

¹⁴C年代測定のための骨試料調製法
Bone sample preparation method for ¹⁴C dating

南 雅代
Masayo Minami

名古屋大学年代測定総合研究センター
Center for Chronological Research, Nagoya University, Nagoya 464-8602, Japan.

*Corresponding author. E-mail: minami@nendai.nagoya-u.ac.jp

Abstract

Bones are one of the most attractive materials for archaeological dating, because they often provide direct information about prehistoric events. Bone collagen is commonly used for ¹⁴C-dating of bones. The bone pretreatment includes the removal of mineral phase of bones with 0.4-0.6M HCl followed by a gentle-base-acid extraction to remove extraneous carbon such as humic acids from the organic bone residue. Next, the collagen is dissolved as gelatin at 85-90°C and pH 3 and, and filtered through a glass filter to remove non-soluble contaminants, then freeze-dried. The gelatin with its yield of <0.7 wt% could remain exogenous carbon, and so more cleaning step using the high molecular weight (>30 kD) of gelatins to remove contaminants by ultrafiltration is needed. The appropriate schematic overview of collagen extraction and ultrafiltration is performed.

Keywords: 骨 ; 放射性炭素年代 ; 試料調製法
キーワード : bone ; ¹⁴C age ; sample preparation method

1. はじめに

遺跡から出土する骨からは、当時の人の食性や生活環境、年代などの情報を直接得ることができ、考古学において非常に重要である。しかし、土壌中に埋没している骨は、日本のような酸性土壌のもとでは容易に変質しやすく、元の骨の情報を保持していない場合がある。特に骨の無機成分は変質を受け易いため、これまで、¹⁴C年代測定の際は、化学的風化作用に安定な硬タンパク質の骨コラーゲンが用いられてきた。しかし、骨コラーゲンも続成作用の影響を受け、しばしばフミン酸やフルボ酸といった外来有機物に汚染されていることがあり、骨本来の正しい年代を与えないことがある。より確かな ¹⁴C 年代を得るために、私はこれまで、骨ゼラチンを加水分解してアミノ酸とし、XAD-2 樹脂を用いて外来有機物を除去する方法 (Minami *et al.*, 2000)、骨試料を希塩酸で脱灰した後にアルカリ処理する方法 (Minami *et al.*, 2004) などを試みて来た。前者は骨ゼラチン収率が 1%より低い試料においても、骨本来の信頼性のある年代を得ることができるが、XAD-2 樹脂の前洗浄に時間がかかる上、樹脂から完全に汚染を除去するのが困難であるという欠点がある。また後者は、骨の有機炭素を損失しやすく、特に保存状態の悪い骨の場合は全て溶解してしまい、骨脱灰成分が残らない可能性もある。

さらに、現生の骨や年代が若い骨においては、骨に残存する脂質成分によって $\delta^{13}\text{C}$ や ¹⁴C 年代測定に影響がでる可能性が考えられるため、アセトンおよびクロロホルム/メタノールで前洗浄をする必要がある (Minami and Nakamura, 2005)。

近年、骨の試料調製法として、限外ろ過調製法が広まり、世界中で用いられるようになってきている。この限外ろ過調製法は、骨試料から抽出したゼラチンをさらに分子量でふるい分ける方法であり、最初に *Brown et al. (1988)* によって提言されたものである。限外ろ過を行うことにより、低分子の外來有機物や変質したタンパク質が除外され、より正しい ^{14}C 年代をもつ高分子量のゼラチンだけを分離抽出できると考えられる。我々は、この限外ろ過法を骨調製法に付加することにより、新たな汚染をひき起こすことがないか、未ろ過の骨ゼラチンよりも信頼性のある ^{14}C 年代が得られるかどうかの検討を行った結果、*Ramsey et al. (2004)* が提唱する方法でフィルターの前洗浄を行い、短時間限外ろ過をした場合は、新たな汚染もなく、より信頼性のある ^{14}C 年代が得られることが明らかになったが (山崎ほか, 2010)、長時間の限外ろ過を行うと、外來炭素による汚染のために年代が古くなることがわかった。使用した Vivaspin™ 6 (VS 6: ポリエーテルスルホン, 30kD MWCO) のフィルターは 4.3-5.0 kyr という古い年代をもっているため、長時間の限外ろ過により年代が古くなるのは、主としてフィルターに起因する汚染のためと考えられる (*Hüls et al., 2007; Minami et al., 2012*)。

