

化石骨のアミノ酸抽出とその¹⁴C年代

南 雅代・中村 俊夫
(名古屋大学年代測定資料研究センター)

1. はじめに

化石骨の正確な¹⁴C年代測定、同位体比測定のためには、元の同位体比が保存されており、外来の炭素がすべて除かれていることが重要である。骨を構成する無機成分は、酸性土壌中では容易に分解されたり外部との交換が起きたりするため、化石骨の¹⁴C年代、同位体比測定に際しては、化学的風化作用に対して比較的安定であるとされる硬タンパク質のコラーゲンが用いられてきた。しかし、化石骨の多くはコラーゲン続成作用を受け、また、フミン酸、フルボ酸など、化石の周囲の堆積物由来の有機物によって汚染されている。

名古屋大学年代測定資料研究センターで行われてきたコラーゲン抽出法は、0.2N NaOH中であらかじめ超音波洗浄した化石骨試料を粉碎し、セルロースチューブ内で1N HClを用いて脱灰した後、チューブの内容物を遠心分離して、沈殿を90℃の水で10時間加熱してゼラチンコラーゲンを得る方法である(有田ほか, 1990)。本方法はゼラチンコラーゲンの収率が高く、保存状態の良好な化石試料においては有効であるが、ゼラチンコラーゲンの収率が1%以下といった風化が進んだ化石に対しては、コラーゲンの¹⁴C年代値は実際の年代より若返った値を示すことが報告されている(沢田ほか, 1992; 中村ほか, 1996)。コラーゲン含有量が低い骨試料は、骨以外からの炭素の汚染を受けて若返りの年代を示した可能性が高く、今までのコラーゲン抽出法では化石骨から外来炭素を除去するのは不十分であると考えられる。そこで、我々は昨年度からXAD-2樹脂という吸着ポリマーを用いて化石骨試料からフミン酸、フルボ酸などの外来有機物を完全に除去し、信頼度の高い¹⁴C年代、炭素同位体比を得る試みを行いつつある(南・中村, 1997)。本研究では、今までのゼラチンコラーゲン抽出法によって得られた結果とXAD-2樹脂を用いる方法によって得られた結果を比較し、後者の方法が信頼度の高い¹⁴C年代、炭素同位体比を得るのに有効であるかどうかの検討を行った。

2. 試料

今回試料とした化石骨は、琵琶南湖の瀬田川の河口近くに位置する栗津湖底遺跡の第3貝塚から(財)滋賀県文化財保護協会によって1991年に採集されたイノシシ、ニホ

ンジカの骨片である。粟津湖底遺跡は、水面下2～3mの湖底に沈んだ縄文貝塚で、第3貝塚からは縄文時代中期前葉の船元I式の土器が出土しており、それらに前後する次期の型式の土器はごくわずかしか出土していない（滋賀県教育委員会（編），1997）。第3貝塚は最上層の第I層から最下層の第IX層まで大きく9層に分けられ、第II～III、V～IX層から採集された骨片については、セルロースチューブ内で脱灰後、ゼラチン化を行う今までのコラーゲン抽出法によって、また、骨片と同層の同じ地点から採取された木片、セタシジミ貝についても ^{14}C 年代値、 $\delta^{13}\text{C}$ 値が出されている（中村ほか，1997）。3種類の試料の各々は、層序によらずほぼ一定の ^{14}C 年代値を示しているが、3種類間の年代値は系統的に大きく異なり、貝が最も古く（約4900年）、次に木片（約4600年）、最も若いのが骨片（約4300年）と報告されている。

