

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月15日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13894

研究課題名(和文) セルソーターを用いた次世代花粉化石濃縮法の開発と、放射性炭素年代測定の高精度化

研究課題名(英文) Extraction of fossil pollen grains from sediment matrix by cell-sorter and improving radiocarbon calibration

研究代表者

中川 毅 (Nakagawa, Takeshi)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号：20332190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：セルソーターを用いて、福井県水月湖の堆積物から高純度の化石花粉を抽出する技術を開発した。年代測定に必要な100万粒子を抽出するのに要する時間は、前処理まで含めると、平均で1サンプルおよそ1～1.5日(1人の研究者が1台の装置を用いた場合)まで短縮することができた。

次に、抽出された化石花粉に対して放射性炭素年代測定を実施して、先行研究(Bronk Ramsey et al. 2012)によって判明していた樹木の葉化石の年代と比較したところ、両者はきわめて良い一致を示した。すなわち、葉化石が算出しない層準でも、リザーバー効果のない放射性炭素年代を安定的に得ることができる技術の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：A method using cell-sorter to extract fossil pollen grains from sediments of Lake Suigetsu has been developed. The workload to extract 1,000,000 pollen grains, which is the required number for radiocarbon dating, was typically 1 to 1.5 day per sample (using one machine operated by one person).

We then performed radiocarbon dating of extracted pollen samples, and compared the results with the radiocarbon dates of terrestrial leaf fossils (Bronk Ramsey et al. 2012), and confirmed that they are in excellent agreement. We, therefore, established a method to obtain terrestrial radiocarbon dates from any horizons (even from horizons without macro remains).

研究分野：古気候学、地質年代学

キーワード：放射性炭素年代測定 セルソーター 化石花粉 水月湖 年縞 放射性炭素年代較正曲線

## 1. 研究開始当初の背景

水月湖(福井県)の年縞堆積物には、年縞の計数に基づく正確な歴年代と、800 点を超える樹木の葉の化石に対して測定された放射性炭素( $^{14}\text{C}$ )年代が与えられており、 $^{14}\text{C}$ 年代較正の世界標準である IntCal の主要な構成要素として採用されている (Bronk Ramsey et al. 2012; Reimer et al. 2013)。特に、年輪年代の限界である 13,500 年前から、 $^{14}\text{C}$ 年代の限界である 50,000 年前までの間については、水月湖データの質が全世界の年代較正の質を左右していると言っても過言ではない。

だが、年代測定に用いる樹木の葉の化石が堆積物中から見つかるかどうかは偶然に支配される。このため水月湖の  $^{14}\text{C}$ 年代データも、たまたま化石が見つかった層準にしか与えられておらず、本当の意味で連続でもなければ等間隔でもなかった。言い換えるなら、較正曲線の質は時代によってばらつきが生じていた。もし、葉の化石の代わりに花粉の化石を高純度で抽出し、その  $^{14}\text{C}$ 年代を測定することが可能になれば、較正モデルの均質化と高精度化に大きく寄与することができると想定された。

## 2. 研究の目的

本研究では、堆積物中に豊富に含まれ、しかも大気中の二酸化炭素濃度を直接反映していると考えられる化石花粉を、セルソーターを用いて高純度で効率よく抽出する技術の開発をめざした。それにより、全世界で用いられている  $^{14}\text{C}$ 年代較正モデルを高品質化すると共に、同分野の研究を日本の「得意技」に昇華させることが本研究のもっとも大きな目的であった。

上記の目的を達成した上で、水月湖のコアのうち、主として 11,000 年前~15,000 年前に相当する部分から 42 層準を選び、花粉の抽出と年代測定を実施する計画であった。これにより、較正データの密度を 46%向上すると同時に、データの等間隔性を飛躍的に高める予定であった。しかしじっさいには、微量の花粉試料の年代を測定することに特異的な問題がいくつも発生したため、初期のおよそ半数のデータは無駄になってしまった。

そこで途中段階として、微量の化石花粉であっても安定的に年代測定ができるルーチンを開発するという目的をあらたに設定した。それを実現した上で、残った時間を較正データの蓄積に回すことにした。

なお、このような事情のため、当初の研究目的は途中までしか達成されなかった。「やり残し」の分については、本研究で蓄積された技術を踏まえ、あらたに科研費を獲得することで発展的に継続中である(平成 30 年度、基盤研究 A:「セルソーターによる化石花粉抽出技術を用いた、放射性炭素年代較正モデ

