

限外ろ過法を用いた化石骨の¹⁴C年代測定
-これまでの総括-

Radiocarbon dating of fossil bones using ultrafiltration –Summary of our studies–

南 雅代^{1*}・坂田 健²・中村俊夫¹

Masayo Minami^{1*}, Ken Sakata², Toshio Nakamura¹

¹名古屋大学年代測定総合研究センター・²名古屋大学大学院環境学研究科

¹Center for Chronological Research, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8602, Japan

²Graduate School of Environmental Studies, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

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

Abstract

We summarized our past studies on bone pretreatment for ¹⁴C-dating of some fossil bones. The samples used for the studies are animal bones (~4600 BP; gelatin yield of 2–4 wt%) from the Awazu underwater archaeological site, Shiga, Japan, a mammoth bone (39,305 ± 242 BP; gelatin yield of 17 wt%) of the Fifth International Radiocarbon Intercomparison (VIRI) sample E, and human bones (~750 BP; gelatin yield of 2–11 wt%) from an archaeological site in Yuigahama, Kamakura, Japan. The ¹⁴C ages of the high-molecular-weight (HMW) gelatins of the Awazu animal bones were the oldest and similar to those of wood collected from the same layer as the bones, and the NaOH-treated-unfiltered gelatins and XAD-purified hydrolysates gave ¹⁴C ages within the acceptable margins of error; therefore, ultrafiltration was effective for accurate ¹⁴C dating, while NaOH-treated gelatin without ultrafiltration was also sufficient to obtain accurate ¹⁴C dates on the animal bones. The ¹⁴C ages of the Yuigahama human skeletons from 3 individuals also showed statistically the same ¹⁴C ages as NaOH-treated-unfiltered gelatins and HMW gelatins within the margins of error, although HMW gelatins were likely to give slightly older ages than unfiltered gelatin with a yield of less than ~3%. These results indicate that unfiltered gelatins extracted from fossil bones of gelatin yield more than ~3% can produce accurate ¹⁴C ages without the need for ultrafiltration. Meanwhile, excessively long ultrafiltration time was suspected to have contaminated the bone samples with material from the ultrafilter, because those samples exhibited older ¹⁴C ages than did those filtered for shorter durations. The results in this study indicate that ¹⁴C ages of unfiltered gelatin extracted from well-preserved bones can be sufficiently accurate, while unfiltered gelatins with low yields could remain slightly contaminated, and that ultrafiltration might effectively remove such contaminants to provide more accurate ages for ill-preserved bones.

Keywords: Radiocarbon; Ultrafiltration; Fossil Bone; Sample preparation

1. はじめに

遺跡から出土する骨・歯は、死後も残存することが多いため、昔のさまざまな情報を直接我々に与えてくれる。例えば、骨・歯の形態からは、生前の栄養状態や病歴を、放射性炭素

(^{14}C) からは年代を, 炭素・窒素同位体比 ($\delta^{13}\text{C} \cdot \delta^{15}\text{N}$) からは生前の食性を, 古DNA解析やストロンチウム同位体比からは種の系統や伝播などの情報を得ることができる。これらの情報を正確に引き出すためには, 骨・歯遺物を適切な方法で化学処理し, 本質的な情報のみを抽出することが重要である。

骨・歯は無機質 (大部分がヒドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 結晶からなる) と有機質 (大部分がI型コラーゲンからなる) から構成される (図1)。骨および歯の象牙質は約20%の有機質を含むが, 歯のエナメル質はほとんどが無機質からなっている。骨の無機質は, 土壤中容易にイオン交換または分解しやすく, ヒドロキシアパタイト中の Ca^{2+} は Na^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} は CO_3^{2-} , OH は F , Cl などのイオンと容易にイオン交換する。

