. おわりに

本研究では、ナノ物質については、下水に含まれるナノ物質の水生生物影響の評価、マイクロプラスチックについては、繊維状マイクロプラスチックの分析法の構築と、それらの下水処理過程や放流先における挙

動、化学繊維製タオルの洗濯実験による繊維の発生量調査および水生生物に与える影響を明らかにすることを目的として研究を行った。本研究で得られた主な知見を以下に示す。

1) 銀ナノ粒子と下水の複合影響を藻類生長阻害試験から評価した結果、流入原水及び処理水中の化学物質と銀ナノ粒子の複合影響は相殺効果であることが分かった。また、流入原水では $0.1 \mu\text{m}$ ~ $0.02 \mu\text{m}$ 、 50kDa ~ 10kDa 、 10kDa 未満の範囲に、処理水では 50kDa ~ 10kDa の範囲に、銀ナノ粒子と相殺効果を主に引き起こす化学物質が存在することが示唆された。

2) 酸化チタンについて下水処理場における実態調査を行い、下水中の酸化チタン濃度は下水処理過程で 91.3% 低減し、汚泥に移行していることが示された。

3) 下水試料中の繊維状マイクロプラスチックの分析法を構築した。繊維の検出は、Nile Red 染色による蛍光観察法とし、効果的な前処理方法として、NaI 溶液を用いた比重分離とフェントン反応による夾雑物除去について条件の最適化を行った。

4) 本研究で構築した繊維状マイクロプラスチックの分析手法をとりまとめ、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²⁴⁾を発行した。

5) 下水処理場における実態調査は 2 処理場で合計 3 回行い、流入下水と放流水の繊維状マイクロプラスチック濃度から求めた除去率は 98.9~99.9% であった。

6) 下水試料中から検出される繊維状マイクロプラスチックは、ナイロンやポリエステルと考えられる赤色の蛍光を示す繊維が主であり、流入下水中の赤発光繊維の濃度は 52 本/L から 357 本/L まで時間によって変動した。

7) 下水試料中から検出される繊維の長さ分布は処理場によって異なったが、長さ $500 \mu\text{m}$ 未満の短い繊維が多く検出されていた。また、流入下水と放流水の比較では長さ分布は似た形状となった。

8) 市販の化学繊維製タオルの洗濯実験を行い、洗濯発生繊維を分析した。洗濯 3 回と脱水によるタオル 1g あたりの微細化繊維の発生量はポリエステルでは 0.049mg/g 、ナイロンでは 0.12mg/g であった。

9) 粒状マイクロプラスチックがムレミカヅキモに及ぼす影響を藻類培養実験から調査した。6 種類の粉末状 MPs (PET、PS、LDPE、UHPE、Ny6-P、Ny12) のうち、Ny6-P で生長阻害が大きかった。

10) ナイロンがプラスに帯電し、ムレミカヅキモがマイナスに帯電していることから、Ny6-P とムレミカヅキモが静電的に吸着し、増殖を阻害することが考

えられた。またメタボローム解析からは、ムレミカヅキモに Ny6 が吸着すると、それにより呼吸や光合成が阻害され、アミノ酸代謝によるオートファジーシステムが変わりに誘導されることが推察された。

11) ヒメダカ稚魚を用いて繊維状マイクロプラスチックが魚類に及ぼす影響を調査した。洗濯で発生させた PEs 繊維を 21 日間のヒメダカ稚魚に曝露した結果、流入下水に含まれる繊維量に近い 0.2mg/L の濃度では 34.2% の稚魚に、その 10 倍の 2mg/L では 92.5% の稚魚に繊維の取り込みが確認された。曝露した繊維は主に消化管で観察され、一部は糞として排出されることが明らかになった。

12) PEs 2mg/L の曝露区では、稚魚の体長と体重が有意に低下した。メタボローム解析からは、 2mg/L 曝露区の稚魚では、核酸代謝に関与する代謝物が誘導され、アミノ酸に関与する代謝物が抑制されることが明らかになった。また、糞中の菌叢解析により、PEs 2mg/L の曝露で特定の菌叢に影響が生じることが明らかになった。

謝辞

本研究の成果の一部は、ナノ物質については中央大学の山村寛教授との「下水中に含まれるナノ物質の検出と挙動に関する共同研究」、マイクロプラスチックについては、京都大学の田中周平准教授との「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」によるものである。

本研究を遂行するにあたり下水試料をご提供いただいた下水道事業者には謝辞を表す。

最後に、繊維状マイクロプラスチックの分析法の開発、実態調査に当たっては、水質チーム派遣職員 阿部翔太氏、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。

参考文献

- 1) Howard Weinburg, Anne Galyean, Micheal Leopold. (2011). Evaluating engineered nanoparticles in natural water, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30, No. 1, 72-83
- 2) (株) 三菱化学テクノロジーリサーチ (2010)、ナノマテリアル安全対策調査事業報告書 (厚生労働省請負業務) <http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/nano/nanopdf/H21houkoku/honbun/all.pdf> (2017 年 1 月 31 日確認)
- 3) Julia Fabrega, Samuel N. Luoma, Charles R. Tyler, Tamara S. Galloway, Jamie R. Lead. (2011). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment.

