

# 化石骨の脱灰処理条件の検討

南 雅代<sup>1)</sup>・中村俊夫<sup>2)</sup>

1) 名古屋大学大学院環境学研究科

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

TEL: 052-789-3030 FAX: 052-789-3033

e-mail: minami@eps.nagoya-u.ac.jp

2) 名古屋大学年代測定総合研究センター

## 【はじめに】

化石骨の信頼度の高い炭素・窒素同位体比ならびに  $^{14}\text{C}$  年代測定においては、骨が本来持っている固有の有機成分を高純度で抽出し、分析していくことが必要不可欠である。骨は酸性土壌中では分解されやすいため、保存状態の良好な骨試料を得ることは容易ではない。したがって、保存状態が良好でない試料においても、外来有機物を効率的に除去し、骨本来の有機成分を損失することなく抽出することが重要となってくる。骨の外来有機物としては土壌由来のフミン物質が主たるものである。フミン物質は、アルカリに可溶で酸に不溶な成分であるフミン酸、酸・アルカリに可溶な成分であるフルボ酸、酸・アルカリに不溶な成分であるフミンに区分される。例えば、化石骨を脱灰-アルカリ処理することにより、外来有機物を除去することができるが、同時にかかなりの骨固有成分も損失してしまう。それに対して、XAD-2 樹脂を用いる方法は、外来有機物を効果的に除去し、信頼度の高い  $^{14}\text{C}$  年代を得るのに有効である (Stafford *et al.*, 1988 ; Minami and Nakamura, 2000 など)。しかし、XAD-2 樹脂処理法の場合でも、処理の段階で骨本来の有機成分が残っていないと、その成分を抽出することは不可能である。そこで本研究では、実際の化石骨に対し、骨の有機成分を損失することなく効率的に脱灰を行うための塩酸の濃度条件について検討を行った。

## 【実験方法】

用いた化石骨試料は、粟津湖底遺跡に存する第 3 縄文貝塚の第 VII 層から採取されたイノシシ、ニホンジカなどの獣類骨片である。

獣類骨片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後、蒸留水で注いで凍結乾燥した。これをステンレス乳鉢を用いて粉碎した。骨粉末を、0.4M、0.6M、0.8M、1.0M、1.2M の 5 種類の違った濃度の塩酸によって脱灰した。脱灰は、ビーカーに化石骨試料を直接入れ、塩酸を加える場合と、セルロースチ

チューブに蒸留水で封入してから塩酸の入ったビーカーに入れる場合の二通り行った。ビーカーに試料を直接入れた方は、脱灰後内容物を遠心分離し、酸に不溶な脱灰成分を蒸留水で洗浄して凍結乾燥した。セルロースチューブ内で脱灰を行った方は、蒸留水で透析後、遠心分離を行い、可溶成分は凍結乾燥を、不溶成分は 90℃で一晩ゼラチン抽出してろ過後、ろ液を凍結乾燥した。

ビーカー内で直接脱灰した成分、セルロースチューブを用いて脱灰した成分、ゼラチンコラーゲン成分、可溶性コラーゲン成分についてはそれぞれ酸化銅、銀線とともにバイコール管に真空封管した後 850℃に加熱し、生じた気体を真空ラインを用いて N<sub>2</sub> と CO<sub>2</sub> に精製した。N<sub>2</sub> の精製は、液体窒素で冷却した線状モレキュラシープス (13X, 1/16) にトラップさせる方法を用いた (南ほか, 1998)。得られた CO<sub>2</sub> は、<sup>14</sup>C 年代測定用と同位体比測定用に 2 分割した。<sup>14</sup>C 年代測定用 CO<sub>2</sub> は、鉄触媒を用い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トロン加速器質量分析計 (2 号機) によって測定を行った。炭素・窒素安定同位体比の測定は気体用質量分析 (Finnigan MAT-252) により、炭素および窒素含有量の測定は CN コーダー (柳本製, MT-700) により行った。