これまでの研究を踏まえ、ここでは、現在 ^{14}C 年代測定のために最適と考えられる骨調製法を紹介したいと思う。

2. 骨調製法

2.1. 粉砕

骨片は表面の汚れをカッターあるいはデンタルドリルで削り取った後、ガラスビーカーに入れ、超純水中で超音波洗浄を行う。以降、超純水は、Milli-Q Gradient A10 (UV ランプで水中の有機物を分解、除去する機能をもつ、TOC は 2-3ppb 程度) で作られた水を使用している。骨の状態によっては、脂質成分を除去するために、アセトン中、あるいはクロロホルム:メタノール=2:1 溶液中で洗浄を行う。ソックスレー抽出が可能な場合はソックスレー抽出で、準備できない場合は、ビーカー内で簡易的に洗浄するだけでもかなり効果がある。その後、超純水中で超音波洗浄を行う。その後、凍結乾燥を行い、ステンレス乳鉢で粉砕する。

2.2. 希塩酸による脱灰

得られた骨粉末を遠沈管 (あらかじめ酸で洗浄しておく) に入れ、0.4-0.6M HCl を加えて、4°C で一日脱灰を行う。年代測定総合研究センターでは、セルロースチューブを用いた方法 (有田ほか, 1990) がよく用いられるが、いずれの脱灰法を用いても、骨ゼラチンの ^{14}C 年代に違いは見られない (山崎ほか, 2010)。後者の場合は、酸溶解成分 (ソリューション・コラーゲン: SC) も得ることができるので、ゼラチンの収率が悪く、 ^{14}C 年代測定に供するゼラチンの量が少ない場合は、SC の ^{14}C 年代値を参考値とすることができる点が利点である。

遠沈管を用いた場合は、そのまま 2000 rpm で 20 分、遠心分離にかけ、上澄み液を捨てる (その後の分析に必要な場合は、別の容器に移す)。酸不溶成分に超純水を加え、洗浄した後、再び遠心分離し、上澄み液を捨てる。セルロースチューブを用いた場合は、チューブ内容物をガラス遠沈管 (あらかじめ洗浄し、焼き出ししておく) に移し、2000 rpm で 20 分、遠心分離を行い、上澄み液を別のガラス遠沈管に移す。酸不溶成分に超純水を加え、洗浄した後、再び遠心分離し、上澄み液を前述の別のガラス遠沈管に加える。この上澄み液の入った遠沈管はパラフィルムをかけ、冷凍庫で十分に予備凍結をした後、凍結乾燥を行う。その際、洗浄済みのマイクロチップ等を用いて、パラフィルムに数カ所穴を開けておく。

2.3. 脱灰成分のアルカリ処理

遠沈管中の酸不溶脱灰成分に、0.1M NaOH 液を加え、2 時間程反応させる。*Minami et al. (2004)* は、脱灰成分に 48 時間と 2 時間のアルカリ処理を試み、2 時間だと脱灰成分が約 30% 損失、48 時間だと約 50% 損失すること、いずれの ^{14}C 年代結果も違いがないこと、を示し、アルカリ処理は 2 時間で十分であると報告

している。ドイツのキール大学では、この過程を 0.25M NaOH 液、15 分で行っており、本方法よりも濃いアルカリ溶液で短時間、ということがわかる。骨試料によっては、0.25M NaOH 液によって、脱灰成分のほとんどが溶解してしまうものもあり、得られた成分の状態を考慮して、NaOH 液の濃度を選ぶ必要があると考えられる。

アルカリ処理後遠心分離し、上澄み液を捨て、超純水を加えて脱灰成分を洗浄した後、次に、0.1M HCl を 0.1M NaOH 液と同量加えて中和し、同様に、遠心分離して上澄み液を捨て、さらに超純水を加えて脱灰成分を洗浄した後、遠心分離して上澄み液を捨てる。ところで、骨に混入するフミン酸成分の分析を行いたい場合は、上澄み液を捨てずに、別の容器に回収し、凍結乾燥して、試料とする。

