

## 限外濾過調製法を用いた骨ゼラチンの<sup>14</sup>C年代測定 Radiocarbon dating of bone gelatin using ultrafiltration protocol

山崎 香奈<sup>1</sup>・南 雅代<sup>2</sup>・大森 貴之<sup>3</sup>・中村 俊夫<sup>2</sup>

Kana YAMAMZAKI<sup>1\*</sup>・Masayo MINAMI<sup>2</sup>・Takayuki OMORI<sup>3</sup>・Toshio NAKAMURA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学理学部・<sup>2</sup>名古屋大学年代測定総合研究センター・<sup>3</sup>名古屋大学大学院環境学研究科

<sup>1</sup>Faculty of Science, Nagoya University, Nagoya, 464-8602, Japan

<sup>2</sup>Center for Chronological Research, Nagoya University, Nagoya, 464-8602, Japan

<sup>3</sup>Graduate School of Environmental Studies, Nagoya, 464-8601, Japan

### Abstract

Bone is one of the most widely used materials for archaeological dating. It is also relatively difficult to be efficiently pretreated, and so new methods for pretreatment have been tried actively. Ultrafiltration of bone gelatin is thought to be effective in reducing environmental contamination from soil-derived amino acids as well as degraded gelatin or other short-chain proteins in many laboratories. To study effects of this method on <sup>14</sup>C age, we analyzed various fractions of collagen (acid-soluble collagen, gelatin, high molecular weight gelatin and low molecular weight gelatin), which are extracted by decalcification and ultrafiltration. We found that the low molecular weight gelatin often has different values of isotope ratios and contents of carbon and nitrogen from the other fractions. Therefore, the low molecular weight gelatin could decrease the precision and the accuracy of <sup>14</sup>C dating for bone gelatin.

*Keywords: radiocarbon dating; bone gelatin; ultrafiltration*

キーワード: 放射性炭素年代測定法; 骨ゼラチン; 限外濾過

### はじめに

遺跡などから出土する骨は当時の生活環境など考古学に重要な情報を多数保持している。これらの情報に欠かすことのできない時間軸を加える目的で骨の<sup>14</sup>C年代測定が行われる。骨の無機成分は土壤中で容易に交換または分解されやすく、正確な<sup>14</sup>C年代測定には適さない。そのため、多くの研究機関で化学的風化作用に安定な硬タンパク質の骨ゼラチンが用いられてきた。しかし、骨ゼラチンも腐植酸などの外来有機物に汚染されていることが多く、これらもまた測定される年代値をずらしかねない。限外濾過調製法は、<sup>14</sup>C年代測定を行うために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調製法で、最初にBrown et al. (1988)<sup>1)</sup>によって提言されたものである。この調製法を取り入れることにより分解したゼラチンや外来有機物が除外され正しい<sup>14</sup>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、近年注目を集めている<sup>2,3)</sup>。本研究では、限外濾過で除外される低分子量のゼラチン成分が<sup>14</sup>C年代値に与える影響を調べることで限外濾過が正確な<sup>14</sup>C年代測定に有効かどうかの検討を行った。

## 試料

今回使用した骨試料は、第 5 回放射性炭素国際比較 (VIRI: The Fifth International Radiocarbon Inter-comparison) の骨試料 (Sample E, F, G, I) と、鎌倉由比ヶ浜南遺跡から出土した人骨試料 (埋葬遺構 18B 東, 18B 西) である。

### (1) Sample E: マンモス骨

Quartz Creek 遺跡で出土したマンモスの骨盤部分。本研究では骨の緻密質のうち、茶色に変色した外側部分と変色していない内側部分とを分けて分析した。合意値は  $39,305 \pm 121$  BP。

### (2) Sample F: 馬骨

シベリアにあるスキタイの埋葬地の1つから出土した馬骨。合意値は  $2,513 \pm 5$  BP。

### (3) Sample G: 人骨

青年期の女性。合意値は  $969 \pm 5$  BP。

### (4) Sample I: クジラ骨

スバルバル諸島の Svenskoya 島の海岸から出土したクジラの顎骨。合意値は  $8,331 \pm 6$  BP。

### (5) 18B 東: 人骨

鎌倉由比ヶ浜南遺跡の単体埋葬から出土した壮年期の女性。

### (6) 18B 西: 人骨

18B 東と同一の単体埋葬から出土した壮年期の男性。

## 実験方法

骨試料は蒸留水中で繰り返し超音波洗浄し、さらに 0.2M NaOH 中で超音波洗浄したあと凍結乾燥してステンレス乳鉢で粉碎した。脱灰は 2 種類の方法 (脱灰 A, B) で行った。脱灰 A では、骨粉末をセルロースチューブに封入し 0.1M の塩酸の入ったビーカーに入れて脱灰した。脱灰終了後、ビーカー内の塩酸を蒸留水にかえて透析を行い、セルロースチューブの内容物を遠心分離し酸可溶成分 (酸可溶コラーゲン) と不溶成分とに分けて凍結乾燥した。脱灰 B では、遠沈管に直接骨粉末と 0.6M の塩酸を入れて脱灰した。脱灰終了後は遠沈管の内容物を遠心分離し、酸可溶成分と酸不溶成分とに分けて凍結乾燥した。さらに、両脱灰後の酸不溶成分に蒸留水を加えて 90°C で一晚ゼラチン抽出を行い、遠心分離してその上澄み凍結乾燥した。抽出したゼラチンの一部を限外濾過した。限外濾過に用いる遠沈管 (Vivaspin™6, 30kDMWCO [molecular weight cut off]) の洗浄と限外濾過の方法は主として Ramsey et al. (2004)<sup>2)</sup> の方法に基づいた。ピバスピンは蒸留水を 2 度遠心分離した後、蒸留水中で繰り返し超音波洗浄し再び蒸留水を遠心分離して洗浄を行なった。限外濾過はゼラチン 50-60mg を蒸留水約 5ml に溶かして行い、上液が 1-2ml ほどに減少するまで 3000rpm で遠心分離した (2.5h-17h)。ただし、長時間遠心分離することによる新たな汚染の混入を避ける目的で、一部の試料において本研究独自の 2 つの方法 (上液残量に関わらず 2.5 時間の遠心分離で限外濾過を終了する方法と限外濾過するゼラチン量を通常約半分減らして行う方法) で限外濾過した。限外濾過後、その上液 (高分子量ゼラチン) と下液 (低分子量成分) をそれぞれ凍結乾燥した。

