

## 海洋生物の環境改善に向けた電気化学的酸化反応システムに関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2024-03-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 目細, 太一 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10098/0002000162">http://hdl.handle.net/10098/0002000162</a>

福井大学審査

学位論文 [博士 (工学)]

海洋生物の環境改善に向けた電気化学的酸化反応システムに関する研究

2024年3月

目細 太一

# 目次

	ページ
<b>第 1 章 緒論</b>	<b>1</b>
1-1 プラスチック	1
1-2 プラスチックごみ問題	3
1-3 マイクロプラスチック問題	3
1-3-1 マイクロプラスチック	3
1-3-2 一次マイクロプラスチック	3
1-3-3 二次マイクロプラスチック	4
1-3-4 マイクロプラスチック問題	4
1-4 マイクロプラスチック分解	5
1-4-1 生物学的なマイクロプラスチック分解	5
1-4-2 化学的なマイクロプラスチック分解	6
1-5 マイクロプラスチックによる海洋生物への影響	8
1-6 魚類のストレスレベルのモニタリング	10
1-6-1 ストレスレベルの指標となるコルチゾールとグルコース	10
1-6-2 コルチゾールの測定方法	11
1-6-3 グルコースの測定方法	11
1-7 グルコースバイオセンサ	11
1-8 将来への課題と本研究の目的	12
1-8-1 現状	12
1-8-2 新たなマイクロプラスチック分解技術の開発	12
1-8-3 魚類の健康状態モニタリング	13
参考文献	14

<b>第 2 章</b>	<b>電気化学的促進酸化プロセスを用いた ポリアミド 66 の分解評価</b>	<b>21</b>
2-1	緒言	21
2-2	実験操作	23
2-2-1	試薬および実験機器	23
2-2-2	EAOP による PA66 フィルムを分解するための反応セルの設計と構築	24
2-2-3	白金板の裁断および表面の還元処理	24
2-2-4	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 中における O <sub>2</sub> の電気化学還元による H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 発生電位の調査	24
2-2-5	ABTS ならびに HRP を用いた 電気化学還元による H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 発生量の評価	25
2-2-6	ESR を用いた EAOP による・OH 発生の評価	25
2-2-7	EAOP 処理による PA66 フィルムの分解	26
2-2-8	PA66 フィルムの EAOP による分解評価	26
2-2-8-1	PA66 フィルムの EAOP による分解評価   形態観察	26
2-2-8-2	PA66 フィルムの EAOP による分解評価   ATR-FTIR 分析による分子構造変化の観察	26
2-2-8-3	PA66 フィルムの EAOP による分解評価   XRD 分析による結晶構造変化の観察	26
2-2-8-4	PA66 フィルムの EAOP による分解評価   GC による電解液中の分解生成物の分析	27
2-2-8-5	PA66 フィルムの EAOP による分解評価   重量変化の観察	27
2-3	結果と考察	28
2-3-1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 中における O <sub>2</sub> の電気化学還元による H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 発生電位の調査	28
2-3-2	ABTS ならびに HRP を用いた EAOP による H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 発生量の評価	29
2-3-3	ESR を用いた EAOP による・OH 発生の評価	31

2-3-4	PA66 フィルムの EAOP による分解評価	33
2-3-4-1	PA66 フィルムの EAOP による分解評価   形態観察	33
2-3-4-2	PA66 フィルムの EAOP による分解評価   ATR-FTIR 分析による分子構造変化の観察	34
2-3-4-3	PA66 フィルムの EAOP による分解評価   XRD 分析による結晶構造変化の観察	35
2-3-4-4	PA66 フィルムの EAOP による分解評価   GC による電解液中の分解生成物の分析	36
2-3-4-5	PA66 フィルムの EAOP による分解評価   重量変化の観察	37
2-4	結論	38
	参考文献	40
<b>第 3 章</b>	<b>電気化学的促進酸化プロセス中を用いた ポリエチレンテレフタレートの分解評価</b>	<b>42</b>
3-1	緒言	42
3-2	実験操作	44
3-2-1	試薬および実験機器	44
3-2-2	EAOP による PET フィルムを分解するための反応セルの設計と作製	44
3-2-3	白金板表面の還元処理	44
3-2-4	EAOP 処理による PET フィルムの分解	44
3-2-5	PET フィルムの EAOP による分解評価	45
3-2-5-1	PET フィルムの EAOP による分解評価   形態観察	45
3-2-5-2	PET フィルムの EAOP による分解評価   ATR-FTIR 分析による分子構造変化の観察	45
3-2-5-3	PET フィルムの EAOP による分解評価   XRD 分析による結晶構造変化の観察	45

3-2-5-4	PET フィルムの EAOP による分解評価   重量変化の観察	45
3-3	結果と考察	46
3-3-1	PET フィルムの EAOP による分解評価	46
3-3-1-1	PET フィルムの EAOP による分解評価   形態観察	46
3-3-1-2	PET フィルムの EAOP による分解評価   ATR-FTIR 分析による分子構造変化の観察	48
3-3-1-3	PET フィルムの EAOP による分解評価   XRD 分析による結晶構造変化の観察	49
3-3-1-4	PET フィルムの EAOP による分解評価   重量変化の観察	50
3-4	結論	51
	参考文献	52
<b>第 4 章</b>	<b>魚類のヘルスマニタリングのための 自己発電型グルコースセンサの開発</b>	<b>54</b>
4-1	緒言	54
4-2	実験操作	56
4-2-1	試薬および実験機器	56
4-2-2	MWCNT 分散液の調製	56
4-2-3	MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極の作製	57
4-2-4	MWCNT/BOD 修飾電極の作製	57
4-2-5	作製した MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極の評価	58
4-2-6	作製した MWCNT/BOD 修飾電極の評価	58
4-2-7	構築した自己発電型グルコースセンサの評価	58

4-3	結果と考察	59
4-3-1	作製した MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極の評価	59
4-3-2	作製した MWCNT/BOD 修飾電極の評価	60
4-3-3	MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極と MWCNT/BOD 修飾電極で構築した自己発電型グルコースセンサの評価	61
4-3-4	クロダイの血液を用いた自己発電型グルコースセンサのグルコース応答性評価	63
4-4	結論	64
	参考文献	65
<b>第 5 章</b>	<b>結論</b>	<b>68</b>
5-1	本研究が目指した EAOP を用いたマイクロプラスチック分解	68
5-2	EAOP 中の $H_2O_2$ および $\bullet OH$ 発生評価と、EAOP を用いた PA66 の分解評価	68
5-3	EAOP を用いた PET の分解評価	69
5-4	魚類のヘルスマモニタリングのための自己発電型グルコースセンサの開発	69
	発表論文リスト	70
	謝辞	71

## 第1章 緒論

### 1-1 プラスチック

プラスチックが大規模生産され、使用されるようになったのは 1950 年代である。プラスチックは、石油などの天然炭素資源を主な原料とし、炭素、水素、酸素、窒素、塩素などの原子を鎖状や網状に重合・合成したポリマーを使用し、加熱・加圧により自由に成形できる材料である。画期的な素材であるプラスチックは、軽量で耐久性に優れ、様々な形に成形加工でき、大量生産が可能であることから、私たちの暮らしに定着し、様々な生活分野や産業分野に貢献してきた。しかし現在、大量に生産、使用、廃棄されたプラスチックがプラスチックごみとして問題視されている。適切に処理されず環境中へ放出されたプラスチックごみが、環境中で分解されないことによる環境破壊の原因や生態系へ影響を及ぼす原因となっており、世界的に解決すべき課題として取り上げられている。

### 1-2 プラスチックごみ問題

プラスチックの使用が始まった 1950 年代のプラスチックの世界的な生産量は約 1.5 Mt/年だったが、その量は年々増加しており 2020 年には約 376 Mt/年にまで増加した (Figure 1-1) [1, 2]。製造されたプラスチック製品はその用途によって長寿命のものから使い捨て目的である短寿命のものまでである。そして、現在生産されている大量のプラスチックの内、約半数が使い捨て目的のプラスチックであり、1950 年代から 2015 年末までの 65 年間に廃棄された使い捨て目的のプラスチックの累計重量は約 6300 Mt に達している。このうち 78% (4900 Mt) が埋立処理、12% (800 Mt) が焼却処理されており、リサイクルされているのはわずか 9% (600 Mt) である (Figure 1-2) [3]。

リサイクルされず廃棄されるプラスチックは国や地域によって正しく管理された回収および処理のもと廃棄されるべきであるが、管理不届きな廃棄物が発生している。ここで管理不届きな廃棄物とは、ポイ捨てされた廃棄物か、不適切に廃棄された廃棄物であり、ゴミ捨て場や開放的な埋立地での廃棄が含まれる。不適切に管理された廃棄物は、内陸の水路、廃水への流出、風や潮の流れによる輸送によって、最終的に海洋に流入する可能性がある[4]。特定の水路によって運ばれるプラスチック廃棄物の重量は、ドナウ川で1日あたり約 4.2 Mt と推定されている[5, 6]。ただし、これらのデータは河川の流域の特徴やその地区の人口、経済状況等に左右されるため、これらの推定を地球規模に容易にあてはめて考えることはできない。しかし、河川や海洋近くの河口にて、確かにプラスチックごみが海洋へ流出しているという事実ではある。最終的に海洋へたどりついたプラスチックは紫外線への曝露、波に揉まれることによる摩擦、昼夜の寒暖差による水温変化などのダメージを繰返し受けることで劣化・破碎していき、次第にマイクロプラスチックとなる[7, 8]。



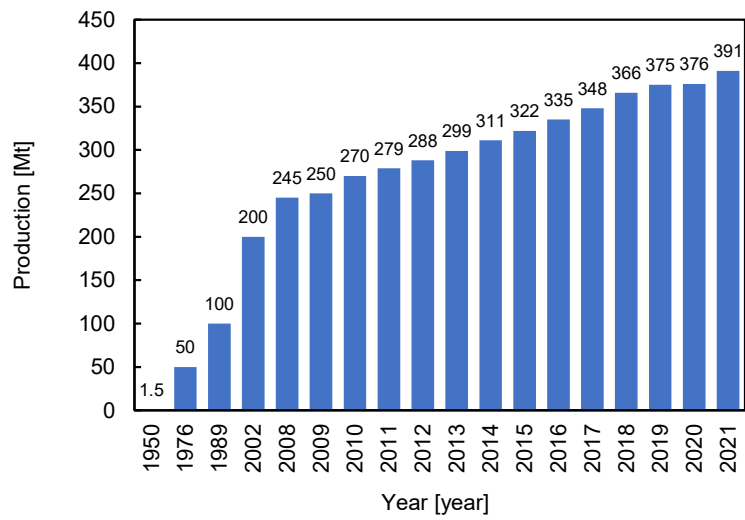


Figure 1-1 World plastic production by year. Drawn by reference [2].

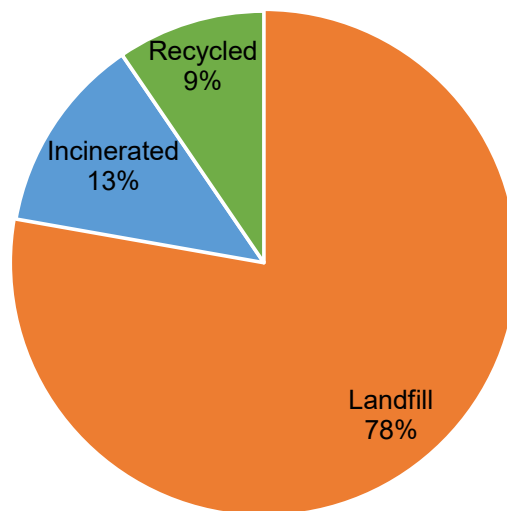


Figure 1-2 The rate of cumulative waste plastics from 1950 to 2015 by disposal treatment. Drawn by reference [3].

### 1-3 マイクロプラスチック問題

#### 1-3-1 マイクロプラスチック

マイクロプラスチックは一般に 5 mm 以下のプラスチックと定義されている (Figure 1-3)。このマイクロプラスチックは大きく分けて一次マイクロプラスチックと二次マイクロプラスチックに分類される。

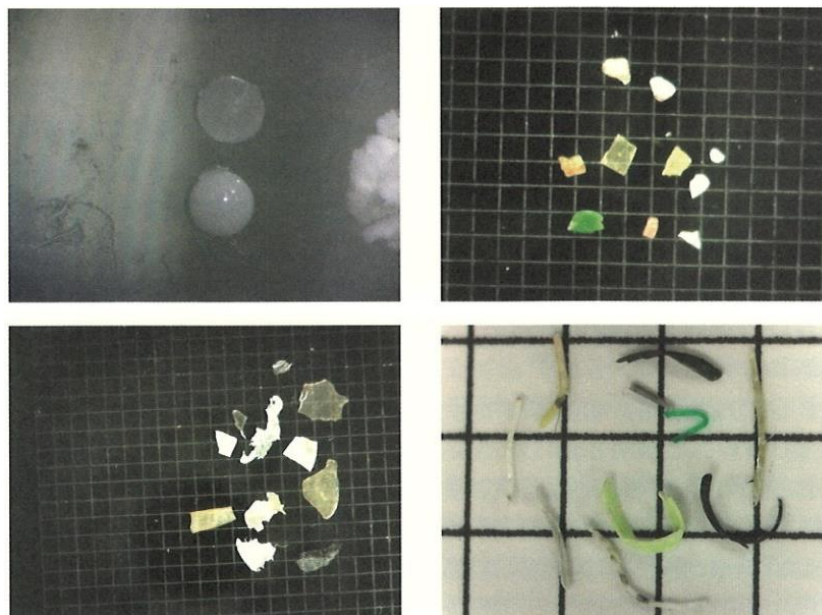


Figure 1-3 Secondary microplastics collected from the bay of Tokyo. Adapted from reference [9].

Left-upper: Beads ( $\phi=0.5$  mm)

Right-upper: Granular (1 mm/square)

Left-lower: Sheet (1 mm/square)

Right-lower: Fiber (5 mm/square)

#### 1-3-2 一次マイクロプラスチック

一次マイクロプラスチックとは、人為的に製造された微小な (5 mm 以下) プラスチックで、プラスチック製品の材料となるレジンペレットや、かつて化粧品や歯磨き粉にスクラブ剤として含まれていたマイクロビーズがこれに該当する。これら一次マイクロプラスチックが環境汚染を引き起こす要因となることを懸念して、アメリカでは 2017 年 7 月からマイクロビーズの製造が禁止されている。日本では、2018 年 6 月に成立した改正海洋漂着物処理推進法にマイクロプラスチック対策が加わり、本格的な対策が始まっている。これに伴い、日本の主要メーカーでもスクラブ剤としてのマイクロビーズの使用が見られなくなってきた。しかし最近では、合成繊維を用いた繊維製品の洗濯時に発生する繊維くずも、一次マイクロプラスチックとして問題視され始めている。特にこれをマイクロプラスチックファイバーと呼ぶ。マイクロプラスチックファイバーは、一次マイクロプラスチック全体の 35%を占めているという報告もある[10]。

### 1-3-3 二次マイクロプラスチック

二次マイクロプラスチックとは、もともと大きなプラスチック製品が環境中に放出され、年月をかけて紫外線や温度変化などの化学的な力と、波や風などの物理的な力によって劣化し、微細化（5 mm 以下）したものである。プラスチック製の包装材や容器などが微細化したものが多く、形状はシート状や欠片（粒状）が多く観察されている。

### 1-3-4 マイクロプラスチック問題

マイクロプラスチック問題が注目される以前までは、プラスチック海洋ごみが問題となっていた。プラスチック海洋ごみの問題は、漂着ごみによる景観への悪影響や、不法投棄された漁網のイルカやウミガメへの巻き付き、海鳥によるプラスチック製品誤飲等の海洋生物への影響といった“マクロ”な問題が主であったが、近年は海洋に流出したプラスチック製品が、紫外線や波などによって細かい破片となった“マイクロ”プラスチックの問題が大きく取り上げられている。

マイクロプラスチック問題とは、環境問題の1つである。マイクロプラスチックは、一度自然環境中に流出すると、回収がほぼ不可能であることが大きな問題になっている。マイクロプラスチックは多くの環境調査研究により、地表水[10]、沿岸堆積物[11]、砂丘[12]、淡水堆積物[13]、深海環境[14]においてすでに確認されており、さらには海洋生物の体内においても確認されている[15, 16]。また、マイクロプラスチックは、海洋中で劣化・分解することによって、プラスチック製品の性能向上を目的とした、製造時に添加された化学物質の放出が起こる。加えて、劣化・分解によって新たに出現した表面官能基が他の化合物を吸着しやすいという性質を持っている。これは、製品サイズのプラスチックに比べ、マイクロプラスチックは体積に対する表面積の割合が大きいためである[17-21]。マイクロプラスチック問題の最大の懸念点は海洋生物の生態系の破壊にある（Figure 1-4）。マイクロプラスチック問題による海洋生物の生態系破壊のメカニズムは魚類、甲殻類、貝類、鳥類、海洋哺乳類が海水に混ざったマイクロプラスチックを誤食してしまうことである。マイクロプラスチックは消化が困難であるため、消化不良や胃潰瘍などを引き起こし海洋生物にダメージを与える。具体的な生態毒性としては、神経毒性、捕食性能の低下、成長と繁殖への影響、代謝エネルギーの増加などが報告されている。さらに、海洋生物によるマイクロプラスチックや化学汚染物質の生体濃縮はヒトへの悪影響を与えるという可能性も懸念されている[22, 23]。

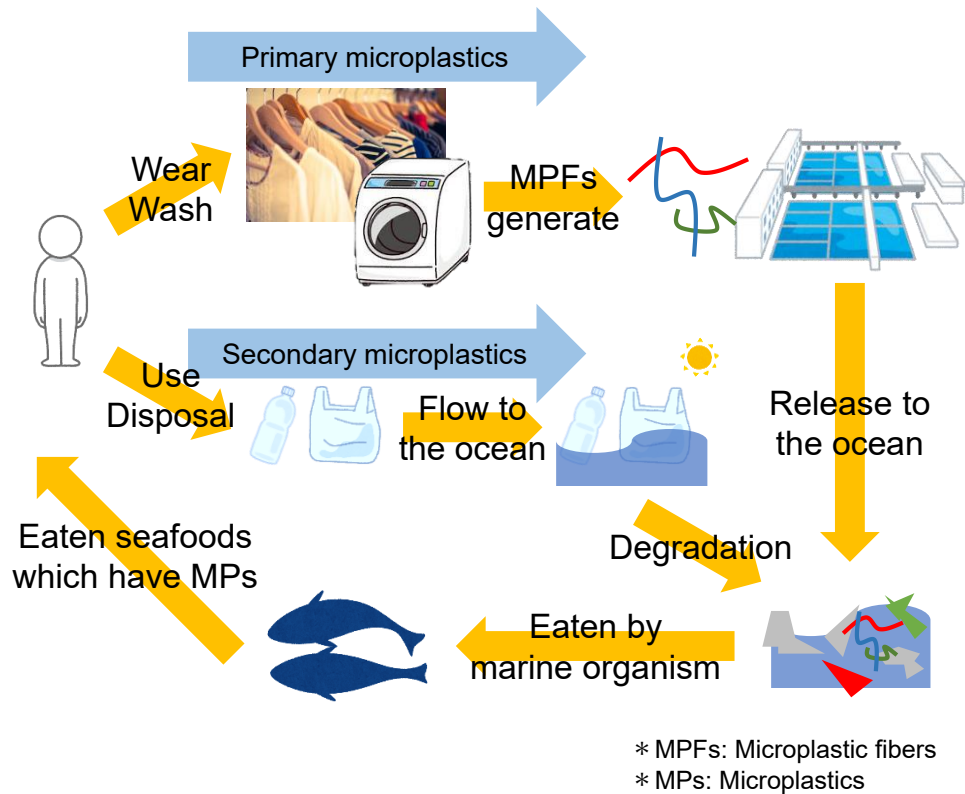


Figure 1-4 Cycle of harmful effects by microplastics.

#### 1-4 マイクロプラスチック分解

マイクロプラスチック問題を解決するために、様々な研究が行われている。プラスチックの丈夫で劣化しにくいというメリットは、分解が難しく廃棄処理が困難であるというデメリットでもあり、分解技術の開発研究を悩ませている。具体的に求められる技術には、分解システム全体が低コストであり、非毒性・環境に優しく、より速く分解可能であるといった点が挙げられる。これらを網羅した技術を開発するのが困難であり、多くの研究者が現在も研究を行っている。

##### 1-4-1 生物学的なマイクロプラスチック分解

マイクロプラスチックを分解する方法として最も研究されているのが生物学的な分解である。生物学的なマイクロプラスチック分解は具体的に、酵素を用いた分解、そのような酵素を合成できる微生物を用いた分解、さらにはそのような微生物を腸内に持っている昆虫幼虫を用いた分解が行われている[24, 25]。現在までに *Tenebrio molitor*, *Tenebrio obscurus*, *Zophobas atratus*, *Plodia interpunctella*, *Achroia grisella*, *Galleria mellonella* などの様々な昆虫幼虫がマイクロプラスチックを摂取し、分解する能力があることが報告されている[26–30]。マイクロプラスチックを摂食する昆虫幼虫の腸内からは *Exiguobacterium* sp., *Enterobacter asburiae*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Ideonella sakaiensis* などが分離された[31–33]。プラスチック分解酵素としては NylC [34, 35]、PET hydrolase (PETase)、MHET hydrolase

(MHETase) [32, 36]などが発見されている。NylC は Polyamide 構造中のアミド結合を加水分解することによって分解を行う。PETase は polyethylene terephthalate (PET) のエステル結合を加水分解し、mono(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET) を生成、METase は MHET のエステル結合を加水分解し、Ethylene glycol と Terephthalic acid に分解する。これら昆虫幼虫や微生物を用いたマイクロプラスチック分解のメリットは、マイクロプラスチックごみを土壌やコンポスト内で分解することでマイクロプラスチックを堆肥化することができる。また、酵素を用いたマイクロプラスチック分解のメリットは、酵素の特異性にあり、ポリマー構造内の必ず決まった部位を切断するため、モノマー構造に戻しやすく、ポリマーリサイクルが可能になる点が挙げられる。これらのマイクロプラスチック分解方法は、分解のために有害な薬品を使うことなく、環境に悪影響を与えない方法として注目されている。

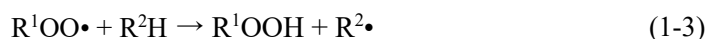
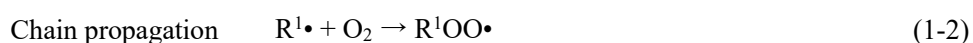
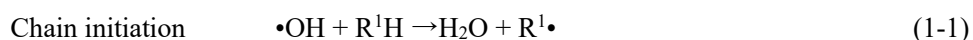
しかし、これらの分解方法にも未だ困難な壁がある。昆虫幼虫および微生物によるプラスチック分解には、これら生物を飼育しなければならないことが問題となる。飼育の関係上、適切な湿度・温度環境を準備するための労力やコスト、また餌としての適切な供給プラスチック量を設定するため、一度に多量のプラスチック分解には向いていないことがあげられる。S. Yoshida らは *Ideonera sakaiensis* が PET 破片を 30 °C の条件下で  $0.13 \text{ mg cm}^{-2} \text{ day}^{-1}$  の速度で分解していることを[32]、Z. Chen らは *Zophobas atratus* が発泡スチロール片を 25 °C の条件下で  $0.11 \text{ g day}^{-1}$  の速度で分解していることを報告している[29]。酵素の分解によるプラスチック分解に関しては、酵素の安定性に問題がある。酵素は生体内で合成されるタンパク質を基本骨格として構成されている。よって、温度変化や pH 変化によって失活してしまう物質であることから、プラスチック分解のための長期使用に問題があり逐次新たな酵素を供給しなければならない。また、酵素は特異的な基質（この場合はポリマー構造内の特定の官能基や結合）に対してのみ反応を行う物質であるため、様々なブレンドポリマーを使用したプラスチックや、分別されることなく集められたマイクロプラスチックを分解するには向いていない。酵素の長期安定性および基質となるポリマーの探索について研究を続けていく必要がある。