### 【結果と考察】

表 1 に得られた結果を示す。<sup>14</sup>C 年代測定の標準体には NIST 蔞酸 (RM-94) を用い、<sup>14</sup>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 1σ で示した。図中の C はセルロースチューブ内で脱灰したことを示し、GC はゼラチンコラーゲン、SC は可溶性コラーゲンを示す。図 1 (a)~(f) に脱灰時の塩酸の濃度を横軸にとり、酸不溶成分の収率、酸不溶成分中の炭素含有量、各有機成分の C/N 比、炭素・窒素同位体比、<sup>14</sup>C 年代値の塩酸濃度の違いによる変化について示した。

#### (a) 酸不溶成分の収率

塩酸の濃度が 0.4M から 1.0M の範囲においては、酸不溶成分の収率はほとんど変化がなかったが、濃度が 1.2M になると収率は減少する傾向を示した。1.2M における収率の減少は、骨の有機成分の損失によるものと考えられる。また、ビーカー内で脱灰する場合よりも、セルロースチューブを用いて脱灰する場合のほうが酸不溶成分の収率が高く、塩酸の濃度の違いによる収率の変化も少なかった。ビーカー内で脱灰する場合は、試料に直接塩酸を加えるため、ビーカーの周りを冷却していたとしても添加時に若干発熱が生じるが、セルロースチューブ内で脱灰する場合は、まずチューブ内に試料と蒸留水を入れた後、塩酸中に浸すため、チューブ内の塩酸濃度が徐々に上が

っていき、反応が穏やかなためと考えられる。ビーカー内で脱灰する場合、脱灰後、内容物を 2000rpm で 20 分遠心分離しているが、上澄みに若干コラーゲンが逃げてしまっていることも考えられる。

表 1 化石骨を脱灰する時の塩酸の濃度を変えた場合の各有機画分のコラーゲン収率、炭素収率、C/N 比、 $\delta^{13}\text{C}$  値、 $\delta^{15}\text{N}$  値および  $^{14}\text{C}$  年代値の変化

Table 1 Variety of collagen and carbon yields, C/N ratio,  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values and  $^{14}\text{C}$  age for organic fractions in changing HCl concentration on decalcifying of a fossil bone

Concentration of HCl (M)	yield (%)	carbon yield (%)	C/N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$^{14}\text{C}$ age (BP)
<i>Decalcification in a beaker</i>						
0.4	8.11	44.0	3.2	-23.0	5.1	-----
0.6	8.66	43.0	3.0	-23.0	5.0	-----
0.8	8.98	43.3	3.0	-23.0	4.8	-----
1.0	8.70	42.0	3.0	-23.0	4.8	-----
1.2	6.49	43.9	3.1	-23.0	5.0	-----
<i>Decalcification in a cellulose tube</i>						
C-0.4	9.69	44.6	3.0	-23.0	4.8	4260±50
C-0.6	9.91	44.7	3.0	-22.9	5.0	4180±40
C-0.8	9.94	43.6	3.0	-22.9	5.0	4160±50
C-1.0	10.1	39.5	3.1	-22.7	5.1	4240±60
C-1.2	9.73	43.2	3.1	-22.8	5.0	4240±50
<i>Gelatin collagen</i>						
C-GC-0.4	----	46.1	3.0	-23.0	4.8	4400±40
C-GC-0.6	9.61	41.7	3.0	-22.7	---	4380±40
C-GC-0.8	----	42.0	2.9	-22.6	5.1	4380±40
C-GC-1.0	9.77	44.1	3.0	-22.8	4.9	-----
C-GC-1.2	9.49	44.8	3.0	-22.9	4.9	-----
<i>Solution collagen</i>						
C-SC-0.4	3.49	31.8	3.3	-22.6	4.5	4140±30
C-SC-0.6	3.62	33.6	3.1	-22.6	4.7	4230±40
C-SC-0.8	3.28	35.4	3.1	-22.8	5.0	4350±40
C-SC-1.0	3.55	33.5	3.2	-22.7	5.1	-----
C-SC-1.2	3.72	32.5	3.2	-22.6	4.5	-----

