

骨試料の年代測定

南 雅代*

Dating of fossil bones

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

はじめに

遺跡から出土する骨は、さまざまな情報を直接我々に与えてくれる非常に貴重な媒体である。例えば、骨中の放射性炭素 (^{14}C) からは年代を、炭素・窒素同位体比からは当時の人の食性を、古DNA解析やストロンチウム同位体比からは民族の系統や伝播などの情報を得ることができる。骨を用いた年代測定や食性解析を行う場合、土壌中で容易に交換または分解されやすい骨無機質(大部分がヒドロキシapatiteで構成される)より、化学的風化作用に比較的強い有機質の硬タンパク質コラーゲンを用いるほうが、信頼度の高い情報を引き出せるとされる。しかし、骨コラーゲンにおいても、土壌中に埋没している間に、多かれ少なかれフミン酸やフルボ酸といった外来有機物に汚染され、続成作用によって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、骨コラーゲンの分析を行う際は、適切な方法で化学処理し、骨の本質的な情報のみを抽出してやる必要がある。

ここでは、骨試料の年代測定法のうち ^{14}C 年代測定に絞って、 ^{14}C 年代測定のための骨試料調製法、特に骨コラーゲンの純化方法に関するいくつかの例について紹介し、イラン南部アルセンジャン地区のタング・シカン洞窟遺跡から採取された骨試料の試料調製の結果についても述べる。

^{14}C 測定のための骨試料調製法

埋没土壌に接していた骨表面は特に外来有機物によって汚染されているため、表面の汚れを物理的・化学的に除去する。クリーニング後の骨片をステンレス乳鉢で粉碎し、0.4–0.6M HCl中で脱灰を行って骨コラーゲンを得る。以下、骨コラーゲンの純化方法に関して紹介する。

(1) 骨コラーゲンのゼラチン抽出

骨コラーゲンは、分子量10万程度のペプチド鎖が3本らせん状に絡み合った構造をしている。コラーゲンを高温(85–90°C)のpH~3の水中で変成させると、三量体が解離し、立体構造の異なる水溶性のゼラチン(約10万分子量)が得られる。このゼラチン抽出の過程で、コラーゲンのらせん状構造内に入り込んだ外来有機物を除去することができる。この方法はLongin(1971)により開発されたもので、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、信頼性ある ^{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%以下の場合、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)。1%以下のゼラチン収率の場合、骨ゼラチンに以下の(3)あるいは(4)の化学処理を行うことで、外来有機物ならびに変質・減成したゼラチンを除去することが可能であり、得られる ^{14}C 年代値の信頼度が増す。

(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、外来有機物を除く方法で

ある。図1に、琵琶湖南湖の粟津湖底遺跡のII, III, V, VI, VII, VIII, IX各層から出土した獣骨試料 (AWA-8~14) の¹⁴C結果を示す。0.1M NaOH処理の有無による¹⁴C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1内の◇) は明らかに若返った年代を示すのに対し、アルカリ処理を行った骨ゼラチン (◆) は同層の木片 (×) の年代とほぼ一致している (Minami et al., 2013)。木片の年代は最も信頼度が高いと考えられるので、アルカリ処理をすることにより、より正確な年代に近づいていることがわかる。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である (e.g. Stafford et al., 1988; Minami and Nakamura, 2000)。図1から、XAD-2樹脂処理を行ったアミノ酸 (▲) は、AWA-10を除いて同層の木片 (×) 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、骨

本来の信頼性のある年代が得られている。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-2樹脂の前洗浄に時間がかかる上、樹脂から完全に汚染物質を除去するのが難しいという欠点がある。

(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。我々の研究室ではVivaspin™ 6 (VS 6: ポリエーテルスルホン, 30kD MWCO) を使用して限外ろ過を行っている。図1に示すように、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¹⁴C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示唆される。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. (2013)