3. 実験方法

実験方法は、主としてStafford et al. (1988)の方法に基づいた。0.2N NaOH中であらかじめ超音波洗浄し、粉末にした化石骨試料を0.6N HCl (4°C, 24hr)で脱灰した後、6N HCl (110°C, 24hr)と反応させて加水分解した。得られた加水分解物をXAD-2樹脂を詰めたカラム(1×30 cm)に通して6N HClでアミノ酸集合体を溶出させ、樹脂に吸着している外来有機物成分は0.5M NaOH、1M NH₄OHで溶離した。各成分はロータリーエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥した。以上の操作は南・中村（1997）に詳しい。このようにして得られた試料は酸化銅、銀線とともにバイコール管に真空封管して850°Cに加熱し、生じた気体を真空ラインを用いて精製してCO₂を得た。CO₂を水素還元法によりグラファイト化し、タンデトロン加速器質量分析計を用いて ^{14}C 年代を測定した。CO₂の一部は分取して、気体用質量分析計(MAT-252)により $\delta^{13}\text{C}$ 値を測定した。また、各成分の凍結乾燥試料はCNコーダー（柳本製、MT-700）により炭素および窒素含有量を測定した。

4. 結果と考察

分析したAWA-8（第II層）、AWA-9（第III層）、AWA-10（第V層）、AWA-11（第VI層）、AWA-12（第VII層）の5骨片試料について、脱灰後の酸に不溶成分（DBPと略す）と可溶成分（Sと略す）、XAD樹脂処理をしたアミノ酸集合体成分（XADと略す）とフミン酸やフルボ酸成分（Fと略す）のC/N比、 $\delta^{13}\text{C}$ 値および ^{14}C 年代値を表1に示す。 ^{14}C 年代濃度の標準体にはNBS蔞酸（RM-94）を用いた。 ^{14}C 年代値はLibbyの半減期5,568年を用いて算出し、西暦1950年から遡った年数で示した。なお、より正確な ^{14}C 年代値を得るため、それぞれの $\delta^{13}\text{C}$ 値を用いて炭素同位体分別の補正を行った（中村ほか，1994；小田，1994）。

表1 粟津湖底遺跡の第3貝塚から採集された骨片のC/N比、 $\delta^{13}\text{C}$ 値
および ^{14}C 年代値

Table 1 C/N ratios, $\delta^{13}\text{C}$ values and ^{14}C dates for fossil bones from the third shell mound excavated at Awazu submarine archaeological site.

Sample	Collagen yield (%)	CO ₂ yield (%)	C/N ratio	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	^{14}C age (yr BP)	Lab no. (NUTA-)	
AWA-8	DBP	6.98	39.6	3.2	-20.9	4330 ± 100	5834
	XAD	-----	41.4	2.9	-20.2	4530 ± 80	5303
	F	-----	1.06	----	-24.2	-----	-----
	GC	0.62	42.8	3.2	-20.7	4180 ± 70	4832
AWA-9	DBP	7.87	44.8	3.2	-21.6	4470 ± 80	5831
	XAD	-----	24.7	2.7	-21.0	4530 ± 80	5304
	F	-----	2.02	3.9	-25.6	-----	-----
	GC	0.56	38.6	3.4	-21.4	4090 ± 80	4833
AWA-10	DBP	6.57	43.0	3.2	-21.0	4400 ± 90	5354
	S	-----	14.8	3.6	-21.6	4190 ± 90	5355
	XAD	-----	24.1	3.1	-20.2	4360 ± 70	5142
	F	-----	3.09	----	-23.4	3940 ± 110	5833
	GC	2.15	44.5	3.2	-20.8	4360 ± 80	4839
AWA-11	DBP	5.86	50.9	3.1	-21.2	4390 ± 120	5360
	XAD	-----	27.5	2.9	-20.4	4570 ± 100	5830
	F	-----	0.27	----	-27.4	-----	-----
	GC	1.86	38.6	3.2	-20.9	4210 ± 80	4840
AWA-12	DBP	10.2	42.8	3.1	-23.3	4270 ± 100	5835
	XAD	-----	23.4	2.7	-22.6	4500 ± 80	5145
	F	-----	2.11	----	-26.3	2070 ± 80	5367
	GC	3.80	44.7	3.0	-23.0	4430 ± 80	5077