#### 1-4-2 化学的なマイクロプラスチック分解

酵素等を用いた生物学的なマイクロプラスチック分解方法がある一方で、化学的なマイクロプラスチック分解方法も数多く提案されている。化学的なマイクロプラスチック分解は具体的に、強酸を使用した強酸処理、強塩基を使用した強塩基処理、強力な酸化剤を使用した酸化処理などがある。強酸処理や強塩基処理は、処理液に強酸や強塩基を使用することから、危険かつ有害であり、処理後に処理液の中性化が必要となる。また、強酸処理および強塩基処理によるマイクロプラスチック分解効率を向上させるためには、処理液の温度を上昇させる必要がある。そして、強酸処理および強塩基処理は基本的にはポリマーの加水分解を促進させる処理であるため、ポリマーの主鎖である C-C 結合 (347 kJ/mol) や C-H 結合 (413 kJ/mol) を切断する能力は低い。よって、マイクロプラスチックを二酸化炭素や水まで分解する最終的な無機化は困難である[37, 38]。

近年、強力な酸化剤として様々な活性酸素種を使用した酸化処理として促進酸化プロセス (AOPs:

Advanced oxidation processes) が応用されている。AOPs の中でも硫酸ラジカル ( $\bullet\text{SO}_4$ ) やヒドロキシラジカル ( $\bullet\text{OH}$ ) などの活性酸素種を生成し、処理するものが広く応用されている [39, 40]。これら活性酸素種を利用したマイクロプラスチック分解は、活性酸素種を開始剤としたポリマーの自動酸化に基づいている。式 (1-1) から式 (1-8) に  $\bullet\text{OH}$  を開始剤とした際のポリマーの自動酸化反応の機構を示す。 $\bullet\text{OH}$  を開始剤とした際のポリマーの自動酸化では発生したアルキルラジカル ( $\text{R}\bullet$ ) によって、ラジカル反応が開始される。その後もアルコキシラジカル ( $\text{RO}\bullet$ )、ペルオキシドラジカル ( $\text{ROO}\bullet$ ) によって、連鎖的に自動酸化が進行していく [41]。



AOPs には以下の利点があると考えられる。(I) 汚染物質やマイクロプラスチックを分離・回収して移動させる必要がなく、水相中の有機化合物を分解・除去することができる。(II)  $\bullet\text{OH}$  は反応性が高いため、多くの水系汚染物質と区別なく反応し、様々な汚染物質の同時分解・除去が可能となる。(III)  $\bullet\text{OH}$  自体の完全な還元生成物は  $\text{H}_2\text{O}$  であるため、AOPs は理論上、水中に新たな有害物質を発生させない。一方で欠点もある。(I) 多くの AOPs の稼働を維持するためには、高価な化学試薬を継続的に投入する必要がある。(II) 多くの AOPs による  $\bullet\text{OH}$  発生には Fe、Co、Mn、およびそれらの酸化物などの遷移金属が必要となり、金属溶出による二次汚染や大量のスラッジ発生が問題となる。そこで、高価な化学試薬を必要とせず、また遷移金属も用いない AOPs として電気化学的促進酸化プロセス (EAOP: Electrochemical advanced oxidation process) がある。EAOP によって  $\bullet\text{OH}$  を発生させるための要素は、電解質を含む水、酸素、紫外線、電気エネルギーといった環境に優しく、コストも比較的低いものである。汚染物質やマイクロプラスチックを含む水質改善には AOPs が有効であるが、AOPs の中でも環境に優しい EAOP に移行するべきである。しかし、EAOP を用いた有機汚染物質の分解報告はいくつかあるが [42-44]、EAOP をマイクロプラスチック分解に応用した報告はない。EAOP はマイクロプラスチック分解に有効である可能性がある。

## 1-5 マイクロプラスチックによる海洋生物への影響

ここまでマイクロプラスチック分解に関して述べてきた。マイクロプラスチックを分解する必要がある理由に、マイクロプラスチックを海洋生物が摂取してしまうという事実がある。プラスチック片やマイクロプラスチックが多く海洋生物の内臓内から検出されるという報告がある[45, 46]。Figure 1-5 や Table1-1 に示すように、天然魚の体内からマイクロプラスチックの検出が報告されている。また、1-3-4 で述べたように、マイクロプラスチックは汚染物質を吸着しやすいという特性があることから、海洋生物の体内へ汚染物質が輸送されてしまう。マイクロプラスチックや汚染物質の取り込みは、海洋生物の健康被害に影響することが考えられる。多くの研究者が、マイクロプラスチックが海洋生物に及ぼす悪影響について研究しており、その影響は生物学的機能の低下から死に至るまで様々である[47]。摂取後のマイクロプラスチック毒性は以下のように分類される：(I) 消化器系に蓄積し、閉鎖や損傷などの物理的害をもたらす。(II) 擬似餌となるため、生物のエネルギー伝達を妨害する。(III) 体内の臓器や組織がマイクロプラスチックに晒される。

魚類におけるマイクロプラスチックの影響を調査するため、実験室内で魚類に対するマイクロプラスチック曝露試験に関する研究が行われている。マイクロプラスチックは摂食後に魚類の消化器系に蓄積され、消化管全域を閉鎖するため、食欲の減退を引き起こし摂食を制限する可能性があることが報告されている[48, 49]。また、マイクロプラスチックの摂食は消化管の物理的な損傷を誘発し、魚類の食性や発育に問題を引き起こす可能性がある[50-53]。具体的な研究では、運動能力の低下、遺伝子発現の乱れ、生殖器官の損傷、成長阻害、腸内細菌異常、体重減少、肝臓の抗酸化状態の乱れ、ストレス、酸化損傷、生存能力低下、行動の変化、免疫機能の損傷などの症状が報告されている[54-67]。魚類がマイクロプラスチックの摂食によって様々な健康被害が引き起こされることが明らかとなってきた。しかし、その影響は十分に理解されておらず、マイクロプラスチックによる魚類の健康被害を抑制するために、マイクロプラスチック分解技術を開発するだけでなく、マイクロプラスチックによる魚類の健康状態変化を観察する必要があると考えた。魚類の健康状態を把握することによって、我々の食生活に関わってくる天然魚の状態や、その天然魚が生息している海域の海洋環境状態の観測が期待できる。



Figure 1-5 Microplastics was detected in fish gut. Picture is from 5 Gyres Institute.

Table 1-1 Example of marine organisms with reported plastic feeding.

種名	プラスチック種類	調査年	調査海域	参考文献
イタチザメ	プラスチックシートなど	1978-2000	南アフリカ	[68]
カジカ的一种	ポリスチレン小球	1971	東部北大西洋	[69]
ホウボウ的一种	プラスチックレジンペレット、ポリスチレン小球	1971	東部北大西洋	[69]
フユヒラメ	ポリスチレン小球	1971	東部北大西洋	[69]
ホワイトパーチ	レジンペレット、ポリスチレン小球	1971	東部北大西洋	[69]
シイラ	ロープ、ボトル、プラスチック破片	2007-2012	西部北大西洋、北太平洋	[70]
カマスサワラ	プラスチックシート	1965-1981	西部北大西洋	[71]
クロタチカマス	プラスチック破片	2007-2012	北太平洋	[70]
キハダマグロ	プラスチック破片	1980-1982	西部北大西洋（メキシコ湾）	[71]
タイセイヨウクロマグロ	プラスチック破片	1980-1982	西部北大西洋（メキシコ湾）	[71]
メバチマグロ	プラスチック破片	2007-2012	北太平洋	[70]
ミナミマグロ	プラスチックバッグ	1992-1994	南太平洋（タスマニア東部沖）	[72]
メカジキ	プラスチック破片	2007-2012	北太平洋	[70]
ニシマアジ	プラスチック破片など	2010-2011	北大西洋（北海）	[73]
トウゴロウイワシ的一种	ポリスチレン小球	1971	東部北大西洋	[69]
タイセイヨウニシン	ポリスチレン小球、プラスチック破片など	2010-2011	北大西洋（北海）	[73]
ミズウオ	ポリスチレン破片、プラスチックキャップ、プラスチック製漁具、プラスチックバッグなど	1964-2012	北太平洋、日本沿岸	[70, 74, 75]
タイセイヨウダラ	プラスチック破片など	2010-2011	北大西洋（北海）	[73]
ホワイトティング	プラスチック破片など	2010-2011	北大西洋（北海）	[73]
コダラ	プラスチック破片など	2010-2011	北大西洋（北海）	[73]
ミナミマンダイ	プラスチックシート、テグス	1993-1994	南大西洋	[76]
アカマンボウ的一种	プラスチック破片、テグス、ロープ	2007-2012	北太平洋	[70]
ヒカリハダカ	プラスチック破片、テグス、ロープ	2008	北太平洋	[77]
ナガハダカ	プラスチック破片	2008	北太平洋	[77]
ドングリハダカ	プラスチック破片	2008	北太平洋	[77]
キララハダカ的一种	プラスチック破片	2008	北太平洋	[77]
クロトカゲギス	プラスチック破片	2008	北太平洋	[77]
サンマ	プラスチック破片	2008	北太平洋	[77]



## 1-6 魚類のストレスレベルのモニタリング

魚類がマイクロプラスチックを摂食することによって変化する健康状態の1つにストレスレベルの変化がある。さらに、魚類のストレスレベルの変化は、血液組成や内分泌系、ホルモン分泌などの変化を伴うことが報告されている[78, 79]。魚類のストレスレベルをモニタリングすることで、魚類の健康状態や健康被害、その海域の海洋環境状態を調査することができる。

### 1-6-1 ストレスレベルの指標となるコルチゾールとグルコース

魚類のコルチゾール濃度と血中グルコース濃度は、ストレスレベルの指標として報告されている[80-82]。コルチゾールは、ストレス反応時に分泌されるステロイドホルモンである。魚がストレスを受けると、コルチゾール濃度はストレス要因の強さに応じた量だけ一時的に上昇する。そして、コルチゾール濃度が上昇すると間接的にグルコース濃度も上昇する。通常、血中グルコース濃度が上昇した場合、インスリンが分泌される。インスリン受容体がインスリンを感知するとグルコース輸送体である GLUT4 (glucose transporter type4) へ血中グルコースを筋細胞や脂肪細胞へ輸送するよう命令を出す。ここで、コルチゾールはインスリン受容体が GLUT4 へ命令を出すことを阻害する。その結果、GLUT4 による血中から筋細胞や脂肪細胞へのグルコース輸送が行われなくなり、結果として血中グルコース濃度が上昇する (Figure 1-7)。したがって、血中グルコース濃度もコルチゾールと同様にストレスに対する間接的な応答物質である[83, 84]。

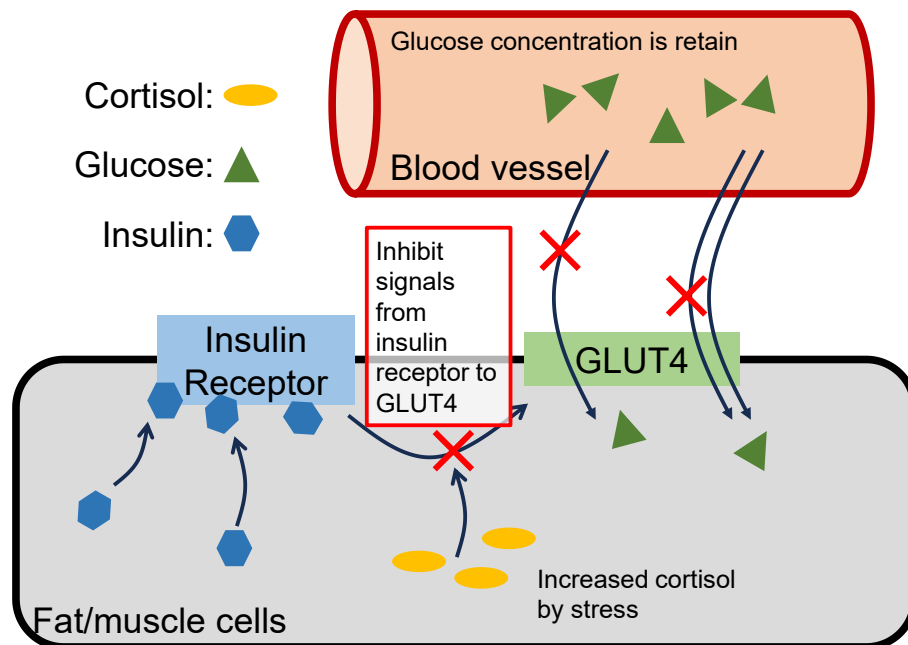


Figure 1-7 Schematic image of mechanism of increased blood glucose concentration due to increased cortisol by stress.

## 1-6-2 コルチゾールの測定方法

コルチゾールなどのステロイドホルモンの測定には、液体クロマトグラフィー-質量分析法（LC-MS：Liquid Chromatography-Mass Spectrometry）や酵素結合免疫吸着測定法（ELISA：Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）が一般的に用いられている[85-87]。LC-MSは検出感度、選択性、再現性が高いが、分析装置が大型で高価であり、複雑な試料の前処理や測定条件の選択などの専門知識が必要である。一方、ELISA法は特別な装置や機器を必要としない簡便な測定法であるが、複雑な試料処理と長い反応時間が必要である。これら2つの方法は非常に優れたホルモン物質検出法ではあるが、いずれも血液等のサンプリングから、検査結果が出るまでに時間がかかってしまい、間接的な検査結果になってしまう。できる限り多くのサンプルに対して迅速かつ簡便に検査することには向いていない。

## 1-6-3 グルコースの測定方法

グルコースの測定には、酵素反応を利用した比色法や蛍光法、電極法が応用されている。酵素比色法や酵素蛍光法では、1検体ずつ酵素反応させながら吸光度分析を行う必要があり、魚類の血中グルコース濃度を迅速かつ連続的に測定することは困難である。一方、酵素電極法は比色法や蛍光法に比べ、装置の小型化が容易であり、迅速かつ簡便に測定できるという利点がある。また、グルコース測定における酵素電極法はコルチゾールを測定する方法よりも、装置が簡便かつ、測定終了までの時間が短いなどの利点がある。そこで、本研究では、グルコースの測定方法として酵素電極法を用いたグルコースバイオセンサに注目した。

## 1-7 グルコースバイオセンサ

酵素電極法であるグルコースバイオセンサは、検出対象となるグルコースの酸化を触媒する酵素を電極上に固定化したものである。グルコースの酸化を触媒する酵素の例としてグルコースオキシダーゼ（GOx：Glucose Oxidase）やグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH：Glucose Dehydrogenase）などがある[83-92]。これらの酵素がグルコースを酸化して得た電子を電気信号として検出し、グルコース濃度を間接的に測定できる。また、グルコースバイオセンサは操作が簡便で、迅速な現場分析が可能であり、サンプルの抽出や単離といった複雑な前処理を必要としない。最も一般的なグルコースバイオセンサの測定方法はアンペロメトリーを用いたものである。作用電極と参照電極に一定の電圧を印加し、作用電極と対極間の電流を測定する。得られた電流値からグルコース濃度を換算することでグルコース濃度を間接的に測定することができる。これら酵素電極法によるアンペロメトリーを用いた魚類の血中グルコース濃度を連続的にモニタリングする魚類用グルコースセンサが開発されたという報告がある[93]。しかし、アンペロメトリーなどの電気化学的方法は、電気化学測定を行うためのポテンショスタットやガルバノスタットに外部電源やバッテリーによる電力供給を必要とするため、魚類を対象とした現地でのリアルタイムで連続的なモニタリングには不向きである。魚類を対象とした現地での

リアルタイムで連続的なモニタリングを行うためには、センサの小型化と外部電源を必要としないシステムの構築が必要となる。

## 1-8 将来への課題と本研究の目的

### 1-8-1 現状

海洋マイクロプラスチック問題を解決する1つの方法は、合成繊維を用いた繊維製品から放出されるマイクロプラスチックファイバーの海洋への流出を防ぐことである。マイクロプラスチックファイバーは海洋に放出される一次マイクロプラスチックの約35%を占めているからである。そのため、発生したマイクロプラスチックファイバーが環境に放出されるまでに分解・除去できるようなシステムの開発が必要である。このようなシステムに求められる要件は、水中で分解・除去が可能、環境に無害、一度に多量を分解可能、ポリマー種が混合されたマイクロプラスチックを分別することなく分解可能、最終的に水や二酸化炭素まで分解可能である点が求められる。現在研究の主流となっている酵素を用いたマイクロプラスチックの生物学的分解は、モノマーリサイクルや環境に無害な分解方法ではあるが、酵素の基質特異性によってポリマー種の分別が必要となるなどの課題がある。これらの条件や課題を克服したマイクロプラスチック分解方法の開発が求められている。

また、海洋中の天然魚の体内からマイクロプラスチックが検出されており、海洋生物の健康被害や我々の食生活や健康を脅かす危険性がある。具体的な健康被害には成長阻害や繁殖阻害などがある。海洋生物の健康状態を調査するために健康状態のモニタリングが必要である。海洋生物の健康状態のモニタリングは、海洋生物の健康状態のモニタリングだけでなく、その海域の海洋環境を知る知見ともなる。

これら上記2つの取り組みはどちらも海洋生物の環境改善に向けた検討である。さらに現在、主に行われている化学的なマイクロプラスチック分解は基本的には酸化反応を用いた分解を行っている。酸化反応を用いていることに共通して、バイオセンサを用いたセンシングではセンシングする標的物質を酸化している。以上2点を踏まえて、海洋生物の環境改善を行うためには電気化学的な酸化反応をすすめるための反応場を構築することが必要である。

### 1-8-2 新たなマイクロプラスチック分解技術の開発

酸化反応を基本とした化学的なマイクロプラスチック分解を実施する場合、活性酸素種を生成するために触媒として遷移金属やその酸化物を用いる必要がある。しかし、金属溶出による二次汚染や大量のスラッジ発生が問題となり、実用化の妨げとなっている。マイクロプラスチック分解に求められていることは、環境に優しく、分解システムの工程が少ないことである。そこで本研究では水中にて有害な添加試薬等を用いずにマイクロプラスチックを分解する方法に関して検討を行った。具体的には電気化学反応を利用した酸化反応を用いたものである。第2章と第3章で記述する。

### 1-8-3 魚類の健康状態モニタリング

海洋中の天然魚の体内からマイクロプラスチックが検出されている。海洋生物が摂食したマイクロプラスチックは消化器官内に損傷を与える可能性や、マイクロプラスチックに吸着した汚染物質が海洋生物の健康被害を引き起こす可能性がある。この問題を解決するためにマイクロプラスチック流出抑制や分解方法開発などの取り組みがあるが、実際に海洋生物の健康状態をモニタリングする必要がある。より有効な海洋生物の健康状態のデータを得るためには、現場でリアルタイムかつ連続でモニタリングが可能なセンサを用いることである。これらの需要を満たすストレスモニタリングセンサの開発を検討した。具体的にはストレス指標物質を電気化学的に酸化することでモニタリングを行う。第4章で記述する。

## 参考文献

- [1] PLASTICS EUROPE, Plastics – the Facts 2022, PlasticsEurope AISBL
- [2] BACK TO BLUE, PLASTIC MANAGEMENT INDEX WHITEPAPER, Economist Impact and The Nippon Foundation
- [3] R. Geyer, J. R. Jambeck, K. L. Law. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.*, **3**, 7, (2017)
- [4] J. R. Jambeck, R. Geyer, C. Wilcox, T. R. Sigler, M. Perryman, A. Andrady, R. Narayan, K. L. Law. Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Sci.*, **347**, 768–771, (2015)
- [5] H. S. Carson, M. R. Lamson, D. Nakashima, D. Toloumu, J. Hafner, N. Maximenko, K. J. McDermid. Tracking the sources and sinks of local marine debris in Hawai'i. *Mar. Environ. Res.*, **84**, 76–83, (2013).
- [6] A. Lechner, H. Keckeis, F. L. Loisl, B. Zens, R. Krusch, M. Tritthart, M. Glas, E. Schludermann. The Danube so colourful: A potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environ. Pollut.*, **188**, 177–181, (2014).
- [7] S. Lambert, M. Wanger. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere.*, **145**, 265–268, (2016)
- [8] L. Sørensen, A. S. Groven, I. A. Hovsbakken, O. D. Puerto, D. F. Krause, A. Sarno, A. M. Booth. UV degradation of natural and synthetic microfibers causes fragmentation and release of polymer degradation products and chemical additives. *Sci. Total Environ.*, **755**, 143170, (2021)
- [9] 海洋生分解性プラスチック技術編集委員会. 最新の海洋生分解性プラスチックの研究開発動向ープラスチック・MPsの現状と対策ー. テクノシステム, (2021)
- [10] F. D. Falco, E. D. Pace, M. Cocca, M. Avella. The contribution of washing processes of synthetic clothes to microplastic pollution. *Sci. Rep.*, **9**, 6633, (2019)
- [11] F. Faure, C. Saini, G. Potter, F. Galgani, L.F. de Alencastro, P. Hagmann, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**, 12190–12197, (2015)
- [12] M. A. Browne, P. Crump, S. J. Niven, E. Teuten, A. Tonkin, T. Galloway, R. Thompson. Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 9175–9179, (2011)
- [13] G. Liebezeit, F. Dubaish. Microplastics in beaches of the East Frisian islands Spiekeroog and Kachelotplate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **89**, 213–217, (2012)
- [14] R. A. Castañeda, S. Avlijas, M. A. Simard, A. Ricciardi. Microplastic pollution in St. Lawrence River sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **71**, 1767–1771, (2014)
- [15] L. C. Woodall, A. S. Vidal, M. Canals, G. L. J. Paterson, R. Coppock, V. Sleight, A. Calafat, A. D. Rogers, B. E. Narayanaswamy, R. C. Thompson. The deep sea is a major sink for microplastic debris. *R. Soc. Open Sci.* **1**, 140317, (2014)