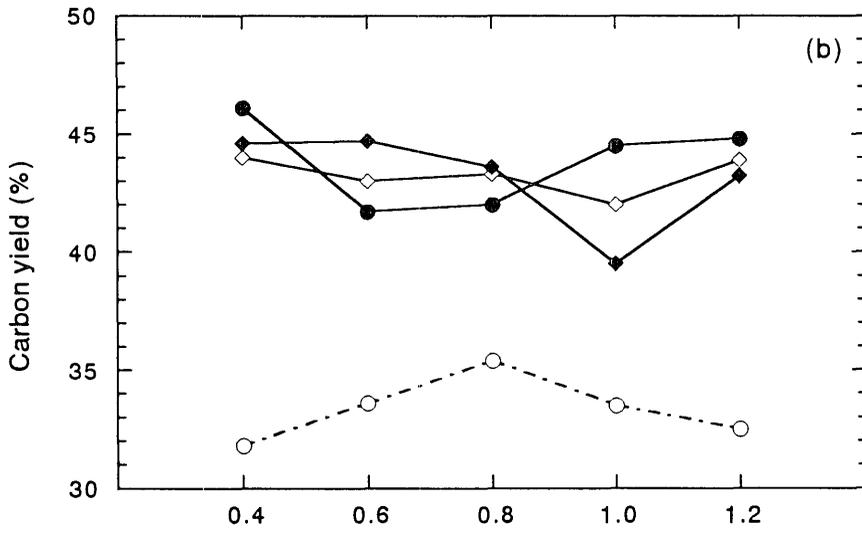
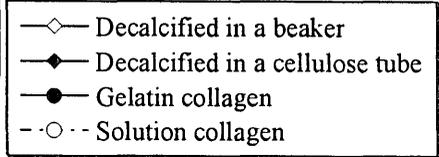
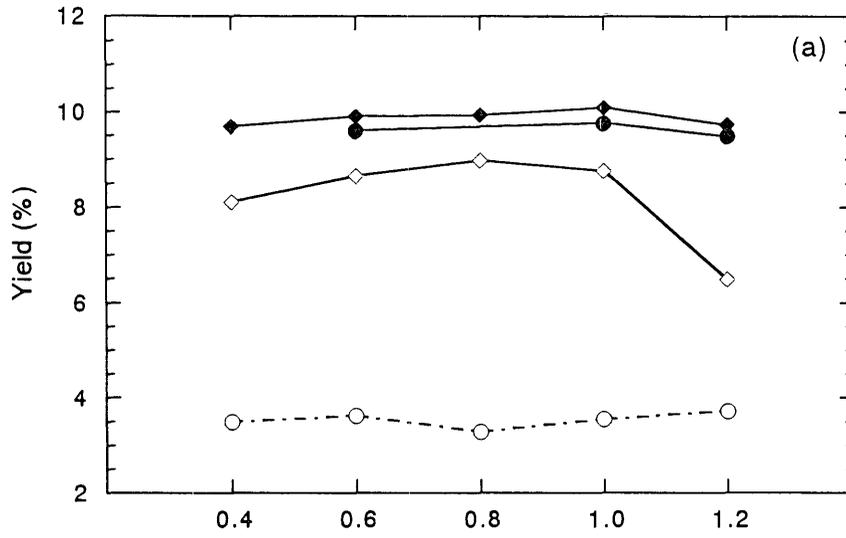
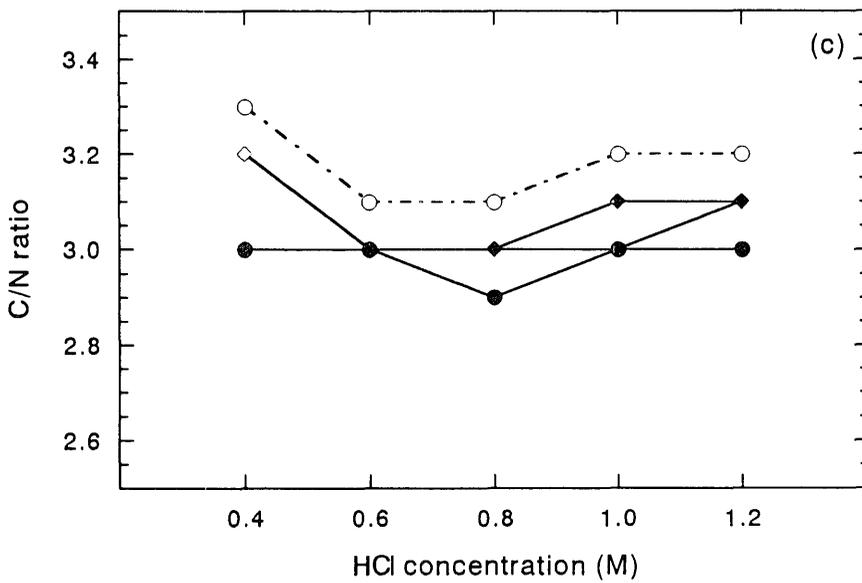