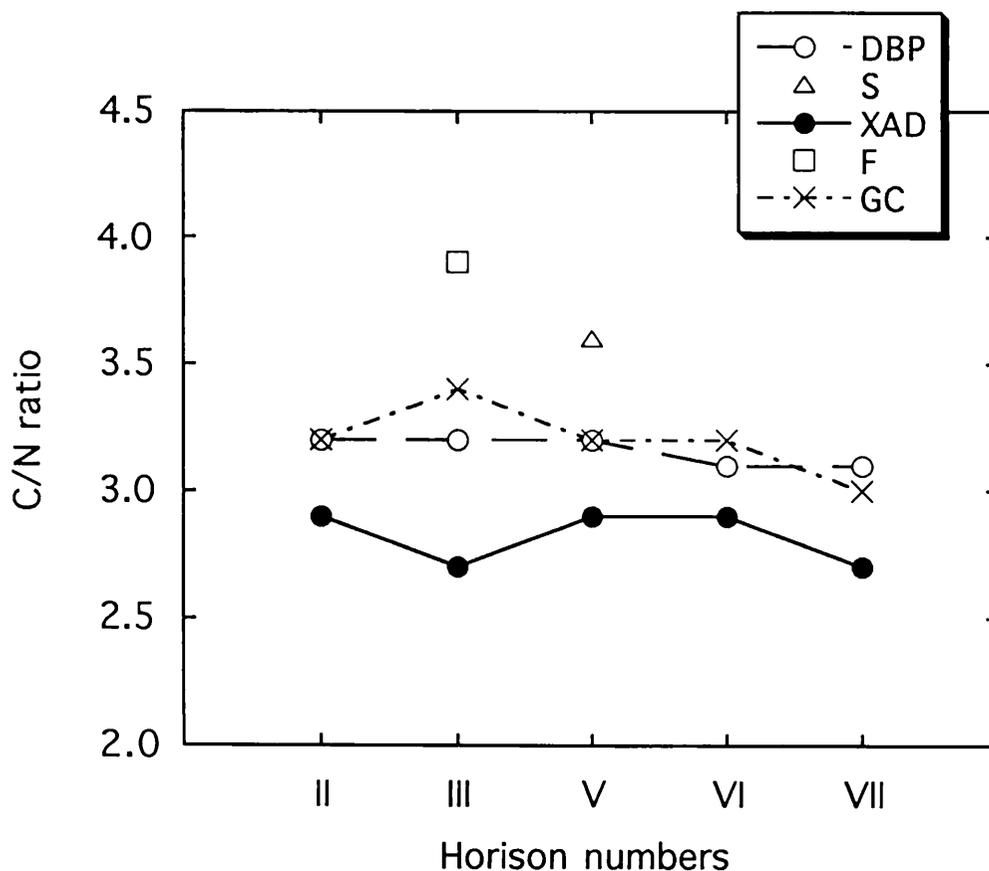
- 1) DBP : Decalcified Bone Powder
- 2) S : Dilute acid-Soluble fraction
- 3) XAD : XAD resin-treated Hydrolysate fraction
- 3) GC : Gelatin collagen fraction extracted by means of gelatinization
(data from Nakamura et al., 1997)
- 4) F : Fulvic and Humic acid fraction
- 5) Errors of ^{14}C ages are 1σ .