酸可溶コラーゲン、ゼラチン、高分子量ゼラチン、低分子量ゼラチンの 4 成分について、それぞれ酸化銅、還元銅、銀線とともに石英管に真空封管して 850 度で加熱し、真空ラインを用いて生じた気体を N<sub>2</sub> と CO<sub>2</sub> に精製した。N<sub>2</sub> の精製は、線状モレキュラシーブス (13X, 1/16) に吸着させる方法で行った。CO<sub>2</sub> については、<sup>14</sup>C 年代測定用と安定同位体比測定用に 2 分割した。<sup>14</sup>C 年代測定用の CO<sub>2</sub> は、鉄触媒を用いて水素還元してグラファイトに変え、名古屋大学年代測定総合研究センターに設置されているタンデム加速器質量分析計 (High Voltage Engineering Europe Model 4130-AMS) により <sup>14</sup>C 年代測定を行った。炭素およ

び窒素安定同位体比は気体用質量分析計 (Finnigan MAT-252) により測定した。また、ゼラチンと高分子量ゼラチンについては、炭素および窒素含有率を元素分析計 (CE Instruments NC2500) により測定した。

## 結果と考察

図 1 から図 6 に各成分の測定結果 (炭素含有率, 窒素含有率, C/N モル比,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ ,  $^{14}\text{C}$  age) の関係を試料ごとに示す。図中の SC は酸可溶コラーゲン, GC は限外濾過を施すまえ前の骨ゼラチン, highGC は骨ゼラチンを限外濾過した結果上液中に残った高分子量ゼラチン, lowGC は限外濾過膜を通過した低分子量成分を示す。炭素含有率は, 元素分析計で測定した値の他に, 燃焼して生じる  $\text{CO}_2$  量から算出したおおよその値も並べて示した。 $^{14}\text{C}$  年代測定の標準体には NIST-HOx II を用い,  $^{14}\text{C}$  年代値は Libby の半減期 5568 年を用いて算出した。測定誤差は  $1\sigma$  で示した。

### (1) 炭素および窒素含有率 (図 1 および 2)

ゼラチンの炭素含有率は, 元素分析計で測定した値と燃焼して生じた  $\text{CO}_2$  量から算出した値とが数%の範囲内で一致していることから, 後者の値も信頼できる値であることがわかる。したがって, 量の少なから元素分析計での測定が行なえなかった酸可溶コラーゲンおよび低分子量成分の炭素含有率は, 生じる  $\text{CO}_2$  量から算出した値を用いて考察を行なった。一般的にゼラチンの炭素および窒素含有率はそれぞれ約 40 wt.% と約 15 wt.% である。どの試料においても, ゼラチンと高分子量ゼラチンの含有率はその許容範囲内に収まっているため, 骨からのゼラチン抽出が正しく行われたことがわかる。濾過前後のゼラチンと比較すると, ほとんどの試料で濾過前のゼラチンよりも濾過後の高分子量ゼラチンの両含有率が高い。また, ほとんどの試料で酸可溶コラーゲンおよび低分子量成分の炭素含有率がゼラチンよりも低い。この要因は, 酸可溶コラーゲンや低分子量成分が空気中の水分を含みやすいことと, ゼラチン中に残留した金属イオンや塩素が限外濾過で低分子量成分側に分離されることにある。水分を含みやすい性質は, これら2成分が凍結乾燥後でも封を開けるとすぐに空気中の水分を吸収し粘着質になることから判断できる。水分を含みやすい成分は, 埋葬土壌中や試料調製の過程で細かく分解したコラーゲンやゼラチンか, 親水基を多くもつ腐植酸等の外来有機物である可能性が高く, 試料調製中も外からの汚染を受けやすい。したがって, 限外濾過でこれらの成分を取り除くことでより正確な  $^{14}\text{C}$  年代測定が可能になると考えられる。金属イオンや塩素が低分子量成分側に分離されることは, 燃焼後の石英管を見るとわかる (図 7)。ほとんどの石英管の内壁が白く変色しているのに対し, 濾過後の高分子量ゼラチンの石英管はもとの透明な状態をよく保っている。石英管内壁の変色は, 脱灰の際に高濃度の塩酸を使用した試料の際に特に顕著に見られることから, 燃焼する成分に付着した金属イオンや塩素が原因と考えられる。これらは直接  $^{14}\text{C}$  年代をずらすことはないが燃焼中に石英管の破損を生む原因となるため, 限外濾過で取り除くことでより効率の良い  $^{14}\text{C}$  年代測定が可能となる。

### (2) C/N モル比 (図 3)

ゼラチンの C/N 比は, モル比で 2.9-3.5 が許容範囲である<sup>4)</sup>。限外濾過前のゼラチンおよび濾過後の高分子量ゼラチンの C/N 比はともにこの範囲内に収まっており, さらに, 両者に明瞭な差は見られない。フミン酸やフルボ酸等の腐植物質は比較的高い C/N 比 (モル比で約 10-50) を持ち, ゼラチンの 10 wt.% 程度に相当する腐植物質が限外濾過で取り除かれた場合にはゼラチンの C/N 比に影響を与える。今回の実験では, 限外濾過で除外された低分子量成分は濾過前のゼラチンの約 5-10 wt.% だったことから, 低分子量成分内の腐植物質が占める割合は高くなかったことがわかる。一方, 脱灰方法と比較すると, ほとんどの試料において脱灰 A で抽出したゼラチンは脱灰 B のものより C/N 比が高くなる傾向が示された。低濃度 (約 0.4M 未満) の塩酸で脱灰すると高濃度 (約 0.4M 以上) の塩酸で脱灰したときよりもゼラチン C/N 比が高く