骨の有機質の大部分を占めるI型コラーゲンは, 分子量10万のアミノ酸残基数1,000程度のポリペプチド鎖 (α 鎖) が3本でらせん構造を作り, 分子量約30万の細長い棒状 (長さ約300 nm, 直径約2 nm) をしている (図2)。無機質よりも分子が大きく, 複雑な構造をしていて汚染物質が入り込みにくいいため, 骨の ^{14}C 年代測定や $\delta^{13}\text{C} \cdot \delta^{15}\text{N}$ 測定を行う場合, 有機質コラーゲンをを用いるほうが, 信頼度の高い情報が得られるとされている。さらに, コラーゲンを高温 (85–90°C) のpH~3の水中で変成させるとコラーゲンの3本鎖がほどけるため, 三重らせん構造内に入り込んだ汚染物質を除去することができる。この方法はLongin (1971)により開発されたゼラチン抽出法であり, 現在でも広く用いられている骨試料調製の有力な手法である。

得られた骨ゼラチンが白色で綿毛状であれば, 純度の高いゼラチンが抽出されたと考えられ, 信頼ある ^{14}C 年代値が得られる可能性が高いが, 綿毛状であっても黄色を帯びている場合は, 骨ゼラチンに汚染炭素が残存している可能性が考えられる。骨ゼラチンの質は, 炭素/窒素 (C/N) 比からおおよそ推測可能であり, C/N モル比が2.9–3.5であれば十分な純度であるとされる (van Klinken, 1999)。しかし, これまでの経験から, 少し黄色がかったゼラチンでも3.2–3.3の値を示すことがほとんどであり, 厳密な指標とは言いがたい。C/N比よりも鋭敏な指標がゼラチン収率 (抽出されたゼラチンの骨試料に対するwt%) であり, 1 wt%以下の場合には得られた ^{14}C 年代値の信頼度が低いことが多い (Minami and Nakamura, 2000)。

このように, 骨コラーゲンにおいても, 土壤中に埋没している間に分解し, ペプチド結合が切れて減成していくため, 土壌腐植物質や微生物などの外来有機物と交換あるいは結合し易くなり, 元の骨本来の情報が乱されていることがある。したがって, 骨の本質成分であるコラーゲンをできるだけ損失することなく, 外来有機物を適切に除去することは, 正確な年

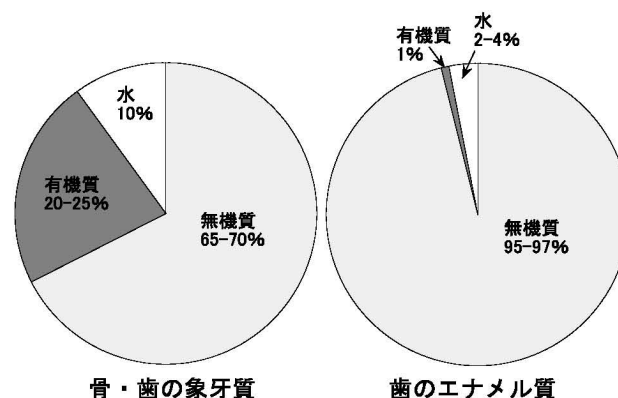


Fig. 1. Composition of hard tissue.
図1. 硬組織 (骨・歯) の組成。

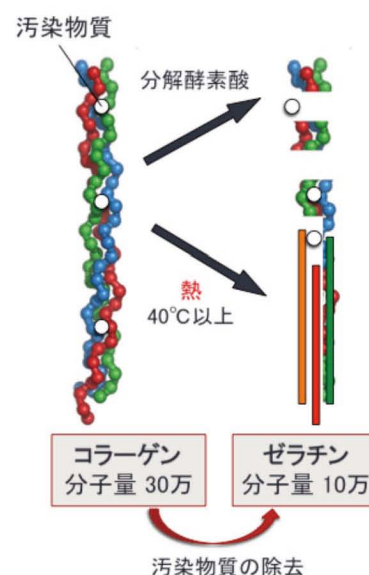


Fig. 2. A drawing of collagen and gelatin.
図2. コラーゲンとゼラチンの模式図。

代測定のために必要不可欠である。これまで、骨コラーゲンから汚染物質を除去する方法として、コラーゲンのアルカリ処理、ゼラチンを加水分解してXAD-2樹脂処理、限外ろ過による高分子量ゼラチンの抽出等の方法を試みてきた。