ルの高精度化」、代表:中川 毅、課題番号:18H03744)。すなわち、「挑戦的」な研究を「萌芽」させるという、本研究の究極の目的は達成されたものと考えている。

## 3. 研究の方法

セルソーターによる花粉抽出の効率、その前処理の段階でどこまで花粉純度を高めておくことができるかに大きく左右される。予備実験の段階では、従来の花粉分析で用いる前処理の手法 (Nakagawa et al. 1998) をそのまま転用していたため、一サンプルの濃縮に 20 日もの時間が必要だった。このままでは、「大量のデータを効率よく生産する」という目的は達成できないことが想定された。

そこで、まず過去の水月湖掘削の際に大量に集めて保管してあった「くず土」(サンプルパイプやツール類に付着した、分析的な研究には使えないが、水月湖起源であることは確かであり、深度もおおまかには把握されている堆積物)を使用して、思いつく限りの化学処理のルーチンを試していった。

つぎに、前処理のおわった「くず土」をじっさいにセルソーターに導入し、含まれる粒子の蛍光パターンを解析した。その上で、前方散乱、側方散乱、紫外線蛍光、青色蛍光、緑色蛍光、赤色蛍光の 6 つのパラメータによって粒子を特徴づけ、どの領域にどのような粒子が集まっているかを、顕微鏡観察によって特定していった。

花粉を抽出するルーチンが定まった後は、福井県水月湖で 2006 年および 2014 年に採取された堆積物サンプルのうち、11,000~15,000 年前の層準からほぼ等間隔に 40 点を選んで化石花粉を抽出し、 $^{14}\text{C}$ 年代測定を実施した。得られた結果は、同じく水月湖の堆積物で樹木の葉の化石に対して大量に測定されている  $^{14}\text{C}$ 年代 (Bronk Ramsey et al. 2012) と比較し、値の確度のチェックをおこなった。結果に大きな齟齬があった場合には、原因を特定した上でルーチンの改良をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) 堆積物の前処理

試行錯誤の結果、前処理後の花粉純度は劇的に向上させることができた。セルソーターの視点で見ると、一つの粒子を観察して分別するのに必要な時間は、粒子のサイズにまったく依存しない。すなわち、セルソーターを用いた花粉抽出の効率、微細な粒子まで含めた「総粒子数」のうち何パーセントが、最終的に抽出されるべき花粉であるかにのみ左右される。とくにサイズの小さい粒子は、肉眼的には存在感がそれほど大きくないが、粒子数にすると大半を占める場合があるた

め、注意が必要であった。

図1の上のパネルは、研究を開始した2016年の時点で達成していた前濃縮の結果である。従来型の花粉分析にとっては、おおむね十分な（あるいはむしろ優秀な）純度であるが、サイズを無視した粒子数で言うと、花粉が占める割合は数パーセントに過ぎない。

いっぽう下のパネルは、本研究完了時に達成されている前濃縮の純度を示している。ここでは、視野に存在する全粒子のうち、花粉が占める割合は50%を大きく上回っている。これにより、年代測定に必要な100万粒子の花粉を得るために必要なセルソーターの運転時間は、20日から数時間へと劇的に短縮することができた。

最終的に確定した前処理のルーチンは以下の通りである：

- HCl 処理
- 水洗
- KOH 処理と洗浄
- HCl 処理
- 比重 1.8 の  $ZnCl_2$  溶液で重液分離
- KOH 処理
- 水洗
- 40 ミクロンメッシュ処理（通過分を回収）
- 10 ミクロンメッシュ処理（通過分を廃棄）