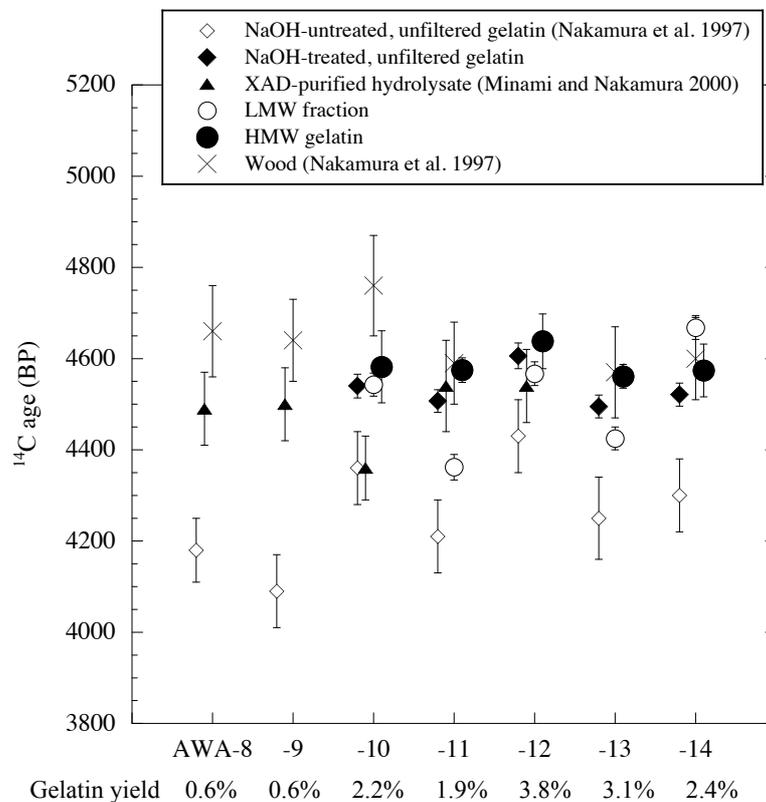


図1. 粟津湖底遺跡から採取した獣類骨コラーゲンのアルカリ処理, XAD-2樹脂処理, 限外ろ過の有無による¹⁴C年代値の違い

表1 タング・シカン洞窟遺跡のトレンチE5から採取された動物骨試料に対するゼラチン抽出結果

Sample No.	Layer	Basket No.	Gelatin yield (%)	C/N ratio
1L-k	1	3	0.36	6.4
2L-j	2	4	0.22	7.7
3L-l	3	6	0.19	5.0
4L-l	4	8	0.30	6.1
5L-i	5	13	0.27	6.2
6L-b	6	16	0.31	6.1

も、長時間の限外ろ過を行うと、ろ過膜（4.3–5.0 kyrの年代をもつ）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。したがって、限外ろ過を行う際は、限外ろ過膜の前洗浄を徹底するとともに、ろ過の時間を短く抑えることが重要であると言える。

遺跡から出土する骨の¹⁴C年代測定のための試料調製法について、これまでの我々の研究結果に基づいて紹介した。骨の有機質の保存状態の良好な骨試料の場合は、ゼラチン抽出のみでも正しい¹⁴C年代測定が得られるのに対し、保存状態の悪い骨試料は、ゼラチン抽出のみでは信頼性のある¹⁴C年代測定が得られないことが多いため、骨ゼラチンをさらに純化するために、アミノ酸まで分解してXAD-2樹脂により外来炭素を除去する方法や、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が用いられる。これらの方法を用いることにより、骨試料から信頼度の高い¹⁴C年代値を得ることができる。しかし、保存状態の悪い骨試料の場合、続成作用を受けて有機質が変質・分解しているため、脱灰に使用するHCl濃度、骨コラーゲンのアルカリ処理時のNaOH溶液の濃度・処理時間等を適切に設定しないと、骨の本質成分までも損失し、¹⁴C年代測定に必要なゼラチン量を得ることができないことになる。また、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、骨コラーゲンの保存状態に応じた、最適・最短の試料調製法を用いることが重要である。

イラン南部アルセンジャン地区のタング・シカン洞窟遺跡の年代測定

筑波大学の常木教授を中心とするイラン-日本

考古発掘団は、2011年度からイラン南部のアルセンジャン地区、タング・シカン洞窟遺跡（A5-3）において精力的に遺跡発掘を行っており、中期旧石器時代～新石器時代（約30万～1万年前）の大量の石器や動物骨が出土している。この遺跡の文化層に年代軸を入れるため、トレンチE5（全6層）の1～5層から採取された炭化物を用いて¹⁴C年代測定を行った。その結果、1層の炭化物は300–115 BP (n=4)という非常に若い年代を、2層の炭化物は26750–26370 BP (n=3)という後期旧石器時代（約3万–1万年前）を、3層の炭化物は1試料が24380 BP、もう1試料はほぼ¹⁴C測定限界の5万年より古い年代を示した。さらに4、5層の炭化物試料も5万年より古い年代をもつことがわかった。以上の結果から、この遺跡は後期～中期旧石器時代の長いシーケンスをもっていることが明らかとなった。

さらに、トレンチE5の1～6層から採取された骨試料に対して¹⁴C年代測定を行うため、前述のゼラチン抽出法によって、骨ゼラチンを抽出しところ、得られたゼラチンは褐色に着色しており、ゼラチン収率も0.3%以下と低い結果となった（表1）。また、C/N比は5以上の高い値を示し、外来有機物が除去しきれず、ゼラチンもかなり変質していることがわかる。XRDによる結晶構造解析から、これらの骨試料は上層、下層にかかわらず、いずれの層においても、かなり化石化が進んでいることが示唆された。洞窟遺跡内土壌の主成分元素分析の結果、CaOが約20%、P₂O₅が約5%と、いずれの含有量も高く、骨が土壌中に埋没している間に骨の有機質の分解が進み、かなり化石化が進行していると考えられる。

今後、これらの骨試料に限外ろ過を行って高分

子量ゼラチンを抽出し、 ^{14}C 年代測定を行う予定にしている。

謝辞

安間了日本フィッシュン・トラック研究会会長からは、第37回フィッシュン・トラック研究会、共通テーマセッション「考古学と連携」で講演する機会をあたえていただきました。また、常木晃教授（筑波大学）には、イラン・アルセンジャンのタング・シカン洞窟遺跡の炭化物および骨試料の ^{14}C 年代測定の機会を与えてくださいました。ここに記して感謝いたします。

文献

- Brown T.A., Nelson D.E., Vogel J.S., and Southon J.R., 1988, Improved collagen extraction by modified Longin method. *Radiocarbon*, 30, pp. 171-177.
- 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. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52, pp. 2257-2267.
- Hüls M.C., Grootes P. M., and Nadeau M.-J., 2007, How Clean is Ultrafiltration Cleaning of Bone Collagen? *Radiocarbon*, 49, pp. 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, pp. 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, pp. 302-307.
- Minami M., Yamazaki K., Omori, T., and Nakamura T., 2013, Radiocarbon dating of VIRI bone samples using ultrafiltration. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res.*, B294, pp. 240-245.
- 中村俊夫, 太田友子, 伊庭功・南 雅代, 池田晃子, 1997, 滋賀県栗津湖底遺跡第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, pp. 237-246.
- van Klinken G.J., 1999, Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science*, 26, pp. 687-695.