ナウマンゾウ臼歯化石のAMS^{14}C年代
－XAD-2樹脂を用いて－

南　雅代[1)]・中村俊夫[2)]

1) 日本学術振興会特別研究員（名古屋大学年代測定資料研究センター）
2) 名古屋大学年代測定資料研究センター

1．はじめに

骨化石の正確な^{14}C年代測定、炭素・窒素安定同位体比測定のためには、元の同位体比が保存されており、外来の有機物がすべて除かれていることが重要である。骨化石の^{14}C年代、同位体比測定に際しては、化学的風化作用に対して比較的安定であるとされる硬タンパク質のコラーゲンを抽出して用いることが多いが、骨化石の多くはコラーゲン続成作用を受け、また、化石の周囲の堆積物由来の有機物によって汚染されていることが多い。そのため、ゼラチンコラーゲンの収率が１％以下といった、保存性の悪い化石に対しては、コラーゲンの^{14}C年代値は実際の年代より若返った値を示す例が見られる（沢田ほか, 1992; 中村ほか, 1996）。そこで、我々はコラーゲンをアミノ酸まで分解し、XAD-2吸着樹脂を用いて骨化石試料からフミン酸・フルボ酸などの外来有機物を完全に除去する方法を検討してきた（南・中村, 1997, 1998）。

滋賀県琵琶湖の粟津湖底遺跡の縄文貝塚から採集されたイノシシ、ニホンジカなどの獣類細骨片にXAD-2吸着樹脂を用いる方法を試みた結果、XAD-2樹脂処理されたアミノ酸集合体成分は、コラーゲン抽出法によって得られたゼラチンコラーゲン成分に比べて数百年古い^{14}C年代値を示し，同層から採取された木片の年代に近づき誤差内で一致する傾向が見られた。特にゼラチンコラーゲン収率が１％より低い試料において^{14}C年代値の差が大きくなる傾向が見られたことから、XAD-2吸着樹脂を用いる方法は、保存状態が良好でない骨化石から効果的に外来炭素を除去し，若返りのない^{14}C年代値を得るのに有効であると示唆された。

本研究では、さらに古い骨化石でもXAD-2吸着樹脂を用いる方法が有効かどうかを調べるため、愛媛県宇和島の海底から採取されたナウマンゾウの臼歯化石に対して本方法を試みた。この臼歯化石はエナメル質・象牙質・セメント質が明瞭に層をなしていた。臼歯に関しては象牙質から抽出したコラーゲンを用いるのが普通であるが、エナメル質、セメント質についても年代測定が可能かどうかの検討もあわせて行った。ゼラチンコラーゲン抽出法による^{14}C年代測定結果は、すでに中村ら（1998）に報告されている。

2．試　料

本研究に用いたナウマンゾウ臼歯化石は、1960年頃、四国西端三崎半島の南に位置する宇和海の名取梶谷鼻沖からタイ網漁の網にかかって採取され、同地の資料館に保管されていたものである。

ナウマンゾウ臼歯試料の外観は全体的に白っぽく、エナメル質の層が黒光していた。エナメル質、エナメル質で覆われた象牙質、さらにエナメル質を覆う歯冠セメント質の部分を分離し、それぞれ分析を行った。中村ら（1998）のゼラチンコラーゲン抽出法に用いた試料は象牙質の部分から採取されたものである。ゼラチンコラーゲンの収率は1.22%であり、29,200±870 yr BP という年代値が得られている。

3．実験方法

試料調整

実験手順を図１に示す。ナウマンゾウ臼歯化石は表面の汚れをカッターで削り取った後、蒸留水中で繰り返し超音波洗浄し、不純物を除去した。試料を凍結乾燥し、エナメル質・象牙質・セメント質の層に分け、それぞれステンレス乳鉢によって粉砕した。約1～2 gの粉末試料を0.8N HCl 約100～200 ml を用いて、時々撹拌させながら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。この脱灰試料約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。

コラーゲン加水分解物は、あらかじめ6N HCl で平衡化しておいたXAD-2樹脂（20～50 mesh）を詰めたカラムに通し、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ルボ酸成分を0.5M NaOH、1M NH_4OHで溶離した。XAD処理されたアミノ酸成分、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。