なる傾向はこれまでも確認されており<sup>5)</sup>, 低濃度の塩酸で行う脱灰ではゼラチンに腐植物質が残留することが懸念されていた。しかし, 本研究で, 限外濾過をしてもその C/N 比に変化が生じなかったことから, C/N 比に影響を与えているのは腐植物質の残留よりも脱灰時の塩酸濃度によって異なるゼラチンのアミノ酸組成である可能性が示唆される。

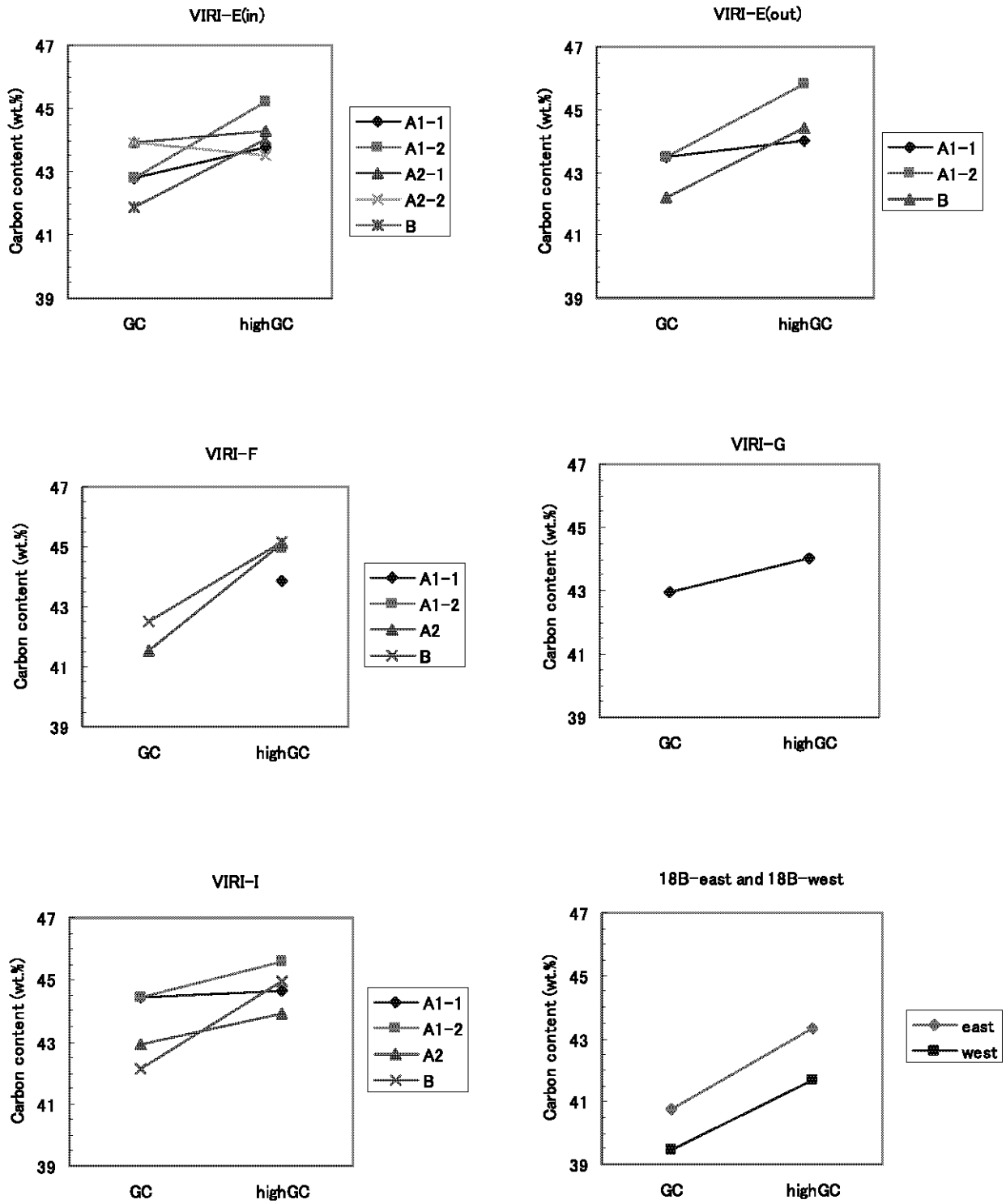


図1 炭素含有率 (wt.%)

Fig. 1 Carbon content (wt.%)