強調すべき点として、従来型の花粉分析で多様されるアセトリシス処理は、有機物を使用すること、また同位体分別のリスクがあることから、処理ルーチンに加えなかった。

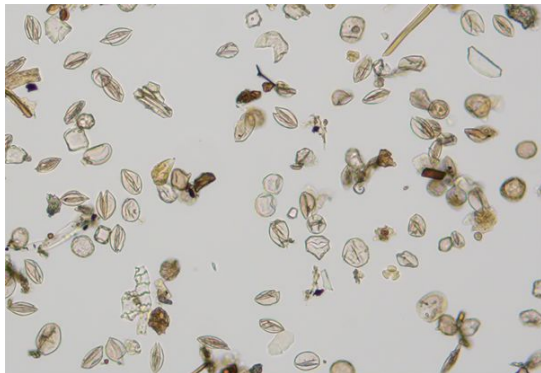
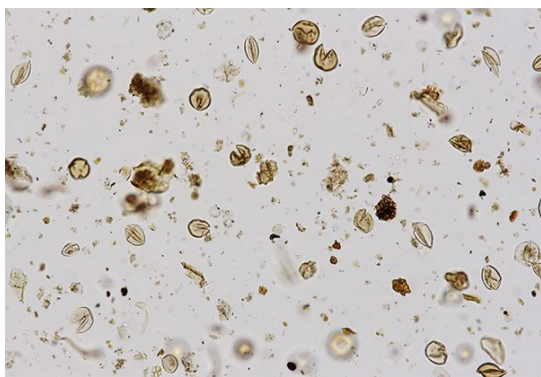


図1：花粉の前濃縮技術の向上。上：研究開始時の前濃縮技術。下：研究終了時の技術。

また、この処理によって花粉の純度は劇的に向上するが、化石花粉の組成（分類群ごとのパーセンテージ）は影響を受ける。すなわちこの処理は、年代測定用の前処理としては適しているが、従来型の花粉分析用の処理として用いることはできない。

## （2）セルソーターによる花粉抽出

実験を開始した当初は、花粉抽出に最適な「普遍的な」セッティングを特定することをめざしていた。しかし、実験を進めるにつれて、そのような設定は現実的には「存在しない」ことが判明した（花粉の蛍光特性は、事前の化学処理、堆積物の年代、化学処理後の経過時間などによってまちまちであった）。

現実的には、前濃縮の技術が向上し、セルソーターに導入する粒子のうち「大半をしめる」ものが花粉である場合が多くなっていることを利用して、「もっとも典型的な領域」を分収することで、ほとんどの場合には100%近い純度の花粉分画を得ることができるようになった（図2）。

従来の花粉処理では、とくに *Botriococcus* 類やクンショウモの化石、微粒炭などが、花粉サンプル中に残留しがちな粒子として典型的に知られていた。今回実験にもちいた水月湖の「くず土」の中にもこれらの粒子は存在していたが、セルソーターのセッティングを調整することで、それらの大半を効率的に除去することができた（ただし、花粉の純度と回収率は背反する関係にあるため、状況に応じた判断は必要である）。

また詳細情報は割愛するが、化石花粉粒子が凝集を起こさないような液性の調整、液滴に十分な電荷が乗らなかった場合でも回収できるようなシステムの開発、「詰まり」を起こした場合でも作業が長時間中断しないような監視システムの構築、有機物を含まないシース液の開発、サンプルロスを極力抑えるための、口径数  $mm^2$  のフィルタリング装置の開発、前処理段階で堆積物を効率的に拡散させるための添加物の開発など、周辺技術を全般に充実させることにも成功した（Yamada et al. 準備中）。

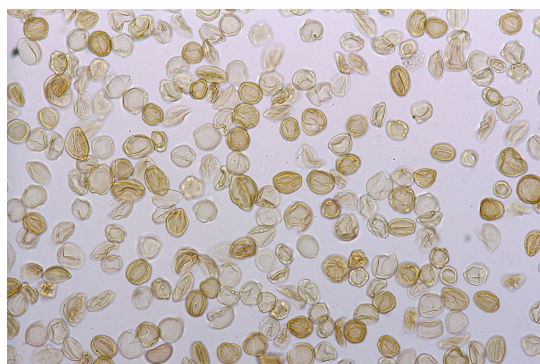


図2：セルソーターによって濃縮された化石花粉。圧倒的な純度を達成している。

以上のことすべての結果として、水月湖の晩氷期～完新世初期の年縞堆積物であれば、およそ 30g の試料から 100 万粒を超える化石花粉を安定的に抽出できるようになった。典型的な処理速度は、1 人の研究者が 1 台のセルソーターを用いて作業した場合で、1 週間におよそ 8 サンプル程度である。

なお古典的な花粉分析の結果、この時代の水月湖の堆積物は 1g あたり少なくとも 10 万粒、今回の研究に用いた 30g であれば、300 万粒以上の化石花粉を含んでいることが判明している。すなわち、年代測定に適さない粒子を除去していく過程で、全体の 6 割程度の花粉は失われていることになる。本研究で獲得した技術はすでに十分「実用的」であるが、まだかなりの「伸びしろ」を残していることも事実であり、今後の課題となっている。