4-1. C/N比

骨片試料から抽出した成分のC/N比は層序の違いにほとんどよらず一定である（図1）。いずれの層位においても、XAD樹脂を通して得られたアミノ酸集合体成分（XAD）のC/N比が一番小さく2.8前後の値を示し、脱灰して骨の無機成分を除去した成分（DBP）とゼラチンコラーゲン（GC）のC/N比は、XADより幾分高く3.2前後の値を示している。外来有機物と考えられるフミン酸やフルボ酸成分（Fと略す）のC/N比は骨コラーゲンよりも高い値を示している。コラーゲンのようにグリシンの多いタンパク質のC/N比は、 3.2 ± 0.5 といわれており（Hare and von Endt, 1990）、一方、土壌有機物のC/N比は10以上の高い値をもつものが多い。化石骨が埋まっている堆積物などコラーゲン以外からの有機物の影響で、FのC/N比が高くなったと考えられる。

図1 粟津湖底遺跡の第3貝塚から採集された骨片から抽出した成分の層序によるC/N比

Figure 1 C/N ratios for some fractions extracted from fossil bones vs. horizon numbers in the third shell mound excavated at Awazu submarine archaeological site.

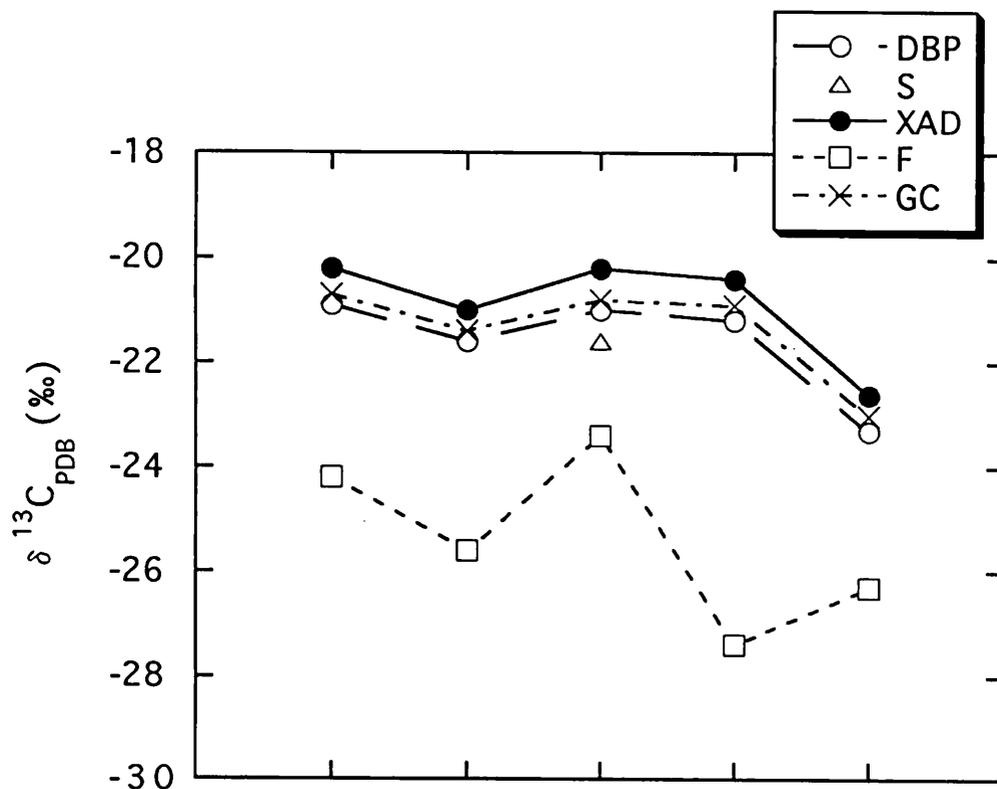


4-2. $\delta^{13}\text{C}$ 値

骨片試料から抽出した成分の $\delta^{13}\text{C}$ 値を層序に示したのが図2である。骨コラーゲンの各成分の $\delta^{13}\text{C}$ 値は、第VII層を除いて層序によらずほぼ一定である。いずれの層位においても、アミノ酸集合体 (XAD) の $\delta^{13}\text{C}$ 値が一番大きく $-20\sim-21\%$ で、GCの $\delta^{13}\text{C}$ 値がそれより $0.4\sim 0.6\%$ 小さく、DBPはGCよりさらに 0.2% 位小さい $\delta^{13}\text{C}$ 値を示している。フルボ酸、フミン酸成分(F)の $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-24\sim-28\%$ と、骨コラーゲンが示す値よりもかなり小さい。DBPは試料中の炭酸塩を除去したのみでフミン酸、フルボ酸などの不純物は除去されずに残っている可能性が高く、この不純物の影響を受けて $\delta^{13}\text{C}$ 値が低くなったと考えられる。ゼラチンコラーゲン抽出成分 (GC) には、 90°C の温水に不溶なフミン酸、フルボ酸は含まれないはずであるが、XADに比べて $\delta^{13}\text{C}$ 値が高いことから、これら外来有機物由来の炭素が除去されずに残っている可能性が考えられる。

図2 粟津湖底遺跡の第3貝塚から採集された骨片から抽出した成分の層序による $\delta^{13}\text{C}$ 値

Figure 2 $\delta^{13}\text{C}$ ratios for some fractions extracted from fossil bones vs. horizon numbers in the third shell mound excavated at Awazu submarine archaeological site.