- [16] Y. Lu, Y. Zhang, Y. Deng, W. Jiang, Y. Zhao, J. Geng, L. Ding, H. Ren. Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 4054–4060, (2016)
- [17] Z. L. R. Botterell, N. Beaumont, T. Dorrington, M. Steinke, R. C. Thompson, P. K. Lindeque. Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. *Environ. Pouution*, **245**, 98–110, (2019)
- [18] L. M. Rios, C. Moore, P. R. Jones. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Mar. Pollut. Bull.*, **54**, 1230–1237, (2007).
- [19] E. L. Teuten, S. J Rowland, T. S. Galloway, R. C. Thompson. Potential for Plastics to Transport Hydrophobic Contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 7759–7764, (2007)
- [20] Y. Mato, T. Isobe, H. Takada, H. Kanehiro, C. Ohtake, T. Kaminuma. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 318–324, (2001)
- [21] A. Bakir, S. J. Rowland, R. C. Thompson. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions., *Environ. Pollut.*, **185**, 16–23, (2014)
- [22] L. C. Sá, M. Oliveira, F. Ribeiro, T. L. Rocha, M. N. Futter. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Sci. Total Environ.*, **645**, 1029–1039, (2018)
- [23] F. Shahidi, P. Ambigaipalan. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J. Functional Foods*, **18**, 820–897, (2015)
- [24] J. Yang, Y. Yang, W. M. Wu, J. Zhao, L. Jiang. Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. *Environ. Sci. Technol.*, **48**, 13776–13784, (2014)
- [25] A. M. Brandon, S. H. Gao, R. Tian, D. Ning, S. S. Yang, J. Zhou, W. M. Wu, C. S. Criddle. Biodegradation of Polyethylene and Plastic Mixtures in Mealworms (*Larvae of Tenebrio molitor*) and Effects on the Gut Microbiome. *Environ. Sci. Technol.*, **52**, 65266533, (2018)
- [26] Y. Yang, J. Yang, W. M. Wu, J. Zhao, Y. Song, L. Gao, R. Yang, L. Jiang. Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. *Environ. Sci. Technol.*, **49**, 12080–12086, (2015)
- [27] B. Y. Peng, Y. Su, Z. Chen, J. Chen, X. Zhou, M. E. Benbow, C. S. Criddle, W. M. Wu, Y. Zhang. Biodegradation of Polystyrene by Dark (*Tenebrio obscurus*) and Yellow (*Tenebrio molitor*) Mealworms (*Coleoptera: Tenebrionidae*). *Environ. Sci. Technol.*, **53**, 5256– 5265, (2019)
- [28] H. R. Kim, H. M. Lee, H. C. Yu, E. Jeon, S. Lee, J. Li, D. H. Kim. Biodegradation of Polystyrene by *Pseudomonas* sp. Isolated from the Gut of Superworms (*Larvae of Zophobas atratus*). *Environ. Sci. Technol.*, **54**, 6987–6996, (2020)
- [29] P. Bombelli, C. J. Howe, F. Bertocchini. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Curr. Biol.*, **27**, R292–R293, (2017)

- [30] Z. Chen, Y. Zhang, R. Xing, C. Rensing, J. Lü, M. Chen, S. Zhong, S. Zhou. Reactive Oxygen Species Triggered Oxidative Degradation of Polystyrene in the Gut of Superworms (*Zophobas atratus* Larvae). *Environ. Sci. Technol.*, **57**, 7867–7874, (2023)
- [31] Y. Yang, J. Yang, W. M. Wu, J. Zhao, Y. Song, L. Gao, R. Yang, L. Jiang. Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 2. Role of Gut Microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 12087–12093, (2015)
- [32] S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*. **351**, 1196–1199, (2016)
- [33] S. Kakudo, S. Negoro, I. Urabe, H. Okada. Nylon oligomer degradation gene, nylC, on plasmid pOAD2 from a Flavobacterium strain encodes endo-type 6-aminohexanoate oligomer hydrolase: purification and characterization of the nylC gene product. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3978–3980, (1993)
- [34] S. Negoro, S. Kakudo, I. Urabe, H. Okada. A new nylon oligomer degradation gene (nylC) on plasmid pOAD2 from a Flavobacterium sp. *J. Bacteriol.*, **174**, 7948–7953, (1992)
- [35] S. Joo, I. J. Cho, H. Seo, H. F. Son, H. Y. Sagong, T. J. Shin, S. Y. Choi, S. Y. Lee, K. J. Kim. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nat. Commun.*, **9**, 382, (2018)
- [36] S. T. L. Sait, L. Sørensen, S. Kubowicz, K. V. Jonas, S. V. Gonzalez, A. G. Asimakopoulos, A. M. Booth. Microplastic fibers from synthetic textiles: Environmental degradation and additive chemical content. *Environ. Pollut.*, **268**, 115745, (2021)
- [37] L. Reich, S. S. Stivala-共著；岡村誠三，山岡仁史，辻孝三-共訳。ポリマーの分解。化学同人，(1974)
- [38] 栗原福次。プラスチックの劣化。日刊工業新聞社，(1970)
- [39] K. Hu, P. Zhou, Y. Yang, T. Hall, G. Nie, Y. Yao, X. Duan, S. Wang. Degradation of Microplastics by a Thermal Fenton Reaction. *ACS. EST. Engg.*, **2**, 110–120, (2022)
- [40] M. Feilizadeh, M. R. K. Estahbanati, Z. Nayernia, S. Avazpour, P. Drogui, R. D. Tyagi. Chapter 13 - Chemical degradation of microplastics and nanoplastics in water and wastewater. *Current Developments in Biotechnol. Bioeng.*, 315–332, (2023)
- [41] 二木鋭雄。プラスチックの酸化分解。燃料協会誌，**51**, 204–211, (1972)
- [42] Y. Zhou, G. Zhang, J. Zou. Photoelectrocatalytic generation of miscellaneous oxygen-based radicals towards cooperative degradation of multiple organic pollutants in water. *Water Reuse*, **11**, 531–541, (2021)
- [43] I. Sirés, E. Brillas, M. A. Oturan, M. A. Rodrigo, M. Panizza. Electrochemical advanced oxidation processes: today and tomorrow. A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **21**, 8336–8367, (2014)

- [44] C. Comninellis, A. Kapalka, S. Malato, S. A. Parsons, I. Poulios, D. Mantzavinos. Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **83**, 769–776, (2008)
- [45] 山下麗, 田中厚資, 高田秀重. 海洋プラスチック汚染: 海洋生態系におけるプラスチックの動態と生物への影響. *日本生態学会誌*, **66**, 51–68, (2016)
- [46] K. Tanaka, H. Takada. Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Scientific Reports*, **6**, 34351, (2016)
- [47] M. S. Bhuyan. Effects of Microplastics on Fish and in Human Health. *Front. Environ. Sci.*, **10**, 827289, (2022)
- [48] A. L. Lusher, M. McHugh, R.C. Thompson. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Mar. Pollut. Bull.* **67**, 94–99, (2013)
- [49] S. L. Wright, R. C. Thompson, T. S. Galloway. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environ. Pollut.*, **178**, 483–492, (2013)
- [50] J. N. Huang, B. Wen, L. Xu, H. C. Ma, X. X. Li, J. Z. Gao, Z. Z. Chen. Micro/nano-plastics cause neurobehavioral toxicity in discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*): Insight from brain-gut-microbiota axis. *J. Hazard. Mater.*, **421**, 126830, (2022)
- [51] K. Jabeen, B. Li, Q. Chen, L. Su, C. Wu, H. Hollert, H. Shi. Effects of virgin microplastics on goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, **213**, 323–332, (2018)
- [52] S. B. Borrelle, C. M. Rochman, M. Liboiron, J. F. Provencher. Why we need an international agreement on marine plastic pollution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 9994–9997, (2017)
- [53] C. Pedà, L. Caccamo, M. C. Fossi, F. Gai, F. Andaloro, L. Genovese, A. Perdichizzi, T. Romeo, G. Maricchiolo. Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environ. Pollut.*, **212**, 251–256, (2016)
- [54] X. Mu, S. Qi, J. Liu, L. Yuan, Y. Huang, J. Xue, L. Qian, C. Wang, Y. Li. Toxicity and behavioral response of zebrafish exposed to combined microplastic and bisphenol analogues. *Environ. Chem. Lett.*, **20**, 41–48, (2022)
- [55] Y. Zhao, Z. Qin, Z. Huang, Z. Bao, T. Luo, Y. Jin. Effects of polyethylene microplastics on the microbiome and metabolism in larval zebrafish. *Environ. Pollut.*, **282**, 117039, (2021)
- [56] X. Zhang, M. Xia, J. Zhao, Z. Cao, W. Zou, Q. Zhou. Photoaging enhanced the adverse effects of polyamide microplastics on the growth, intestinal health, and lipid absorption in developing zebrafish. *Environ. Int.*, **158**, 106922, (2022)



- [57] B. Xia, Q. Sui, Y. Du, L. Wang, J. Jing, L. Zhu, X. Zhao, X. Sun, A. M. Booth, B. Chen, K. Qu, B. Xing. Secondary PVC microplastics are more toxic than primary PVC microplastics to *Oryzias melastigma* embryos. *J. Hazard. Mater.*, **424**, 127421, (2022)
- [58] J. Wang, X. Li, M. Gao, X. Li, L. Zhao, S. Ru. Polystyrene microplastics increase estrogenic effects of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on male marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Chemosphere*, **287**, 132312, (2022)
- [59] X. Zhang, K. Wen, D. Ding, J. Liu, Z. Lei, X. Chen, G. Ye, J. Zhang, H. Shen, C. Yan, S. Dong, Q. Huang, Y. Lin. Size-dependent adverse effects of microplastics on intestinal microbiota and metabolic homeostasis in the marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Environ. Int.*, **151**, 106452, (2021)
- [60] S. Feng, Y. Zeng, Z. Cai, J. Wu, L. L. Chan, J. Zhu, J. Zhou. Polystyrene microplastics alter the intestinal microbiota function and the hepatic metabolism status in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Sci. Total Environ.*, **759**, 143558, (2021)
- [61] Y. Li, G. Yang, J. Wang, L. Lu, X. Li, Y. Zheng, Z. Zhang, S. Ru. Microplastics increase the accumulation of phenanthrene in the ovaries of marine medaka (*Oryzias melastigma*) and its transgenerational toxicity. *J. Hazard. Mater.*, **424**, 127754, (2022)
- [62] F. L. Bihanic, C. Clérandeau, B. Cormier, J. C. Crebassa, S. H. Keiter, R. Beiras, B. Morin, M. L. Bégout, X. Cousin, J. Cachot. Organic contaminants sorbed to microplastics affect marine medaka fish early life stages development. *Mar. Pollut. Bull.*, **154**, 111059, (2020)
- [63] C. Espinosa, A. Cuesta, M. Á. Esteban. Effects of dietary polyvinylchloride microparticles on general health, immune status and expression of several genes related to stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) *Fish Shellfish Immunol.* **68**, 251–259, (2017)
- [64] P. Pannetier, B. Morin, F. L. Bihanic, L. Dubreil, C. Clérandeau, F. Chouvellon, K. V. Arkel, M. Danion, J. Cachot. Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. *Environ. Int.*, **134**, 105047, (2020)
- [65] H. Jacob, M. Besson, F. Oberhaensli, A. Taylor, B. Gillet, S. Hughes, S. D. Melvin, P. Bustamante, P. W. Swarzenski, D. Lecchini, M. Metian. A multifaceted assessment of the effects of polyethylene microplastics on juvenile gilthead seabreams (*Sparus aurata*). *Aquat. Toxicol.*, **241**, 106004, (2021)
- [66] B. R. Fuster, P. A. Lopez, K. G. Marcos, C. Alomar, M. Compa, E. Álvarez, M. M. Julià, A. S. Martí, A. Sureda, S. Deudero. Experimental evidence of physiological and behavioral effects of microplastic ingestion in *Sparus aurata*. *Aquat. Toxicol.*, **231**, 105737, (2021)
- [67] A. Solomando, X. Capó, C. Alomar, M. Compa, J. M. Valencia, A. Sureda, S. Deudero. Assessment of the effect of long-term exposure to microplastics and depuration period in *Sparus aurata* Linnaeus, 1758: Liver and blood biomarkers. *Sci. Total Environ.*, **786**, 147479, (2021)

- [68] G. Cliff, S. F. J. Dudley, P. G. Ryan, N. Singleton. Large sharks and plastic debris in KwaZulu-Natal, South Africa. *Mar. Freshwater Res.*, **53**, 575–581, (2002)
- [69] E. J. Carpenter, S. J. Anderson, G. R. Harvey, H. P. Miklas, B. B. Peck. Polystyrene Spherules in Coastal Waters. *Science*, **178**, 749–750, (1972)
- [70] C. A. Choy, J. C. Drazen. Plastic for dinner? Observations of frequent debris ingestion by pelagic predatory fishes from the central North Pacific. *Mar. Ecol. Prog.*, **485**, 155–163, (2013)
- [71] C. S. Manooch, W. T. Hogarth. Stomach Contents and Giant Trematodes from Wahoo, *Acanthocybium Solanderi*, Collected Along the South Atlantic and Gulf Coasts of the United States. *Bull. Mar. Sci.*, **33**, 227–238, (1983)
- [72] J. W. Young, T. D. Lamb, D. Le, R. W. Bradford, A. W. Whitelaw. Feeding ecology and interannual variations in diet of southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*, in relation to coastal and oceanic waters off eastern Tasmania, Australia. *Environ. Biol. Fishes.*, **50**, 275–291, (1997)
- [73] E. M. Foekema, C. D. Gruijter, M. T. Mergia, J. A. Franeker, A. T. J. Murk, A. A. Koelmans. Plastic in North Sea Fish. *Environ. Sci. Technol.*, **47**, 8818–8824, (2013)
- [74] T. Kubota. Synthetic materials found in the stomachs of longnose lancetfish collected from Suruga Bay, central Japan. *Environ. Sci.*, **154**, 710–717 (1990)
- [75] L. A. Jantz, C. L. Morishige, G. L. Bruland, C. A. Lepczyk. Ingestion of plastic marine debris by longnose lancetfish (*Alepisaurus ferox*) in the North Pacific Ocean. **69**, 97–104, (2013)
- [76] G. D. Jackson, N. G. Buxton, M. J. A. George. Diet of the southern opah *Lampris immaculatus* on the Patagonian Shelf; the significance of the squid *Moroteuthis ingens* and anthropogenic plastic. *Mar. Ecol. Prog.*, **206**, 2115–2126, (2000)
- [77] C. M. Boerger, G. L. Lattin, S. L. Moore, C. J. Moore. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Mar. Pollut. Bull.* **60**, 2275–2278, (2010)
- [78] B. A. Barton, G. K. Iwama. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, **1**, 3–26, (1991)
- [79] B. A. Barton. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.*, **40**, 517–525, (2002)
- [80] P. Thomas, L. Robertson. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture*, **9669–86**, (1991)
- [81] S. E. Fevolden, T. Refstie, B. Gjerde. Genetic and phenotypic parameters for cortisol and glucose stress response in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture*, **118**, 205–216, (1993)

- [82] E. K. Silbergeld. Blood glucose: A sensitive indicator of environmental stress in fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **11**, 20–25 (1974)
- [83] A. T. Kohyani, S. Keyvanshokoo, A. Nematollahi, N. Mahmoudi, H. Pasha-Zanoosi. Effects of dietary nucleotides supplementation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance and acute stress response: *Fish Physiol. Biochem.* **38**, 431–440, (2012)
- [84] W. L. Shelver, N. W. Shappell, M. Franek, F. R. Rubio. ELISA for Sulfonamides and Its Application for Screening in Water Contamination. *J. Agric. Food Chem.*, **15**, 6609–6615, (2008)
- [85] S. Rodriguez-Mozaz, M. J. L. Alda, D. Barceló. Picogram per Liter Level Determination of Estrogens in Natural Waters and Waterworks by a Fully Automated On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Method. *Anal. Chem.* **76**6998–7006, (2004)
- [86] A. Yamamoto, N. Kakutani, K. Yamamoto, T. Kamiura, H. Miyakoda. Steroid Hormone Profiles of Urban and Tidal Rivers Using LC/MS/MS Equipped with Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Photoionization Sources. *Environ. Sci. Tec.*, **40**, 4132–4137, (2006)
- [87] Y. Gao, Y. Zhou, R. Chandrawati. Metal and Metal Oxide Nanoparticles to Enhance the Performance of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *ACS Appl. Nano. Mater.*, **3**, 1–21, (2020)
- [88] L. G. Fernández, M. Novell, P. Blondeau, F. J. Andrade. A disposable, simple, fast and low-cost paper-based biosensor and its application to the determination of glucose in commercial orange juices. *Food Chem.*, **265**, 64–69, (2018)
- [89] H. C. Chen, Y. M. Tu, C. C. Hou, Y. C. Lin, C. H. Chen, K. H. Yang. Direct electron transfer of glucose oxidase and dual hydrogen peroxide and glucose detection based on water-dispersible carbon nanotubes derivative. *Anal. Chim. Acta.*, **867**, 83–91, (2015)
- [90] J. H. T. Luong, J. D. Glennon, A. Gedanken, S. K. Vashist. Achievement and assessment of direct electron transfer of glucose oxidase in electrochemical biosensing using carbon nanotubes, graphene, and their nanocomposites. *Microchim. Acta.*, **184**, 369–388, (2017)
- [91] M. Y. Elahi, A. A. Khodadadi, Y. Mortazavi. A Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Immobilized on ZnO/Cu<sub>2</sub>O Graphene Oxide Nanocomposite Electrode. *J. Electrochem. Soc.*, **161**, B81–B87, (2014)
- [92] Y. Yu, Z. Chen, S. He, B. Zhang, X. Li, M. Yao. Direct electron transfer of glucose oxidase and biosensing for glucose based on PDDA-capped gold nanoparticle modified graphene/multi-walled carbon nanotubes electrode. *Biosens. Bioelectron.*, **52**, 147–152, (2014)
- [93] H. Endo, Y. Yonemori, K. Hibi, H. Ren, T. Hayashi, W. Tsugawa, K. Sode. Wireless enzyme sensor system for real-time monitoring of blood glucose levels in fish. *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 1417–1423, (2009)

## 第2章 電気化学的促進酸化プロセスを用いたポリアミド 66 の分解

### 2-1 緒言

現在報告されているマイクロプラスチックに関する統計において、ファイバー形状のマイクロプラスチックがマイクロプラスチックの 35%を占めているという報告がある[1]。ファイバー形状のマイクロプラスチックは、合成繊維を用いた繊維製品を洗濯することによって発生し[1-5]、発生したマイクロプラスチックは下水処理場で完全に取り除くことができず、河川や海洋へ流出してしまっている[6-11]。このような要因によるマイクロプラスチックを分解・除去するための新たな技術が必要とされている。合成繊維から発生するマイクロプラスチックがマイクロプラスチックの 35%を占めていることから、このようなマイクロプラスチックを対象として分解技術の研究・開発を行うことで、マイクロプラスチック問題の解決に大きく貢献することが期待される。

本研究ではマイクロプラスチックの新たな分解方法として電気化学的促進酸化プロセス (EAOP: Electrochemical advanced oxidation processes) を用いたヒドロキシラジカル ( $\bullet\text{OH}$ ) によるマイクロプラスチック分解を提案する。非常に強力な酸化力をもった $\bullet\text{OH}$  [12]の発生を制御することで、 $\bullet\text{OH}$ を開始剤としたポリマーのラジカル連鎖反応が開始すると考えた (式 1-12 から 1-8) [12]。本研究では $\bullet\text{OH}$ を発生させる方法としてEAOPを選択した。EAOPは電解液を含む $\text{H}_2\text{O}$ 中で $\text{O}_2$ を還元することで $\text{H}_2\text{O}_2$ を発生させ、この $\text{H}_2\text{O}_2$ に紫外線 (UV) を照射することで $\bullet\text{OH}$ を発生させるプロセスである[13, 14]。このように、EAOPは化学汚染物質となるような試薬を必要とせず、UV照射、電圧印加、 $\text{O}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}$ 、電解質といった環境に優しく、連続供給が簡便である化合物や電気エネルギーを使用するため、 $\bullet\text{OH}$ を連続生成するためのシンプルかつクリーンな方法と言える。第2章ではEAOP中に発生する $\text{H}_2\text{O}_2$ の発生量を比色法によって[15]、 $\bullet\text{OH}$ の発生確認を電子スピン共鳴法 (ESR: Electro Spin Resonance) を用いて評価した[16-18]。

また、第2章ではEAOPによるマイクロプラスチックの分解評価も行った。マイクロプラスチックのサンプルとしたポリマー種は、合成繊維として主に使用されているポリアミド種であるポリアミド 66 (PA66, Figure 2-1) を選択した。正式名はポリアミドであるが、通称はナイロンと呼ばれることが多い。ポリアミドには分子構造から 66、6、610、11、12 型およびこれらの共重合物がある。強度が大きく (引張強さ:  $500\text{--}1000\text{ kg/cm}^2$ )、粘り強いいため、脆性破壊を起こしにくい。密度あたりの強度は金属にも匹敵し、疲労しにくい。自己潤滑性、耐摩耗性、振動吸収、衝撃吸収、騒音吸音、耐候性、耐有機溶剤性などの性質に優れる。使用温度範囲は $-18\text{ }^\circ\text{C}$ から $120\text{ }^\circ\text{C}$ とされている[19]。実験はマイクロプラスチックのサイズとされている $5\times 5\text{ mm}$ に裁断したポリアミド 66 フィルムを使用した。本研究の緒言では、繊維製品由来のマイクロプラスチックであるマイクロプラスチックファイバーに焦点を当てて議論を行っていたため、本来であれば、マイクロプラスチックファイバーを用いた分解実験を行うべきであった。しかし、ファイバー形状のマイクロプラスチックサンプルはサイズが小さく形状の維持

が難しいなど扱いが難しく、分析も困難であったため、今回はフィルム形状のサンプルとした。分解を目指しているターゲットと形状は異なっているが、同種のポリマーの分解を行うことで、今後のマイクロプラスチック分解研究分野の手助けになることを期待している。

分解処理後の評価を、形態変化観察を行うために走査型電子顕微鏡（SEM: Scanning Electron Microscope）観察を、分子構造変化を観察するために全反射フーリエ変換赤外分光法（ATR-FTIR: Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy）による分析を、結晶化度変化を観察するために X 線回折法（XRD: X-ray diffraction）による分析を、分解生成物を検出するためにガスクロマトグラフィー（GC: Gas Chromatography）による分析を、分解による重量減少を電子天秤によって測定を行った。

第 2 章では EAOP を利用して、マイクロプラスチックの電気化学を用いて酸化反応によって分解することを検討する。具体的には EAOP において発生する  $\text{H}_2\text{O}_2$  の濃度評価と  $\cdot\text{OH}$  の発生評価、EAOP を用いた PA66 分解評価を行った。（Figure 2-2）。

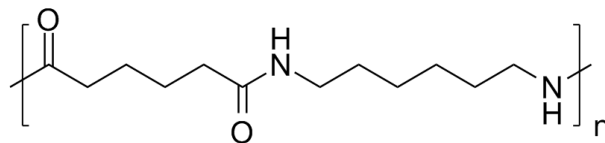


Figure 2-1 The molecular structure of PA66.

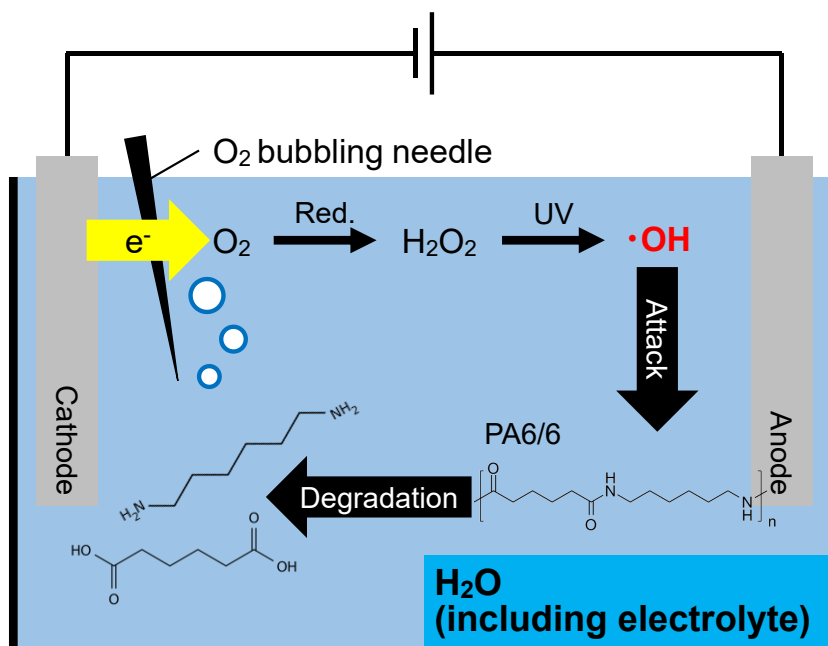


Figure 2-2 Schematic image of PA66 degradation by EAOP.