分析に用いた塩酸は石英容器にて蒸留したもの、水は２回蒸留した超純水である。XAD-2樹脂はアセトン、水で繰り返し洗浄した後、3N HCl、3N 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精製したものを用いた。

試料のガス精製および測定

試料中の炭素のCO_2化、CO_2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℃に加熱した後ゆっくり

骨化石試料

↓

蒸留水による超音波洗浄

↓

凍結乾燥

↓

ステンレス乳鉢で粉砕

↓

4℃、0.8N HClで脱灰（一晩）

↓

遠心分離して上澄み液を棄てる

↓

残留物を凍結乾燥　〈*DBP*〉

↓

アルミニウムブロックヒーター内にて
110℃、6N HClで加水分解（一晩）

↓

吸引ろ過

↓

XAD-2カラム処理

加水分解溶液をXAD-2樹脂を詰めたカラム（1×30cm）に通す

↓

6N HCl　→ アミノ酸集合体〈*XAD*〉

↓

0.5M NaOH

1M NH_4OH　→ フルボ酸〈*F*〉

図１　XAD-2樹脂を用いて骨化石試料からアミノ酸集合体を抽出する実験手順

と冷却してコラーゲン中の炭素を酸化してCO_2に、窒素をN_2に変えた。N_2の分離は線状モレキュラシーブス（13X, 1/16）を用いた。直径6mmのバイコール管にモレキュラシーブスを数粒入れ、真空ラインに接続して、バーナーであらかじめモレキュラーシーブスの焼き出しをしておく。ラインに試料ガスを導入し、3箇所で液体窒素トラップを段階的にくぐらせて十分にCO_2やH_2Oを取り除いた後、N_2を液体窒素で冷却したモレキュラーシーブスにトラップさせて封じ切る（南ほか, 1998）。その後、液体窒素（-196℃）、液体窒素で冷却したエタノール（約-100℃）、ペンタン（-128℃）を冷媒として用いてCO_2を精製した。このCO_2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トロン加速器質量分析計を用いて^{14}C年代測定を行った。なお、分取した一部のCO_2と全N_2は気体用質量分析計（MAT-252）により$\delta^{13}C$、$\delta^{15}N$値を測定した。

また、CNコーダー（柳本製，MT-700）により炭素および窒素含有量を測定した。

アミノ酸分析

XAD-2樹脂処理されたアミノ酸集合体成分について、名古屋大学大気水圏科学研究所に設置されているアミノ酸自動分析計（日立 835型）によりアミノ酸組成分析を行った。試料1mg/l水溶液にリン酸緩衝液を加えてpH9.2とし、10ulを分取する。そこにオルトフタルアルデヒド試薬500μl、メリカプト試薬490μlを添加し、得られた反応液の2μlをアミノ酸自動分析計に導入する。カラムはイナートシルODS-3（4.6φ×160mm）を用い、A液：リン酸緩衝液、B液：A液60ml＋アストニトリル、C液：80℃アストニトリルによるグラディエント溶離を行った。検出は励起波長350nm、蛍光波長460nmで行った。

4．結　果

宇和海から採取されたナウマンゾウ臼歯化石の分析結果を表１に示す。加速器質量分析計による^{14}Cの計測時にバックグラウンドが高かったため、表１の年代値はバックグラウンド補正を行った値である。ゼラチンコラーゲン成分（GC）と可溶性コラーゲン成分（SC）の結果は中村ほか（1998）から引用したが、GCの年代値は、再計算によって得られた27,280 (yr BP) を記した。その理由として、GCとSCはC/N比、$\delta^{13}C$値、$\delta^{15}N$値がいずれもほとんど同じ 値を示しており、年代値のみ４千年も異なるのは考えにくいと思われること、そして、GC収率が1.22%と保存性がよい本試料においては、外来の炭素によって汚染されている可能性が低く、GCとSCの年代値にそれ程大きな差が生じないと考えられることが挙げられる。一般に、新鮮な骨から抽出したコラーゲンはGCの含有率が高く、年代が古い化石骨においてはSCの含有率が増加し、化石化の段階でGCがSCへと分解するが、保存が良好で、外来有機物による汚染がない場合は、GCとSCの年代値は一致すると考えられる。