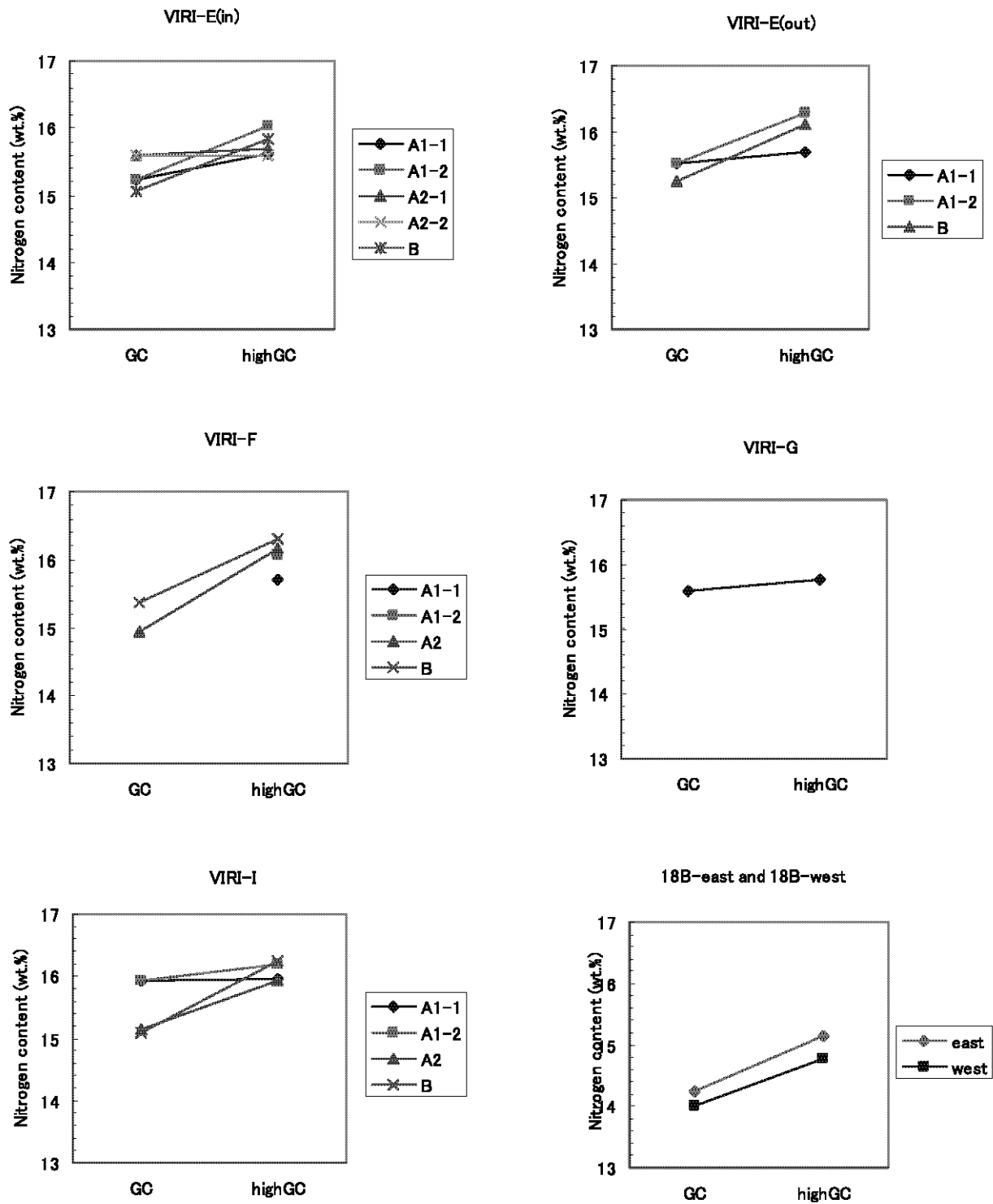


図 2 窒素含有率 (wt.%)

Fig. 2 Nitrogen content (wt.%)