## 2-2 実験操作

### 2-2-1 試薬および実験機器

塩酸 (HCl)、硫酸 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、リン酸二水素ナトリウム (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、リン酸水素二ナトリウム (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP: Horseradish peroxidase)、5,5-Dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS, 10 mg tablet) は Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA) から購入した。PA66 フィルム (66 ナイロンシート、0.3 mm × 500 mm × 1 m、分子量記載なし) は株式会社コクゴ (東京、日本) から購入した。酸素ガスと窒素ガスは宇野酸素株式会社 (福井、日本) から購入した。全ての試薬はいずれも特級のものを使用した。

実験に使用した水は Merck Millipore (MA, USA) の超純水製造装置 Milli-Q Water Purification System によってフィルター処理したものを使用した。3D CAD ソフトは Juergen Riegel, Werner Mayer, Yorik van Havre らによって開発されたオープンソースソフトウェア FreeCAD を使用した。設計した CAD ファイルは日本 3D プリンター株式会社 (東京、日本) の Raise3D 専用スライスソフトウェア idea Maker を用いてスライスした。3D プリンタは日本 3D プリンター株式会社の Raise3D E2 を使用した。白金板は株式会社ニラコ (東京、日本) の白金板 (0.30 × 20 × 20 mm 99.95%) を使用した。電気化学測定は BAS 株式会社 (東京、日本) の電気化学測定装置 Electrochemical Analyzer Model 1205C を使用した。ファンクションジェネレータはテレダイン・ジャパン株式会社 (東京、日本) の WaveStation2012 を使用した。UV ランプはアズワン株式会社 (大阪、日本) の SUV-4 を使用した。マイクロプレートリーダーはサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社 (東京、日本) の Multiskan SkyHigh 吸光マイクロプレートリーダーを使用した。ESR 装置は日本電子株式会社 (東京、日本) の JES-FA100 を使用した。イオンコータは株式会社真空デバイス (茨城、日本) の MPS-1S を使用した。SEM は日本電子株式会社の JSM-6390 を使用した。ATR-FTIR 装置はサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社の Nicolet6700 を使用した。XRD 装置は Bruker (MA, USA) の D8 ADVANCE を使用した。GC-MS 装置はアジレント・テクノロジー株式会社 (東京、日本) の GC 部は Agilent 7890B GC システムを、カラム部は HP-5ms を、MS 部は Agilent 5977B GC/MSD を使用した。電子天秤はメトラー・トレド株式会社 (東京、日本) の分析天秤を使用した。

## 2-2-2 EAOP による PA66 フィルムを分解するための反応セルの設計と構築

CAD ソフト Free CAD を用いて、EAOP による PA66 フィルムを分解するための反応セルを設計した。設計した反応セルの 3D モデルの外観を Figure 2-3 に示す。電解液を溜めることのできる内部空間は約 33.6 mL とした。設計した CAD ファイルはスライスソフトウェアを用いてスライスした。造形設定はエクストルーダ温度：210 °C、プラットフォーム温度：55 °C、レイヤー高さ：0.2000 mm、造形速度：60.0 mm/s、充填率：5%、充填形状：ジャイロイド、サポート充填率 30%、サポート充填形状：一直線とした。造形後、サポートを取り除き反応セルとして使用した。

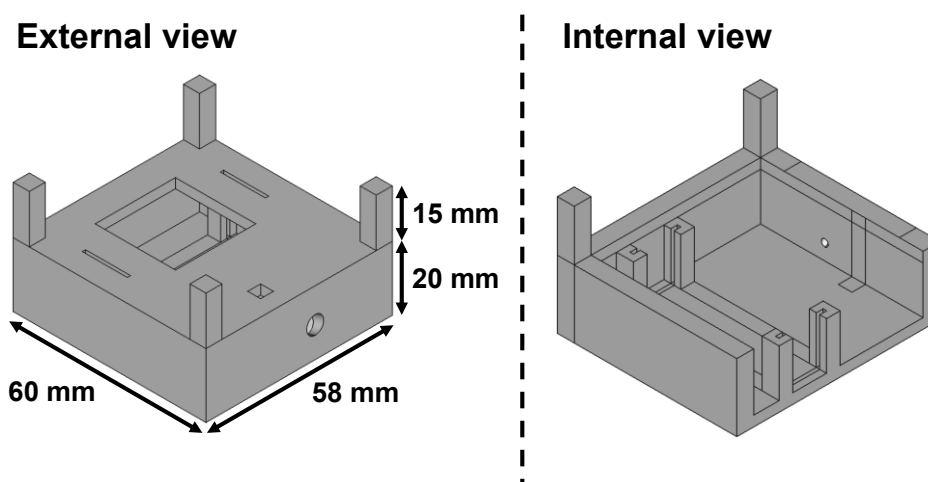


Figure 2-3 The external and internal 3D view of reactor pot.

## 2-2-3 白金板の裁断および表面の還元処理

今回入手した 20 × 20 mm の白金板を 20 × 10 mm に裁断した。全ての実験を行う直前に、白金板を 1 N HCl に 1 分間浸漬させたあと、超純水ですすぎ、N<sub>2</sub> 気流で乾燥させた。

## 2-2-4 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中における O<sub>2</sub> の電気化学還元による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発生電位の調査

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中に溶存した O<sub>2</sub> を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> へ還元する電位を調査した。作製した反応セルに 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 30 mL 加え、60 分間の O<sub>2</sub> バブリングを行うことで、O<sub>2</sub> を飽和させた。電気化学測定装置を用いてリニアスイープボルタンメトリー (LSV : Linear Sweep Voltammmetry) を行った。白金板をアノードとカソードとした二電極方式にて行った。LSV の測定条件は以下の通りである ; 掃引幅 : 0.0—3.0 V、掃引速度 : 50 mV/s。比較実験として H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> に 60 分間の N<sub>2</sub> バブリングを行い、O<sub>2</sub> を脱気したサンプルでの LSV も行った。

### 2-2-5 ABTS ならびに HRP を用いた電気化学還元による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発生量の評価

EAOP 中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発生量を評価した。反応セルに H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 30 mL 加え、60 分間の O<sub>2</sub> バブリングを行い、O<sub>2</sub> を飽和させた。ファンクションジェネレータを用いて-1.6V の直流電圧を 60 分間印加した。電圧印加はアノード、カソードともに白金板 (20 × 10 mm) を用いた。電圧印加中にも O<sub>2</sub> バブリングを行い、スターラーで穏やかに攪拌した。60 分後、96 穴プレート上に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発生処理を行った H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 68 μL 採取し、20 mM ABTS 溶液 19.4 μL および 80 μg/mL HRP 溶液 174 μL を加えた。同サンプルを 5 つ調製し、マイクロプレートリーダーで λ=420 nm での吸光度を測定した。

### 2-2-6 ESR を用いた EAOP による・OH 発生の評価

EAOP を行った際の・OH 発生量を ESR によって評価した。・OH は非常に反応性が高く、短寿命であり検出が困難である。そこで、・OH のスピントラップ剤である DMPO を用いることでスピニアダクト・OH-DMPO を形成させ、ESR により検出した (Figure 2-4)。0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> に DMPO が終濃度 50 mM となるよう混合し、混合液を反応セルに加えた。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-DMPO 混合液に 60 分間の O<sub>2</sub> バブリングを行い、O<sub>2</sub> を飽和させた。ファンクションジェネレータを用いて-1.6 V の直流電圧を印加しながら、650 μW/cm<sup>2</sup> の強度で λ=254 nm の UV を照射する処理を 60 分間行った。これを EAOP 処理とした。60 分間の EAOP 処理中も O<sub>2</sub> バブリングは継続して行った。60 分後、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-DMPO 混合液をキャピラリーで採取し、ESR 測定を行った。ESR の測定条件は、掃引範囲：330.0-334.0 mT、周波数：9450MHz、強度：1.0 W、掃引時間：1.0 min、Mn マーカ：700 とした。

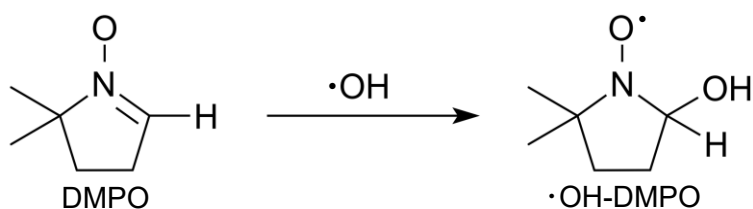


Figure 2-4 Reaction of ·OH-DMPO adduct formation from ·OH and DMPO.



### 2-2-7 EAOP 処理による PA66 フィルムの分解

PA66 フィルムはマイクロプラスチックを模して  $5 \times 5 \text{ mm}$  に裁断し、サンプルとした。裁断したサンプルに対して EAOP 処理を行った。反応セル内を  $0.2 \text{ NH}_2\text{SO}_4$  で満たし、その中に PA66 フィルムを浸漬させた。ファンクションジェネレータを用いて  $-1.6 \text{ V}$  の直流電圧を印加しながら、 $650 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  の強度で  $\lambda=254 \text{ nm}$  の UV した。処理中は常に  $\text{O}_2$  バブリングを行った。これを EAOP 処理とした。24 時間、48 時間、72 時間、120 時間の EAOP 処理後、残った PA66 フィルムは回収し、超純水で洗浄後、シリカゲルの入ったデシケータ内で減圧乾燥を一晩行った。また、残った  $\text{H}_2\text{SO}_4$  も回収し、 $4^\circ\text{C}$  で保存した。比較実験として、 $-1.6 \text{ V}$  の直流電圧を印加したのみサンプル、 $\lambda=254 \text{ nm}$  の UV を照射したのみのサンプル、 $0.2 \text{ N H}_2\text{SO}_4$  に浸漬したのみのサンプルも準備した。

### 2-2-8 PA66 フィルムの EAOP による分解評価

2-2-7 で各処理を行ったサンプルに対して、以下の分析実験を行い、PA66 フィルムの EAOP による分解評価を行った。

#### 2-2-8-1 PA66 フィルムの EAOP による分解評価 | 形態観察

2-2-8 で各処理を行った後、サンプルの形態観察を SEM を用いて行った。観察するサンプルに導電性を付与するため、イオンコータを用いて Au-Pd 粒子をコーティング (30 秒、15 mA) した。SEM 観察時の加速電圧は  $15.0 \text{ kV}$  とした。

#### 2-2-8-2 PA66 フィルムの EAOP による分解評価 | ATR-FTIR 分析による分子構造変化の観察

2-2-8 で各処理を行った後、サンプルの分子構造変化を ATR-FTIR を用いて観察した。ATR-FTIR の測定条件は以下の通りである；分解能： $4 \text{ cm}^{-1}$ 、積算回数：32 回、掃引範囲： $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ 、バックグラウンド補正、ベースライン補正を行った。スペクトルの規格化は C-H 変角振動 ( $-\text{CH}_2-$ ) 由来の  $1465 \text{ cm}^{-1}$  で行った。

#### 2-2-8-3 PA66 フィルムの EAOP による分解評価 | XRD 分析による結晶化度変化の観察

2-2-8 で各処理を行った後、サンプルの結晶過度変化を XRD を用いて観察した。XRD の測定は、開始角度： $2\theta=10^\circ$ 、終了角度： $2\theta=35^\circ$ 、サンプリング幅： $0.05^\circ$ 、1 ステップのスキャンスピード： $3.5 \text{ s}$ 、管電圧： $40 \text{ kV}$ 、管電流： $40 \text{ mA}$  の測定条件のもと行った。データ取得後、生データに対して、 $\text{K}\alpha$  除去、バックグラウンド減算、スムージングを行った。

#### 2-2-8-4 PA66 フィルムの EAOP による分解評価 | GC による電解液中の分解生成物の分析

3-2-8 で EAOP を行った後、回収した  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を GC で分析することで分解生成物を確認した。分液漏斗に回収した  $\text{H}_2\text{SO}_4$  に酢酸エチルを加え、静かに浸透することで  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中に溶存している PA66 フィルム分解生成物である脂溶性成分を酢酸エチル中へ抽出した。浸透、層分離後、酢酸エチル層を回収し、残った  $\text{H}_2\text{SO}_4$  層に対してさらに酢酸エチルを加えて同様の操作を行った。これを繰り返し、合計で3回の液液抽出を行った。抽出後の酢酸エチル溶液に硫酸マグネシウムを加え、穏やかに攪拌することで脱水を行った。脱水終了後、溶液を濾過することで硫酸マグネシウムを除去し、得られた酢酸エチル溶液は  $4\text{ }^\circ\text{C}$  で保存した。GC 分析はカラム温度： $40\text{ }^\circ\text{C}$  で3分間保持→ $20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  で昇温→ $300\text{ }^\circ\text{C}$  で5分間保持、キャリアーガス：窒素、スプリット比：1:100、イオン化法：電子イオン化法の分析条件のもと行った。

#### 2-2-8-5 PA66 フィルムの EAOP による分解評価 | 重量変化の観察

裁断した PA66 フィルムを 3-2-8 と同様の操作で EAOP 処理を行った。EAOP 処理は 2, 4, 6, 8, 10 日間の積算で行った。各積算日数の EAOP 処理後、サンプルを超純水ですすぎ、シリカゲルの入ったデシケータ内で減圧乾燥を 24 時間行った。乾燥後の PA66 フィルムを電子天秤で重量測定した。電子天秤での重量測定は最小表示が  $0.1\text{ mg}$  までとした。同サンプルに対して重量測定は 3 回行い、平均した。

## 2-3 結果と考察

### 2-3-1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中における O<sub>2</sub>の電気化学還元による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>発生電位の調査

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中に溶存した O<sub>2</sub>を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>へ還元する電位を調査した。Figure 2-5 は、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中に O<sub>2</sub>を溶存させたサンプル（赤）、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中から O<sub>2</sub>を脱気したサンプル（青）の LSV の結果を Figure 2-5 に示す。O<sub>2</sub>を溶存させたサンプルでは-1.4 V 付近に還元ピークが観られた。一方で、O<sub>2</sub>を脱気したサンプルでは-1.4 V 付近に還元ピークは観られなかった。よって、-1.4 V 付近の還元は O<sub>2</sub>の還元が起こっていると判断した。以降、EAOP 処理を行う際の電圧印加は-1.4 V より低定電圧側の-1.6 V とした。

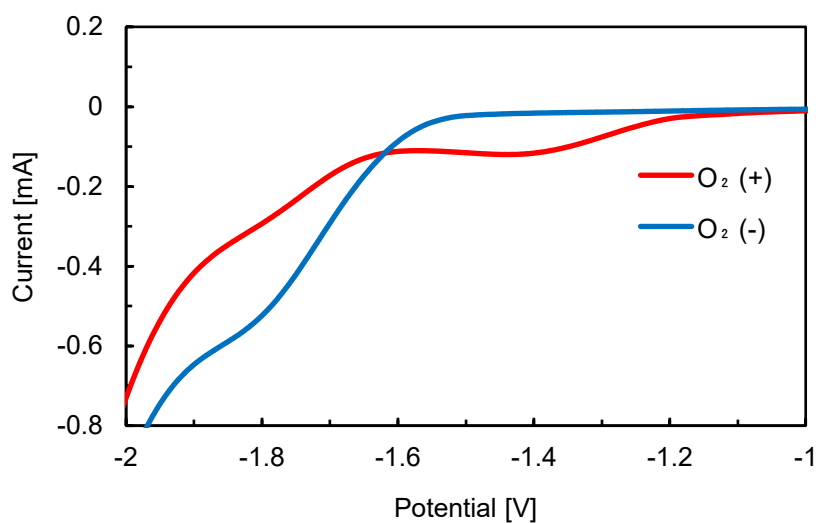
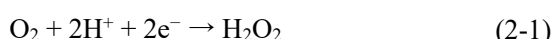


Figure 2-5 LSV grams of O<sub>2</sub> reduction in 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 2-3-2 ABTS ならびに HRP を用いた EAOP による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発生量の評価

EAOP スキーム中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を発生させるための行程である電解液に対して O<sub>2</sub> バブリングを行いながら -1.6 V の電圧印加を行った際の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発生量を評価した。Figure 2-6 は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を ABTS ならびに HRP により呈色した際の λ=420 nm での吸光度と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度関係を表す検量線 (a) と、検量線から計算した EAOP スキーム中に発生した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 (b) である。Figure 2-6 (a) の検量線から、今回の EAOP スキーム中に発生した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は 4.49 nM であることが分かり、EAOP スキーム中にて確かに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が発生していることを確認した。

ここで、O<sub>2</sub> 還元による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成の半反応式は以下の通りである。



今回行った 3600 秒間の電気化学反応の平均電流値は -0.16 mA であった。よって、電気量は 576 mC である。ファラデー定数を 96485 C/mol としたとき、流れた電子は 5.969 μmol と計算できる。今回流れた電子全てが式 (2-1) で消費されたとすると、理論的に発生する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は 2.984 μmol となる。

一方で実際に測定した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の量は 30 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中で 4.49 nM であったため、134.7 pmol となる。ここで、今回は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の自然分解に関しては考慮しないこととする。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の自然分解速度はそのときの温度、分圧、pH、濃度により異なるため、今回は計算することができないからである。また、今回発生している H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は非常に低濃度であるため、自然分解量は無視できるほど少ない。このとき、今回行った O<sub>2</sub> 還元による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成の電流効率を以下の式 (2-2) を用いて求めた。

$$\text{Current efficiency (\%)} = \frac{n_{\text{H}_2\text{O}_2}}{\frac{1}{2}n_e} \quad (2-2)$$

ここで  $n_{\text{H}_2\text{O}_2}$  は発生した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の物質量、 $n_e$  は流れた全電子の物質量である。上記式によって求めた電流効率はわずか 0.0045% であった。よりより効率を求めるため、電極改善が必要である。

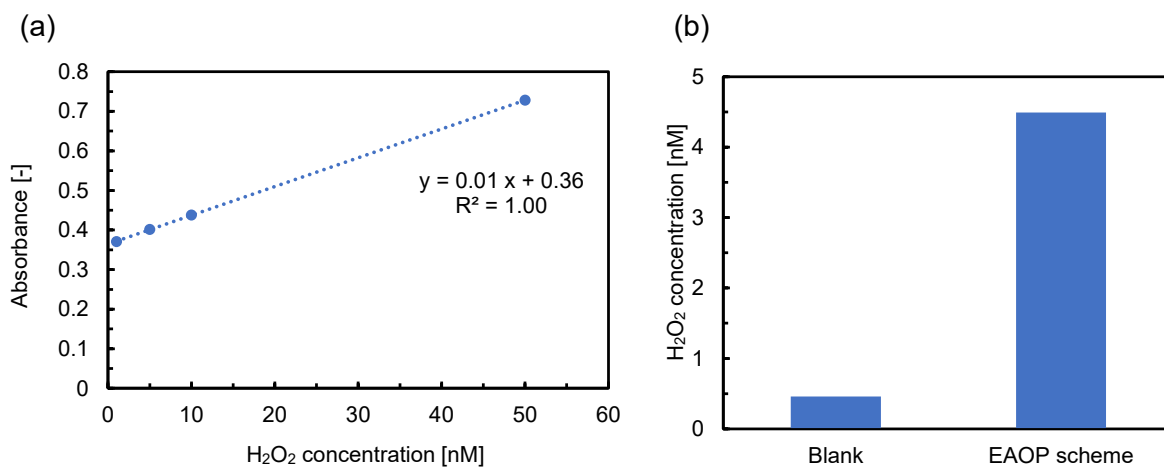


Figure 2-6 (a) The calibration plot of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration vs. absorbance (n=5). (b) The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated during EAOP scheme calculated from calibration plot. Blank is the result of measuring H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> without applied voltage.

### 2-3-3 ESR を用いた EAOP による・OH 発生の評価

EAOP を行った際の・OH 発生を ESR によって評価した。グラフは横軸に磁束密度、縦軸に強度を表している。ESR にて・OH を検出する際は DMPO を使用し、スピニアダクト・OH-DMPO を形成させる。・OH-DMPO を ESR で検出するとスペクトル強度比が 1:2:2:1 のスペクトルが現れる[16-18]。この現象について以下に解説する。

今回使用したスピントラップ剤である DMPO には、核スピンを持つ  $^1\text{H}$  や  $^{14}\text{N}$  が存在している。スピニアダクトの中で不対電子の磁気モーメントに対するスピントラップ剤の核スピンの影響は、通常不対電子を持つ原子から数えて 3 番目までの原子に核スピンがある場合に現れる。そして、核スピンのある原子核の位置が不対電子から遠ざかるほど、影響は小さくなる。スピニアダクト・OH-DMPO において、 $\alpha$  位の  $^{14}\text{N}$  は電子スピン  $S=3/2$  であるため超微細構造の吸収線は 3 本に別れる。核スピンは  $I=1$  であるため別れた吸収線のそれぞれの合成核スピン量子数は  $m_I=-1, 0, 1$  となる。次いで  $\beta$  位の  $^1\text{H}$  は電子スピン  $S=1/2$  であるため超微細構造の吸収線はさらに 2 本ずつ別れていく。核スピンは  $I=1/2$  であるため別れた吸収線のそれぞれの合成核スピン量子数は  $m_I=\pm 1/2$  でそれぞれ和算される。その結果、最終的なスピン強度の和は  $m_I=-3/2$  が 1 つ、 $-1/2$  が 2 つ、 $1/2$  が 2 つ、 $3/2$  が 1 つとなる。よって得られる強度比が 1:2:2:1 になる。これにより出力される ESR スペクトルのシグナル強度も 1:2:2:1 となる (Figure 2-7)。

Figure 2-8 は得られた ESR スペクトルであり、処理を行っていない  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (赤：コントロール)、電圧印加のみを行ったもの (橙)、UV 照射のみを行ったもの (黄)、EAOP 処理を行ったもの (緑) の結果を示している。Figure 2-8 (a) は第 3 および第 4 Mn マーカ間の範囲を示したものの、(b) は (a) グラフ内の青点線内の範囲を拡大したものである。EAOP 処理を行った以外のサンプルでは Mn マーカ間にシグナルが全くないことから・OH-DMPO が検出されておらず、・OH が発生していないことがわかる。一方で EAOP 処理を行ったサンプルでは Mn マーカ間にシグナルを確認することができ、さらにそのシグナルが 1:2:2:1 の強度で現れた。この結果から EAOP サンプルでは・OH-DMPO 複合体が検出できており・OH が発生していることが確認された。また今回の比較実験から EAOP スキーム内での・OH 発生には電圧印加と UV 照射の両方が重要であることが示唆された。

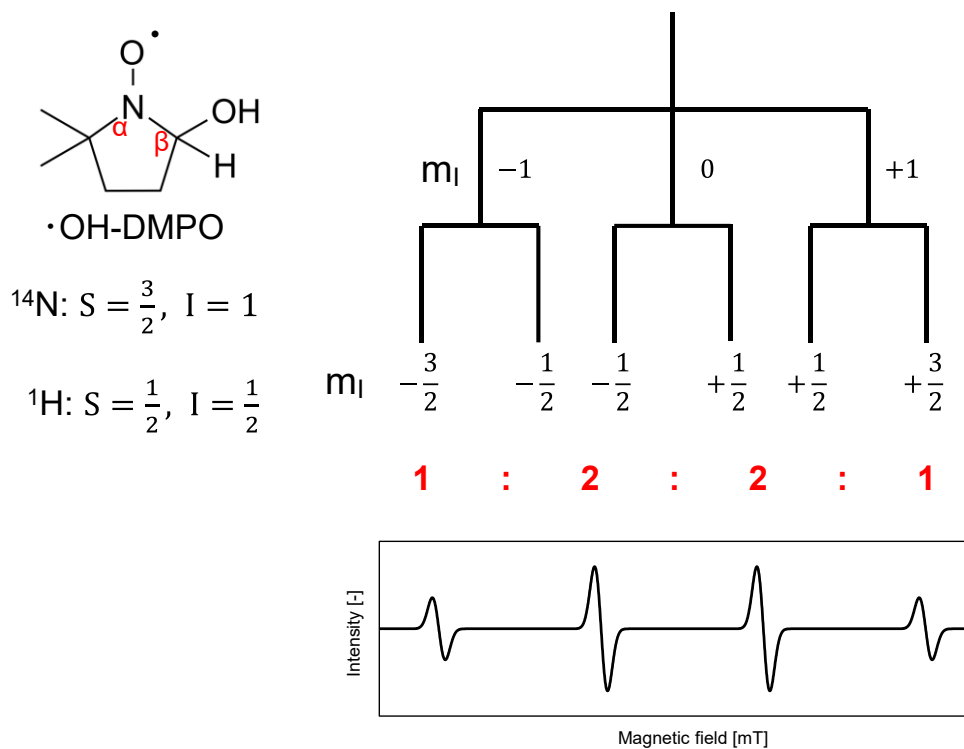


Figure 2-7 Illustration of the principle that ESR spectrum intensity ratio of spin adduct  $\bullet\text{OH-DMPO}$  appears 1:2:2:1.

