

# 骨化石試料に対する信頼度の高い $^{14}\text{C}$ 年代、 炭素同位体比測定を試み

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

骨化石試料において正確な炭素同位体比、 $^{14}\text{C}$ 年代測定のためには、1) 元の同位体比が保存されている、2) 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のヒドロキシアパタイトや炭酸カルシウム等は、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、骨化石の炭素同位体比、 $^{14}\text{C}$ 年代測定には、化学的風化作用に対してより安定であるとされている硬タンパク質のコラーゲンが用いられてきた。しかし、大多数の骨化石は大なり小なりコラーゲン続成作用を受け、また、かなりの量のフミン酸、フルボ酸など、化石の周囲にあった堆積物からもたらされた可能性のある有機物によって汚染されている。

骨から外来の有機物を取り除く方法としては、粉碎した試料を0.8N HClで脱灰した後、残さを0.5% NaOHでリーチングし、90°Cの水でゼラチン化を行う方法が一般的に行われてきた。ところが最近、もっと効果的な処理方法として、XAD樹脂という吸着ポリマーを用いて外来の有機物を除去したり (Stafford et al., 1982, 1987, 1988)、陽イオン交換樹脂を用いてコラーゲン特有のアミノ酸を分離する方法 (Stafford et al., 1982, 1987, 1988; Gillespie et al., 1984) が行われつつある。

そこで本研究では、骨化石試料を脱灰後、加水分解し、得られたアミノ酸集合体からXAD樹脂を用いてフミン酸、フルボ酸などの不純物を取り除き、信頼度の高い $^{14}\text{C}$ 年代、炭素同位体比を測定する試みを行った。

## 2. 試料

今回試料とした骨化石は、粟津湖底遺跡の第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。粟津湖底遺跡は琵琶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いる。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、ゼラチン化を行う従来のコラーゲン抽出法 (有田ほか, 1990; 沢田ほか, 1992; 中村ほか, 1996) によって $\delta^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 年代値が出されている (中村ほか, 1997)。