図1 化石骨を脱灰する時の塩酸濃度を変えた場合の各成分の  
 (a) 収率(%)  
 (b) 炭素含有率(%)  
 (c) C/N比

Fig. 1 In changing HCl concentration on decalcification of a fossil bone,  
 (a) yield (%)  
 (b) carbon yield (%)  
 (c) C/N ratio of four fractions



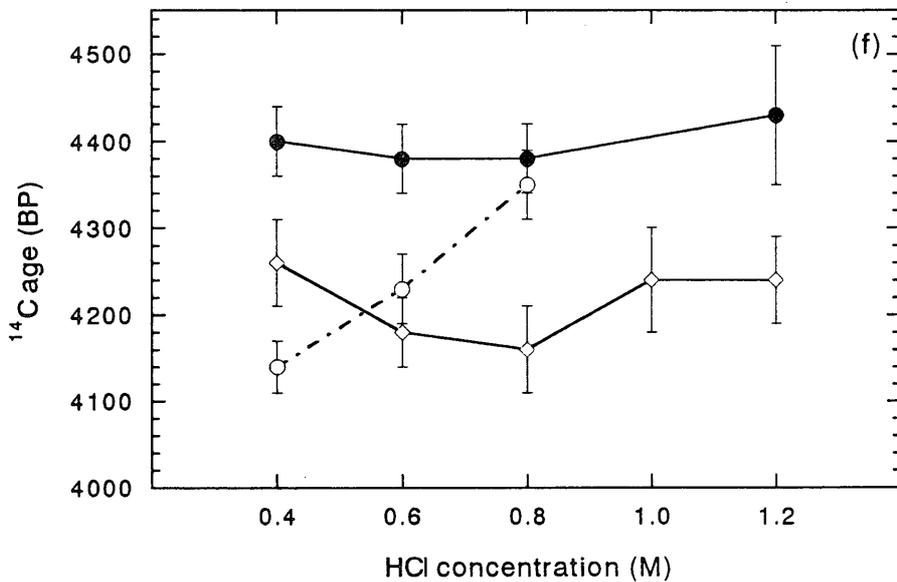
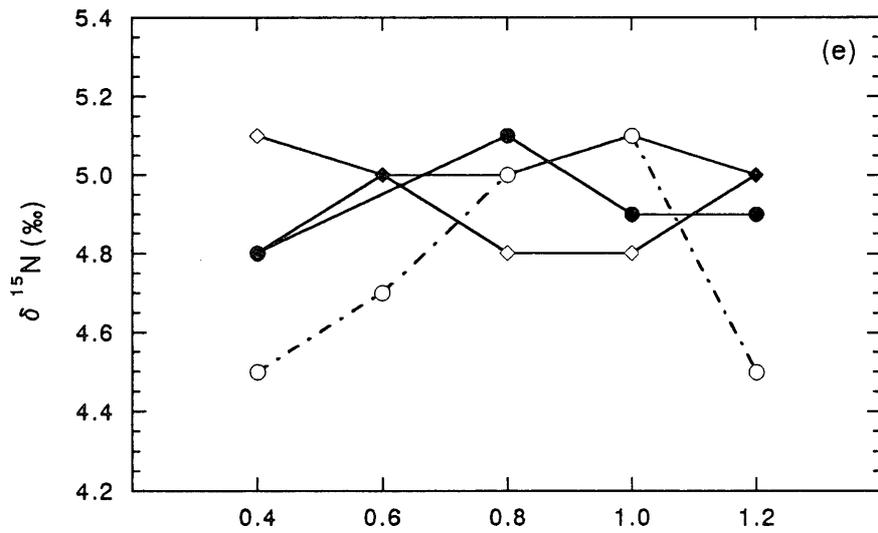