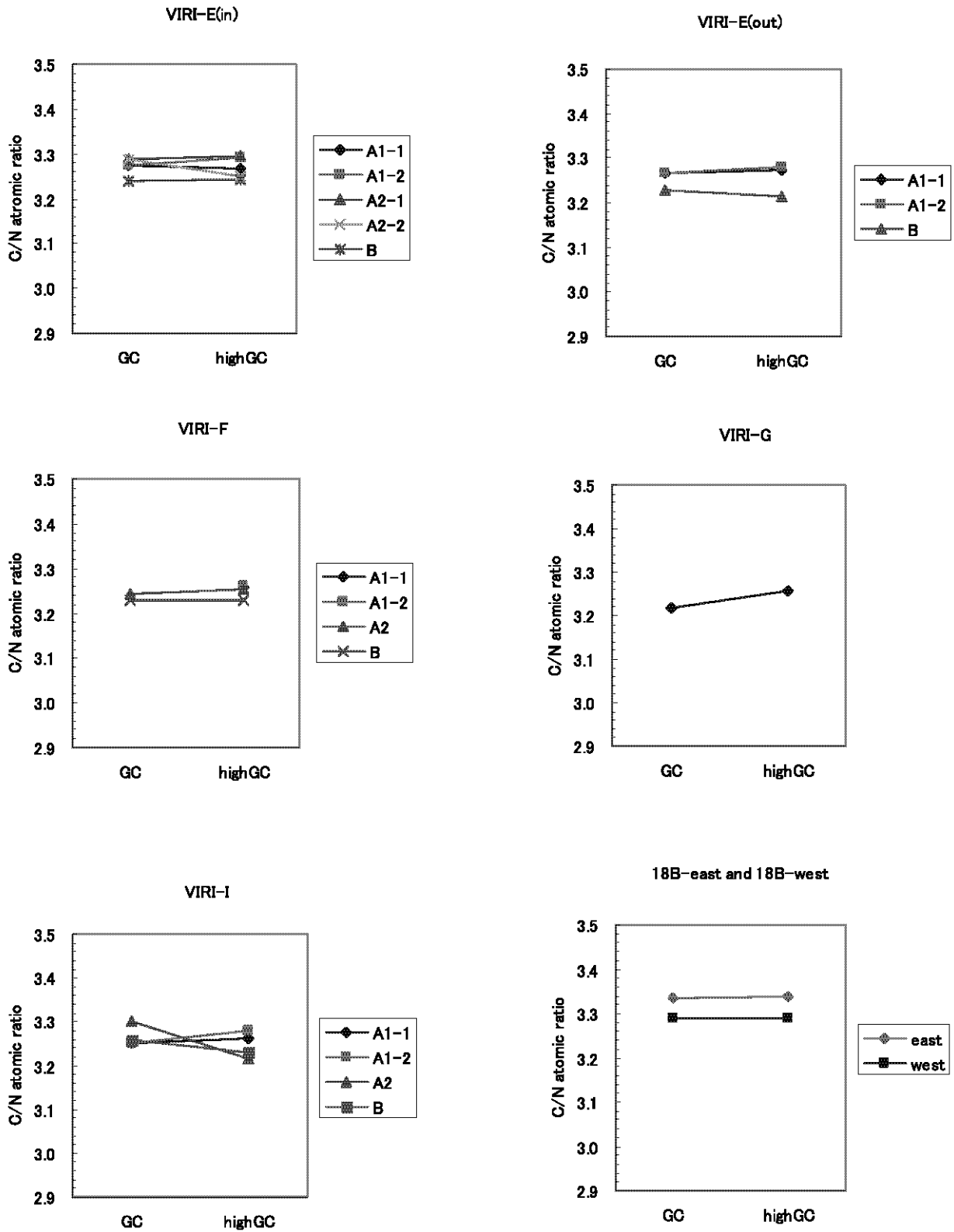


図3 C/N モル比

Fig. 3 C/N atomic ratio

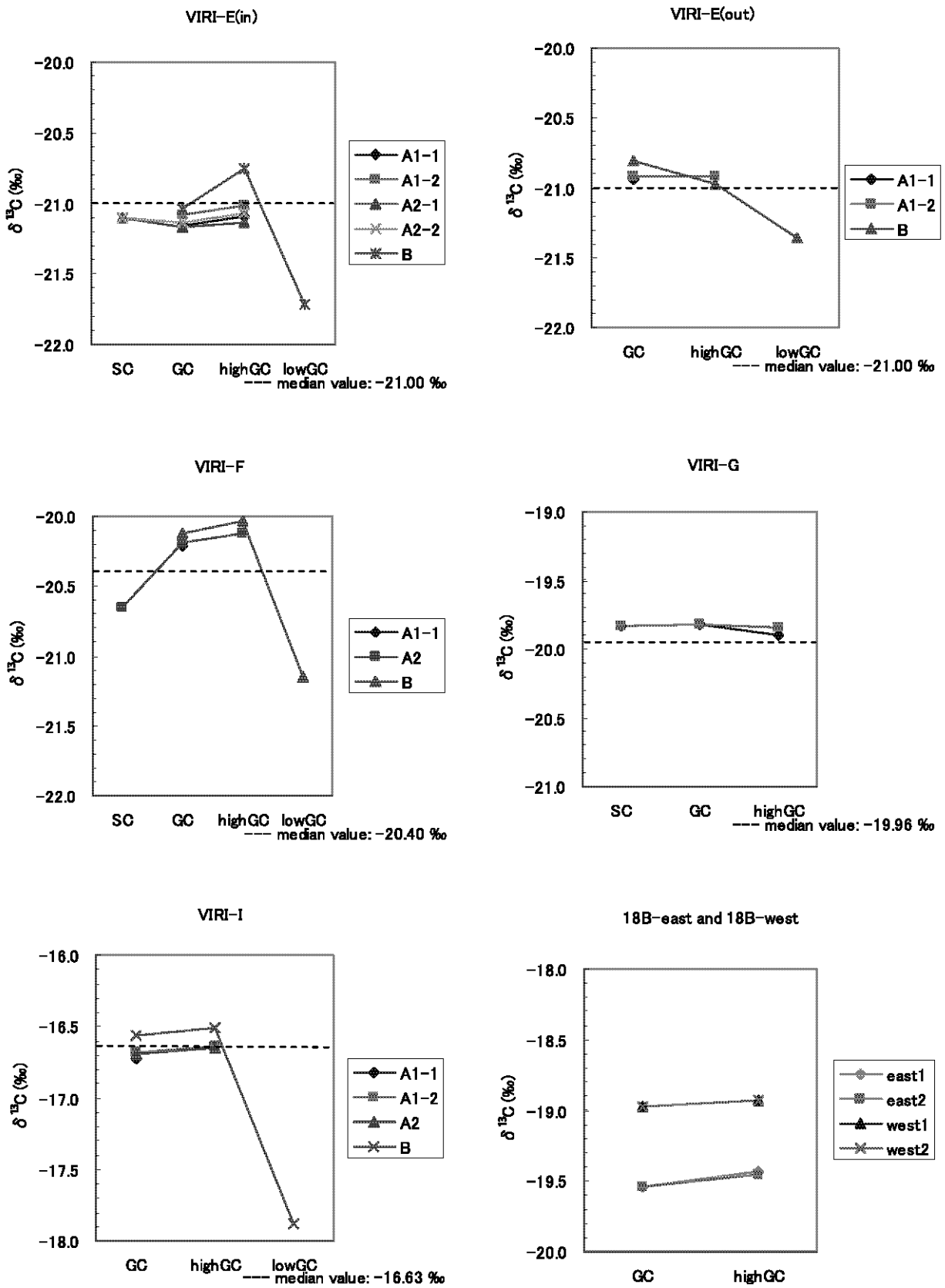


図4 炭素安定同位体比 (‰) とVIRIにおける中央値