表１　宇和海から採取されたナウマンゾウ臼歯化石のC/N比、$\delta^{13}C$値、$\delta^{15}N$値および^{14}C年代値

		CO_2収率 (%)	C/N比	$\delta^{13}C_{PDB}$ 6) (‰)	$\delta^{15}N_{AIR}$ 6) (‰)	^{14}C年代 7) (yr BP)	測定番号 (NUTA-)
象牙質	DBP 1)	39.7	3.1	-20.4	8.5	27190±1520	5955
	XAD 2)	20.2	3.0	-20.0	9.0	27580± 490	5945
	F 3)	0.29	---	-24.2	---	16710± 380	5951
	GC 4)	42.0	3.2	-20.2	8.6	27280± 870	5722
	SC 5)	24.9	3.2	-20.2	8.5	24880± 580	5723
エナメル質	DBP	1.65	7.2	-15.3	8.2	22810± 740	6030
	XAD	0.37	4.6	-18.5	7.6	15850± 320	5944
	F	0.09	---	-19.0	---	--------	----
セメント質	DBP	41.7	3.3	-20.5	8.2	25550±1410	5954
	XAD	27.8	3.1	-19.5	8.3	26640± 610	5946
	F	0.41	---	-25.3	---	16860± 380	5950

1) DBP : 脱灰処理後、塩酸に不溶な成分
2) XAD : XAD-2樹脂処理したコラーゲン加水分解成分
3) F : フルボ酸成分
4) GC : ゼラチン抽出法によって得られたゼラチンコラーゲン成分
5) SC : 可溶性コラーゲン成分
6) $\delta^{13}C_{PDB}$・$\delta^{15}N_{AIR}$の誤差は±0.1‰
7) ^{14}C年代値の誤差は2σ

C/N比

C/N比は、抽出したコラーゲンが、本当にコラーゲンかどうかの純度の指標となる。コラーゲンのようにグリシン含有率の大きいタンパク質のC/N比は、3.2±0.5といわれている（Hare and von Endt, 1990）。表１から、象牙質とセメント質の脱灰成分（DBP）、XAD-2樹脂処理したコラーゲン加水分解成分（XAD）、ゼラチンコラーゲン成分（GC）および可溶性コラーゲン（SC）は3.0～3.2のC/N比を示し、コラーゲンの値の範囲に入っている。しかし、エナメル質のC/N比は、大きくはずれており、コラーゲンではないことを示唆している。エナメル質のCO_2収率は極めて低く、このことからも、エナメル質にコラーゲンはほとんど含まれていなかったことがわかる。

δ^{13}C値・δ^{15}N値

動物のタンパク質を構成する炭素と窒素の同位体組成は、その動物が生前に摂取していた食物に依存して決まり、食性解析に利用されている（南川, 1993）。陸上の草食（C3植物）動物の骨コラーゲンの値は、C3植物が示すδ^{13}C=-24～-31‰、δ^{15}N=-3～+7‰よりもそれぞれ約5‰濃縮された値を有すると考えられている。象牙質、セメント質のδ^{13}C値は-20‰、δ^{15}N値は+9‰であり、草食動物であるナウマンゾウの臼歯コラーゲンの値として調和的である。エナメル質のδ^{13}C値はこれらの値よりも明らかに大きい値となった。

^{14}C年代値

臼歯試料の象牙質はエナメル質、セメント質よりも古い^{14}C年代値を示し、XAD成分とGC成分、さらにDBP成分はほぼ同じ年代値（27,200～27,600 yrBP）を示した（図２）。象牙質はエナメル質、セメント質に覆われているので、外来炭素による汚染が少なく、最も信頼性の高い年代値が得られたと考えられる。外来有機物であるF成分は、どの層も歯本来の年代より明らかに若い年代値（15,900～16,900 yrBP）を示した。