2.4. ゼラチン抽出

得られた酸不溶脱灰成分に 10-20mL の超純水を加え、さらに HCl を少量加えて、溶液を pH 3 にし、85-90°C (アルミブロックヒーターを用いる) で一晚、ゼラチン抽出を行う。内容物を、暖かいうちにガラスフィルター (あらかじめ焼き出ししておく) によって吸引ろ過をしてゼラチン液を回収し、冷凍庫で十分に予備凍結をした後、凍結乾燥を行う。ところで、このろ過過程において、キール大学では、0.45 μ m の銀フィルターを用いており、本研究で用いるガラスフィルターとの得られる ^{14}C 年代結果の違いについて、今後、検討する必要があると考えられる。

以上の処理によって得られた骨ゼラチンが白色で綿毛状であれば、信頼性のある ^{14}C 年代値を与えると考えられる。綿毛状ではあるが、少し黄色を帯びている場合は、わずかに外来炭素の汚染が残存していると考えられ、C/N 比、ゼラチン収率のチェックが必要と考えられる。C/N 比が 2.9-3.5 であれば骨コラーゲンとして保存状態がよいとされているが (Klinken, 1999)、これまでの経験で、保存状態のよい骨コラーゲンの場合は、3.2-3.3 の値を示すことがほとんどである。C/N 比よりも、骨の保存状態によって鋭敏なのがゼラチン (コラーゲン) 収率であり、0.7 wt% よりも低いものは、ゼラチンが正しい ^{14}C 年代値を示さない可能性がある。フミン酸等の腐食酸は高い C/N 比を示すため、骨ゼラチンの C/N 比が 3.4 より高いか、あるいはゼラチン収率が 0.7 wt% より低い場合は、得られる ^{14}C 年代値は信頼性が低いと考えられ、データを出す時に、この点を明示しておく必要がある。

2.5. 骨ゼラチンの限外ろ過

骨ゼラチンの保存状態がよい場合は、ゼラチンの ^{14}C 年代値と、限外ろ過をして分離した高分子ゼラチンの ^{14}C 年代値はほぼ同じ値を示すが (山崎ほか, 2010; Minami *et al.*, 2012)、保存状態の悪い骨ゼラチンの場合は、ゼラチンに残存している外来炭素を除去する必要があり、限外ろ過法が有効と考えられる。以下、骨ゼラチンの限外ろ過方法についてまとめる。

VS6 に超純水を入れ、遠心分離機で、3000 rpm で遠心分離を行ない、ろ液を捨てる。この操作を 2 回行なう。その後、約 1 時間、超純水中でフィルターを超音波洗浄する。さらにその後、VS6 に超純水を入れ、3000 rpm で遠心分離を行ない、ろ液を捨てる。この操作を 2 回行なう。

ゼラチン試料 50-60mg を超純水約 5mL に溶かし、VS 6 にマイクロピペット (ガラス製、洗浄後、焼き出したもの) を用いて流し入れる。4°C に設定した遠心分離機にセットし、上液が 1-1.5 mL ほどに減少するまで 3000 rpm で遠心分離を行なう。通常、1 時間程で分離が終了するが、それ以上かかる場合でも、2.5 時間で、遠心分離を終えるようにする。一度にゼラチン溶液を流し入れるのではなく、何回かに分けて流し入れると、ろ過の時間が短縮できる (山崎ほか, 2010)。