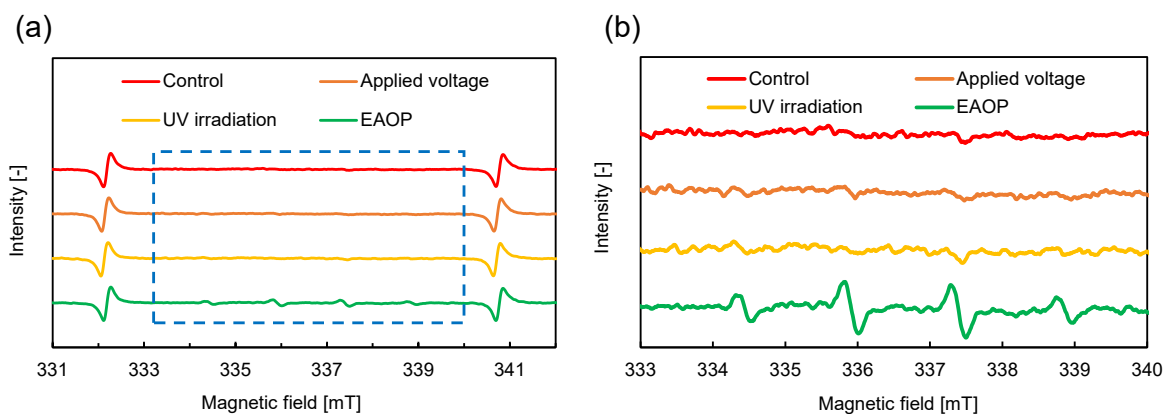


Figure 2-8 ESR spectra of  $\bullet\text{OH-DMPO}$  for each experimental condition. Red: Control, Orange: Only applied voltage, Yellow: Only UV irradiation, Green: EAOP. (a) Wide range between Mn 3 and Mn 4 marker, (b) magnified range of (a) blue dotted rectangle for easy to compare the signal intensity.

## 2-3-4 PA66 フィルムの EAOP による分解評価

以下、各分析実験によって得られた PA66 フィルムの EAOP による分解評価を記述する。

### 2-3-4-1 PA66 フィルムの EAOP による分解評価 | 形態観察

Figure 2-9 は、 $H_2SO_4$  浸漬 (コントロール)、EAOP、UV 照射のみを行った PA66 フィルムの写真である。EAOP 処理を行ったサンプルおよび UV 照射を行ったサンプルは、フィルムがより不透明になり、わずかに黄色く変色していることを確認した。SEM 画像では EAOP 処理および UV 照射を行ったサンプルはどちらも亀裂が入っていることを確認したが、特に EAOP 処理を行った場合には、その亀裂の箇所凹凸が出現していることを確認した。以上の形態観察から、UV 照射と EAOP 処理によって PA66 フィルムが劣化しており、さらに EAOP では劣化が激しいことを確認した。

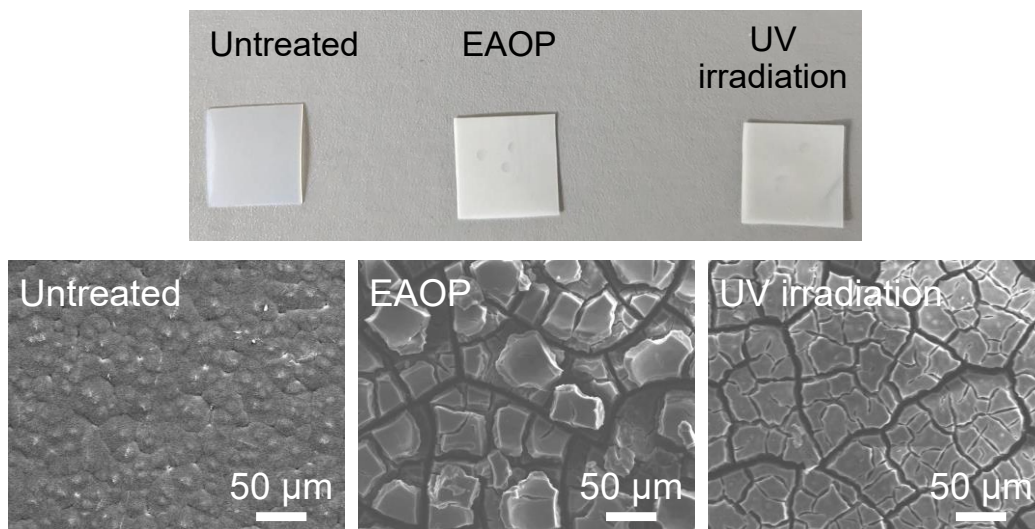


Figure 2-9 Sample observation under different treatment [untreated, EAOP treatment, only UV irradiation]. (Upper) photograph image and (lower) SEM image.



### 2-3-4-2 PA66 フィルムの EAOP による分解評価 | ATR-FTIR 分析による分子構造変化の観察

Figure 2-10 は、未処理（黒）、 $\text{H}_2\text{SO}_4$  浸漬（淡青：5 日間コントロール、青：10 日間コントロール）、EAOP 処理（橙：5 日間 EAOP、赤：10 日間 EAOP）を行った PA66 フィルムの ATR-FTIR スペクトルである。グラフは横軸に波数、縦軸に強度を表している。アミド結合由来 IR スペクトルは、 $\text{C}=\text{O}$  伸縮振動由来の  $1630\text{ cm}^{-1}$  と  $\text{N-H}$  変角振動由来の  $1540\text{ cm}^{-1}$  で帰属することができ、グラフ中に垂直な灰色の線で示した。このアミド結合由来の IR スペクトルが、EAOP 処理を行うことで強度が小さくなっていた。この結果から PA66 構造中のアミド結合が相対的に減少しており、アミド結合が切断されていると考えられる。

Shannen T. L. Sait らは長期間におよぶ UV 照射によるポリアミドの分解を行い、ATR-FTIR によって分解の評価を行っている。Shannen T. L. Sait らが行った ATR-FTIR 分析においても、アミド結合由来の IR スペクトルである  $1630\text{ cm}^{-1}$  と  $1531\text{ cm}^{-1}$  の波数において、分解前後でスペクトル強度が減少していることを報告し [20]、本手法でも同様の ATR-FTIR 結果であったことから、PA66 中のアミド結合が減少していると考えられる。

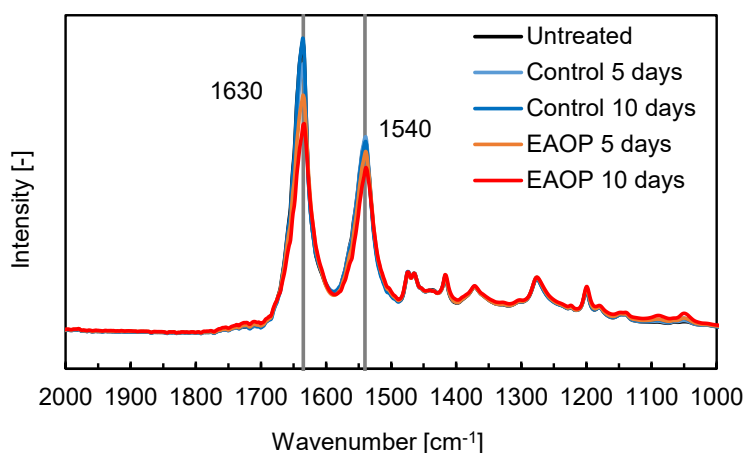


Figure 2-10 ATR-FTIR spectrums untreated, control, EAOP treated PA66 films. The vertical lines are the amide attribution lines ( $1540\text{ cm}^{-1}$ ,  $1630\text{ cm}^{-1}$ ).

### 2-3-4-3 PA66 フィルムの EAOP による分解評価 | XRD 分析による結晶化度変化の観察

Figure 2-11 (a) は、未処理、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浸漬（コントロール）、EAOP 処理を行った PA66 フィルムの XRD パターンである。グラフは横軸に角度、縦軸に強度を表している。2θ=20°, 24°付近に PA66 に特有な (100) 面と、(010) 面の強いピーク得た。各処理を行うことによって PA66 の結晶構造が変化していないことが確認された。得られたデータはガウス関数を用いてピーク分離を行った。10 日間 EAOP 処理を行ったサンプルの XRD パターンデータをピーク分離したものを Figure 2-10 (b) に示す。2θ=18.6°, 20.3°, 23.6°に結晶部由来の回折ピーク（Pattern1, 2, 3）を、2θ=21.6°を広範なピーク頂点とする非晶部由来の回折ピーク（Pattern4）を観察した。ピーク分離を行ったそれぞれの関数を 10°-35°の範囲で積分し、下記 (2-3) 式に適用することで結晶化度を求めた。

$$Crystallinity (\%) = \frac{I_c}{I_c + I_a} \times 100 \quad (2-3)$$

ここで  $I_c$  は結晶部由来の回折ピーク強度、 $I_a$  は非晶部由来の回折ピーク強度である。

その結果、処理を行う前であった Untreated データでは結晶化度が 29.9%と算出されたのに対し、10 日間 EAOP 処理を行ったデータでは結晶化度が 37.8%に増加していた。EAOP 処理を行うことで非晶部が結晶化したという考察は難し、他の分析データと一致しない。よって EAOP 処理を行うことで非晶部から優先的に分解が始まり、相対的に結晶部が多くなり、結晶化度が高まったのだと考察できる。ここで、Figure 2-8 にあるように、EAOP 処理を行うことによって PA66 フィルムはより不透明になっている。プラスチックフィルムの透明性は、結晶化度が高いと不透明になり、結晶化度が低いと透明になるという特徴がある。よって、フィルムの透明度の変化の考察と XRD 解析結果の考察は一致しており、PA66 フィルムは非晶部から優先的に分解が起こり、結晶化度が増加していることが示唆された。

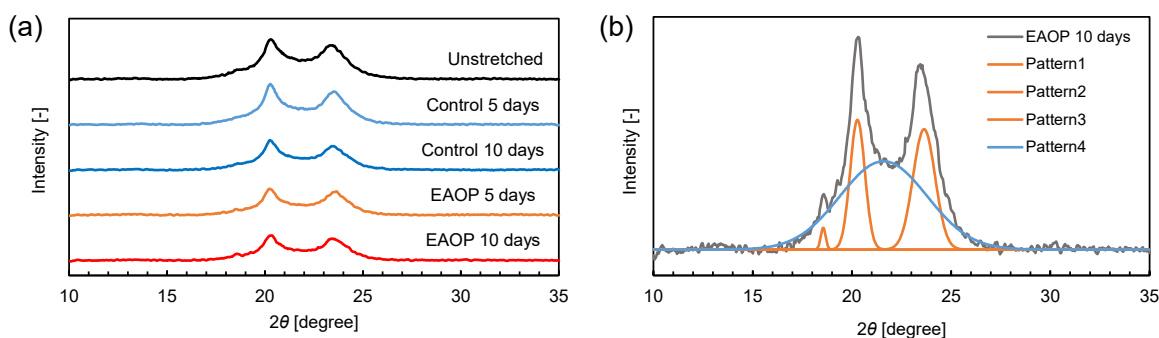


Figure 2-11 (a) XRD patterns of untreated, control, and EAOP treated PA66 films. (b) XRD patterns with peak separation of the results in EAOP at 10 days.

#### 2-3-4-4 PA66 フィルムの EAOP による分解評価 | GC による電解液中の分解生成物の分析

EAOP 処理後、電解液 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) を酢酸エチルに置換し、サンプルを GC で分析した。Figure 2-12 は EAOP 処理後の  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (黄)、ブランクとしての  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (赤) のクロマトグラムである。検出された3つのピークは 14.5 min、14.8 min、15.3 min の保持時間であった。これらのピークを帰属した結果、それぞれヘキサデカンアミド、クエン酸アセチルトリブチル、9-オクタデカンアミドであることが示唆された。クエン酸アセチルトリブチルに関しては、切断されたアミド結合がラジカル状態にあり、UV エネルギーによるアミド結合同士の再結合によってエステル結合が形成されたと考えた。ヘキサデカンアミドとオクタデカンアミドについては、PA66 が分解して短鎖アミド化合物が形成された可能性がある。分析した  $\text{H}_2\text{SO}_4$  には、EAOP 処理を行う段階で他の有機化合物を添加していない。よって、分解処理後に短鎖アミド化合物が検出されたことから、PA66 フィルムから分解生成物として短鎖アミド化合物が  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中に放出されたことが示唆された。

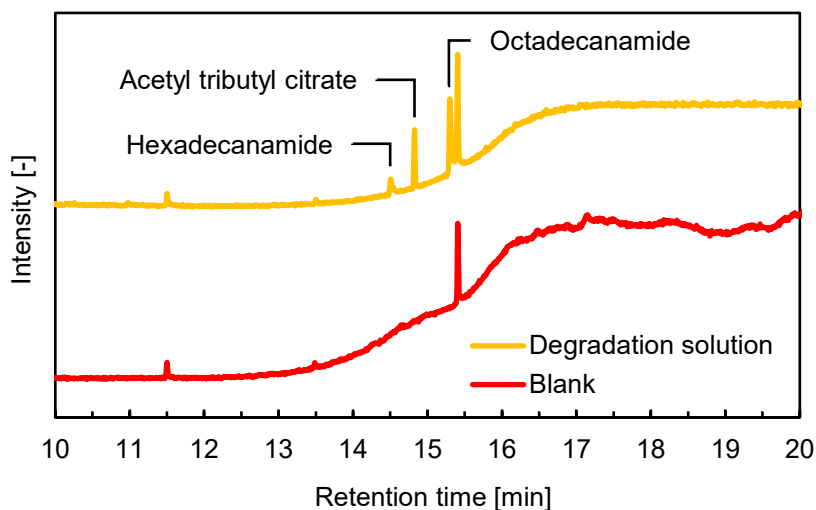


Figure 2-12 GC chromatogram of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  after EAOP treated PA66 fiber mats.

#### 2-3-4-5 PA66 フィルムの EAOP による分解評価 | 重量変化の観察

EAOP 処理によるサンプルの重量減少を調査した。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浸漬 (Control)、EAOP 処理 (EAOP) を 5 日間および 10 日間行ったサンプルの重量減少の結果を Table 2-1 に示す。10 日間の処理によって、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浸漬しただけでは重量減少が 0.04±0.01 mg だったが、EAOP 処理を行った場合の重量減少は 0.14 ±0.02 mg であり、減少率は 1.75 ±0.00%であった。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浸漬を行ったサンプルと EAOP 処理を行ったサンプルの重量減少量に対して有意差検定を行った。t 検定の結果、5 日間および 10 日間の処理の両結果において重量減少量に有意な差がみられた (5 日間処理の場合:  $t(8) = 5.05, P = 9.92 \times 10^{-4}$ 、10 日間処理の場合:  $t(7) = 8.87, P = 4.69 \times 10^{-5}$ )。EAOP 処理を適用することによって、確かに PA66 フィルムの重量が減少しているが、わずか 0.14 mg の重量減少であったため、より分解効率をよくするための EAOP システム改善が求められる。

Table 2-1 Weight analysis of control and EAOP PA66 films (n=5). Treatment time was 5 and 10 days.

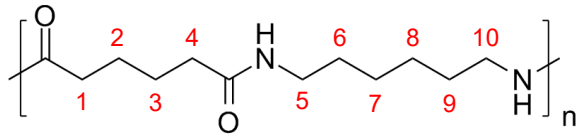
	Weight loss at 5 days [mg]	Weight loss at 10 days [mg]
Control	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01
EAOP	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.02

## 2-4 結論

第2章では新たなマイクロプラスチック分解方法として、EAOPによるマイクロプラスチック分解の検討を目的とした。具体的には、EAOPにおいて発生する $\text{H}_2\text{O}_2$ の発生量と $\bullet\text{OH}$ の発生確認、ならびにEAOP処理を用いたPA66分解評価を行った。60分のEAOP中で $\text{H}_2\text{O}_2$ は134.7 pmol発生していた。60分のEAOP処理中で $\bullet\text{OH}$ が確かに発生していた。PA66フィルムは、EAOP処理を行った後、フィルム表面がより不透明になり僅かに黄変し、フィルム表面に亀裂が入り凹凸が出現したことをSEM観察から確認した。アミド結合が減少したことをATR-FTIRから確認した。結晶化度が減少したことをXRDから確認した。EAOP処理後の電解液である $\text{H}_2\text{SO}_4$ をGCで分析したところ、短鎖アミド化合物が検出され、PA66フィルムから生成されていることを確認した。以上のことから、EAOP処理によって発生させた $\bullet\text{OH}$ がPA66の分解を促進していると考えられる。本システムでは電気化学反応を用いて強力な酸化剤を生成させ、ポリマーを酸化することによって分解するシステムを構築した。

Figure 2-13にPA66における $\bullet\text{OH}$ を開始剤としたラジカル連鎖反応の一例を挙げる。PA66繰り返し単位構造中の $\text{CH}_2$ 主鎖に対して図の赤字のように番号を付し、5番の $\text{CH}_2$ 以外をポリマーとして一般化しRおよびR'とした。示した図では5番目の $\text{CH}_2$ に対して、まず $\bullet\text{OH}$ によりH原子引き抜きが起こる。H原子が引き抜かれることでラジカル化した $\bullet\text{C}$ に $\text{O}_2$ 分子が付加しペルオキシドラジカル( $\text{COO}\bullet$ )を形成する。次いでヒドロペルオキシド( $\text{HOO}\bullet$ )によってO原子が引き抜かれオキシドラジカル( $\text{CO}\bullet$ )になる。ここにH原子が付加することで反応が停止し、アミド化合物とアルデヒド化合物を生成する。これらラジカル反応があらゆる炭素鎖位置で繰り返し行われることで、徐々に分解していったのではないかと考えている。ただし、GCによって検出されたアミド化合物を得るためには、ラジカル連鎖反応中に反応停止することなく、赤色矢印で示した区間の反応が繰り返し行われることが必要であると考えている。

## PA66



Detected Production	Hexadecanamide	Octadecanamide
Molecular structure		

## Radical chain reaction

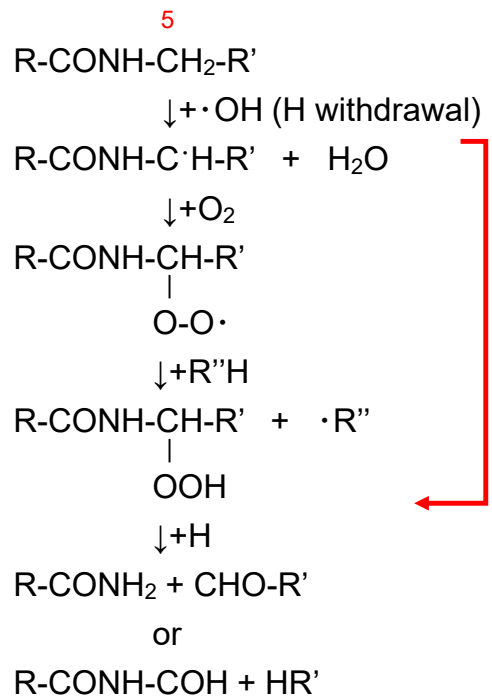


Figure 2-13 As an example of radical chain reaction scheme of PA66.