本稿においては、いくつかの骨試料に対し、骨コラーゲンから汚染物質を除去する方法を試みた例を示し、限外ろ過法を用いて分離抽出した高分子量ゼラチンの ^{14}C 年代を、未ろ過のゼラチンの ^{14}C 年代と比較したこれまでの例をまとめる。

2. 骨コラーゲンのアルカリ処理による外来炭素の除去

ゼラチン抽出を行う前に骨コラーゲンをアルカリ処理することにより、土壌由来の腐植物質を除く方法 (Longin 法+アルカリ処理) である。図3に、琵琶湖の粟津湖底遺跡第3貝塚のII, III, V, VI, VII, VIII, IXの各層から採集された獣骨片 AWA-8~14 (イノシシ, ニホンジカ骨片) の ^{14}C 結果を、同層から出土した木片の ^{14}C 結果 (中村ほか, 1997) とともに示す。木片の示す ^{14}C 年代は、年輪数の多い古い木の場合、実際の年代より古い年代が得られることがあるが (Old wood effect), 続成作用や生前の食性など様々な影響で年代値が変化しやすい骨よりも、得られる ^{14}C 年代の信頼性が高いと考えられる。

AWA-8~14のゼラチン収率は0.6~3.8 wt%であり、AWA-8及びAWA-9はゼラチン収率が1 wt%より低く、他の骨試料よりゼラチン残存状態がよくない。0.1M NaOH処理の有無による ^{14}C 年代の違いを調べた結果、アルカリ処理を行わなかった骨ゼラチン (図3内の◇) は明らかに若返った年代を示しており、ゼラチン収率の悪い試料のほうが、若返りの程度が大きい傾向が見られる。一方、アルカリ処理を行った骨ゼラチン (◆) は同層の木片 (×) の年代に近づく傾向が見られる (Minami *et al.*, 2013a)。アルカリ溶解成分の年代は $3,930 \pm 110$ BP (V層), $2,080 \pm 80$ BP (VII層) であったことから (Minami and Nakamura, 2000), アルカリ処理を行なうことにより、骨コラーゲンからフルボ酸等のアルカリに溶解する汚染物質が除去され、より正確な ^{14}C 年代に近づくことが示唆された。しかし、アルカリ処理の時間が長いと骨本質成分が損失することが知られており (Minami *et al.*, 2004), 用いるアルカリの濃度, 処理の時間などに注意する必要がある。

3. アミノ酸のXAD-2樹脂による純化

骨ゼラチンを加水分解し、ペプチド結合を切って個々のアミノ酸にすることで、外来有機物を遊離させ、XAD-2樹脂を用いてその外来有機物を除去する方法である (e.g. Stafford *et al.*,