C/N比、δ^{13}Cおよびδ^{15}N値において象牙質、セメント質とは違った値を示すエナメル質の^{14}C年代値はかなり若い年代を示した。

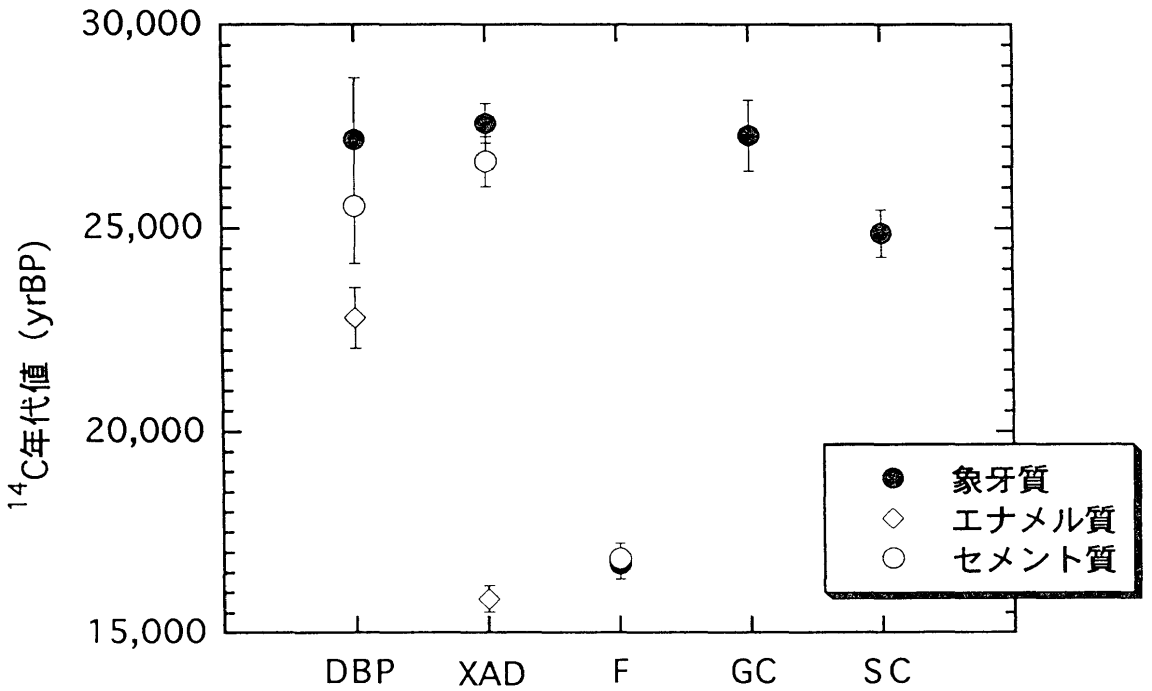

図２　宇和海から採取されたナウマンゾウ臼歯化石の^{14}C年代値

アミノ酸分析結果

XAD-2樹脂処理したコラーゲン加水分解成分をアミノ酸分析した結果を表2に示す。A、Bは0.5M EDTAで脱灰し、残査を6M HClで加水分解した後、アミノ酸分析を行った結果である（落合、秋山, 1986）。宇和海ナウマンゾウのアミノ酸濃度はセメント質が一番高く、エナメル質はかなり低い。いずれもグリシン、次いでアラニンの割合が非常に高いことがわかる。チロシン、フェニルアラニンの含有量は、野尻湖ナウマンゾウや現生アジアゾウの値に比べて著しく低いが、これは脱灰に塩酸を用いているため、抽出されたコラーゲンの構造に変化が生じている可能性が考えられる。

化石試料中に含まれるタンパク質は、化石化の過程で続成作用の影響を受けて、元の構造に変化を生じている。この変化はアミノ酸組成に顕著に現れるとされており、アミノ酸組成に変化を起こす要因としては、温度要因が重要と考えられている（佐俣, 1993）。熱に対して不安定なアミノ酸であるアルギニン、メチオニン、トレオニン、セリン、ヒスチジンなどの含有量が現生種にくらべて著しく低い場合、タンパク質が強い続成作用を生じている可能性が考えられる（Vallentyne, 1964）。宇和海のナウマンゾウの場合、特にそのような傾向は見られないので、熱による強い続成作用があった可能性は少ないと考えられる。