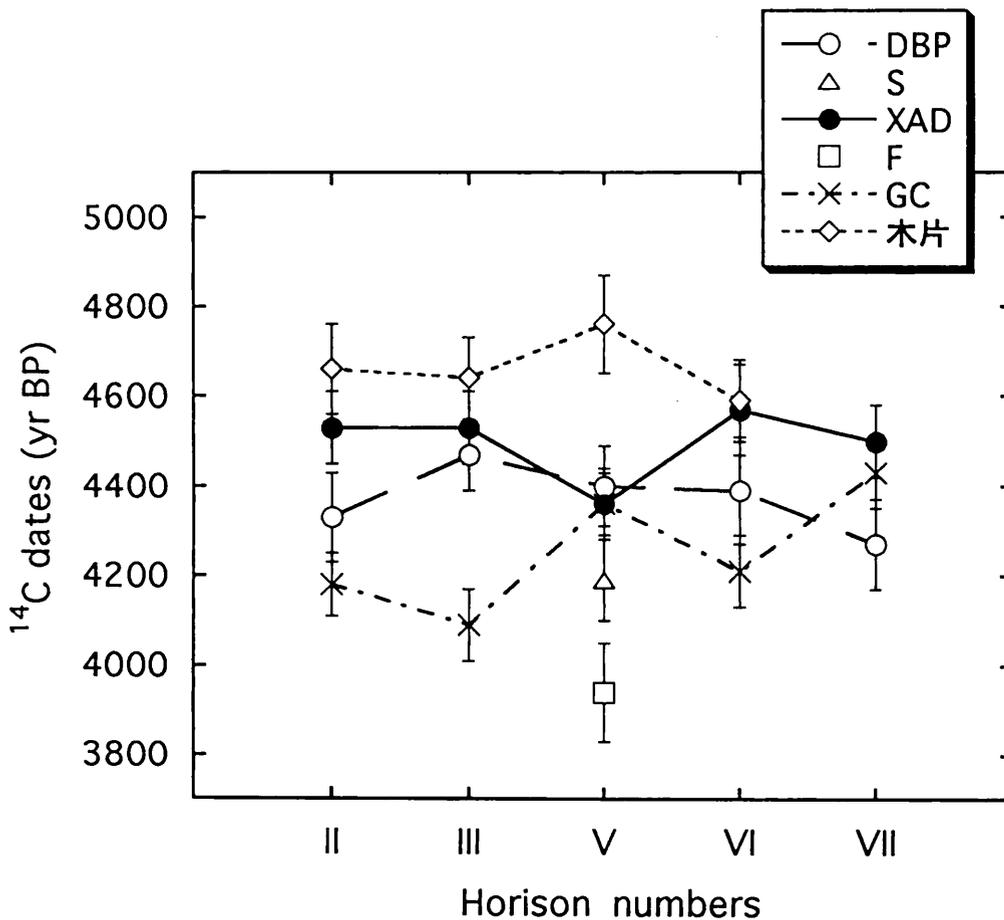


4-3. ^{14}C 年代値

図3に、骨片試料から抽出した成分の ^{14}C 年代値を、骨片と同層の同じ地点から採取された木片の ^{14}C 年代値とともに示した。第V層を除いて、XADの ^{14}C 年代値はGCの ^{14}C 年代値よりも古く、同層の木片から得られた ^{14}C 年代値に近づき、誤差内で一致する傾向が見られた。GCの ^{14}C 年代値は、ゼラチンコラーゲンの収率が悪い第II層のAWA-8（収率0.62%）や第III層のAWA-9（収率0.56%）で数百年若くなっているが、XADの ^{14}C 年代値は収率に関係なく、第V層を除いて4500~4570 (yr BP)となった。Fの ^{14}C 年代はAWA-10が3940 (yr BP)、AWA-11が2070 (yr BP)と骨コラーゲン本来の年代よりかなり若く、特にAWA-11において際だって若い値を示している。AWA-10の試料はゼラチンコラーゲンの収率が2.15%と多く、保存状態が良好で若い年代の外来炭素の汚染が少ない試料であったために、XADとGCの間に年代差が生じなかったと考えられる。

図3 粟津湖底遺跡の第3貝塚から採集された骨片から抽出した成分の層序による ^{14}C 年代値

Figure 3 ^{14}C dates for some fractions extracted from fossil bones vs. horizon numbers in the third shell mound excavated at Awazu submarine archaeological site.



5. まとめ

一般に新鮮な骨から回収されたゼラチンコラーゲン中の炭素含有率は40~50%とされており、38~45%の炭素含有量を示す今回の骨片試料は比較的保存性がよかったと考えられる。しかし、その中でも、ゼラチンコラーゲンの収率が1%以下と少ない第II層のAWA-8や第III層のAWA-9では、GCから得られた¹⁴C年代値が、実際の年代よりも数百年位若返っている。この結果から、コラーゲン含有量が低い化石骨試料においては、今までのゼラチンコラーゲン抽出法によって化石骨から外来炭素を除去するのは不十分であると考えられる。