Fig. 4 Carbon stable isotope ratio (‰) vs. PDB and median values on VIRI

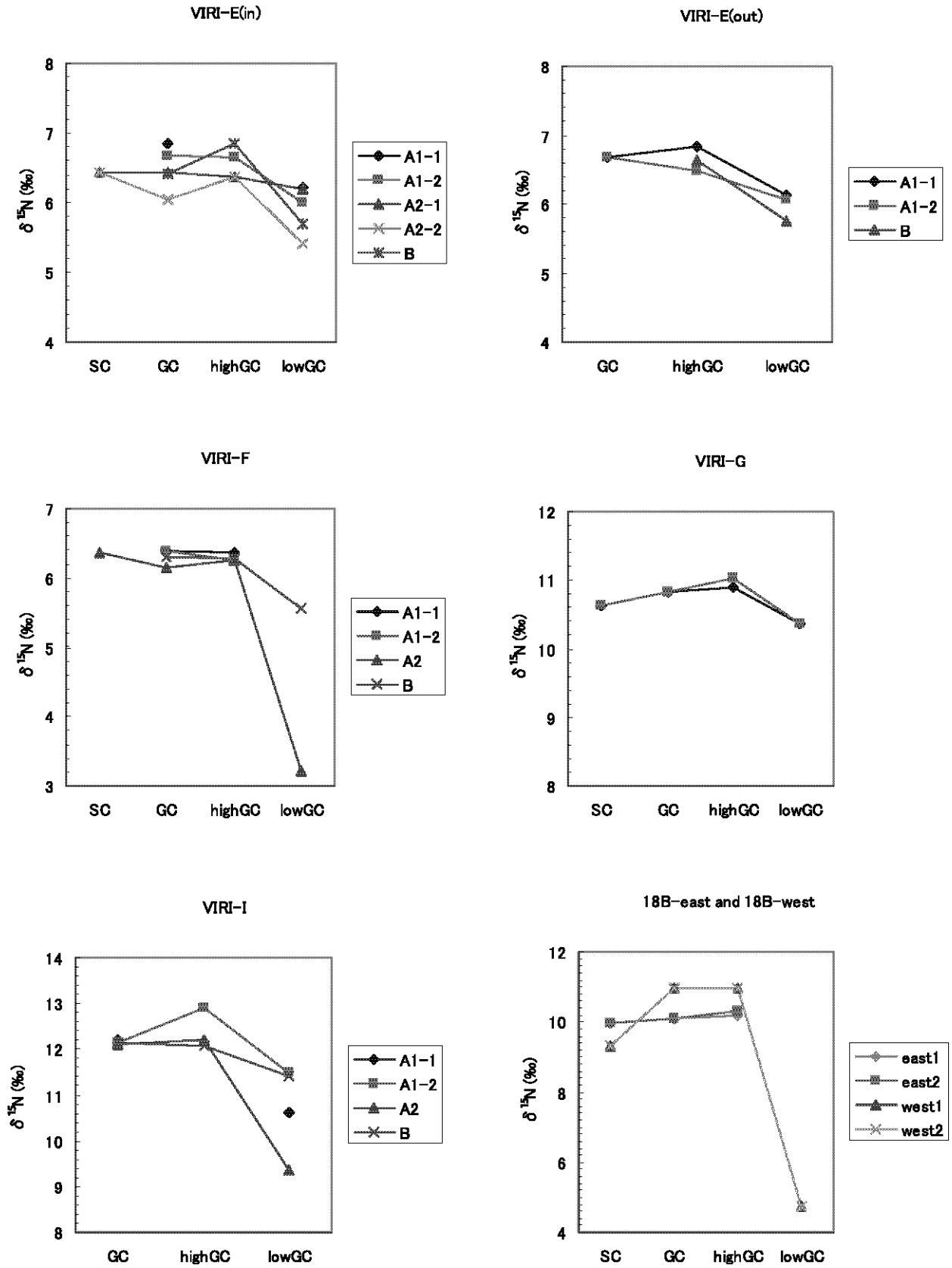


図5 窒素安定同位体比 (‰)