表2　宇和海から採取されたナウマンゾウ臼歯に含まれるコラーゲンのアミノ酸組成　（単位：μmol/g）

	象牙質	エナメル質	セメント質	A	B
Asp	311	130	641	470	490
Thr	246	85	714	190	190
Ser	403	96	672	330	370
Glu	455	244	1172	706	770
Gly	3729	572	9660	3270	3220
Ala	820	323	2002	1260	1150
His+Val	145	106	301	299	297
Met	31	20	58	36	50
Ile	29	13	71	130	110
Leu	72	31	169	280	280
Tyr	0	2	3	27	52
Phe	3	0	9	140	150
Lys	93	102	186	310	300
Arg	257	150	753	470	500

A：野尻湖湖底から採取されたナウマンゾウの歯牙

B：現生のアジアゾウの歯牙

5．考　察

本臼歯試料はゼラチンコラーゲン収率が1.22％と高いことから（中村ら, 1998）、保存状態が良好であったと考えられる。コラーゲン抽出法によって得られたゼラチンコラーゲンの年代値と、XAD-2樹脂処理されたアミノ酸集合体の年代値の間には大差なく、コラーゲン抽出法によって信頼度の高い年代値が得られていることがわかる。コラーゲン収率が１％以下の保存状態の良好でない骨化石に対してはXAD-2樹脂処理法が有効であるが（南・中村, 1998）、保存状態が良好な骨化石に対しては、両者の方法による差はほとんどないことがわかった。

歯の硬組織を構成する成分は無機質、有機質、水分に大分され、多量の無機成分を含んだ石灰化組織である。特に、エナメル質では無機質の含有率は97％にも及ぶ。エナメル質は高度に石灰化した硬組織であり、成熟したエナメル質は、有機基質（エナメルタンパク質）が次第に分解され、ハイドロキシアパタイトに置き換えられていく（寒河江ほか, 1991）。今回、宇和海ナウマンゾウ臼歯化石のエナメル質においてCO_2収率が極めて低く、C/N比、δ^{13}C値でコラーゲンではない値が得られたが、これは分解されてエナメル質にコラーゲンがほとんど残存していなかったためと考えられる。試料を脱灰後の酸可溶部分にハイドロキシアパタイトが含まれている。無機成分のハイ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^{14}C年代測定には不適と考えられているが、この成分についても年代測定を試み、検討してみたいと思っている。

ナウマンゾウは、長鼻類の中でも歯冠セメント質の組織構造が典型的に発達しており、化石においてもタンパク質と多糖質からなる基質を大量に残存していることが知られている（小林ほか, 1991）。本研究のナウマンゾウにおいては、セメント質のCO_2収率が象牙質よりも高く、象牙質と同じC/N比、δ^{13}Cおよびδ^{15}N値を示した。年代値は象牙質よりも若干若くでたが、それは象牙質がエナメル質、セメント質で覆われているのに対し、セメント質が外からの汚染を受けやすかったからためと考えられるが、試料調整の過程で汚染された可能性も考えられる。今後、この点については、再検討を行う予定である。

謝　辞

アミノ酸分析は、平成９年度名古屋大学大気水圏科学研究所共同研究に基づき、大田啓一助教授によって実施していただいたものである。愛媛県西宇和郡保内町教育委員会の宮本雅三氏には試料を提供していただいた。記して謝意を表する。

なお、本研究の実施に際し、文部省科学研究費補助金重点領域研究 (2)「骨化石のアミノ酸を用いた高精度^{14}C年代測定による日本人の起源の研究」代表者中村俊夫（課題番号09208206）の一部を使用した。

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}C年代測定．名古屋大学古川総合研究資料館報告, 6, 45-54.

Hare, P. E. and von Endt, D. (1990) Variable preservation of the organic matter in fossil bone. Annual Report of Director of the Geophysical Laboratory, Carnegie Institute, Washington, 1989-1990, Geophysical Laboratory, Washington D.C., 115-118.