それに対して、今回試みたXAD吸着樹脂を用いる方法は、外来有機物由来の炭素を取り除いて信頼度の高い¹⁴C年代値を得るのに有効であることがわかった。今後さらに年代の古い化石骨、保存状態の悪い骨試料について本方法を試み、検討を行っていく予定である。

謝 辞

北海道大学大学院地球環境科学研究所の南川雅男博士には、当研究をはじめるにあたって貴重な助言を頂いた。粟津湖底遺跡から出土した試料は滋賀県教育委員会から提供して頂いた。記して感謝の意を表す。なお、本研究の実施に際し、文部省科学研究費補助金重点領域研究(2)「骨化石のアミノ酸を用いた高精度¹⁴C年代測定による日本人の起源の研究」代表者中村俊夫(課題番号09208206)の一部を使用した。

引用文献

- 有田陽子・中井信之・中村俊夫・亀井節夫・秋山雅彦・沢田 健(1990) 哺乳類化石のコラーゲン抽出法とそのAMS法による¹⁴C年代測定. 名古屋大学古川総合研究資料館報告, 6, 45-54.
- Gillespie, R., Hedges, R. E. M. and Wand, J. O. (1984) Radiocarbon dating of bone by accelerator mass spectrometry. *J. Archaeol. Sci.*, 11, 165-170.
- Hare, P. E. and von Endt, D. (1990) Variable preservation of the organic matter in fossil bone. Annual Report of Director of the Geophysical Laboratory, Carnegie Institute, Washington, 1989-1990, Geophysical Laboratory, Washington D.C., 115-118.
- Kitagawa, H., Masuzawa, T., Nakamura, T. and Matsumoto, E. (1993) A batch preparation method for graphite targets with low background for AMS ¹⁴C measurements. *Radiocarbon*, 35, 295-300.