## 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。図1に実験の概略図を

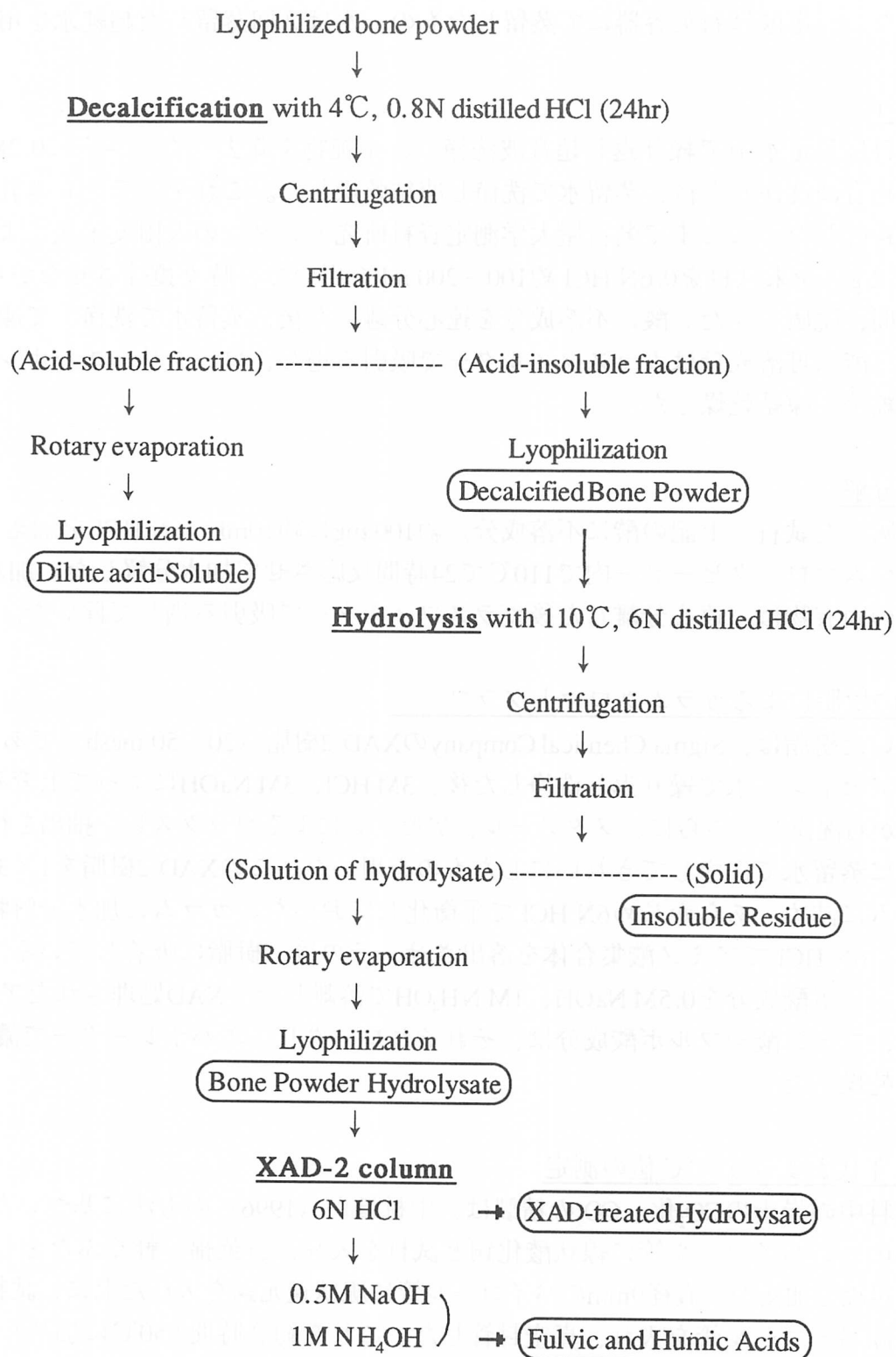


図1 実験の概略図

Figure 1 Experimental scheme

示す。なお、塩酸は石英容器にて蒸留したもの、水は2回蒸留した超純水を用いた。

### 前処理

試料は蒸留水中で繰り返し超音波洗浄し、不純物を除去した。さらに0.2M NaOH中で超音波洗浄した後、蒸留水で洗浄し凍結乾燥した。これをステンレス乳鉢を用いて粉碎した（ここまで名古屋大学測定資料研究センターの太田友子氏による）。約1~2gの粉末試料を0.6N HCl 約100~200 mlを用いて、時々攪拌させながら4℃で24時間、脱灰させた。酸に不溶成分を遠心分離した後、蒸留水で洗浄して凍結乾燥した。酸に可溶成分はガラスフィルターで吸引ろ過し、ロータリーエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥した。

### 加水分解

脱灰した試料（上記の酸に不溶成分）約100 mgに約10mlの6N HClを加え、アルミニウムブロックヒーター内で110℃で24時間反応させて加水分解した。加水分解物中の固有物は、遠心分離した後ガラスフィルターで吸引ろ過して除いた。

### XAD-2樹脂によるカラムクロマトグラフィー

用いた樹脂は、Sigma Chemical CompanyのXAD-2樹脂（20~50 mesh）である。樹脂はアセトン、水で繰り返し洗浄した後、3M HCl、3M NaOHによって上澄みを捨てながら洗浄し、さらに、メタノール、アセトンによるソックスレー抽出を行って、最後に蒸留水で洗浄してきれいにしたものを用いた。このXAD-2樹脂を1×30 cmのカラムに詰め、あらかじめ6N HClで平衡化しておいた。カラムに加水分解物を通して、6N HClでアミノ酸集合体を溶出させ、その後、樹脂に吸着しているフミン酸やフルボ酸成分を0.5M NaOH、1M NH<sub>4</sub>OHで溶離した。XAD処理されたアミノ酸成分、フミン酸やフルボ酸成分は、それぞれロータリーエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥した。

### <sup>14</sup>C年代および $\delta^{13}\text{C}$ 値の測定

試料中の炭素のCO<sub>2</sub>化、CO<sub>2</sub>の精製は、中村ほか（1996）の方法に基づいた。直径6mmの短いバイコール管に線状酸化銅と試料を入れ、石英綿で軽くふたをしてから線状銀線を加えた。直径9mmのバイコール管に線状還元銅を入れた上に、試料の入った6mmバイコール管を入れ、真空封管した。これを約2時間850℃に加熱し、生じた気体を真空ラインで精製してCO<sub>2</sub>を得た。これらのCO<sub>2</sub>を鉄-水素還元法によりグラファイト化し（Kitagawa et al., 1993）、名古屋大学年代測定資料研究センターに設置されているタンデム加速質量分析計を用いて<sup>14</sup>C年代測定を行った。なお、CO<sub>2</sub>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。