## 参考文献

- [1] F. D. Falco, E. D. Pace, M. Cocca, M. Avella. The contribution of washing processes of synthetic clothes to microplastic pollution. *Sci. Rep.*, **9**, 6633 (2019)
- [2] I. E. Napper, Richard C. Thompson. Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Mar. Pollut. Bull.*, **112**, 39–45 (2016)
- [3] M. A. Browne, P. Crump, S. J. Niven, E. Teuten, A. Tonkin, T. Galloway, R. Thompson. Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 9175–9179 (2011)
- [4] R. Dris, J. Gasperi, V. Rocher, M. Saad, N. Renault, B. Tassin. Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. *Environ. Chem.*, **12**, 592–599 (2015)
- [5] N. L. Hartline, N. J. Bruce, S. N. Karba, E. O. Ruff, S. U. Sonar, P. A. Holden. Microfiber Masses Recovered from Conventional Machine Washing of New or Aged Garments. *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 11532–11538 (2016)
- [6] S. Freeman, A. M. Booth, I. Sabbah, R. Tiller, J. Dierking, K. Klun, A. Rotter, E. B. David, J. Javidpour, D. L. Angel. Between source and sea: The role of wastewater treatment in reducing marine microplastics. *J. Environ. Manage.*, **266**, 110642 (2020)
- [7] A. A. Koelmans, N. H. M. Nor, E. Hermsen, M. Kooi, S. M. Mintenig, J. D. France. Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water. Res.*, **155**, 410–422 (2019)
- [8] S. A. Mason, D. Garneau, R. Sutton, Y. Chu, K. Ehmann, J. Barnes, P. Fink, D. Papazissimos, D. L. Rogers. Microplastic pollution is widely detected in US municipal wastewater treatment plant effluent. *Environ. Poll.*, **218**, 1045–1054 (2016)
- [9] S. M. Mintenig, I. I. Veen, M. G. J. Löder, S. Primpke, G. Gerdt. Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water. Res.*, **108**, 365–372 (2017)
- [10] F. Murphy, C. Ewins, F. Carbonnier, B. Quinn. Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 5800–5808 (2016)
- [11] C. D. Rummel, B. I. Escher, O. Sandblom, M. M. Plassmann, H. P. H. Arp, M. MacLeod, A. Jahnke. Effects of Leachates from UV-Weathered Microplastic in Cell-Based Bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, **53**, 9214–9223 (2019)
- [12] 日本化学会. 活性酸素種の化学. 学会出版センター (1990)
- [13] I. Sirés, E. Brillas, M. A. Oturan, M. A. Rodrigo, M. Panizza. Electrochemical advanced oxidation processes: today and tomorrow. A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **21**, 8336–8367 (2014)
- [14] S. Qiu, D. He, J. Ma, T. Liu, T. D. Waite. Kinetic Modeling of the Electro-Fenton Process: Quantification of Reactive Oxygen Species Generation. *Electrochim. Acta.*, **176**, 51–58 (2015)

- [15] 長谷川敬彦, 菅原悦子, 柏木力. ペルオキシダーゼ, 2,2'-アジノジ (3-エチルベンゾチアゾリン 6-スルホン酸) アンモニウム塩を用いた過酸化水素の微量手量法とその応用. *分析化学*, **30**, 470–474 (1981)
- [16] E. G. Janzen. Spin trapping. Spin trapping. *Acc. Chem. Res.*, **4**, 31–40 (1971)
- [17] E. G. Janzen. Spin trapping. Spin trapping. *Meth. Enzymol.*, **105**, 188-198 (1984)
- [18] 山内淳. 磁気共鳴-ESR : 電子スピンの分光学. サイエンス社 (2006)
- [19] 大石不二夫. プラスチックが一番わかる. 技術評論社 (2011)
- [20] S. T. L. Sait, L. Sørensen, S. Kubowicz, K. Vike-Jonas, S. V. Gonzalez, A. G. Asimakopoulos, A. M. Booth. Microplastic fibers from synthetic textiles: Environmental degradation and additive chemical content. *Environ. Pollut.* **268**, 115745 (2021)



### 第3章 電気化学的促進酸化プロセス中を用いたポリエチレンテレフタレートの分解評価

#### 3-1 緒言

第2章ではEAOPを用いたPA66の分解評価を行った。第3章ではPA同様に合成繊維として主に使用されており、マイクロプラスチックファイバーを構成しているポリエチレンテレフタレート（PET: polyethylene terephthalate）をターゲットとしてEAOPを用いて分解および分解評価した。

PETはPA同様に合成繊維として主に使用されており、PETを含む合成繊維を用いた繊維製品を洗濯することによってマイクロプラスチックファイバーが発生し[1-5]、発生したマイクロプラスチックファイバーは下水処理場で完全に取り除くことができず、河川や海洋へ流出してしまっている[6-11]

繊維の放出に関する研究では、他の一般的な合成繊維と一緒に試験した場合、PETが最も多くの繊維を放出することが報告されており[12]、5 kgのPET繊維から600万本のマイクロプラスチックファイバーが放出されると推定されている[13]。PETの分解方法を探ることで、大きくマイクロプラスチック問題解決に寄与できるのではないかと考えた。

PETは結晶性ポリマーであり、繊維としてはテトロンまたはポリエステルの名で有名である。PETはプラスチックとしては、強度、剛性、耐熱性、耐クリープ性、ブロー成形性の良さから、PETボトルとして年間50万トン以上も使用されている。耐熱性に優れ（熱変形240℃、連続耐熱150℃）、耐寒性（-60℃）、電気絶縁性、耐薬品性、耐摩耗性に優れているなどして繊維材料としても使用されている（Figure 3-1）[14]。

PETフィルムを分解サンプルとしてPETへのEAOP処理を施すことでPETの分解評価を行った。分解処理後の評価をSEM、原子間力顕微鏡（AFM: Atomic Force Microscope）、ATR-FTIR、重量測定を行うことで分解評価とした。さらに第3章のPA66分解ではEAOPを行う電解液としてH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液を使用していたが、より環境に優しい条件で分解処理を行うため、EAOPを行う電解液にクエン酸ナトリウム緩衝液を用いた。

第3章ではEAOPを用いたPET分解評価を行った。（Figure 3-2）。

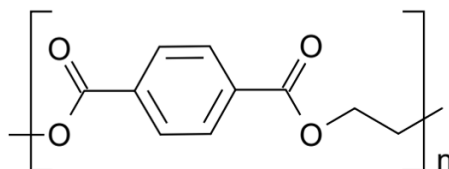


Figure 3-1 The molecular structure of polyethylene terephthalate.

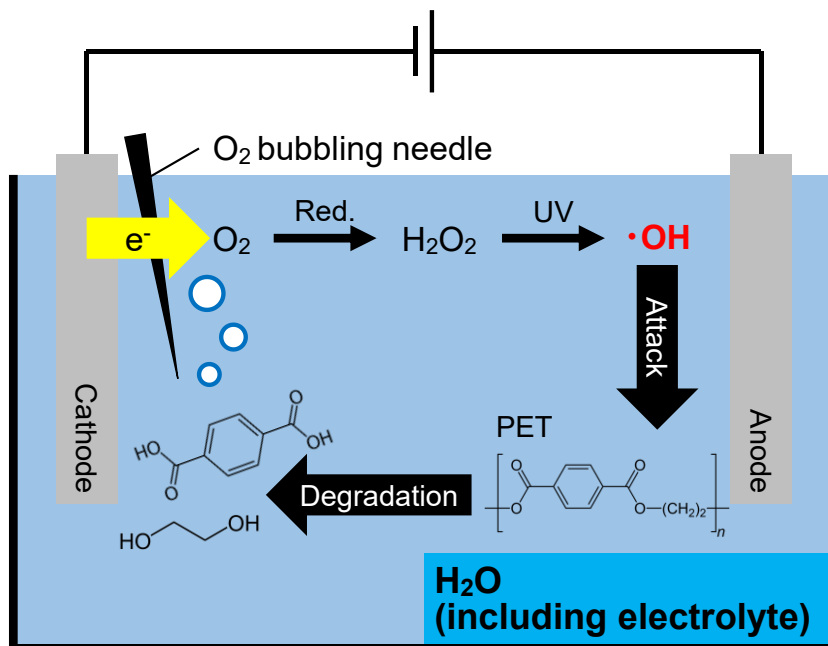


Figure 3-2 Schematic image of PET degradation by EAOP.

## 3-2 実験操作

### 3-2-1 試薬および実験機器

クエン酸、クエン酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。PETフィルム（厚さ 200  $\mu\text{m}$ ）はアズワン株式会社から購入した。その他、塩酸、酸素ガス、窒素ガスは第2章と同様のものを使用した。全ての試薬はいずれも特級のものを使用した。

AFM はセイコーインスツル株式会社（千葉、日本）の SPA-300 を使用した。その他、超純水製造装置、3D CAD ソフト、スライスソフトウェア、3D プリンタ、白金板、ファンクションジェネレータ、UV ランプ、イオンコータ、SEM、ATR-FTIR 装置、電子天秤は第2章と同様のものを使用した。

### 3-2-2 EAOP による PET フィルムを分解するための反応セルの設計と作製

EAOP による PET フィルムを分解するための反応セルは第2章で設計・作製したものと同様のものを使用した。

### 3-2-3 白金板表面の還元処理

2-2-3 で裁断した 20 × 10 mm の白金板を使用した。全ての実験を行う直前に、白金板を 1 N HCl に 1 分間浸漬させたあと、超純水ですすぎ、 $\text{N}_2$  気流で乾燥させた。

### 3-2-4 EAOP 処理による PET フィルムの分解

分解評価を行うための PET フィルムはマイクロプラスチックを模すため、5 × 5 mm に裁断した。裁断した PET フィルムに対して EAOP 処理を行った。反応セル内を 50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）で満たし、その中に PET フィルムを浸漬させた。ファンクションジェネレータを用いて -1.6 V の直流電圧を印加しながら、650  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  の強度で  $\lambda=254 \text{ nm}$  の UV を照射した。処理中は常に  $\text{O}_2$  バブリングを行った。これを EAOP 処理とした。120 時間の EAOP 処理後、残った PET フィルムは回収し、超純水で洗浄後、シリカゲルの入ったデシケータ内で減圧乾燥を一晩行った。比較実験として、-1.6 V の直流電圧を印加したのみサンプル、 $\lambda=254 \text{ nm}$  の UV を照射したのみサンプル、50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）に浸漬したのみサンプルも準備した。

### 3-2-5 PET フィルムの EAOP による分解評価

3-2-4 で各処理を行ったサンプルに対して、以下の分析実験を行い、PET フィルムの EAOP による分解評価を行った。

#### 3-2-5-1 PET フィルムの EAOP による分解評価 | 形態観察

3-2-4 で各処理を行った後、サンプルの形態観察を SEM および AFM を用いて行った。SEM 観察では観察するサンプルに導電性を付与するため、イオンコータを用いて Au-Pd をコーティング (30 秒、15 mA) した。SEM 観察時の加速電圧は 15.0 kV とした。AFM 観察時の条件は観察モード：タッピングモード、周波数：14 Hz、ばね定数：0.26 N/m、スキャン範囲：100 × 100 nm とした。

#### 3-2-5-2 PET フィルムの EAOP による分解評価 | ATR-FTIR 分析による分子構造変化の観察

3-2-4 で各処理を行った後、サンプルの分子構造変化を ATR-FTIR を用いて観察した。ATR-FTIR の測定条件は以下の通りである；分解能：4 cm<sup>-1</sup>、積算回数：64 回、掃引範囲：400–4000 cm<sup>-1</sup>、バックグラウンド補正、ベースライン補正、分解寄与が小さい CH<sub>2</sub> 伸縮由来のピークである 1463 cm<sup>-1</sup> を基準とした規格化を行った。

#### 3-2-5-3 PET フィルムの EAOP による分解評価 | XRD 分析による結晶性の観察

3-2-4 で各処理を行った後、サンプルの結晶性変化を XRD を用いて観察した。XRD の測定は、開始角度：2θ=10°、終了角度：2θ=35°、サンプリング幅：0.05°、1 ステップのスキャンスピード：3.5 s、管電圧：40 kV、管電流：40 mA の測定条件のもと行った。データ取得後、Kα 除去、バックグラウンド減算、スムージングを行った。

#### 3-2-5-4 PET フィルムの EAOP による分解評価 | 重量変化の観察

3-2-4 で各処理を行った後、サンプルの重量変化を電子天秤を用いて測定した。電子天秤での重量測定は最小表示が 0.1 mg までとした。同サンプルに対して重量測定は 3 回行い、平均した。

### 3-3 結果と考察

#### 3-3-1 PET フィルムの EAOP による分解評価

以下、各分析実験によって得られた PET フィルムの EAOP による分解評価を記述する。

##### 3-3-1-1 PET フィルムの EAOP による分解評価 | 形態観察

Figure 3-3 (a), (b), (c) はそれぞれ、未処理、クエン酸ナトリウム緩衝液に浸漬のみ、EAOP を行った PET フィルムの写真である。処理を行う前の PET フィルムは透明であり、それをクエン酸ナトリウム緩衝液へ 120 時間浸漬しても透明性は保たれたままだった。一方で、EAOP 処理を行った PET フィルムはフィルム表面が白く濁っていた。

Figure 3-3 (d), (e), (f) はそれぞれ、未処理、クエン酸ナトリウム緩衝液に浸漬のみ、EAOP を行った SEM 画像である。処理を行う前の PET フィルムは凹凸が観察されず滑らかな表面であり、それをクエン酸ナトリウム緩衝液へ 120 時間浸漬しても滑らかなままであった。一方で、EAOP 処理を行った PET フィルムは細かな凹凸が観察された。この結果は EAOP 処理を行うことで PET フィルムの表面が粗くなっていることが確認でき、EAOP 処理によって PET フィルムが分解されていることが示唆された。

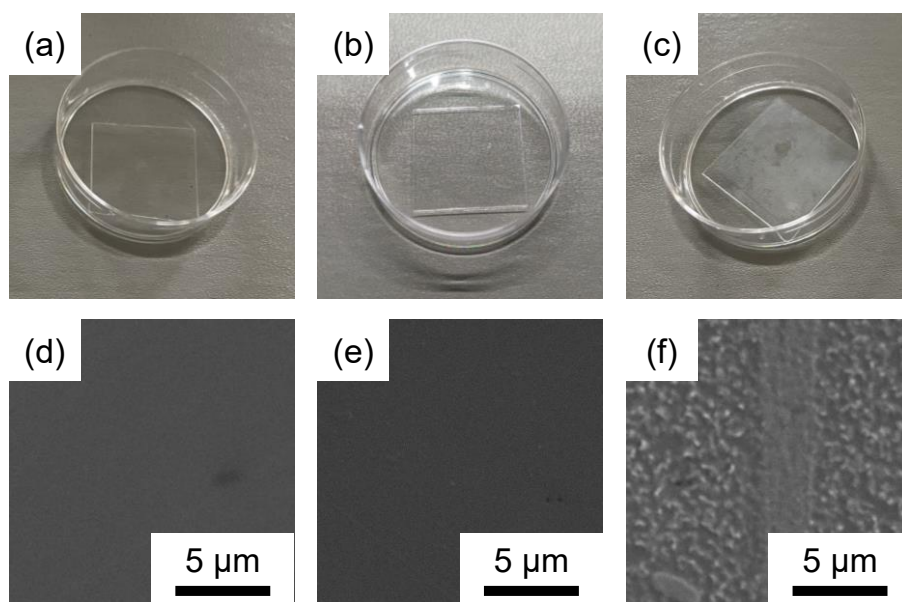


Figure 3-3 Photographs of the PET films (a) untreated, (b) immersed electrolyte, and (c) EAOP treated. SEM images (5000× magnification) of the PET film (d) untreated, (e) immersed electrolyte, and (f) EAOP treated.

Figure 3-4 (a) は未処理の、(b) は EAOP 処理後の PET フィルムの AFM 像、Table 3-1 は平均面粗さ測定結果である。Figure 3-4 (a), (b), (c) の AFM 像において、xy 平面はスキャンした試料の範囲を表し、z 軸は測定された粗さを表す。Table 3-1 から未処理の (a) や電解液に浸漬させただけの (b) に比べて、EAOP 処理後の (c) は平均面粗さおよび最大高低差が一桁大きいことが示唆された。この粗さの増加から、PET フィルムの分解はフィルム表面から徐々に分解が起こっていることが確認された。

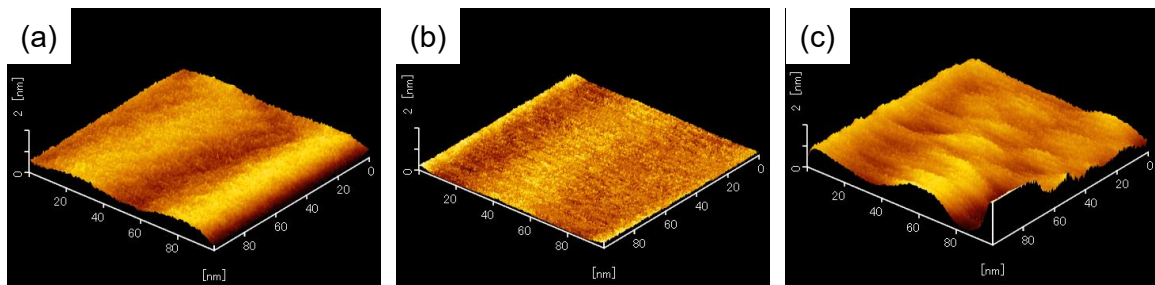


Figure 3-4 AFM images of the PET film (a) untreated, (b) immersed electrolyte, and (c) EAOP treated.

Table 3-1 Roughness analysis by AFM.

	Average surface roughness [nm]	Maximum height difference [nm]
Untreated	$9.692 \times 10^{-2}$	$7.444 \times 10^{-1}$
Immersed electrolyte	$2.385 \times 10^{-2}$	$2.869 \times 10^{-1}$
EAOP treated	$1.438 \times 10^{-1}$	$1.248 \times 10^0$

### 3-3-1-2 PET フィルムの EAOP による分解評価 | ATR-FTIR 分析による分子構造変化の観察

Figure 3-5 は、未処理（黒）、くえん酸ナトリウム緩衝液浸漬（青）、EAOP 処理後（赤）の PET フィルムの ATR-FTIR スペクトルである。グラフは横軸に波数、縦軸に強度を表している。エステル結合由来の IR スペクトルは  $1118\text{ cm}^{-1}$ 、 $1259\text{ cm}^{-1}$ 、 $1718\text{ cm}^{-1}$  で観察することができ、グラフ中に垂直な灰色の線で示した。このエステル結合由来の IR スペクトルが、EAOP 処理を行うことで強度が小さくなっていた。この結果から PET 構造中のエステル結合が相対的に減少しており、エステル結合が切断されていると考えられる。

Shannen T. L. Sait らは長期間におよぶ UV 照射による PET の分解を行い、ATR-FTIR によって分解の評価を行っている。Shannen T. L. Sait らが行った ATR-FTIR 分析においても、エステル結合由来の IR スペクトルである  $1714\text{ cm}^{-1}$ 、 $1246\text{ cm}^{-1}$ 、 $1100\text{ cm}^{-1}$  の波数において、分解前後でスペクトル強度が減少していることを報告し[15]、本手法でも結果が一致したことから、PET 中のエステル結合が減少していると考えられる。

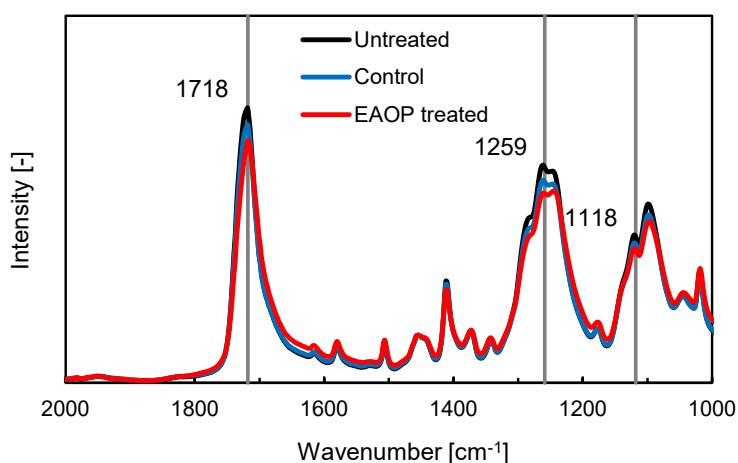


Figure 3-5 ATR-FTIR spectrums of untreated, control, EAOP treated PET film. The vertical lines are the ester attribution lines ( $1118\text{ cm}^{-1}$ ,  $1259\text{ cm}^{-1}$ ,  $1718\text{ cm}^{-1}$ ).

### 3-3-1-3 PET フィルムの EAOP による分解評価 | XRD 分析による結晶性変化の観察

Figure 3-6 は、未処理（黒）および EAOP 処理（橙：5 日間 EAOP、赤：10 日間 EAOP）を行った PET フィルムの XRD パターンである。グラフは横軸に角度、縦軸に強度を表している。 $2\theta = 21.3^\circ$ を頂点とする非晶部由来のブロードな回折ピークを得た。一方で、結晶部由来のシャープな回折ピークは得られなかったため、結晶化度の算出は行うことができなかった。よって、非晶部由来のブロードな回折ピークを  $10^\circ$ – $35^\circ$ まで積分し、グラフの面積で比較することとした。面積の減少率は以下の式 (3-1) により求めた。

$$\text{Area decrease rate (\%)} = \frac{A_u - A_t}{A_u} \times 100 \quad (3-1)$$

ここで、 $A_u$  は未処理サンプルの XRD パターン面積、 $A_t$  は EAOP 処理後サンプルの XRD パターン面積である。

算出された面積減少率は 19.6%であった。これにより、EAOP 処理を行うことによって非晶部の分解が起こっていることが考えられる。

ただし、5 日間の分解と 10 日間の分解で XRD パターンがほぼ同様であったことから、非晶部の分解は 5 日までに終了している可能性がある。

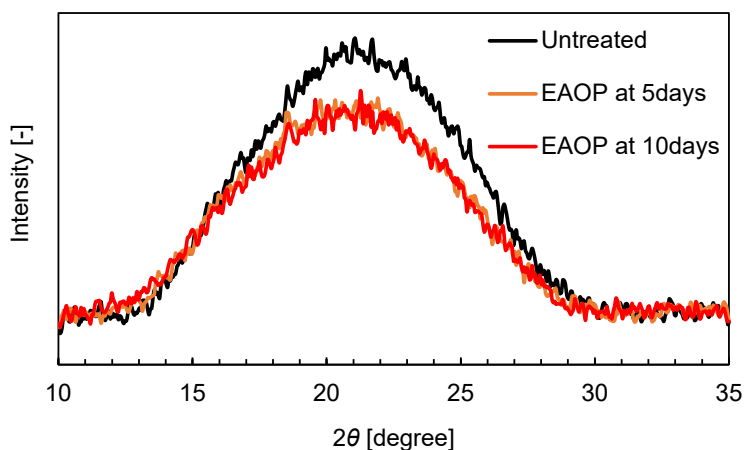


Figure 3-6 XRD patterns of untreated, control, and EAOP treated PA66 films.



#### 3-3-1-4 PET フィルムの EAOP による分解評価 | 重量変化の観察

EAOP 処理によるサンプルの重量減少を調査した。くえん酸ナトリウム緩衝液浸漬 (Control)、EAOP 処理 (EAOP) を 5 日間を子なった散布  $r$  の重量減少の結果を Table 3-2 に示す。5 日間の EAOP 処理によって  $0.12 \pm 0.04$  mg ( $n=5$ ) の重量減少を達成し、減少率は  $1.37 \pm 0.42\%$  であった。くえん酸ナトリウム緩衝液浸漬を行ったサンプルと EAOP 処理を行ったサンプルの重量減少量に対して有意差検定を行った。t 検定の結果 5 日間の処理において重量減少量には有意な差がみられた ( $t(6) = 2.43, P = 0.05$ )。重量減少を観測することにより、EAOP 処理による PET フィルムの分解を確認した。

Table 3-2 Weight analysis of the PET films ( $n=5$ ).