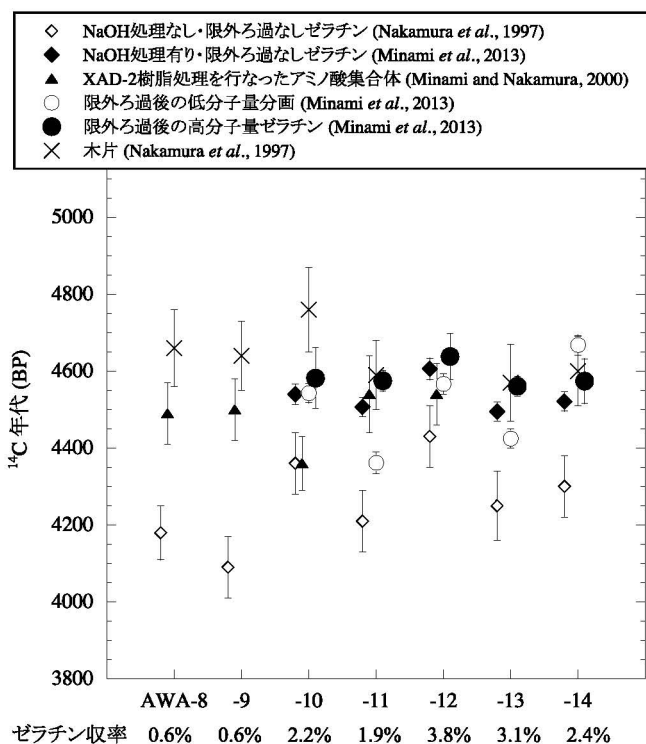


Fig. 3. ^{14}C ages of organic fractions from animal fossil bones and wood collected at Awazu submarine archaeological site, Shiga, Japan.

図3. 粟津湖底遺跡から採取した獣骨コラーゲンのアルカリ処理, XAD-2樹脂処理, 限外ろ過の有無による ^{14}C 年代値の違い。

1988; Minami and Nakamura, 2000)。図3から、XAD-2樹脂処理を行ったアミノ酸 (▲) は、AWA-10を除き、同層の木片 (×) の年代とほぼ一致しており、骨ゼラチン収率が1%より低い骨試料においても、正確な ^{14}C 年代が得られていると考えられる。アミノ酸レベルでの純化は、外来炭素を除去する上で効果的であるが、一方で、この方法は、XAD-樹脂の前洗浄に時間がかかり、また、XAD-2樹脂処理の過程で逆に骨試料を汚染させる可能性があるという欠点がある。

4. 骨ゼラチンの限外ろ過による高分子量ゼラチンの抽出

限外ろ過法は、骨ゼラチンから変成したゼラチン破片、塩、土壌由来有機物等、低分子量の汚染物質を分子量でふるい分けする方法であり、最初に Brown *et al.* (1988) によって提言された。我々の研究室では限外ろ過膜に Vivaspin™ 6 (VS 6: ポリエーテルスルホン, 分画分子量3万) を使用し、南 (2012) に記した実験方法により、限外ろ過を行っている。

4-1. 栗津湖底遺跡から採取した獣骨

図3に示すように、栗津湖底遺跡から採取した獣骨コラーゲンにおいては、限外ろ過後の高分子量ゼラチン (●) が、5抽出成分の中で一番古い年代が古く、同層の木片の年代とよく一致する傾向が見られた。したがって、限外ろ過を行うことにより、低分子量の外来有機物や変質したゼラチンが除外され、より正しい ^{14}C 年代をもつ未変質の高分子量のゼラチンだけを分離抽出できていることがわかる。

4-2. 第5回放射性炭素国際比較の骨試料 (VIRI-E: マンモスの骨)

図4に VIRI-E の限外ろ過の有無による ^{14}C 年代値の違いを示す。データは、山崎ほか (2010) による。VIRI-E においては、未ろ過のゼラチンと限外ろ過後の高分子量ゼラチンの ^{14}C 年代は誤差範囲内で同じであった。これは、用いたマンモスの骨のゼラチン収率が17%と高く、保存状態が良好で、ゼラチン抽出のみで汚染物質をほとんど除去することが可能だったためと考えられる。しかし、限外ろ過前のゼラチンは示す年代幅が大きい、限外ろ過後の高分子量ゼラチンの ^{14}C 年代は収束したコンセンサス値に近い値を示していること、低分子量分画は明らかに若い年代を示していることから、限外ろ過を行うことにより、この場合も、低分子量の外来有機物や変質したゼラチンが除外されていることが示唆される。

本方法は、上述したアルカリ処理法に比べて骨の本質成分の損失が少ないため、保存状態が良好でない古い骨に対して有効であると考えられる。また、XAD-2樹脂を用いる方法よりも実験手順が複雑ではないため、手軽に骨ゼラチンの純化が可能である。一方で、用いる限外ろ過膜によっては、ろ過後の高分子量ゼラチンの年代が古くなることも報告されており (Hüls *et al.*, 2007), Minami *et al.* (2013b) も、長時