Fig.5 Nitrogen stable isotope ratio (‰) vs. AIR



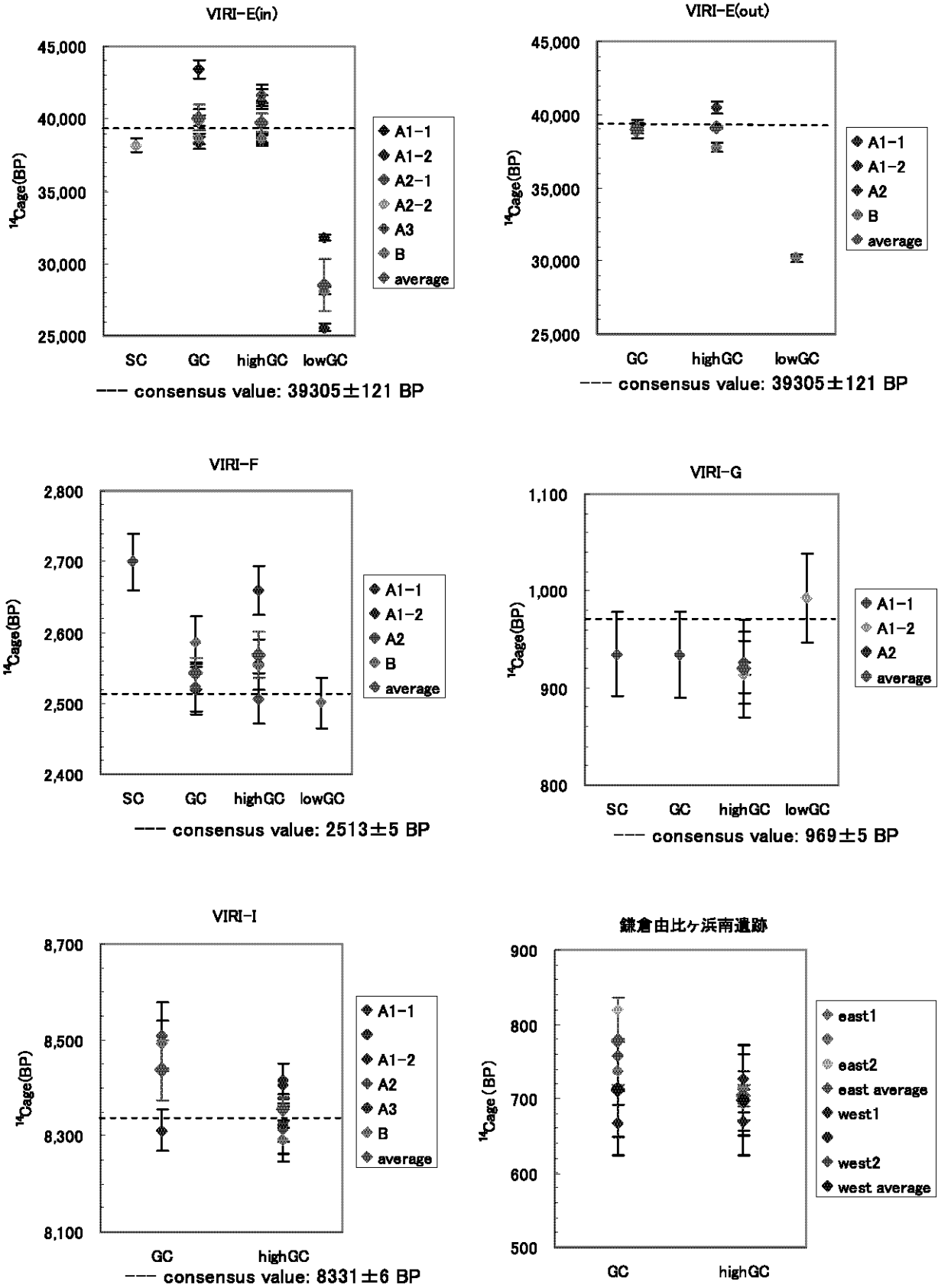


図 6  $^{14}\text{C}$  年代値 (BP) と VIRI における中央値

Fig.6  $^{14}\text{C}$  age (BP) and consensus values from VIRI



図 7 VIRI-G の燃焼後の石英管. 左から SC, GC1, GC2  
highGC1, highGC2, lowGC.

Fig. 7 The combusted quartz tubes for VIRI-G

From the left to right:

SC, GC1, GC2, highGC1, highGC2 and lowGC.

### (3) 炭素および窒素安定同位体比 (図 4 および 5)

炭素安定同位体比は PDB 標準体の  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  比からの偏差として,

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = [ (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{sample}} / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB standard}} - 1.0 ] \times 1000 (\text{‰})$$

で定義される. また, 窒素安定同位体比は大気中の  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  比からの偏差として,

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} = [ (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{sample}} / (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{AIR standard}} - 1.0 ] \times 1000 (\text{‰})$$

で定義される. 測定誤差は共に  $\pm 0.1\text{‰}$  である. 骨ゼラチンの炭素および窒素安定同位体比はその動物の食性によって決まり, 食性復元や古環境復元に利用されている<sup>6,7</sup>. 全試料のゼラチンにおいて, 食性から推測される範囲と調和的な同位体比が得られた. また, VIRI 試料のゼラチンの炭素安定同位体比は VIRI で得られた中央値とほぼ一致した. このことから, すべての試料で正しくゼラチン抽出と燃焼後の  $\text{CO}_2$  および  $\text{N}_2$  の精製が行われたと考えられる. また, 濾過前のゼラチンと高分子量ゼラチンの値に不自然な相違が見られないことから, 限外濾過によって新たに加わった汚染が小さかったことがわかる. 酸可溶コラーゲンの同位体比はゼラチンと同程度だが, 低分子量成分の同位体比はほとんどの試料でゼラチンの許容範囲を超えて小さい. また, そのことを反映して高分子量ゼラチンの値は濾過前のゼラチンよりもわずかに大きい. 低分子量成分がゼラチンと異なる同位体比をもつことはゼラチンとは起源の異なる成分を含んでいることを示しており, さらに, その割合は酸可溶コラーゲンよりも高いと推測される. さらに, 植物由来の物質の同位体比が動物がもつ値より小さいことから(ただし, C4植物の炭素安定同位体比を除く), 低分子量成分に含まれる異物として土壌埋葬中の腐植酸等が考えられる. 今回使用したゼラチン含量の高い骨にも少量ではあるがこのように起源の異なる成分が含まれていることから, 多くの骨試料の  $^{14}\text{C}$  年代測定および安定同位体比分析に限外濾過調製法が有効に働くだろう.

### (4) $^{14}\text{C}$ 年代 (図 6)

VIRI の中央値とゼラチンの測定結果は, 誤差範囲を考慮するとおおよそ一致したといえる. VIRI は参

加した研究機関のほとんどが限外濾過をしない従来の試料調製を行なったため、特に低分子量成分がゼラチンと異なる年代をもつ VIRI-E および G では真の年代値と VIRI の中央値との間に有意な差が存在する可能性が高い。VIRI-E や I のような年代の古い骨では測定誤差範囲を超える値の不一致が生じたが、高分子量ゼラチンの測定では濾過前のゼラチンよりもそれが少なく比較的再現性の良い年代値が得られた。また、鎌倉由比ヶ浜南遺跡で出土した2体の人骨は同一の単体埋葬から出土したことから同じ年代値をもつと推測されるが、2体のゼラチンの年代値は誤差範囲内で一致し、高分子量ゼラチンの年代値はさらによく一致した。このように、濾過前のゼラチンよりも濾過後の高分子量ゼラチンで再現性のよい年代値が得られたことは、限外濾過することでゼラチン中に含まれる異なる年代値をもつ外来物や分解されて年代値のずれたゼラチン成分が除外されゼラチンが純化されたことが要因と考えられる。さらに、変色が見られた VIRI-E 外は低分子量成分と同様に、VIRI-E 内のゼラチンのよりもわずかに若い年代値を示した。このことは、化学的風化作用を受けた骨も、ゼラチンを限外濾過して低分子量成分を除外すれば測定される年代値を真の値に近づけることが可能であることを示唆している。酸可溶コラーゲンは安定同位体比と同様に年代値においても、低分子量成分との共通性はほとんど見られない。また、全試料の高分子量ゼラチンの年代値に異常な値は見られなかったことから、限外濾過がゼラチンに加えた汚染は古い年代値にも若い年代値にも影響を与えないほど小さいことがわかる。

#### (5) 脱灰条件が限外濾過に与える影響

0.6M-HCl による脱灰 B を行ったゼラチンの限外濾過は、0.1M-HCl による脱灰 A を行ったゼラチンよりもはるかに短時間で行うことができる。また、脱灰 B のゼラチンのほうが脱灰 A のゼラチンよりも低分子量成分の占める割合が高い。これらの傾向は、脱灰の塩酸濃度が高いほどゼラチンの加水分解が進み、濾過膜の目詰まりが起こりにくくなることが要因である。したがって、ゼラチン含量の高い骨試料では高濃度の塩酸で脱灰を行うことによって、効率の良い限外濾過を行うことができる。