	Weight loss at 5 days [mg]
Control	$0.02 \pm 0.08$
EAOP treated	$0.12 \pm 0.03$

### 3-4 結論

第3章ではEAOP処理を用いたPET分解評価を行った。PETフィルムは、EAOP処理を5日間行うことで、透明であったPETフィルム表面が白く濁った。また、SEMおよびAFM観察により、EAOP処理後のPETフィルムには微細な凹凸が確認された。ATR-FTIR分析では、PET分子構造中のエステル結合の切断が確認された。XRD分析では非晶部が分解されていることを確認した。さらに、わずか5日間のEAOP処理によって、PETフィルムの重量が $1.37 \pm 0.42\%$ 減少した。これらのデータは $\bullet\text{OH}$ を発生させるEAOP処理によってPETフィルムの分解が起こっていることを示すのに十分なデータであると言える。第2章ではPA66の分解を行い5日間の分解では1.49%であった。一方で、第3章で行ったPETの5日間の分解では1.37%であった。これらの結果から、EAOPによるマイクロプラスチック分解では、PETよりもPA66はより分解されやすいのではないかと考えている。理由はPET分子構造は芳香環を持っており、芳香環を持っていないPA66より強固な結合を持っているからだと感ぜられる。また、両者のXRDの結果から、EAOP処理によるポリマーの分解は、結晶部位よりも非晶部位が優先して分解されることが予想される。

本章でも、EAOPシステムを用いることで、電気化学反応をもとにした、PETの酸化分解を行った。第2章、第3章での電気化学的酸化反応システムによるマイクロプラスチック分解によって海洋生物の環境改善に貢献できると期待している。

## 参考文献

- [1] F. D. Falco, E. D. Pace, M. Cocca, M. Avella. The contribution of washing processes of synthetic clothes to microplastic pollution. *Sci. Rep.*, **9**, 6633 (2019)
- [2] I. E. Napper, Richard C. Thompson. Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Mar. Pollut. Bull.*, **112**, 39–45 (2016)
- [3] M. A. Browne, P. Crump, S. J. Niven, E. Teuten, A. Tonkin, T. Galloway, R. Thompson. Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 9175–9179 (2011)
- [4] R. Dris, J. Gasperi, V. Rocher, M. Saad, N. Renault, B. Tassin. Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. *Environ. Chem.*, **12**, 592–599 (2015)
- [5] N. L. Hartline, N. J. Bruce, S. N. Karba, E. O. Ruff, S. U. Sonar, P. A. Holden. Microfiber Masses Recovered from Conventional Machine Washing of New or Aged Garments. *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 11532–11538 (2016)
- [6] S. Freeman, A. M. Booth, I. Sabbah, R. Tiller, J. Dierking, K. Klun, A. Rotter, E. B. David, J. Javidpour, D. L. Angel. Between source and sea: The role of wastewater treatment in reducing marine microplastics. *J. Environ. Manage.*, **266**, 110642 (2020)
- [7] A. A. Koelmans, N. H. M. Nor, E. Hermsen, M. Kooi, S. M. Mintenig, J. D. France. Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water. Res.*, **155**, 410–422 (2019)
- [8] S. A. Mason, D. Garneau, R. Sutton, Y. Chu, K. Ehmann, J. Barnes, P. Fink, D. Papazissimos, D. L. Rogers. Microplastic pollution is widely detected in US municipal wastewater treatment plant effluent. *Environ. Poll.*, **218**, 1045–1054 (2016)
- [9] S. M. Mintenig, I. I. Veen, M. G. J. Löder, S. Pimpke, G. Gerds. Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water. Res.*, **108**, 365–372 (2017)
- [10] F. Murphy, C. Ewins, F. Carbonnier, B. Quinn. Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 5800–5808 (2016)
- [11] B. M. C. Almroth, L. Åström, S. Roslund, H. Petersson, M. Johansson, N. K. Persson. Quantifying shedding of synthetic fibers from textiles; a source of microplastics released into the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **25**, 1191–1199 (2018)
- [12] F. D. Falco, M. P. Gullo, G. Gentile, E. D. Pace, M. Cocca, L. Gelabert, M. B. Agnésa, A. Rovira, R. Escudero, R. Villalba, R. Mossotti, A. Montarsolo, S. Gavignano, C. Tonin, M. Avella. Evaluation of microplastic release caused by textile washing processes of synthetic fabrics. *Environ. Pollut.*, **236**, 916–925 (2018)

- [13] I. E. Napper, R. C. Thompson. Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Mar. Pollut. Bull.*, **112**, 39–45 (2016)
- [14] 大石不二夫. プラスチックが一番わかる. 技術評論社 (2011)
- [15] S. T. L. Sait, L. Sørensen, S. Kubowicz, K. Vike-Jonas, S. V. Gonzalez, A. G. Asimakopoulos, A. M. Booth. Microplastic fibers from synthetic textiles: Environmental degradation and additive chemical content. *Environ. Pollut.* **268**, 115745, (2021)

## 第4章 魚類のヘルスマニタリングのための自己発電型グルコースセンサの開発

### 4-1 緒言

2章と3章では、マイクロプラスチック問題を解決するためにマイクロプラスチック分解方法として、EAOPを用いたマイクロプラスチック分解について研究・議論してきた。しかし、すでに海洋には大量のマイクロプラスチックが存在しており、海洋生物に健康被害を及ぼし始めている可能性がある。よって、マイクロプラスチックを分解する技術の開発だけではなく、海洋生物の健康状態を観測することも重要となってくる。海洋生物の健康状態をモニタリングすることによって、我々の食生活に関わってくる天然魚の状態や、海洋環境の状態の観測が期待できる。海洋生物の環境改善に貢献することができる。

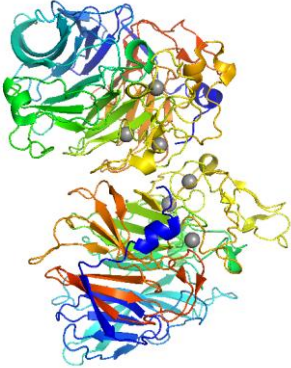

魚類の健康状態の指標の1つにストレスレベルがある。さらに、魚類のストレスレベルの指標として血中グルコース濃度が関係していることが報告されている[1-3]。これまでのグルコース測定には、酵素反応を利用した比色法や蛍光法があった。酵素比色法や酵素蛍光法では、1検体ずつ酵素反応させながら吸光度分析を行う必要があり、魚類の血中グルコース濃度を迅速かつ連続的に測定することは困難であった。本研究では電気化学的な手法を用いたグルコースバイオセンサを用いて血中グルコース濃度を測定することとした[4]。通常のバイオセンサはセンシングを行うために外部からの電力供給が必要となる。しかし、外部からの電力供給を必要としたセンシング技術は天然魚を対象とした現地でのリアルタイムで連続的なモニタリングには不向きである。この欠点を克服するため、バイオ電池に着目した。バイオ電池とは酵素を電極触媒として用いることで、有機分子からエネルギー抽出を行い、起電力を得る燃料電池である[5, 6]。一般的なグルコースセンサはグルコースの酸化反応を起こすため、陽極にグルコース酸化酵素を用いている[7-12]。ここで、反対側の電極である陰極において還元酵素を用いることで、陽極では酸化反応が、陰極では還元反応を起こすことが可能となる。陽極で酸化反応を起こし、陰極で還元反応を起こすことで理論的には起電力を得ることができる。この起電力を用いることができれば、従来までのバイオセンサに必要であった外部からの電力供給を行う必要がなくなる。さらに、得られた起電力によって発生した開回路電圧による電流値を測定することでバイオセンサの役割も担うことができる。本研究ではこのバイオ電池とグルコースバイオセンサを組み合わせたシステムを構築し自己発電型グルコースセンサの開発を目指した。

本研究ではアノード酵素としてグルコースをグルコノラクトンへ酸化する微生物由来ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素 (PQQ-GDH: Pyrroloquinoline quinone-dependent Glucose Dehydrogenase) を用いた[13-15]。従来まで使用されていたグルコース酸化酵素である GOx はグルコース酸化反応に酸素を必要とする。一方で GDH はグルコース酸化反応に酸素を必要としないため、血中における反応にも使用することができる。ここで PQQ-GDH はグルコースを酸化して得た電子を直接電極へ伝達する効率が悪い。よって、電極近傍での電気化学反応はメディエータを介した MET

(mediated electron transfer) 反応を行う必要がある[16, 17]。グルコースを酸化した際に得られた電子をメディエータへ渡し、メディエータが電極表面で酸化された際の電流応答を測定することによってグルコース濃度を定量する。ただし、本バイオセンサは生きた魚類の体内での使用を想定しているため、酵素およびメディエータが電極から脱離し、魚類血中に流入することを避けなければならない。そこでメディエータにはアミノ基反応性電子メディエータである AR-PES (Amine-reactive PES) を用いた。AR-PES は酵素のアミノ基とアミド結合を形成するため、酵素-メディエータ間の固定化が可能となる[18-21]。さらに、その上から Nafion を用いて酵素-メディエータ複合体を電極上に固定化した。また、カソード電極として酸素を水へ還元する *Myrothecium* 属由来ビリルビンオキシダーゼ (BOD : Bilirubin Oxidase) を用いた[22-24]。BOD は自然界に広く存在し、電極間との電子授受にメディエータを必要とせず、至適 pH が 7.0 であるなど、血中で機能しやすい酵素として期待出来る (Table 4-1)。また、アノードカソード両電極において、バイオセンサの高出力化、高感度化のため、電極上には多層カーボンナノチューブ (MWCNT : Multiwalled carbon nanotube) を修飾することで電極面積を増加させた[25-32]。

第 4 章では電気化学的な酸化および還元反応を利用したセンサの開発を行う。具体的には PQQ-GDH を修飾したアノードの評価、BOD を修飾したカソードの評価、そして両電極を同一回路内に組み込むことで構築した自己発電型グルコースセンサの評価を報告する。

Table 4-1 Information of PQQ-GDH and BOD.

	PQQ-GDH	BOD
3D structure		
Catalytic reaction	$\text{Glucose} \xrightarrow{\text{GDH}} \text{Gluconic acid} + \text{H}^+ + \text{e}^-$	$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \xrightarrow{\text{BOD}} 2\text{H}_2\text{O}$

## 4-2 実験操作

### 4-2-1 試薬および実験機器

PQQ-GDH は東洋紡株式会社（大阪、日本）から購入した。アミノ基反応性電子メディエータ（AR-PES）1-[3-(Succinimidylloxycarbonyl) propoxy]-5-ethylphenazinium triflate は株式会社同仁化学研究所（熊本、日本）から購入した。2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) はナカライテスク株式会社（京都、日本）から購入した。MWCNT、BOD、Nafion 溶液は Sigma-Aldrich Co. LLC（St. Louis, USA）から購入した。硫酸（ $\text{H}_2\text{SO}_4$ ）、硝酸（ $\text{HNO}_3$ ）、D(+)-グルコース、L(+)-アスコルビン酸（AA: Ascorbic Acid）、尿素（UA: Urea）、水酸化ナトリウム（NaOH）は富士フイルム和光純薬株式会社（大阪、日本）から購入した。酸素ガスと窒素ガスは宇野酸素株式会社（福井、日本）から購入した。クロダイの血液は近畿大学からご提供いただいた。血液は内壁をヘパリンでコーティングしたシリンジを用いて採血した。採血後、 $-20^\circ\text{C}$  で1時間冷凍することで血液中の赤血球を破壊し、血清サンプルとした。全ての試薬はいずれも特級のものを使用した。

実験に使用した水は Merck Millipore（MA, USA）の超純水製造装置 Milli-Q Water Purification System によってフィルター処理したものを使用した。超音波処理はアズワン株式会社（大阪、日本）の3周波超音波洗浄機 VS-100IIIを用いた。遠心分離器はアズワン株式会社の小型高速遠心機 MF-12000を用いた。電気化学測定は、BAS 株式会社（東京、日本）の電気化学測定装置 Electrochemical Analyzer Model 1205Cを用いた。電流値測定は、株式会社シュリンクス（東京、日本）の無抵抗電流計 SACM-50Fを用いた。電極は作用電極にBAS社のGCEガラス状カーボン電極（外径；6.0 mm、電極部直径；3.0 mm）、参照電極にBAS株式会社のRE-1B水系参照電極（Ag/AgCl、液絡部；イオン透過性ガラス、内部溶液；3 M NaCl、外径；6.0 mm）、カウンター電極に株式会社ニラコ（東京、日本）の白金線（ $\phi$  0.50 mm  $\times$  50 mm）を用いた。

### 4-2-2 MWCNT 分散液の調製

今回入手した MWCNT は非常に疎水性であり、水系に分散させることができず、実験で用いることが困難である。MWCNT の水分散液を得るため、MWCNT の混酸処理を行った。2 mg の MWCNT 粉末に 4 mL の  $\text{H}_2\text{SO}_4$  と  $\text{HNO}_3$  の混酸（3:1, v/v）を加え、超音波処理（28 kHz、3 時間）を行うことで混酸中に MWCNT を分散させた。MWCNT 混酸分散液を遠心分離（4800 g、10 分）により MWCNT を沈殿させ、上澄みの混酸を除去した。混酸を除去した MWCNT に超純水を加え超音波処理（28 kHz、10 分）によって洗浄を行った。再度遠心分離し上澄みの洗浄水を除去した。この洗浄操作を 5 回繰り返した。最後に、回収した MWCNT を  $60^\circ\text{C}$  で一晩乾燥させて混酸処理 MWCNT の粉末を得た。得られた MWCNT 粉末に超純水を加えて超音波処理（28 kHz、30 分）を行うことで 0.5 mg/ml MWCNT 分散液を調製した。

### 4-2-3 MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極の作製

アノード酵素として PQQ-GDH を用いた。導電性を向上させるため、GCE 電極上へ 0.5 mg/mL MWCNT 水分散液を 10  $\mu$ L 滴下し、風乾させた。MWCNT 水分散液乾燥後、1 mg/mL PQQ-GDH 分散液（溶媒：50 mM HEPES-NaOH 緩衝液、pH7.0）を 10  $\mu$ L 滴下し、風乾させた。PQQ-GDH 分散液乾燥後、5 mM AR-PES 水溶液を 10  $\mu$ L 滴下し、風乾させた。AR-PES は酵素・電極間の電子授受を補助するためのメディエータとして使用した。AR-PES 水溶液乾燥後、0.1wt% Nafion 溶液を 10  $\mu$ L 滴下し、風乾させた。Nafion は電極上に修飾した PQQ-GDH および AR-PES を固定化し、電極から脱離するのを抑制するために使用した。得られた電極を MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極とした。本スキームは Figure 4-1 (a) に示した。

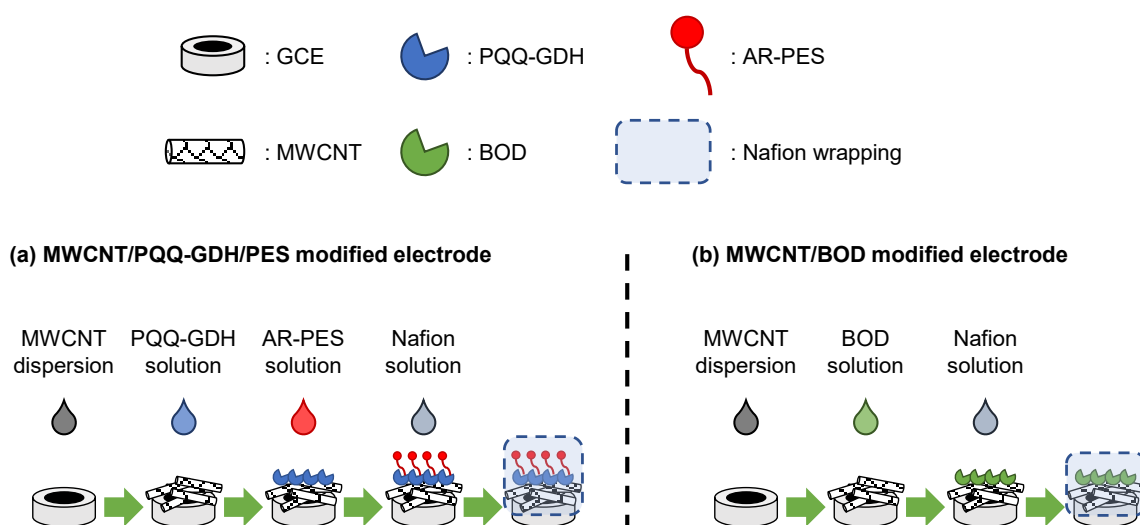


Figure 4-1 Preparation process of (a) MWCNT/PQQ-GDH/PES modified electrode and (b) MWCNT/BPD modified electrode.

### 4-2-4 MWCNT/BOD 修飾電極の作製

カソード酵素として BOD を用いた。導電性を向上させるため GCE 電極上へ 0.5 mg/mL MWCNT 水分散液を 10  $\mu$ L 滴下し、風乾させた。MWCNT 水分散液乾燥後、1 mg/mL BOD 分散液（溶媒：50 mM HEPES-NaOH 緩衝液、pH7.0）を 10  $\mu$ L 滴下し、風乾させた。BOD 分散液乾燥後、0.1wt% Nafion 溶液を 10  $\mu$ L 滴下し、風乾させた。Nafion は電極上に修飾した BOD を固定化し、電極から脱離するのを抑制するために使用した。得られた電極を MWCNT/BOD 修飾電極とした。本スキームは Figure 4-1 (b) に示した。



#### 4-2-5 作製した MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極の評価

作製した MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極を作用電極、白金線をカウンター電極、Ag/AgCl 電極を参照電極とした三電極方式でサイクリックボルタンメトリー (CV: Cyclic Voltammetry) を行った。CV 条件は以下通りである; 掃引速度: 100 mV/s、掃引幅: 0.0 V--1.0V、電解液: 50 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH7.0)。グルコース応答性を確認するため、終濃度が 5 mM となるように電解液へ D(+)-グルコース水溶液を滴下した。

#### 4-2-6 作製した MWCNT/BOD 修飾電極の評価

作製した MWCNT/BOD 修飾電極を作用電極、白金線をカウンター電極、Ag/AgCl 電極を参照電極とした三電極方式でクロノアンペロメトリー (CA: Chronoamperometry) を行った。CA 条件は以下通りである; 印加電圧: 0.01 V、電解液: 50 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH7.0)。電解液の脱気には N<sub>2</sub> バブリング、電解液への O<sub>2</sub> 溶存には O<sub>2</sub> バブリングを行った。

#### 4-2-7 構築した自己発電型グルコースセンサの評価

自己発電型グルコースセンサは作製した MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極と MWCNT/BOD 修飾電極を同じ回路として組むことで構築した。自己発電型グルコースセンサは無抵抗電流計を用いて、電気化学反応に外部からの電源供給を用いずに電流値測定を行った。アノードである MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極とカソードである MWCNT/BOD 修飾電極の電極間距離は 5 mm とした。測定中はスターラーで穏やかに攪拌を行った(Figure 4-2)。

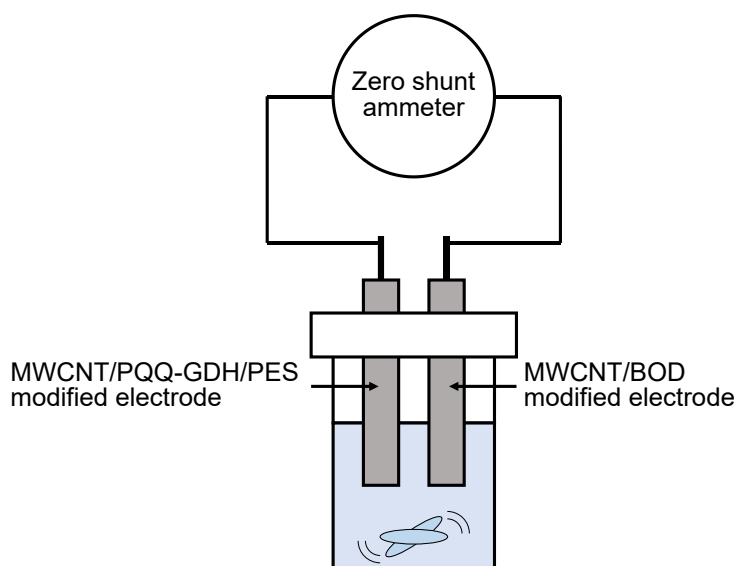


Figure 4-2 Schematic image of experimental system for evaluating self-powered glucose biosensor.

### 4-3 結果と考察

#### 4-3-1 作製した MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極の評価

作製した MWCNT/PQQ-GDH/PES 電極を用いて CV 測定を行った。CV 測定は電解液中のグルコース濃度が異なる条件で行った。結果を Figure 4-3 に示す。この電極ではグルコースの酸化反応をセンシングする目的であるため、ボルタモグラム中の酸化波に注目して分析を行った。電解液にグルコースを滴下していない条件では、メディエータである AR-PES 由来の酸化波が $-0.08$  V 付近で観察された。これは AR-PES が確かに電極上に修飾されていることを示している。電解液に終濃度が $5$  mM となるようにグルコースを滴下した条件では、 $-0.08$  V での酸化電流が、グルコースが $0$  mM の条件と比べて $1.2$   $\mu$ A 増加した。この結果から、PQQ-GDH はグルコースを基質として、酵素触媒反応をアノード上で確かに行っていることを確認した。

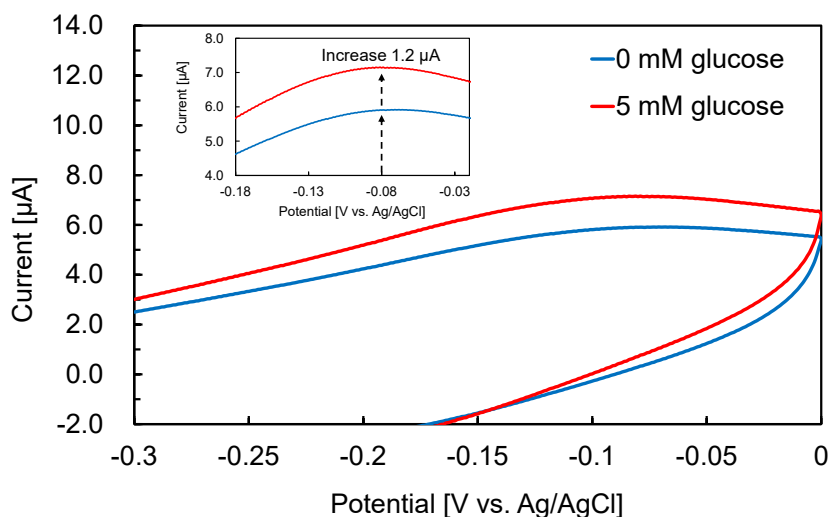


Figure 4-3 CVgram of glucose oxidation reaction using MWCNT/PQQ-GDH/PES-modified electrode with 0 and 5 mM glucose in 50 mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0) at a sweep rate of 100 mV/s. Inset: Magnified CVgram, where arrows indicate the peak potential.

#### 4-3-2 作製した MWCNT/BOD 修飾電極の評価

作製した MWCNT/BOD 修飾電極を用いて CA 測定を行った。CA 測定は  $O_2$  を脱気した状態と  $O_2$  を溶解した状態で、0.01 V の定電圧を印加しながら行った。結果を Figure 4-4 に示す。電解質溶液に  $N_2$  バブリングを行い、 $O_2$  を脱気した状態での CA 測定を 1800 秒まで行った。1800 秒経過後、測定を止めることなく継続しながら電解液に対して  $O_2$  バブリングを開始した。 $O_2$  バブリング開始直後に電流値が有意に増加した。この結果から、BOD は  $O_2$  を基質として、酵素触媒反応をカソード上で確かに行っていることを確認した。

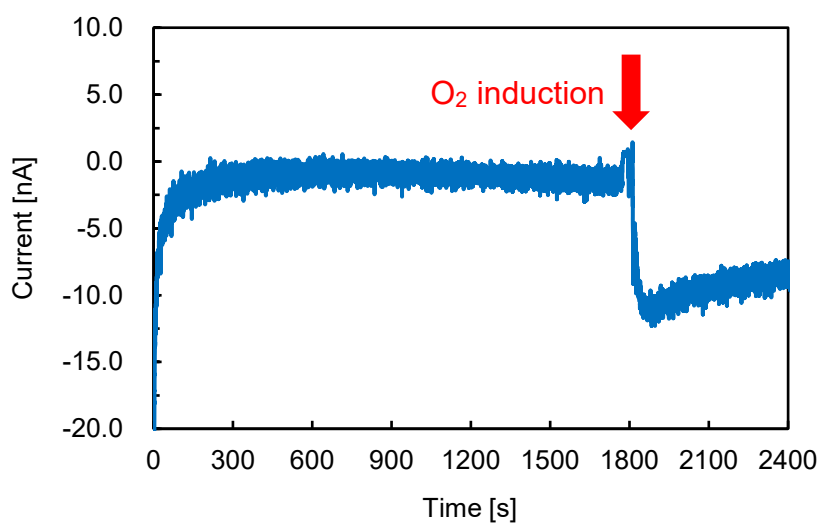


Figure 4-4 CA curve of  $O_2$  reduction reaction using MWCNT/BOD-modified electrode in  $O_2$  degassed 50 mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0) at 0.01 V (vs. Ag/AgCl) with  $O_2$  induction at 1800 s.