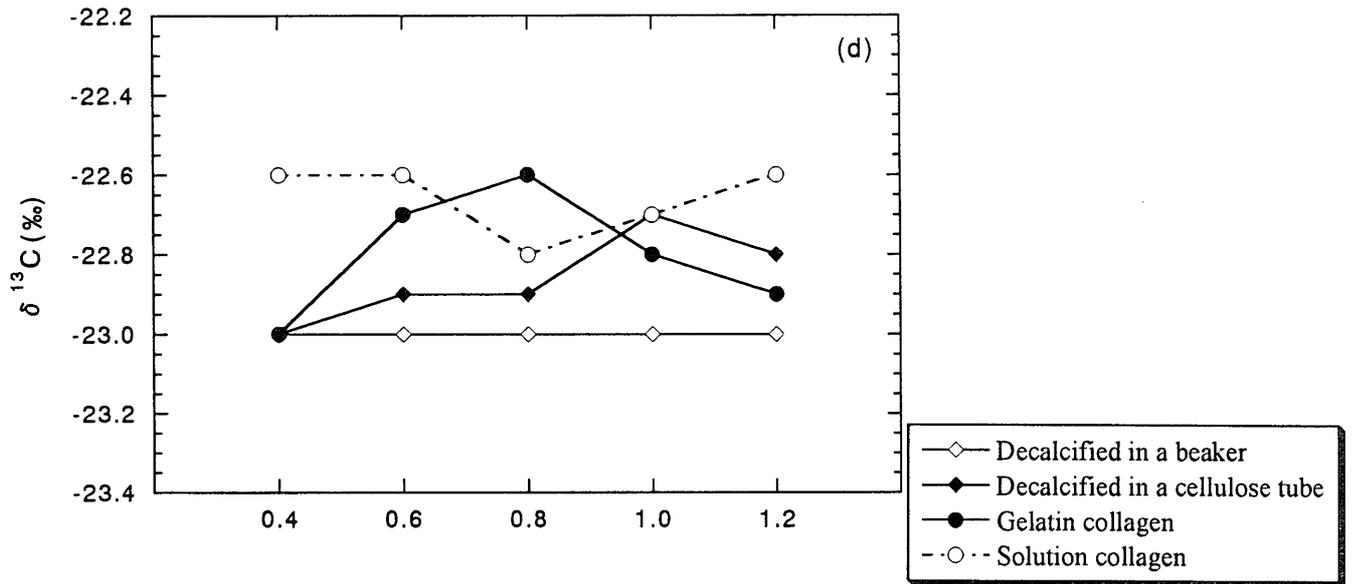


図1 化石骨を脱灰する時の塩酸濃度を変えた場合の各成分の  
 (d) δ<sup>13</sup>C値 (‰)  
 (e) δ<sup>15</sup>N値 (‰)  
 (f) <sup>14</sup>C年代値 (BP)

Fig. 1 In changing HCl concentration on decalcification of a fossil bone,  
 (d) δ<sup>13</sup>C value (‰)  
 (e) δ<sup>15</sup>N value (‰)  
 (f) <sup>14</sup>C age (BP) of four fractions