#### (6) 限外濾過条件が年代値に与える影響

VIRI-E 内および F は他と比べて濾過速度が遅く時間を要する試料で、両者は共通して他試料よりも高分子量成分での  $^{14}\text{C}$  年代値のばらつきが目立った。このことから、濾過速度の遅い試料はフィルターが目詰まりによってゼラチンの濾過が十分になされない可能性が示唆され、濾過時間を短縮するための限外濾過条件を検討する必要がある。上液残量に関わらず 2.5 時間の遠心分離で限外濾過を終了する方法では、限外濾過が通常の限外濾過の場合と同程度になされているかどうかの検討が重要であるが、通常の場合と同様に濾過後のゼラチンで炭素および窒素含有率が増加し、安定同位体比は低分子量成分が小さく濾過後のゼラチンの値が濾過前のゼラチンの値よりやや大きくなる傾向が見られた(E 外以外の VIRI 試料)。また年代値にも大きな違いは生じなかった。したがって、上液が 1ml 程度まで減る前に限外濾過を終了しても低分子量成分は同様に除去されゼラチンの同位体比や  $^{14}\text{C}$  年代値に影響を与えないと考えられる。しかし、特に  $^{14}\text{C}$  年代値については限外濾過の影響を受けやすい汚染の進んだ骨試料を用いて同様に検討を行う必要がある。ゼラチン量を半分程度に減らして限外濾過する方法では、ゼラチンが少ない分濾過膜の目詰まりも生じにくく、通常の半分程度の時間で限外濾過を施すことができた(VIRI-I-A2)。また、濾過するゼラチン重量が数割程度減れば濾過時間を短縮できる傾向がみられる(VIRI-E 内および F)。つまり、一度に限外濾過するゼラチン重量は脱灰時の塩酸濃度と同様に限外濾過に要する時間を左右する重要な因子になりうる。したがって、ゼラチン含量が低く高濃度の塩酸で脱灰を行えない骨試料では、低濃度の塩酸で脱灰する代わりに限外濾過するゼラチン重量を減らすことで効果的に限外濾過できると考えられる。

## まとめ

限外濾過調製法は、ゼラチンを限外濾過することで外来有機物や汚染されたゼラチン成分を低分子量成分として取り除くことができ、より正確な  $^{14}\text{C}$  年代測定が可能となると考えられている。本研究ではこのことを確かめるために、限外濾過で除外される低分子量成分に着目し低分子量成分が  $^{14}\text{C}$  年代値に与える影響について検討を行った。

汚染された成分として酸可溶コラーゲンについてもゼラチン成分と同様に分析を行ったが、炭素含有率以外の同位体比および  $^{14}\text{C}$  年代値ではゼラチンと類似する傾向を示した。このことはゼラチン含量の高さと同様に、使用した骨試料の保存状態の良さを示している。ところが、ゼラチンから限外濾過によって除外された低分子量成分はほとんどの分析結果でゼラチンとは異なる傾向を示し、ゼラチンとは起源の異なる成分を含んでいることが確認された。このような異物が保存状態の良い VIRI 試料から抽出したゼラチン中にも存在することから、多くの骨の同位体比分析および  $^{14}\text{C}$  年代測定で限外濾過調製法が有効に働くと考えられる。

また、低濃度の 0.1M-HCl で脱灰したゼラチンの限外濾過は、濾過膜の目詰まりが生じ長時間を要することが多いため新たな汚染の混入が懸念されるが、この問題点は濾過するゼラチン量を減らすことで解決できる。今後は、より効果的に限外濾過するために、脱灰および限外濾過の最適条件についてさらに詳細な検討が必要である。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、名古屋大学年代測定総合研究センターの皆様にご助言をいただき大変お世話になりました。心より感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Brown TA, Nelson DE, Vogel JS, Southon JR. 1988. Improved collagen extraction by modified Longin method. *Radiocarbon* 30(2):171–177.
- 2) Bronk Ramsey C, Higham TFG, Bowles A, Hedges REM. 2004. Improvements to the pretreatment of bone at Oxford. *Radiocarbon* 46(1):155–163.
- 3) Higham TFG, Jacobi RM, Bronk Ramsey C. 2006. AMS radiocarbon dating of ancient bone using ultrafiltration. *Radiocarbon* 48(2):179–195.
- 4) Van Klinken GJ. 1999. Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science* 26 (6):687–695.
- 5) Minami M, Muto H, Nakamura T. 2004. Chemical techniques to extract organic fractions from fossil bones for accurate  $^{14}\text{C}$  dating. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 223–224:302–307.
- 6) Van der Merwe NJ and Vogel JC. 1978.  $^{13}\text{C}$  content of human collagen as a measure of prehistoric diet in Woodland North America, *Nature* 276:815–816.
- 7) DeNiro MJ and Epstein S. 1980. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45:341–351.

- 8) Jacobi RM and Higham TFG. 2008. The “Red lady” ages gracefully: new ultrafiltration AMS determinations from paviland. *Journal of Human Evolution* 55:898-907.
- 9) Van Klinken GJ, Bowles AD, Hedge REM. 1994. Radiocarbon dating of peptides isolated from contaminated fossil bone collagen by collagenase digestion and reversed-phase chromatography. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 58, No. 11:2543-2551.
- 10) Sellstedt H, Engstrand L, Gejvall NG. 1966. New application of radiocarbon dating to collagen residue in bones. *Nature* 212:572-574
- 11) Minami M and Nakamura T. 2000. AMS radiocarbon age for fossil bone by XAD-2 chromatography method. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 172:462-468.
- 12) Longin R. 1971. New method of collagen extraction for radiocarbon dating. *Nature* 230:241-242.