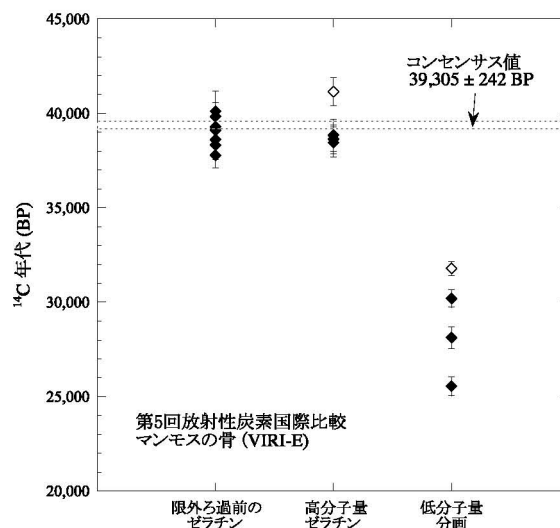


Fig. 4. ^{14}C ages of unfiltered gelatin, HMW gelatin, and LMW fraction of VIRI-E. Data from Minami *et al.* (2013b).
図4. VIRI-E の限外ろ過の有無による ^{14}C 年代値の違い。

間の限外ろ過を行うと、ろ過膜（原料に石油を用いているため、43,200 BP という古い年代をもつ）からの溶出炭素の影響により、高分子量ゼラチンの年代が古くなる可能性があることを示した（図4の白抜きのプロット：17時間限外ろ過を実施；黒塗りのプロット：他は2.5時間限外ろ過を実施）。また、未洗浄の限外ろ過膜は3,900 BP という若い年代を示すことから（Minami *et al.*, 2013b）、限外ろ過膜の前洗浄を十分に行ってから使用することが必要であると言える。

4-3. 鎌倉由比ヶ浜南遺跡の中世人骨

鎌倉由比ヶ浜南遺跡から出土した単体埋葬の人骨3体（YM121A, YM5002, YM5654）の歯および骨部位毎の結果を図5に示す。図中の括弧内の数値は、各骨試料から抽出したゼラチン収率（wt%）を示している。YM121Aの未ろ過ゼラチンの¹⁴C年代は瀧上ほか（2008）によって、YM5002, YM5654の未ろ過ゼラチンおよび高分子量ゼラチンの¹⁴C年代は坂田ほか（2012）によってすでに報告されている。歯は、骨より古い年代を示しているが、骨の各部位の¹⁴C年代は、誤差範囲内で一致しているため、¹⁴C年代測定に骨のどの部位を用いても問題ないと言える。歯の年代が古くなったのは、歯は骨と違い、永久歯に生え変わった時点で代謝が止まるため、死んだ時点ではなく、幼少期の年代を示したためと考えられる。YM5001の犬歯のほうが、YM121の第三臼歯より骨部位との年代差が大きい傾向が見られるのは、犬歯のほうが第三臼歯よりも一般に代謝停止時期が早いことに起因していると思われる。