- 南 雅代・中村俊夫 (1997) 骨化石試料に対する信頼度の高い ^{14}C 年代、炭素同位体比測定を試み。名古屋大学加速器質量分析計業績報告, **VIII**, 247-253.
- 中村俊夫・池田晃子・小田寛貴 (1994) タンデトロン加速器質量分析計による ^{14}C 測定における炭素同位体分別の補正について— ^{14}C 年代算出の手引き—. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告, **V**, 237-243.
- 中村俊夫・大塚裕之・奥野 充・太田友子 (1996) 東シナ海の大陸棚および琉球弧の海底から採取された哺乳類化石の加速器質量分析法による ^{14}C 年代測定。地学雑誌, **105**, 306-316.
- 中村俊夫・太田友子・稲庭 功・南 雅代・池田晃子 (1997) 滋賀県粟津湖底遺跡第3貝塚の同一層から出土した木片、哺乳類骨片、セタシジミ貝殻化石の放射性炭素年代の比較。名古屋大学加速器質量分析計業績報告, **VIII**, 237-246.
- 小田寛貴 (1994) 加速器質量分析計による $^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$ 比測定における同位体効果の補正。名古屋大学加速器質量分析計業績報告, **V**, 244-251.
- 沢田 健・有田陽子・中村俊夫・秋山雅彦・亀井節夫・中井信之 (1992) 加速器質量分析計を用いた ^{14}C 年代測定による野尻湖層の編年。地球科学, **46**, 133-142.
- 滋賀県教育委員会 (編) (1997) 粟津湖底遺跡第3貝塚 (粟津湖底遺跡 I)。琵琶湖開発事業関連埋蔵文化財発掘調査報告書
- Stafford, T. W. JR., Brendel, K. and Duhamel, R. C. (1988) Radiocarbon, ^{13}C and ^{15}N analysis of fossil bone: Removal of humates with XAD-2 resin. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **52**, 2257-2267.

Extraction and radiocarbon dates of amino acids in fossil bones

Masayo MINAMI and Toshio NAKAMURA

(Dating and Materials Research Center, Nagoya University, Nagoya 464-8602, Japan)

Abstract

Accurate radiocarbon (^{14}C) and carbon isotope analysis on fossil bones require that all exogenous carbon be removed. To eliminate the foreign organic matter from bones, XAD-2 chromatography method was tested. The fossil bones used in the experiment were deer and boar bones collected from the Awazu submarine archeological site, Shiga, Japan. The bone samples were decalcificated with 4°C , 0.8N HCl and the acid-insoluble residue was concentrated by centrifugation and lyophilized. The demineralized bone powder was hydrolysed with 6N HCl at 110°C . Solids were removed by centrifugation before the filtered hydrolysate was passed through the XAD-2 resin to remove fulvic and humic acids. For comparison of ability to remove organic contamination from fossil bone, the gelatin-extraction method of decalcification in a cellulose tube with 1.2 HCl, followed by heating at 90°C in water was also examined upon same samples.

The XAD-purified hydrolysates have more positive $\delta^{13}\text{C}$ values and older ^{14}C ages than gelatin collagen extracted in hot water. The difference tends to become greater for poorly-preserved fossil bones, containing less than 1% extractable collagens. The fulvic and humic phases give apparent younger ages and significantly more negative $\delta^{13}\text{C}$ values than bone organic carbon. The result indicates that the gelatin-extraction method is sufficient for ^{14}C dating on well-preserved bones, but insufficient on poorly-preserved bones, because hot-water extraction does not totally remove exogenous organic carbon. Then, XAD-2 resin is recommended for accurate ^{14}C and carbon isotope measurements.