### (3) 年代測定

「くず土」を用いた予備実験の後、水月湖年縞堆積物のいわゆる SG06 コアのうち、11,000～18,000 年前の層準から 42 サンプルを選び、じっさいに化石花粉抽出と年代測定を実施した。初期においては、セルソーターから取り出された花粉分画の純度が高すぎるために、媒質中に完全に拡散してしまって回収できなくなるなどのトラブルが発生した。このため、本報告書を執筆している 2018 年 5 月の段階で得られたデータは 34 点にどまる。また、主に上記の問題が発生したため、年代測定に供することのできた花粉量は、はじめに意図した量である 100 万粒子（おおむね 500 マイクログラムカーボンに相当）に到達しないものが多かった。

年代測定に成功したサンプルについて、花粉から得られた年代を、先行研究によって葉化石から得られていた年代 (Bronk Ramsey et al. 2012) と比較したものが図 3 である。図の中で、青の点は上記先行研究で得られた葉の年代、青の実線は IntCal13 較正モデル (1 標準偏差の上端と下端)、そして青以外の三

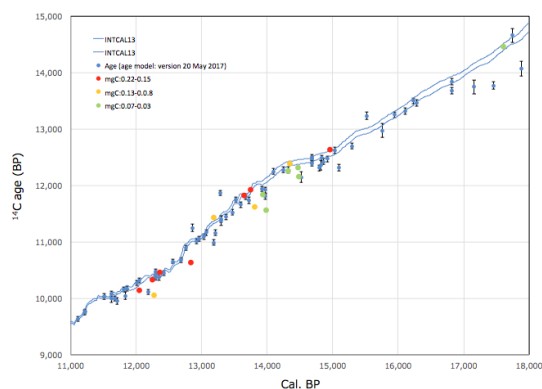


図 3 : 花粉および葉化石から得られた年代の比較。サンプル量さえ確保できれば、安定的に「正解」が得られるようになった。

色の点が、今回の研究で化石花粉から得られた年代値である。今回の三色は、赤が 0.15 mgC 以上、黄色が 0.08mgC 以上、緑が 0.03mgC 以上を確保できたサンプルであることを意味する。

測定の結果、小さなサンプルから得られる年代地は、やや若い方にシフトする場所が見られたが、0.15mgC 以上を確保できたケースにかんしては、既知の「正解」ときわめてよく一致する結果を得た。また一致がやや悪いサンプルについても、花粉の年代が数十年程度の移動平均であるのに対し、葉化石の年代は特定の一年のスナップショットであり、変動性が高いことを考慮するなら、「誤差」であると決めつけることはできない。

今回のプロジェクトでは、年代の accuracy についてはおおむね満足できる結果を得た。だが資金が限界に達したこともあり、<sup>14</sup>C 濃度の年々変動まで検討することはできなかった。今後は、新たに獲得した基盤 A のプロジェクトによって、花粉年代の密度をいっそう向上させ、データの precision の検討をおこなう。また葉化石の年代値の precision との比較を通じて、<sup>14</sup>C 濃度の時系列変化とカーボンサイクルの関係にまで議論の対象を広げていく予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Y Nishiaki, F Guliyev, S Kadowaki, T Omori (2018). Neolithic residential patterns in the southern Caucasus: Radiocarbon analysis of rebuilding cycles of mudbrick architecture at Goytepe, west Azerbaijan. *Quaternary International* 474, 119-130. (査読あり) (DOI: 10.1016/j.quaint.2017.09.015)

L Ito, T Omori, M Yoneda, T Yamaguchi, R Kobayashi, Y Takahashi (2018) Origin and migration of trace elements in the surface sediments of Majuro Atoll, Marshall Islands. *Chemosphere* 202, 65-75. (査読あり)

(DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.083)

D McLean, PG Albert, T Nakagawa, T Suzuki, RA Staff, K Yamada, et al. (2018) Integrating the Holocene tephrostratigraphy for East Asia using a high-resolution cryptotephra study from Lake Suigetsu (SG14 core), central Japan. *Quaternary Science Reviews* 183, 36-58. (査読あり)

(DOI: 10.1016/j.quascirev.2017.12.013)