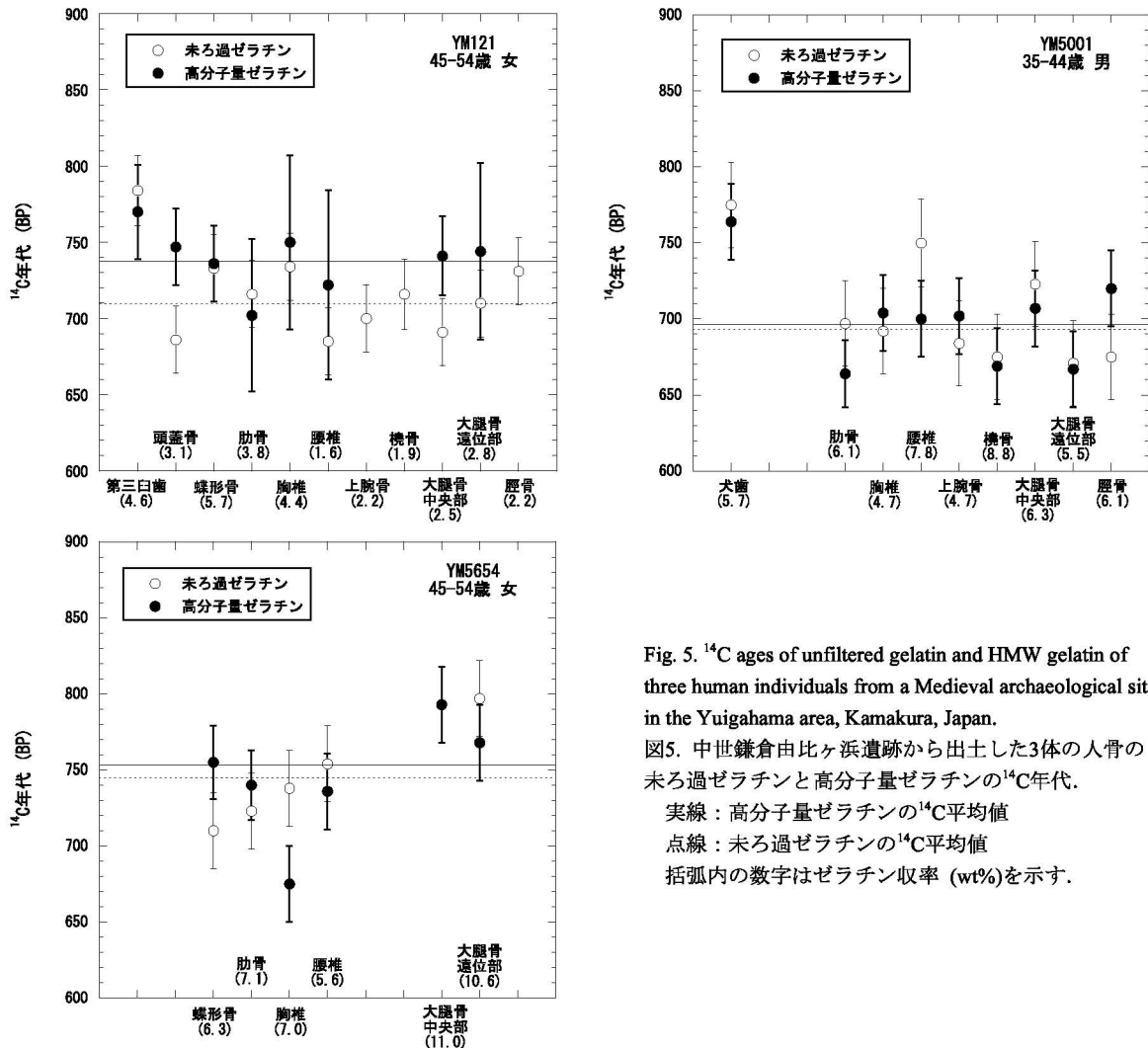


Fig. 5. ¹⁴C ages of unfiltered gelatin and HMW gelatin of three human individuals from a Medieval archaeological site in the Yuigahama area, Kamakura, Japan.

図5. 中世鎌倉由比ヶ浜南遺跡から出土した3体の人骨の未ろ過ゼラチンと高分子量ゼラチンの¹⁴C年代。

実線：高分子量ゼラチンの¹⁴C平均値

点線：未ろ過ゼラチンの¹⁴C平均値

括弧内の数字はゼラチン収率（wt%）を示す。

ゼラチン収率は YM121A が 1.6–5.7 wt% と最も低く、次いで YM5001 (4.7–8.8 wt%) であり、YM5654 が最も高収率 (5.6–11.0 wt%) であることがわかる。ゼラチン収率と、処理前の骨粉の C/N 比とは負の相関が見られ (図 6)、ゼラチン収率が悪いものほど、周囲の堆積物由来の腐食酸による影響を受け、C/N 比が高くなっていることがわかる。