#### 4. 結果

今回は、粟津湖底遺跡、第3貝塚のAWA-10（第V層）、AWA-11（第VI層）、AWA-12（第VII層）の3骨片試料について、脱灰後の酸に不溶成分（DBPと略す）、XAD樹脂処理をしたアミノ酸集合体成分（XADと略す）、フミン酸やフルボ酸成分（Fと略す）の $\delta^{13}\text{C}$ 値と一部の $^{14}\text{C}$ 年代測定を行った。測定結果を表1に示す。

$^{14}\text{C}$ 濃度の標準体にはNBS蓼酸（RM-94）を用いた。 $^{14}\text{C}$ 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 $^{14}\text{C}$ 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 $\delta^{13}\text{C}$ 値および $^{14}\text{C}$ 年代値  
Table 1  $\delta^{13}\text{C}$  values and  $^{14}\text{C}$  dates for fossil bones from the third shell mound excavated at Awazu submarine archaeological site.

Sample	Collagen yield (%)	CO <sub>2</sub> yield (%)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$^{14}\text{C}$ age (yr BP)	Lab no. (NUTA-)
AWA-10 DBP <sup>1)</sup>	6.57	39.1	-21.0		
XAD <sup>2)</sup>	3.12	24.1	-20.2	4360±72 <sup>5)</sup>	5142
SC <sup>3)</sup>	3.00				
GC <sup>3)</sup>	2.15	44.5	-20.8	4360±80	4839
AWA-11 DBP	5.86	41.3	-21.2		
XAD	1.86	27.5	-20.4		
F <sup>4)</sup>		1.47	-27.4		
SC	2.36				
GC	1.86	38.6	-20.9	4210±80	4840
AWA-12 DBP	10.2	40.2	-23.3		
XAD	4.71	23.4	-22.6	4500±75	5150
F		1.17	-26.3		
SC	3.81				
GC	3.80	44.7	-23.0	4430±80	5077

1) DBP : Decalcified Bone Powder

2) XAD : XAD resin-treated Hydrolysate fraction

3) SC : Solution collagen fraction, 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  $^{14}\text{C}$  ages are  $1\sigma$ .

一般に、新鮮な骨から回収されたゼラチンコラーゲン (GCと略す) の炭素含有率は40~50%とされており、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、3試料ともDBPの $\delta^{13}\text{C}$ 値はGCの $\delta^{13}\text{C}$ 値に比べて0.2~0.3‰低いのに対し、XADの $\delta^{13}\text{C}$ 値はGCの $\delta^{13}\text{C}$ 値に比べて0.4~0.6‰高く、また、Fの $\delta^{13}\text{C}$ 値は-26~-27‰といった低い値を示している。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成分のため、不純物の影響を受けて $\delta^{13}\text{C}$ 値がGCに比べて低くなったと考えられる。GCはフミン酸、フルボ酸などの不純物を除去した成分であるが、XADに比べて $\delta^{13}\text{C}$ 値が高く、これら外来の炭素が完全に除去されていない可能性も考えられる。仮に、GCの $\delta^{13}\text{C}$ 値がXADとFに由来する $\delta^{13}\text{C}$ 値の重ね合わせによって得られたものであるとすると、炭素に関して、AWA-11のGCにはXADが92%、Fが8%、またAWA-12のGCにはXADが91%、Fが9%含まれている計算になる。AWA-12 XADの $^{14}\text{C}$ 年代値は $4500 \pm 75$  yr BPと、AWA-12 GCの $4430 \pm 80$  yr BPの誤差範囲内ではあるものの、若干古い年代を示している。今後、DBPやFの成分についても $^{14}\text{C}$ 年代測定を行い、検討を行っていく予定である。

今回の結果から、保存性のよい骨化石試料については、従来のゼラチン抽出法によって得られた $^{14}\text{C}$ 年代値はかなり信頼度が高いと考えられる。しかし、保存性が悪くゼラチンコラーゲンの含有率が低い骨化石試料に対しては、従来法による $^{14}\text{C}$ 年代測定は困難であると考えられる。今回試みたXAD吸着樹脂を用いる方法は、外来の炭素を取り除いて信頼度の高い $^{14}\text{C}$ 年代値を得るのに有効である可能性が示唆された。

## 5. おわりに

コラーゲンを加水分解し、XAD樹脂処理をして得られたアミノ酸集合体を個々のアミノ酸まで分離し、各アミノ酸の $^{14}\text{C}$ 年代を測定することにより、さらに外来の炭素の汚染の少ない信頼度の高い年代が得られるものと考えられる。アミノ酸集合体は陽イオン交換樹脂によって、炭素の同位体分別なしに個々のアミノ酸に分離されることが確かめられている (Macko et al., 1987; Minagawa et al., 1992)。今後、骨化石試料のコラーゲンを個々のアミノ酸まで分離し、各アミノ酸の $^{14}\text{C}$ 年代を求めていく予定である。