I Kitaba, T Nakagawa (2017) Black ceramic spheres as marker grains for

microfossil analyses, with improved chemical, physical, and optical properties. *Quaternary International* 455, 166-169. (査読あり)

(DOI: 10.1016/j.quaint.2017.08.052)

G Schlolaut, A Brauer, T Nakagawa, HF Lamb, JJ Tyler, RA Staff, et al. (2017) Evidence for a bi-partition of the Younger Dryas Stadial in East Asia associated with inversed climate characteristics compared to Europe. *Scientific Reports* 7, 44983. (査読あり)

(<https://www.nature.com/articles/srep44983>)

I Kitaba, M Hyodo, T Nakagawa, S Katoh, DL Dettman, H Sato (2017) Geological support for the Umbrella Effect as a link between geomagnetic field and climate. *Scientific reports* 7, 40682. (査読あり)

(<https://www.nature.com/articles/srep40682>)

Y Suzuki, R Tada, K Yamada, T Irino, K Nagashima, T Nakagawa, et al. (2016) Mass accumulation rate of detrital materials in Lake Suigetsu as a potential proxy for heavy precipitation: a comparison of the observational precipitation and sedimentary record. *Progress in Earth and Planetary Science* 3 (1), 5. (査読あり)

(DOI: 10.1186/s40645-016-0081-x)

D McLean, PG Albert, T Nakagawa, RA Staff, T Suzuki, VC Smith (2016) Identification of the Changbaishan 'Millennium' (B-Tm) eruption deposit in the Lake Suigetsu (SG06) sedimentary archive, Japan: Synchronisation of hemispheric-wide palaeoclimate archives. *Quaternary Science Reviews* 150, 301-307. (査読あり)

(DOI: 10.1016/j.quascirev.2016.08.022)

K Nagashima, Y Suzuki, T Irino, T Nakagawa, R Tada, Y Hara, K Yamada, et al. (2016) Asian dust transport during the last century recorded in Lake Suigetsu sediments. *Geophysical Research Letters* 43 (6), 2835-2842. (査読あり)

(DOI: 10.1002/2015GL067589)

BAA Hoogakker, 29 other authors, T Nakagawa, et al. (2016) Terrestrial biosphere changes over the last 120 kyr. *Climate of the Past* 12 (1), 51-73. (査読あり)

(DOI: 10.5194/cp-12-51-2016)

[学会発表](計6件)

T Omori, K Yamazaki, Y Itahashi, H Ozaki, M Yoneda: Development of a simple

automated graphitization system for radiocarbon dating at the University of Tokyo. AMS14 Conference (2017)

I Kitaba, M Hyodo, T Nakagawa, S Katoh, DL Dettman, H Sato: Selective cooling on land supports cloud formation by cosmic ray during geomagnetic reversals. AGU Fall Meeting (2017)

G Schlolaut, A Brauer, HF Lamb, MH Marshall, RA Staff, C Bronk Ramsey, T Nakagawa: A new high resolution glacial flood history from Japan based on the Lake Suigetsu sediment record. EGU General Assembly (2017)

G Schlolaut, A Brauer, T Nakagawa, H Lamb, M Marshall, M Kato-Saito, et al.: Indications of a pan-hemispheric bi-partition of the Younger Dryas Stadial from Lake Suigetsu, Japan. EGU General Assembly (2016)

K Tsumura, (7 other authors), T Nakagawa: High-resolution paleomagnetic secular variation for the last 20 kyr from varved sediments of Fukui-SG14 core from Lake Suigetsu, central Japan. AGU Fall Meeting (2016)

G Schlolaut, A Brauer, T Nakagawa, et al.: Pan-Hemispheric bi-partition of the Younger Dryas Stadial inferred from a multi-proxy study of the Lake Suigetsu sediments, Japan. AGU Fall Meeting (2016)

[図書](計1件)

中川 毅「人類と気候の10万年史：過去に何が起きたのか、これから何が起こるのか」講談社ブルーバックス、ISBN 978-4-06-502004-3, 2017, 224頁

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 毅 (NAKAGAWA Takeshi)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授  
研究者番号：20332190

### (2) 研究分担者

大森 貴之 (OMORI Takayuki)

東京大学・総合研究博物館・特任研究員  
研究者番号：30748900

### (3) 研究協力者

山田 圭太郎 (YAMADA Keitaro)

京都大学・理学研究科・特別研究員  
研究者番号：30815494