YM121A の骨部位の ^{14}C 平均値は、未ろ過ゼラチン (図 5 に点線で示す) が 710 ± 7 BP, 高分子量ゼラチン (図 5 に実線で示す) が 738 ± 13 BP と、高分子量ゼラチンのほうがわずかに古いのに対し ($p = 0.07$), YM5001 はそれぞれ 696 ± 10 BP, 692 ± 9 BP ($p = 0.61$), YM5654 はそれぞれ 753 ± 11 BP, 745 ± 10 BP ($p = 0.62$) であり、ほとんど差が見られなかった。YM121 に対し、ゼラチン収率が 3% より低い場合に、誤差範囲内ではあるが高分子量ゼラチンの方が未ろ過ゼラチンより古い年代を示す傾向が見られることから、ゼラチン収率 3% が、限外ろ過を行うべき目安と考えられる。ゼラチン収率が 3% 以下の骨粉は、図 6 から C/N 比が 5.5 以上であり、骨粉の C/N 比 ~ 6 も、限外ろ過を行うべき目安として使えると考えられる。

5. まとめ

遺跡から出土する骨の試料調製法の違いによる ^{14}C 年代の違いを、我々の研究結果に基づいて紹介した。骨の有機質の残存状態の良い骨試料の場合は、ゼラチン抽出のみでも正しい ^{14}C 年代測定が得られるのに対し、有機質の変質・減成が起きやすい埋没環境にあった骨試料の場合、ゼラチン抽出のみでは汚染物質を完全除去することは難しく、信頼性のある ^{14}C 年代値が得られないことが多い。骨の保存状態を知る指標としてゼラチン収率があり、ゼラチン収率が 3% 以下、特に 0.7% 以下の場合には、骨ゼラチンからさらに汚染物質を除去する必要がある。アルカリ処理は、汚染物質を除去する方法として有効であるが、骨の本質成分を損失する可能性があり、XAD-2 樹脂法は樹脂の前洗浄が面倒なことを考慮すると、限外ろ過によって未変質の高分子量のゼラチンだけを分離抽出する方法は、ろ過膜の前洗浄や、ろ過時間を留意することにより、比較的簡便に汚染物質を取り除く方法として有効と考えられる。しかし、化学処理の過程を増やすと、その分、試料を汚染させる機会も増えるので、骨の保存状態に応じた、つまり、骨の有機質の残存状態に応じた、最適・最短の試料調製法を用いることが重要であると言える。

引用文献

- Brown, T.A., Nelson, D.E., Vogel, J.S., Southon, J.R. (1988) Improved collagen extraction by modified Longin method. *Radiocarbon* 30, 171–177.
- Hüls, M.C., Grootes, P. M., Nadeau, M.-J. (2007) How Clean is Ultrafiltration Cleaning of Bone Collagen? *Radiocarbon* 49, 193–200.

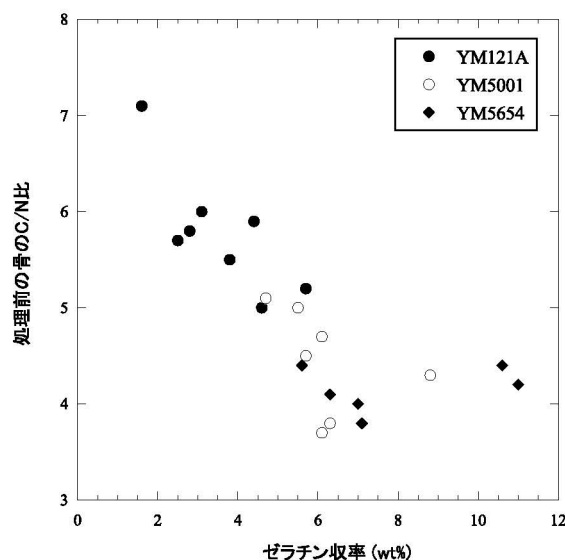


Fig. 6. Relationship between gelatin yields and C/N ratios of original bones from human individuals from a Medieval archaeological site in the Yuigahama area, Kamakura, Japan.
図6. 中世鎌倉倉比ヶ浜遺跡から出土した人骨のゼラチン収率と元の骨のC/N比の関係。