寒河江登志郎・佐俣哲郎・秋山雅彦（1991）歯の化学．亀井節夫（編著）「日本の長鼻類化石」，築地書館, 210-212.

Kitagawa, H., Masuzawa, T., Nakamura, T. and Matsumoto, E. (1993) A batch preparation method for graphite targets with low background for AMS ^{14}C measurements. Radiocarbon, 35, 295-300.

小林巌雄・小澤幸重・神谷英利（1991）歯の組織学．亀井節夫（編著）「日本の長鼻類化石」，築地書館, 203-209.

南　雅代・中村俊夫（1997）骨化石試料に対する信頼度の高い^{14}C年代，炭素同位体比測定の試み．名古屋大学加速器質量分析計業績報告, VIII, 247-253.

南　雅代・中村俊夫（1998）化石骨のアミノ酸抽出とその^{14}C年代．名古屋大学加速器質量分析計業績報告, IX, 46-54.

南　雅代・青木浩・中村俊夫（1998）名古屋大学年代測定資料研究センター・MAT-252における窒素安定同位体比測定について．名古屋大学加速器質量分析計業績報告, IX, 316-322.

南川雅男（1993）アイソトープ食性解析法．日本第四紀学会編：第四紀試料分析法．２．研究対象別分析法．東大出版会．404-414.

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孤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}C年代測定．地学雑誌, 105, 306-316.

落合広・秋山雅彦（1986）現在および化石ゾウの象牙質コラーゲン．総合研究（A）化石化機構と系統発生へのアプローチ．3-9.

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}C年代測定による野尻湖層の編年．地球科学, 46, 133-142.

佐俣哲郎（1993）タンパク質とアミノ酸分析法．日本第四紀学会編：第四紀試料分析法．２．研究対象別分析法．東大出版会．379-388.

Vallentyne, J. R. (1964) Biogeochemistry of organic matter II-thermal reaction kinetics and transformation products of amino acid compounds. Geochem. Cosmochim. Acta, 28, 157-188.

AMS ^{14}C age of a Molar fossil of Naumann's elephant
—with XAD-2 resin—

Masayo MINAMI[1] and Toshio NAKAMURA[2]

1) JSPS Research Fellow (Dating and Materials Research Center, Nagoya University)
2) Dating and Materials Research Center, Nagoya University

The predominant contaminants such as humic and fulvic acids affect ^{14}C date and stable isotope analyses in fossil bone. The XAD-2 treatment of collagen hydrolysate is considered an effective method to eliminate the foreign organic matter from bone. In this study, we have conducted ^{14}C dating, by the XAD-2 method, on a molar fossil of Naumann's elephant (*Palaeoloxodon naumanni*) collected from the Uwa-sea, offshore Natori-kajitanihana, Nishi-Uwa-gun, Ehime prefecture. The ^{14}C date of 29,200±870 yr BP was already obtained for gelatin collagen by gelatin-extraction method of decalcification in a cellulose tube with 1.2N HCl, followed by heating at 90℃ in water (Nakamura et al., 1998).

Three parts of dentine, enamel and cement in the molar fossil were separated for each ^{14}C dating. The samples were decalcificated with 4℃, 0.8N HCl and the acid-insoluble residues were concentrated by centrifugation and lyophilized. The demineralized fractions were hydrolysed with 6N HCl at 110℃. The filtered hydrolysates were passed through the XAD-2 resin to remove fulvic and humic acids.

Dentine phase in the molar fossil gives older ^{14}C age than enamel and cement phases. It is thought that the dentine, covered with enamel and cement phases, is better-preserved. The ^{14}C age of the XAD-purified hydrolysates (XAD) is older than that of solution collagen (SC), but coincide with age of gelatin collagen (GC) in dentine phase. Enamel phase gives different C/N ratio, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values from those of dentine and cement phases, and relatively younger age, which indicates that the majority of enamel protein has decomposed and changed to hydroxyapatite. All fulvic fractions (F) of three phases give significantly younger ages than bone organic carbon.

The molar fossil might be well-preserved because of the higher yield (1.22%) of gelatin collagen more than 1%. The gelatin-extraction method is sufficient for ^{14}C dating on the well-preserved fossil.