限外ろ過後の高分子ゼラチン溶液はマイクロピペットで丸底サンプル瓶に流し入れ、冷凍庫内で予備凍結した後、凍結乾燥を行なう。

3. 骨調製の手順概要

以上の ^{14}C 年代測定のための骨調製法の手順の概要を図 1 にまとめる。

4. 結論

遺跡から出土する骨の ^{14}C 年代測定のための試料調製法について、これまでの結果に基づき、現在最適と考えられる方法についてまとめた。保存状態の悪い骨試料は、脱灰に使用する HCl 濃度や脱灰成分のアルカリ処理の際の NaOH 溶液の濃度を適切に設定しないと、骨の本質成分の大部分を損失してしまい、 ^{14}C 年代測定に必要なゼラチン量を得ることができない。一方、保存状態の良い骨試料の場合は、ゼラチン抽出を行わず、脱灰のみでも信頼性のある ^{14}C 年代測定が得られる。このように、さまざまな状態の骨試料に対して、一定の試料調製法を適用するのは無理があるが、骨の ^{14}C 年代測定のための試料調製法の基準を定めておくことは重要であり、本稿において、そのまとめを行なった。ここで書かれた内容は当然のことながら完璧な骨調製法ではなく、今後さらに、より信頼性のある ^{14}C 年代を得るための技術開発がなされた時に修正、変更、追加がされるべきであると考えられる。

謝辞

これまでの研究は、多くの方々から骨試料の提供をいただいたお陰で遂行することができました。貴重な骨試料を提供して下さった方々に、この場をお借りして、お礼を申し上げます。

参考文献

- 有田陽子・中井信之・中村俊夫・亀井節夫・秋山雅彦・沢田 (1990) 哺乳類化石のコラーゲン抽出法とその AMS 法による ^{14}C 年代測定. 名古屋大学古川総合研究資料館報告, 6, 45-54.
- Brown, T.A., Nelson, D.E., Vogel, J.S., Southon, J.R. (1988) Improved collagen extraction by modified Longin method. *Radiocarbon*, 30(2), 171-177.
- Hüls, M.C., Grootes, P. M., Nadeau, M.-J. (2007) How clean is ultrafiltration cleaning of bone collagen? *Radiocarbon*, 49(2), 193-200.
- Minami, M. and Nakamura, T. (2000) AMS radiocarbon age for fossil bones by XAD-2 chromatography method. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res.*, B172, 462-468.
- Minami, M., Muto, H. and Nakamura, T. (2004): Chemical techniques to extract organic fractions from fossil bones for accurate ^{14}C dating, *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res.*, B223-224, 302-307.
- Minami, M. and Nakamura, T. (2005) Carbon and nitrogen isotopic fractionation in bone collagen during chemical treatment. *Chemical Geology*, 222, 65-74.
- Minami, M., Yamazaki, K., Omori, T., Nakamura, T. (2012) Radiocarbon dating of VIRI bone samples using ultrafiltration. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res.* (in revision)
- Bronk Ramsey, C., Higham, T., Bowles, A., Hedges, R. (2004) Improvements to the pretreatment of bone at Oxford. *Radiocarbon*, 46(1), 155-163.
- van Klinken GJ. (1999) Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science* 26 (6), 687-695.
- 山崎香奈・南 雅代・大森貴之・中村俊夫 (2010) 限外濾過調製法を用いた骨ゼラチンの ^{14}C 年代測定. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告書, XXI, 100-112.