- Longin, R. (1971) New method of collagen extraction for radiocarbon dating. *Nature* 230, 241–242.
- Minami, M., Nakamura, T. (2000) AMS radiocarbon age for fossil bones by XAD-2 chromatography method. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B* 172, 462–468.
- Minami, M., Muto, H., Nakamura, T. (2004) Chemical techniques to extract organic fractions from fossil bones for accurate ^{14}C dating. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B* 223–224, 302–307.
- Minami, M., Yamazaki, K., Omori, T., Nakamura, T. (2013a) Radiocarbon dating of VIRI bone samples using ultrafiltration. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B* 294, 240–245.
- Minami, M., Sakata, K., Takigami, M., Nakamura, T. (2013b) Ultrafiltration pretreatment for ^{14}C dating of fossil bones from archaeological sites in Japan. *Radiocarbon* 55, 481–490.
- 南 雅代 (2012) ^{14}C 年代測定のための骨試料調製法. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告書 XXIII, 185–189.
- 中村俊夫・太田友子・伊庭 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書 VIII, 237–246.
- Stafford, T.W.Jr., Brendel, K., Duhamel, R.C. (1988) Radiocarbon, ^{13}C and ^{15}N analysis of fossil bone: removal of humates with XAD-2 resin. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52, 2257–2267.
- 坂田 健・南 雅代・中村俊夫・長岡朋人・平田和明 (2012) アミノ酸組成ならびに ^{14}C 年代に関する同一古人骨の部位による比較. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告書 XXIII, 86–96.
- 瀧上 舞・南 雅代・中村俊夫 (2008) 古人骨の同一個体における部位の違いによる C/N 比, $\delta^{13}\text{C}$ 値, $\delta^{15}\text{N}$ 値, ^{14}C 年代の相違. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告書 XIX, 117–126.
- 山崎香奈・南 雅代・大森貴之・中村俊夫 (2010) 限外ろ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.
- van Klinken, G.J. (1999) Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science* 26, 687–695.

日本語要旨

化石骨の ^{14}C 年代測定のための試料調製法に関する我々のこれまでの研究についてまとめた。研究に用いた骨試料は、粟津湖底遺跡の獣骨 (~4600 BP; ゼラチン収率 2–4 wt%), VIRI-E マンモスの骨 (39,305 ± 242 BP; ゼラチン収率 17 wt%), 鎌倉由比ヶ浜南遺跡から出土した中世人骨 (~750 BP; ゼラチン収率 2–11 wt%) である。粟津湖底遺跡の獣骨に対しては、信頼ある ^{14}C 年代を得るのに、限外ろ過法は有効であったが、未ろ過ゼラチンでも NaOH 処理を行ってれば、十分に正確な ^{14}C 年代が得られることが明らかになった。鎌倉由比ヶ浜中世人骨に対しては、ゼラチン収率が 3% より低い場合に、誤差範囲内ではあるが高分子量ゼラチンの方が未ろ過ゼラチンより古い年代を示す結果が得られたことから、ゼラチン収率 3% 以下の骨試料に対しては、限外ろ過を行うべきであることが示唆された。また、VIRI-E のようにゼラチン残存率が良好な骨試料に対しては限外ろ過を行う必要はなく、逆に、限外ろ過を長時間実施することにより、ろ紙からの汚染が問題となり得ることがわかった。以上の結果から、保存状態が良好で、ゼラチン残存率が高い骨試料に対して限外ろ過は必要ないが、保存状態が良好でなく、ゼラチンの残存率が悪い骨試料に対しては、限外ろ過法は信頼ある ^{14}C 年代を得るために有効であると言える。骨の有機質の残存状態に応じた、最適・最短の試料調製法を用いることが重要である。