Environmental International, 37:517-531

4) Fadri Gottschalk, Tobias Sonderer, Roland W. Scholz & Bernd Nowack. (2009). Modeled environmental concentration of engineered nanoparticles (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions, Environmental Science and Technology, 43, 24, 9216-9222

5) Elke Muth-Köhne, Laura Sonnack, Karsten Schlich, Florian Hischen, Werner Baumgartner, Kerstin Hund-Rinke, Christoph Schäfers, Martina Fenske. (2013). The toxicity of silver nanoparticles to zebrafish embryos increases through sewage treatment processes, Ecotoxicology, 22: 1264-1277

6) 鎌迫典久、水圏保全のための新たな排水管理ツール「WET」の最新事情、資源環境対策、Vol.47 No.5、58-66 (2011)

7) 蒲生昌志 編：ナノ材料リスク評価書 ―二酸化チタン(TiO₂)―最終報告版：NEDO プロジェクト (P06041) 「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」, 2011.

8) 国立環境研究所・環境省、生物応答を用いた排水試験法 (検討案)、平成 25 年度 排水 (環境水) 管理のバイオアッセイ技術検討分科会 (第 2 回) (2013)

9) 永井孝志、加茂将史、藻類に対する金属複合毒性のモデリング：Biotic Ligand Model, 濃度加算, 独立作用の比較、環境毒性学会誌、17(2)、57-68 (2014)

10) R-3.3.0 for Windows (32/64 bit)

<https://cran.rproject.org/bin/windows/base/old/3.3.0/>
(2017 年 1 月 27 日確認)

11) Mark A. Chappell, Lesley F. Miller, Aaron J. George, Brad A. Pettway, Cynthia L. Price, Beth E. Porter, Anthony J. Bednar, Jennifer M. Seiter, Alan J. Kennedy, Jeffery A. Stevens. (2011). Simultaneous dispersion-dissolution behavior of concentrated silver nanoparticle suspension in the presence of model organic solutes, Chemosphere, 84, 1108-1116

12) 鍋谷佳希, 田中周平, 鈴木裕識, 王夢澤, 雪岡聖, 高見航, 牛島大志, 仲田雅俊, 藤井滋穂, 高田秀重：琵琶湖南湖における 100 μm プランクトンネットを用いたマイクロプラスチック調査, 日本水環境学会シンポジウム講演集, 19, 223-224, 2016.

13) Kataoka, T., Nihei, Y., Kudo, K. and Hinata, H.: Assessment of the sources and inflow processes of microplastics in the river environments of Japan, Environmental Pollution, Vol.244, pp.958-965, 2019.

14) Daniel Sol, Amanda Laca, Adriana Laca, Mario Diaz : Approaching the environmental problem of microplastics: Importance of WWTP treatments, Science of The Total

Environment, Volume 740 (2020) 140016.

15) Mark Anthony Browne, Phillip Crump, Stewart J. Niven, Emma Teuten, Andrew Tonkin, Tamara Galloway, and Richard Thompson : Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks, Environ. Sci. Technol. 2011, 45, 21, 9175-9179.

16) Marlies R. Michielssen, Elien R. Michielssen, Jonathan Niac, Melissa B. Duhaime : Fate of microplastics and other small anthropogenic litter (SAL) in wastewater treatment plants depends on unit processes employed, Environ. Sci.: Water Res. Technol., 2016, 2, 1064-1073.

17) Zeyuan Yang, Shuxing Li, Sirui Ma, Peng Liu, Dan Peng, Zhuozhi Ouyang, Xuetao Guo : Characteristics and removal efficiency of microplastics in sewage treatment plant of Xi'an City, northwest China, Science of The Total Environment, Volume 771, 2021, 145377.

18) 田中周平, 垣田正樹, 雪岡聖, 鈴木裕識, 藤井滋穂, 高田秀重：下水処理工程におけるマイクロプラスチックの挙動と琵琶湖への負荷量の推定, 土木学会論文集 G (環境), 2019, 75 巻, 7 号, p. III_35-III_40.

19) Ministry of the Environment, Japan : Guidelines for Harmonizing Ocean Surface Microplastic Monitoring Methods Version 1.1 (June 2020).

http://www.env.go.jp/water/post_76.html

20) 垣田ら (2017) 下水処理場の各処理工程における粒径 100 μm 以上のマイクロプラスチックの存在実態調査, 第 20 回日本水環境学会シンポジウム講演集, 20, 52-53

21) Shim, W. J., Song, Y. K., Hong, S. H., & Jang, M. (2016). Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. Marine pollution bulletin, 113(1-2), 469-476.

22) Maes, T., Jessop, R., Wellner, N. et al. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. Sci Rep 7, 44501 (2017).

23) Fenton, H. J. H. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. Journal of the Chemical Society, Transactions, 65, pp. 899-910, 1894.