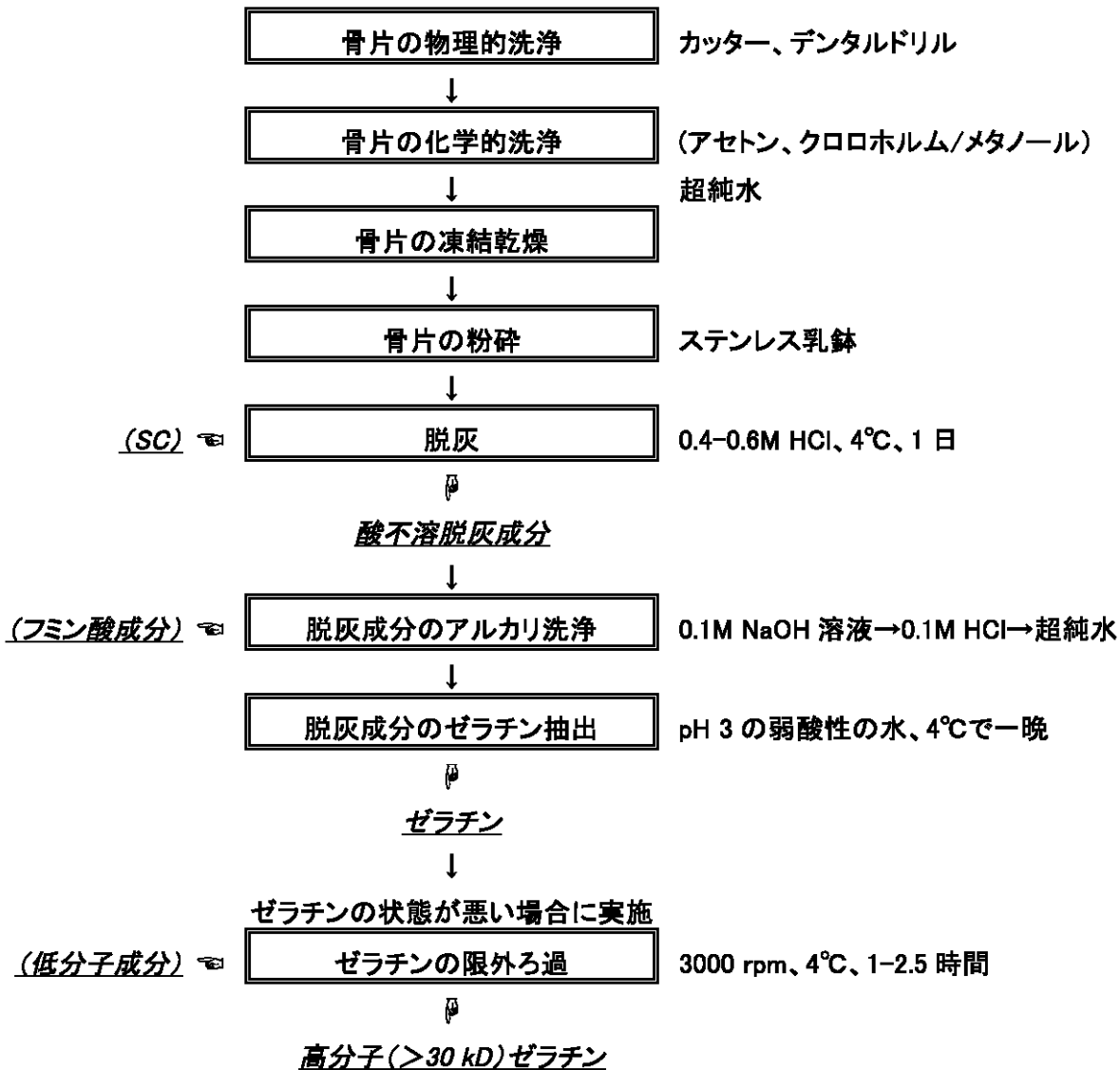


Fig. 1. Schematic overview of collagen extraction and ultrafiltration of bone samples

図1. 骨試料のコラーゲン抽出および限外ろ過の手順の概要

日本語要旨

遺跡から出土する骨は、当時の人の食性や生活環境、年代などの情報を直接与えてくれるものとして、考古学において非常に重要である。骨の ^{14}C 年代測定においては、一般的に、硬タンパク質の骨コラーゲンが用いられる。骨は、まず 0.4-0.6M HCl によって、無機成分を除去する。得られた酸不溶脱灰成分に 0.1M NaOH、0.1M HCl により穏やかにアルカリ・酸処理を行ない、フミン酸などの外来炭素を除去する。次に、85-90°C、pH 3 の弱酸性の水にコラーゲンを溶解し、ゼラチン抽出を行なう。ゼラチン溶液はガラスフィルターによるろ過を行ない、不溶性の外来炭素を除去する。得られたゼラチン収率が 0.7 wt% よりも低い場合は、外来炭素が完全に除去されていない可能性が考えられ、さらに限外ろ過によって、3 万分子量以上の高分子ゼラチンのみをふるい分けする必要がある。本稿においては、以上の骨コラーゲン抽出法、およびゼラチンの限外ろ過法に関して、現在最も適切と考えられる手順について紹介する。