#### (b) 脱灰成分中の炭素含有率

ビーカー内で脱灰した場合もセルロースチューブ内で脱灰した場合も、得られる酸不溶成分の炭素含有率はほぼ同じであった。塩酸の濃度が 0.4M から 1.0M へと高くなるにつれて、酸不溶成分中の炭素含有率は減少し、濃度が 1.2M になると増加する傾向を示している。酸の濃度が低いところでは骨の有機成分以外のフミン物質が溶解し、ゼラチンコラーゲン成分に含まれている可能性が考えられる。

#### (c) C/N 比

0.4M から 0.8M にかけて、いずれの成分も C/N 比が減少し、1.0M で再び若干増加する傾向が見られる。コラーゲンのようにグリシンの多いタンパク質の C/N 比は  $3.2 \pm 0.5$  を示すといわれているが (Hare and von Endt, 1990)、本研究で分析した骨コラーゲンもこの範囲の値を示した。ゼラチンコラーゲンのほうが可溶性コラーゲンよりも約 0.2 低い C/N 比が得られたが、ゼラチンコラーゲンの方が骨の本質成分に近いものであり、ゼラチン抽出によって、より本質コラーゲンが抽出されていることがわかる。0.4M における脱灰成分および可溶性コラーゲンの C/N 比は他に比べてわずかに高い値を示しており、外来有機物が含まれているためと考えられる。

#### (d) 炭素・窒素同位体比

ゼラチンコラーゲン成分と可溶性成分の同位体比は、塩酸の濃度が 0.4M の時、0.6 ~ 1.0M の時、1.2M の 3 つの区分で違った変化をしていると考えられる。0.4M の時は、塩酸の濃度が低いため、脱灰が十分ではなく外来有機物が除去しきれておらず、1.2M の時は、骨の本質成分も損失している可能性が考えられる。しかし、明らかな変化は認められなかった。

#### (f) $^{14}\text{C}$ 年代値

$^{14}\text{C}$  年代値は、酸不溶成分、可溶性コラーゲン成分、ゼラチンコラーゲン成分の順に古い年代が得られた。一般に年代の古い骨、あるいは保存状態の良好でない骨の場合は、ゼラチンコラーゲンに比べて可溶性コラーゲンが増加する傾向にあり、可溶性コラーゲンはゼラチンコラーゲンが変成、分解したものと考えられる。したがって、ゼラチンコラーゲンのほうが骨の本質成分の年代を示すものと考えられる。今回、0.4M の塩酸濃度で脱灰した酸不溶成分をゼラチン抽出した成分と可溶性コラーゲン成分とで 250 年の差が見られたが、脱灰の塩酸濃度が 0.8M の場合は両成分に違いは見られな

かった。したがって、0.4M の脱灰塩酸濃度ではセルロースチューブ内の可溶成分に外来有機物が含まれているに対し、0.8M の濃度では、分解されてほぼセルロースチューブ外に出てしまっていることが示唆された。

ゼラチンコラーゲン成分の  $^{14}\text{C}$  年代値は 0.4M、0.6M、0.8M いずれの塩酸濃度を用いた脱灰の場合でも誤差範囲で同じであった。中村ら(1997)は、本研究と同じ骨片試料を 1.2M 塩酸によってセルロースチューブ内で脱灰し、ゼラチン抽出をして得られたゼラチンコラーゲン成分の  $^{14}\text{C}$  年代値を  $4430 \pm 80$  (BP)と報告しており、本研究の値と一致している。さらにまた、南・中村(1997)は、同骨片試料を 0.8M の塩酸によって直接ビーカー内で脱灰した後、6M 塩酸、 $110^\circ\text{C}$ で一晩加水分解し、XAD-2 樹脂処理を行って得られた成分について、 $4500 \pm 80$  (BP)の  $^{14}\text{C}$  年代値を報告している。したがって、0.4M~1.2M のいずれの塩酸濃度で脱灰した場合も、ゼラチンコラーゲン成分の  $^{14}\text{C}$  年代値に変わりはなく、信頼性のある年代値が得られることがわかった。しかし、本研究で用いた試料は比較的保存の良好な化石骨であるので、より保存状態の悪い化石骨では結果が異なる可能性がある。保存状態の悪い化石骨でも、比較実験を試みる必要があると考えられる。