## 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、当研究をはじめにあたって貴重な助言を頂きました。真空ラインにおける $\text{CO}_2$ の精製、 $\text{CO}_2$ のグラフアイト化など、実験方法に関しては名古屋大学年代測定資料研究センターの太田友子氏に、また炭素同位体比測定に際しては、同センターの青木浩氏にお世話になりました。記して謝意を表します。

## 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 $^{14}\text{C}$ 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.
- Kitagawa, H., Masuzawa, T., Nakamura, T. and Matsumoto, E. (1993) A batch preparation method for graphite targets with low background for AMS  $^{14}\text{C}$  measurements. *Radiocarbon*, **35**, 295-300.
- Macko, S. A., Estep, M. F., Hare, P.E. and Hoering, T. C. (1987) Isotope fractionation of nitrogen and carbon in the synthesis of amino acids by microorganisms. *Chem. Geol.*, **65**, 79-92.
- Minagawa, M., Egawa, S., Kabaya, Y. and Karasawa-Tsuru, K. (1992) Carbon and nitrogen isotope analysis for amino acids from biological sample. *Mass Spectroscopy*, **40**, 47-56.
- 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 $^{14}\text{C}$ 測定における炭素同位体分別の補正について— $^{14}\text{C}$ 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 $^{14}\text{C}$ 年代測定. 地学雑誌, **105**, 306-316.
- 中村俊夫 (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**. (in press)
- 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 $^{14}\text{C}$ 年代測定による野尻湖層の編年. 地球科学, **46**, 133-142.
- Stafford, T. W. JR., Duhamel, R. C., Haynes, C. V. JR. and Brendel, K. (1982) Isolation of proline and hydroxyproline from fossil bone. *Life Sci.*, **31**, 931-938.
- Stafford, T. W. JR., Jull, A. J. T., Brendel, K., Duhamel, R. C. and Donahue, D. (1987) Study of bone radiocarbon dating accuracy at the University of Arizona NSF accelerator facility for radioisotope analysis. *Radiocarbon*, **29**, 24-44.
- Stafford, T. W. JR., Brendel, K. and Duhamel, R. C. (1988) Radiocarbon,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  analysis of fossil bone: Removal of humates with XAD-2 resin. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **52**, 2257-2267.

# An attempt on accurate radiocarbon and carbon isotope measurements of fossil bone

Masayo MINAMI and Toshio NAKAMURA

(Dating and Materials Research Center, Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan)

## Abstract

Accurate radiocarbon ( $^{14}\text{C}$ ) and carbon isotope measurements on fossil bones require that all exogenous carbon be removed. To remove the foreign organic carbon and obtain reliable  $^{14}\text{C}$  ages from bones, XAD-2 chromatography method was examined. The fossil bones used in the experiment were bone fragments collected from the Awazu submarine archeological site. The bone samples were demineralized with  $4^\circ\text{C}$ , 0.8N HCl and the acid-insoluble residue was concentrated by centrifugation and lyophilized. The demineralized bone powder was hydrolysed with 6N HCl at  $110^\circ\text{C}$ . Solids were removed by centrifugation before the filtered hydrolysate was passed through the XAD-2 resin to remove fulvic and humic acids.

$\delta^{13}\text{C}$  values and  $^{14}\text{C}$  ages for three fractions of decalcified bone powder, XAD-treated hydrolysate, and fulvic and humic acids in demineralization – hydrolysis – XAD treatment procedure. XAD-purified hydrolysates have more positive  $\delta^{13}\text{C}$  values and older  $^{14}\text{C}$  ages than gelatin collagen extracted by conventional method. The  $\delta^{13}\text{C}$  values in fulvic and humic phases are significantly more negative than collagen fractions.

Conventional collagen extraction method is sufficient for  $^{14}\text{C}$  dating on well-preserved bones but insufficient on poorly-preserved bones, because the method does not totally remove exogenous organic carbon. XAD-2 resin is recommended for accurate  $^{14}\text{C}$  and carbon isotope measurements.

**Key words** : fossil bone, collagen, hydrolysis, XAD-2 resin,  $^{14}\text{C}$  age,  $\delta^{13}\text{C}$  value

Awazu submarine archeological site