#### 4-3-3 MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極と MWCNT/BOD 修飾電極で構築した自己発電型グルコースセンサの評価

MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極をアノード、MWCNT/BOD 修飾電極をカソードとして、自己発電型グルコースセンサを構築した。構築した自己発電型グルコースセンサの一般的な生物種に対する選択性を実験した。なお、この実験には無抵抗電流計を使用しており、外部からの電力供給を行っていない。Figure 4-5 はそれぞれ 1 mM の UA、AA、グルコースを添加した際の応答電流である。Figure 4-5 に示すように、UA と AA を添加した場合には、電流値に変化は見られなかった。しかし、グルコースを添加した場合、電流値変化が観察された。この結果は、構築した自己発電型グルコースセンサが他の夾雑物には反応せず、グルコースに対してのみ電流応答を示しており、優れたグルコース選択性があることを確認した。

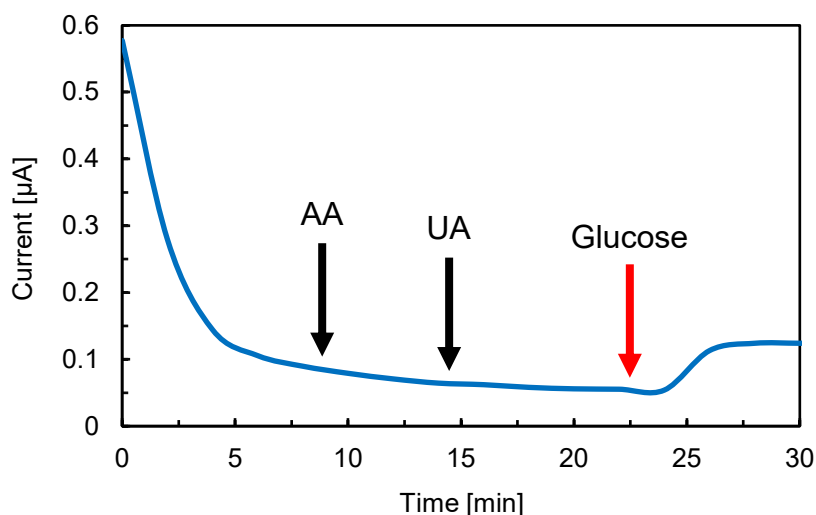


Figure 4-5 Amperometric response of self-powered biosensor in 50 mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0) to AA, UA, and glucose.

構築した自己発電型グルコースセンサの応答電流を異なるグルコース濃度で評価した。Figure 4-6 は 1, 2, 3 mM のグルコース溶液を滴下した際の応答電流を示している。グルコース濃度の増加とともに電流値の増加が観察され、グルコース濃度の変化をセンシング可能であることが確認された。Figure 4-6 に示すように、グルコース濃度と電流の関係は良好な直線性を示した。

さらに、本節の実験では無抵抗電流計を使用しており、電気化学反応に外部からの電源供給を行っていない。しかし、グルコースを添加した際に応答電流が得られていることから、自己発電によって起電力を得ており、その起電力によって発生した電流が出力されていることが確認された。

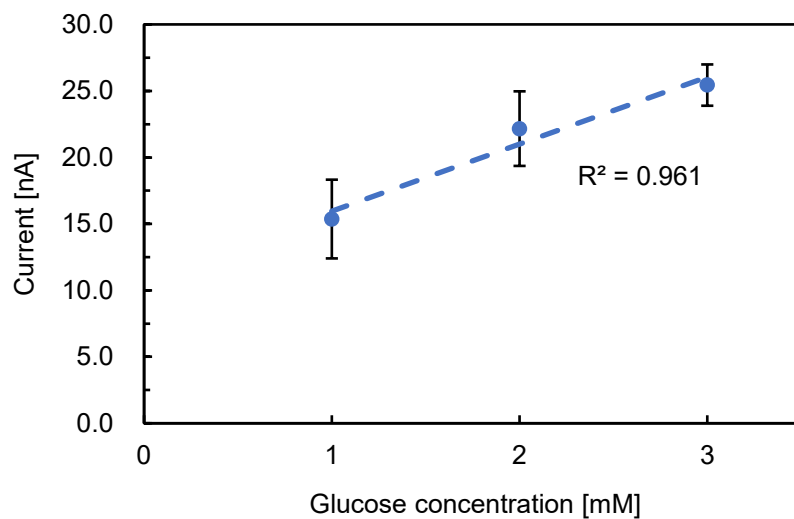


Figure 4-6 Linear dependence of response current on glucose concentration (n=3) in a 50 mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0).

#### 4-3-4 クロダイの血清を用いた自己発電型グルコースセンサのグルコース応答性評価

Figure 4-7 は、クロダイの血清に測定から 4 分後の時点で溶液全体のグルコース終濃度が 3 mM となるようにグルコース水溶液を滴下した際の電流応答を示している。グルコース水溶液滴下直後に電流値が増加していることを確認した。この結果は、自己発電型グルコースセンサがクロダイ血清中に含まれる夾雑物に影響を受けることがなく、グルコースに対してのみ選択性があることが示された。

さらに、本節の実験では無抵抗電流計を使用しており、電気化学反応に外部からの電源供給を行っていないにも関わらず、グルコースを添加した際に応答電流が得られていることから、自己発電によって起電力を得ており、その起電力によって発生した電流値が出力されていることが確認された。

本実験では、実際のクロダイの血清を使用したか、センサの応答性調査として擬似的に血清中にグルコースを添加して実験を行ったものである。実際、どのくらいのストレスを判断できるかについては、さらなる実験やデバイスの改良を行い、実際の生魚に対して実験を行う必要があると考えている。A. T. Kohyani らはストレスの指標物質であるコルチゾール濃度とグルコース濃度の関係についてニジマスを用いて調査し、報告している[33]。コルチゾール濃度が 7.32 ng/ml から 124.6 ng/ml に増加したとき、グルコース濃度は 0.35 mg/ml から 0.52 mg/ml に上昇した。0.35 mg/ml と 0.52 mg/ml をグルコースのモル濃度に変換するとそれぞれ 1.94 mM と 2.89 mM になる。今回の実験では終濃度が 3 mM となるようにグルコース添加を行い、電流応答を得ることができたため、本センサでも同等のグルコース濃度、ならびに間接的にコルチゾール濃度を検出することが可能である。

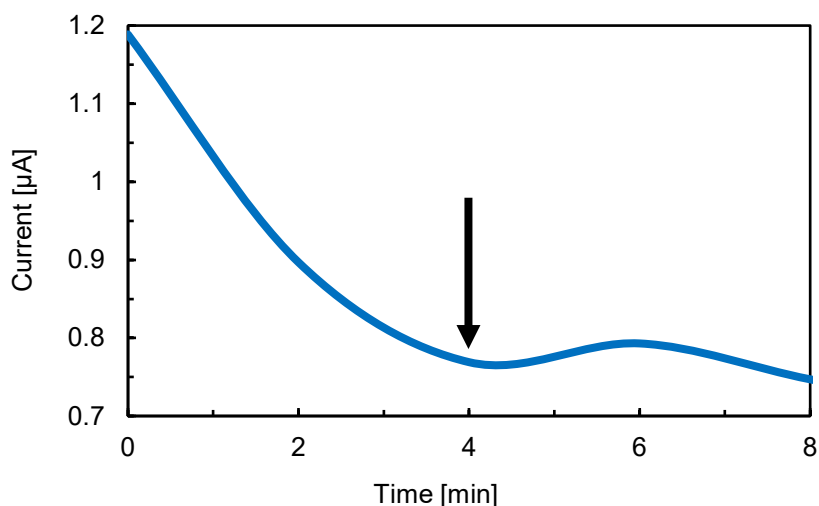


Figure 4-7 Amperometric response of glucose oxidation reaction when using self-powered biosensor in 50 mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0) to analyze black sea bream blood; 3 mM glucose was added at 4 min (arrow).

#### 4-4 結論

第4章では、グルコースを酸化するアノードと酸素を還元するカソードを組み合わせることで自己発電型グルコースセンサを構築した。構築した自己発電型グルコースセンサは魚類がストレスを受けた際に血中グルコース濃度が上昇するという報告をもとに、魚類のストレス検出を目的とした。アノードとして MWCNT/PQQ-GDH/PES 修飾電極を、カソードとして MWCNT/BOD 修飾電極を作製した。無抵抗電流計を用いて電気化学反応に外部からの電力供給を行わない状態で、アノードでのグルコース酸化反応とカソードでの酸素還元反応を同時に起こすことができた。MWCNT を用いることで電極面積を増大させ反応の感度を向上できていると考えている。また、酵素を用いることにより、酵素の基質特異性を活かした、反応を行うことができる。その結果、自己発電で得られた起電力によってグルコースのセンシングを行うことができ、さらにグルコースに対する選択性も確認した。選択性においても、酵素の基質特異性が大きな役割を果たしていると考えられている。本自己発電型グルコースセンサは外部電源やバッテリーを必要としないため小型化が可能である。

## 参考文献

- [1] P. Thomas, L. Robertson. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture*, **9669**–86 (1991)
- [2] S. E. Fevolden, T. Refstie, B. Gjerde. Genetic and phenotypic parameters for cortisol and glucose stress response in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture*, **118**, 205–216 (1993)
- [3] E. K. Silbergeld. Blood glucose: A sensitive indicator of environmental stress in fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **11**, 20–25 (1974)
- [4] Y. Tian, Q. Cui, L. Xu, A. Jiao, H. Ma, C. Wang, M. Zhang, X. Wang, S. Li, M. Chen. Alloyed AuPt nanoframes loaded on h-BN nanosheets as an ingenious ultrasensitive near-infrared photoelectrochemical biosensor for accurate monitoring glucose in human tears. *Biosens. Bioelectron.*, **192**, 113490 (2021)
- [5] 軽部征夫, 民谷栄一. バイオエレクトロニクスーバイオセンサー・バイオチップー. シーエムシー出版 (2013)
- [6] A. T. Yahiro, S. M. Lee, D. O. Kimble, *Biochim. Biophys. Acta*, **88**, 375–383 (1964)
- [7] X. Jiang, Y. Wu, X. Mao, X. Cui, L. Zhu. Amperometric glucose biosensor based on integration of glucose oxidase with platinum nanoparticles/ordered mesoporous carbon nanocomposite. *Sens. Actuator B: CHEM.*, **153**, 158–163 (2011)
- [8] W. Z. Jia, K. Wang, X. H. Xia. Elimination of electrochemical interferences in glucose biosensors. *Trends. Analyt. Chem.*, **29**, 306–318 (2010)
- [9] Y. Xiao, H. X. Ju, H. Y. Chen. Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer. *Anal. Chim. Acta.*, **391**, 73–82 (1999)
- [10] J. Wang, M. Musameh. Carbon-nanotubes doped polypyrrole glucose biosensor. *Anal. Chim. Acta.*, **539**, 209–213 (2005)
- [11] Z. Pu, J. Tu, R. Han, X. Zhang, J. Wu, C. Fang, H. Wu, X. Zhang, H. Yu, D. Li. A flexible enzyme-electrode sensor with cylindrical working electrode modified with a 3D nanostructure for implantable continuous glucose monitoring. *Lab Chip*, **18**, 3570–3577 (2018)
- [12] S. G. Vallejo-Heligon, N. L. Brown, W. M. Reichert, B. Klitzman. Porous, Dexamethasone-loaded polyurethane coatings extend performance window of implantable glucose sensors *in vivo.*, *Acta Biomater.*, **30**. 106–115 (2016)
- [13] H. Sakuraba, K. Yokono, K. Yoneda, A. Watanabe, Y. Asada, T. Satomura, T. Yabutani, J. Motonaka, T. Ohshima. Catalytic properties and crystal structure of quinoprotein aldose sugar dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **502**, 81–88 (2010)
- [14] A. Malinauskas, J. Kuzmarskyt, R. Meškys, A. Ramanavičius. Bioelectrochemical sensor based on PQQ-dependent glucose dehydrogenase. *Sens. Actuators. B Chem.*, **100**, 387–394 (2004)



- [15] G. Li, H. Xu, W. J. Huang, Y. Wang, Y. S. Wu, R. Parajuli. A pyrrole quinoline quinone glucose dehydrogenase biosensor based on screen-printed carbon paste electrodes modified by carbon nanotubes. *Meas. Sci. Technol.*, **19**, 065203 (2008)
- [16] B. Reuillard, A. Ian L. Goff, C. Agnès, M. Holzinger, A. Zebda, C. Gondran, K. Elouarzakia, S. Cosnier. High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 4892–4896 (2013)
- [17] F. Boussema, A. J. Gross, F. Hmida, B. Ayed, H. Majdoub, S. Cosnier, A. Maaref, M. Holzinger. Dawson-type polyoxometalate nanoclusters confined in a carbon nanotube matrix as efficient redox mediators for enzymatic glucose biofuel cell anodes and glucose biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, **109**, 20–26 (2018)
- [18] S. Ferri, K. Kojima, K. Sode. Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases: A Bird’s Eye View of Glucose Sensing Enzymes. *J. Diabetes Sci. Technol.*, **5**, 1068–1076 (2011)
- [19] K. Hiraka, K. Kojima, W. Tsugawa, R. Asano, K. Ikebukuro, K. Sode. Rational engineering of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase for the mediator modification to achieve quasi-direct electron transfer type lactate sensor, *Biosens Bioelectron.*, **151**, 111974 (2020)
- [20] G. Kim, H. Cho, P. Nandhakumar, J. Park, K. Kim, H. Yang. Wash-Free, Sandwich-Type Protein Detection Using Direct Electron Transfer and Catalytic Signal Amplification of Multiple Redox Labels. *Anal. Chem.*, **94**, 2163–2171 (2022)
- [21] M. Nagata, J. Lee, S. Henley, K. Ikebukuro and K. Sode. An Amine-Reactive Phenazine Ethosulfate (arPES)—A Novel Redox Probe for Electrochemical Aptamer-Based Sensor. *Sensors*, **22**, 1760 (2022)
- [22] S. Shleev, A. E. Kasmi, T. Ruzgas, L. Gorton. Direct heterogeneous electron transfer reactions of bilirubin oxidase at a spectrographic graphite electrode. *Electrochem. Commun.*, **6**, 934–939 (2004)
- [23] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, L. Gorton. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2517–2554 (2005)
- [24] L. Santos, V. Climent, C. F. Blanford, F. A. Armstrong. Mechanistic studies of the ‘blue’ Cuenzyme, bilirubin oxidase, as a highly efficient electrocatalyst for the oxygen reduction reaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 13962–13974 (2010)
- [25] S. Rubenwolf, O. Strohmeier, A. Kloke, S. Kerzenmacher, R. Zengerle, F. Stetten. Carbon electrodes for direct electron transfer type laccase cathodes investigated by current density–cathode potential behavior. *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 841–845 (2010)
- [26] M. Holzinger, A. L. Goff, S. Cosnier. Carbon nanotube/enzyme biofuel cells. *Electrochim. Acta*, **82**, 179–190 (2012)
- [27] 齋藤理一郎, 篠原久典. カーボンナノチューブの基礎と応用. 培風館 (1998)
- [28] O. Toprakci, H. A. K. Toprakci, L. Ji, G. Xu, Z. Lin, X. Zhang. Carbon Nanotube-Loaded Electrospun LiFePO<sub>4</sub>/Carbon Composite Nanofibers As Stable and Binder-Free Cathodes for Rechargeable Lithium-Ion Batteries. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **4**, 1273–1280 (2012)

- [29] D. Y. Kang, J. H. Moon. Carbon Nanotube Balls and Their Application in Supercapacitors. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**, 706–711 (2014)
- [30] P. P. Joshi, S. A. Merchant, Y. Wang, D. W. Schmidtke. Amperometric biosensors based on redox polymer-carbon nanotube-enzyme composites. *Anal. Chem.*, **77**, 3183–3188 (2005)
- [31] X. Peng, S. S. Wong. Functional Covalent Chemistry of Carbon Nanotube Surfaces. *Adv. Materials.*, **21**, 625–642 (2009)
- [32] 丸山茂夫. カーボンナノチューブ (ヘッドライン: こんなモノ! が電気を流す). *化学と教育*, **56**602–605 (2008)
- [33] A. T. Kohyani, S. Keyvanshokoh, A. Nematollahi, N. Mahmoudi, H. Pasha-Zanoosi. Effects of dietary nucleotides supplementation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance and acute stress response: *Fish Physiol. Biochem.* **38**, 431–440, (2012)

## 第5章 結論

### 5-1 本研究が目指した海洋生物の環境改善に向けた電気化学的酸化反応システム

マイクロプラスチック分解方法の開発を行うことによって、現在蓄積してしまっている海洋マイクロプラスチックの分解・除去や、今後も排出されるマイクロプラスチックの削減に貢献できる。環境保全を行うためのマイクロプラスチック分解方法において、分解方法自体が環境に優しいシステム系であり低コストであることが必要であり、さらにより優れた分解速度が求められる。これらの要素を満たす分解方法として、EAOPを用いた、 $\bullet\text{OH}$ による分解を試み、分解評価を行った。EAOPは電気化学反応を利用して酸化剤である $\bullet\text{OH}$ を生成させる。生成した $\bullet\text{OH}$ を用いてマイクロプラスチックを分解可能なシステムの構築を行った。また、現状すでに大量に存在しているマイクロプラスチックの分解方法を開発するだけでは海洋生物の環境改善に遅れをとってしまう。海洋生物の環境を監視するためにも、海洋生物に対する健康モニタリングデバイスの構築も行った。こちらは酵素を用いたバイオセンサとバイオ電池を基盤とした、電気化学的酸化を利用したシステムである。構築したセンサを用いて、実際のクロダイの血清中でグルコースの応答性を評価した。

本研究では海洋生物の環境改善に向けた、電気化学的酸化反応を用いたシステムの開発を行った。

### 5-2 EAOP中の $\text{H}_2\text{O}_2$ および $\bullet\text{OH}$ 発生評価と、EAOPを用いたPA66の分解評価

マイクロプラスチックによる環境問題は世界的に深刻な課題となっており、特にファイバー形状のマイクロプラスチックがその中でも重要な一部を占めている。本研究では、合成繊維由来のマイクロプラスチックに焦点を当て、電気化学的促進酸化プロセス（EAOP）を用いた新しい分解手法について検討した。緒言では、合成繊維製品の洗濯によるファイバー形状のマイクロプラスチックの発生が増加している現状を指摘し、マイクロプラスチックファイバーが下水処理場を通過して河川や海洋に至っている報告を示した。この問題への解決策として、新しい分解技術の開発が求められている。本研究では、EAOPを用いて $\bullet\text{OH}$ によるマイクロプラスチック分解を提案し、その有効性を検証した。60分のEAOP処理中に $134.7\text{ pmol}$ の $\text{H}_2\text{O}_2$ が発生し、同時に $\bullet\text{OH}$ の発生も確認された。実験結果から、EAOP処理によってPA66フィルムの表面が変化し、SEM、ATR-FTIR、XRDなどの分析手法を用いてその変化を明らかにした。これらの知見から、EAOP処理によって発生した $\bullet\text{OH}$ がPA66の分解を促進していることが考察される。分解メカニズムとしては、 $\bullet\text{OH}$ を開始材として、ラジカル連鎖反応が進行し、PA66のポリマー鎖切断が起こっているのではないかと考えている。ポリマーの表面変化や分析手法によって確認された物理的・化学的な変化は、新しい分解技術の有望な成果を示唆している。今後の研究では、より広範で実用的な応用可能性を検討し、環境に対する貢献をさらに具体化していくことが期待される。本研究が、マイクロプラスチック問題への理解を深め、新しい技術によってその解決の手助けとなるのが期待できる。

### 5-3 EAOPを用いたPETの分解評価

環境問題として深刻化するマイクロプラスチックファイバーの問題に対処するため、本研究ではEAOP処理を用いてPA66以外にも主要な合成繊維であるPETの分解評価を行った。第3章では、EAOP処理によってPETフィルムが120時間の処理で透明性を失い、表面に微細な凹凸が形成されるなど、物理的な変化が確認された。ATR-FTIR分析ではエステル結合の切断が、XRD分析では非晶部の分解が確認された。また、重量減少データもPETの分解を裏付ける有益な情報となった。これらの結果は、EAOP処理がPETの分解に寄与していることを示唆しており、今後の研究での発展が期待される。また第2章ではEAOP電解液としてH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を使用していたのに対し、第3章の実験ではさらに環境へ配慮したくえん酸ナトリウム緩衝液を使用した。電解液をよりマイルドな条件に変更しても、PETフィルムにおいてはEAOPを用いることで分解を促進できることを示した。この結果より、EAOPには酸化を促進するH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>ではなくても、溶液が酸性条件下であることが重要であることが考察される。本研究が提案するEAOP処理は、環境に優しい条件下でのマイクロプラスチックファイバーの分解手法として有望であり、今後の実用化に向けた更なる研究と発展が期待される。本研究が、新しい視点を提供し、環境負荷の低減に向けて一歩前進する手助けとなることを期待している。

### 5-4 魚類のヘルスマonitoringのための自己発電型グルコースセンサの開発

第4章では、自己発電型グルコースセンサの構築を通じて、魚類のストレス検出に有望な手法の提案を行った。PQQ-GDHを用いたアノードとBODを用いたカソードの組み合わせにより、外部電源不要で酵素によるグルコース濃度の測定が可能なセンサを開発した。この自己発電型グルコースセンサは、魚類がストレスを受けた際に血中グルコース濃度が上昇するという生体反応を利用し、環境変動やストレスの影響をリアルタイムかつ連続的にモニタリングできる特長がある。酵素の基質特異性を活かしたグルコース以外の血中生理活性物質にはセンサ応答せず、グルコースのみに応答する優れた選択性も示した。また、外部電源やバッテリーを必要としないため、小型かつ実用的な利用が期待される。本研究の結果から、自己発電型グルコースセンサ技術は生態系の健康状態のモニタリングにおいて有望な手段となり得ることが示唆される。今後の展望としては、この手法を実際の海洋生態系や水域モニタリングに応用し、環境保全や生態系の健康管理に寄与する可能性を追求していくことが重要だ。

## 発表論文リスト

### 第 2 章

Taichi Meboso, Yoshiyuki Takatsuji, Eiichiro Takamura, Tetsuya Haruyama, Hiroaki Sakamoto

Promoting Degradation of Polyamide-Microplastic Fibers Using Hydroxy Radical Generated by Electrochemical Advanced Oxidation Processes

*Journal of The Electrochemical Society*, **170**, 123505, (2023)

### 第 4 章

Taichi Meboso, Kazuki Hashimoto, Hiroaki Sakamoto, Satoshi Amaya, Shinsuke Torisawa, Yasushi Mitsunaga, Tsunemasa Saiki

Development of Self-powered Biosensor for Fish Health Monitoring

*Sensor and Materials*, **35**, 10, 4491–4500, (2023)

## 謝辞

本研究は、本学工学研究科 繊維先端工学専攻 繊維先端工学分野 ナノバイオ工学研究室 坂元博昭准教授のご指導のもとに行ったものである。研究を行うに当たり、終始ご丁寧な御指導、御鞭撻を承りました、坂元博昭准教授に深く感謝致します。また、本研究を行うに際して、種々御助言を頂きました同研究室の高村映一郎講師に感謝致します。

研究遂行にあたって種々御助言をいただきました九州工業大学大学院 生命体工学研究科 生体機能応用工学専攻 春山哲也教授、高辻義行准教授、兵庫県立工業技術センター 技術企画部 才木常正博士、東京大学大学院 工学系研究科 機械工学専攻 天谷諭博士、近畿大学大学院 農学研究科 光永靖准教授、鳥澤眞介講師、本学工学研究科 繊維先端工学専攻 藤田聡教授、中根幸治教授、本学工学研究科 生物応用化学専攻 里村武範教授、本学理事 末信一朗副学長に感謝致します。

研究遂行にあたって、ESR の貸し出し、御指導いただいた本学工学研究科 物理工学専攻 光藤誠太郎教授、浅野貴行教授、本学工学部 技術職員 山口綾香様、ガスクロマトグラフの貸し出し、御指導いただいた福井県立工業技術センター 化学高分子研究グループ 峠知矢子様、AFM および XRD 使用にあたって御指導いただいた本学 産学官連携本部 西村文宏助教に感謝致します。

本論文を作成にあたり博士論文研究を通じてご協力いただきました本研究室の小林俊貴氏に深く感謝します。

また、研究を進めるに当たってご協力していただきました本研究室所属のすべての学生に御礼申し上げます。