24) 田中周平, 山下洋正, 北村友一, 鈴木裕識：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—, 共同研究報告書 No.558, 2022 年 6 月土木研究所発行.

25) Jing Sun, Xiaohu Dai, Qilin Wang, Mark C.M. van Loosdrecht, Bing-Jie Ni : Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal, Water

Research, Volume 152, 2019, pp.21-37.

26) Hernandez, E., Nowack, B., & Mitrano, D. M. : Polyester textiles as a source of microplastics from households: a mechanistic study to understand microfiber release during washing. *Environmental science & technology*, 51(12), 7036-7046, 2017.

27) Hartline, N. L., Bruce, N. J., Karba, S. N., Ruff, E. O., Sonar, S. U., & Holden, P. A. Microfiber masses recovered from conventional machine washing of new or aged garments. *Environmental science & technology*, 50(21), 11532-11538, 2016.

28) 嶋谷ら : パルセーター型洗濯機による繊維状マイクロプラスチックの排出量実験、第 54 回日本水環境学会年会講演集、p37、2020.

29) NIES collection (2001) Media list, 1. Media for freshwater, terrestrial, hot spring and salt water algae. <https://mcc.nies.go.jp/02medium-e.html>

30) Kim YJ, Lee J, Park S, Park C, Park C, Chio HJ (2017) Effect of the relative permittivity of oxides on the performance of triboelectric nanogenerators. *RSC Adv* 78:49368–49373.

31) Bachhawat AK, Yadav S (2018) The glutathione cycle: glutathione metabolism beyond the gamma-glutamyl cycle. *IUBMB Life* 70:585–592.

32) Song C, Liu Z, Wang C, Li S, Kitamura Y (2020) Different interaction performance between microplastics and microalgae: the bioelimination potential of *Chlorella* sp. L38 and *Phaeodactylum Tricornutum* MASCC-0025. *Sci Total Environ* 723:138146.

33) 鈴木裕織、阿部翔太、村田里美、北村友一、對馬育夫、田中周平、小川文章、「下水処理工程におけるマイクロプラスチックの下水処理場における存在実態調査」、日本水環境学会年会講演集、1-A-11-1、2019

34) Fraune S., Anton-Etxleben F., Augustin R., Franzenburg S., Knop M., Schröder K., Willoweit-Ohl D., Bosch T. (2015) Bacteria-bacteria interactions within the microbiota of the ancestral metazoan *Hydra* contribute to fungal resistance. *The ISME Journal* 9: 1543-1556.

35) Negoro S., Kakudo S., Urabe I., Okada H. (1992) A new nylon oligomer degradation gene (*nylC*) on plasmid pOAD2 from a *Flavobacterium* sp. *Journal of bacteriology* 174(24): 7948-7953.

RESEARCH ON THE BEHAVIOR AND IMPACT OF NANOMATERIALS CONTAINED IN WASTEWATER

Research Period: FY2017-2021

Research Team: Water quality Team, Water Environment Research Group

Author: YAMASHITA Hiromasa

OGAWA Fumiaki

KITAMURA Tomokazu

TSUSHIMA Ikuo

MURATA Satomi

SUZUKI Yuji

Abstract:

In this study, we investigated the effects of nanomaterials in sewage on aquatic organisms and their behavior in the sewage treatment process, the development of analytical methods for fibrous microplastics, their behavior in the sewage treatment process, and the impact of fibers generated from washing experiments of towels made of synthetic fibers on aquatic organisms.

For silver nanoparticles among the nanomaterials, we conducted algae growth inhibition tests using *Raphidocelis subcapitata* in the medium added silver nanoparticles to size-fractionated sewage influent and treated water. The results suggest that the toxicity of silver nanoparticles is reduced in the fraction larger than 10 kDa, due to the coexistence of silver nanoparticles with dissolved compounds in the sewage. At a sewage treatment plant, an on-site investigation was conducted to study the behavior of titanium dioxide. The investigation showed that 91.3% of the titanium dioxide in the sewage was removed and transferred to the sludge during the treatment process.

An observation method of fibrous microplastics was developed by staining fluorescent after removing impurities using Fenton reaction and gravity separation. The on-site investigation revealed that the removal rate of fibrous microplastics at the sewage treatment plant was over 98.9%, and the concentration in the discharged water ranged from 0.4 to 13.2 fibers/L. The majority of the fibers were red fluorescent fibers, which are considered to be polyester and nylon. Washing experiments on towels made of synthetic fibers detected many fibers less than 200 μm in length for polyester and between 200 and 500 μm for nylon.

The effects of microplastics on aquatic organisms were investigated by evaluating the growth of *Raphidocelis subcapitata* using eight types of MPs with different sizes and compositions. The study revealed that nylon 6 particles had an impact on the growth of *Raphidocelis subcapitata* through electrostatic adsorption. We also investigated the effects of exposing newly hatched larval Medaka to polyester fibers prepared from fluorescent polyester fabric, using physiological and omics analyses.

Keywords: Nanomaterials, microplastic fibers, Analytical method, field survey, *Raphidocelis subcapitata*, Medaka