#### 【まとめ】

粟津湖底遺跡に存する第 3 縄文貝塚の第 VII 層から採取されたイノシシ、ニホンジカなどの獣類骨片に対し、骨の有機成分を損失することなく効率的に脱灰を行うための塩酸の濃度条件について検討を行った。その結果、塩酸の濃度が 0.4M から 1.0M の範囲においては、酸不溶成分の収率はほとんど変化がなかったが、濃度が 1.2M になると収率は減少する傾向を示し、骨の有機成分の損失が生じている可能性が示唆された。また、0.4M、0.6M、0.8M、1.2M いずれの塩酸濃度による脱灰の場合でも、ゼラチンコラーゲン成分の  $^{14}\text{C}$  年代値は誤差範囲で同じ値を示し、XAD-2 樹脂処理されたアミノ酸成分もほぼ同じ  $^{14}\text{C}$  年代値を示すことから、信頼性のある年代と考えられる。本研究の結果から、化石骨の脱灰は 0.4M 程度の塩酸濃度で、セルロースチューブ内で行うのが適当と考えられる。しかし、保存状態が異なる化石骨では、今回と同様の結果が得られるとは限らず、さらなる研究が必要である。

## 【謝 辞】

栗津湖底遺跡から出土した化石骨試料は滋賀県教育委員会の伊庭功氏から提供して頂きました。名古屋大学年代測定総合研究センターの太田友子氏には有益な御助言を、丹生越子博士にはタンデトロン 2 号機による  $^{14}\text{C}$  測定をしていただきました。この場を借りて感謝申し上げます。この研究には、文部省科学研究費補助金（特別研究員奨励費，代表者：南雅代，課題番号：10003150）の一部を使用しました。記して感謝の意を示します。

## 引用文献

- 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.
- 南 雅代・中村俊夫 (1997) 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・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.
- 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**, 462-468.
- 中村俊夫・太田友子・稲庭 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*, **VIII**, 237-246.
- 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.

## Determination of the condition in decalcification for a fossil bone

Masayo MINAMI<sup>1)</sup> · Toshio NAKAMURA<sup>2)</sup>

1) Department of Earth and Environmental Sciences, Graduate School of Environmental Studies, Nagoya University, Furo-cho, chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan

Tel: 052-789-3030 Fax: 052-789-333 e-mail: minami@eps.nagoya-u.ac.jp

2) Center for Chronological Research, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan

Tel: 052-789-3082 Fax: 052-789-3095 e-mail: nakamura@nendai.nagoya-u.ac.jp

To investigate the best HCl concentration used for decalcification of a fossil bone without loss of bone organic fractions, various concentrations of 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1.0M and 1.2M HCl were examined to analyze carbon, nitrogen and radiocarbon isotopes. The bone used in the experiment is a fossil fragment collected from the Awazu submarine archeological site, Shiga. The yield of insoluble decalcified fractions does not change in the range from 0.4M to 1.0M HCl, and it decreases on 1.2M HCl. The result suggests that a part of bone organic fractions departs from the decalcified fractions by treatment of higher HCl concentration. The <sup>14</sup>C age for gelatin collagens does not change on any concentrations of 0.4M, 0.6M, 0.8M and 1.2M HCl, and could be reliable because the XAD-2 treated hydrolysate fraction shows the same <sup>14</sup>C age. Therefore, 0.4M is the best concentration of HCl to efficiently decalcify the fossil fragment in this study. The fossil bone used in this study is well-preserved, and the above best condition of decalcification does not apply to another poorly-preserved fossil bones. It could be, however, suitable to decalcify any fossil bone with 0.4M HCl in a cellulose tube.