

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12562

研究課題名（和文）汚染の残る古人骨のアミノ酸¹⁴C年代測定の微量化と実資料への応用

研究課題名（英文）Small-scale radiocarbon dating of contaminated archaeological bones by purification of individual amino acids.

研究代表者

板橋 悠 (Itahashi, Yu)

筑波大学・人文社会系・助教

研究者番号：80782672

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、考古遺跡出土骨から特定のアミノ酸を単離・精製し、その放射性炭素（¹⁴C）年代測定のために微量測定手法を確立することで、従来法では信頼できる年代値が得られなかった汚染の残る遺跡出土骨の年代を決定することである。

本研究では、液体クロマトグラフィーを用いて遺跡出土骨中のアミノ酸を個別に単離・精製する方法を開発した。コラーゲン特有のアミノ酸であるヒドロキシプロリンは外部から混入する可能性が低く、目的の骨に由来する可能性が高い成分である。本手法を用いて遺跡出土骨のヒドロキシプロリンを年代測定することで、従来法では年代が得られなかった資料での放射性炭素年代測定が可能になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺跡出土骨の放射性炭素年代測定では一般的にコラーゲンが利用されています。しかし、通常の前処理では汚染が残り、得られる年代値が想定される年代と大きくかけ離れている場合が多々ありました。本研究で汚染の原因と指標となるマーカーと検討し、汚染の一部は土壌から植物由来の炭素がコラーゲンに沈着していること、コラーゲンの炭素と窒素の比率が汚染の指標となることが確かめられました。

そこで本研究では、コラーゲン特有なため植物や微生物から混入する可能性の少ないアミノ酸だけを取り出して年代測定する方法を開発し、古人骨でより信頼性の高い放射性炭素年代測定を行う方法を検討しました。

研究成果の概要（英文）：I have developed a method of compound-specific radiocarbon analysis (CSRA) of individual amino acids isolated from bone collagen in ancient human and animal samples.

To obtain radiocarbon dates of single compound, I improved a separating method of indigenous amino acids, specifically for hydroxy-proline. I optimized the separation/fraction collection of individual amino acids using high-performance liquid chromatography and a further purified step of the isolated amino acids prior to the small-scale radiocarbon measurement by accelerator mass spectrometry.

By purification after LC separation, the dating hydroxy-proline in the ancient collagens would provide more accurate ages of archaeological bones.

研究分野：考古科学

キーワード：放射性炭素年代測定 古人骨 アミノ酸 コラーゲン HPLC

1. 研究開始当初の背景

遺跡から出土した人骨の放射性炭素 (^{14}C)年代測定は、考古学研究で一般的な手法となってきた。特に人骨を直接測定することで、遺跡や帰属する文化層の年代幅以上に重要な知見を得ることが可能である。骨の ^{14}C 年代測定では、化学的に安定した成分であるコラーゲンを骨から抽出する方法が行われてきた (Longin, 1971)。しかし、コラーゲンの保存状態が悪い骨では成分の変性や汚染の残存が起こっており、信頼できる年代値が得られないとして議論には使用できないことも多々起こっている。特に近年では、対象の人骨や遺物そのものの絶対年代が重視されるようになり、国際査読論文では共伴遺物による間接的な年代推定だけでは認められなくなってきている。

これまでもコラーゲンに沈着した植物由来の有機酸や微生物由来のペプチドなどの外来有機物を取り除く目的で、XAD-2 樹脂や限外濾過法を行い、遺跡出土骨の ^{14}C 年代の改善が試みられてきた。遺跡出土骨中のアミノ酸の ^{14}C 年代は 1990 年に初めて報告され、精製純度や実験工程での汚染などの問題は残るものの、汚染の影響で年代が変化してしまった資料であっても単離アミノ酸であれば想定に近い年代が得られる可能性が示唆されている (Stafford et al., 1990)。近年ではコラーゲンに特異的に含有されているアミノ酸のヒドロキシプロリン(Hyp)が注目され、 ^{14}C 年代を測定する方法が検討されている。例えば、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を使って各アミノ酸を単離する方法が報告されている (Marom et al. 2012)。この方法によって、限外濾過法では汚染が取り除けず本来よりも新しい年代が示されていた化石骨の年代が改善することが報告された。しかし、Marom ら(2012)はアミノ酸を用いた ^{14}C 年代測定のために、通常のコラーゲンの ^{14}C 年代測定 (2.5mg)に用いる 20 倍もの多量のコラーゲン (~50mg)を必要とする。そのため、アミノ酸分析によって ^{14}C 年代が得られるようになっても、現在の方法では古人骨資料への応用は現実的ではない。

一方で物理学や分析化学の分野ではより微量で ^{14}C 測定を行う方法の開発が行われている (例えば、Yokoyama et al., 2010)。従来の 1/20 で測定が可能な微量加速器質量分析計 (AMS) を古人骨のアミノ酸の ^{14}C 年代測定に応用すれば、人骨などの文化財分析において現実的な破壊での年代測定が可能になる。しかし扱う成分が微量になると実験工程からの炭素の混入や残留する外来炭素の影響がより顕著に表れるため、試料の精製はより慎重になる必要がある。

2. 研究の目的

遺跡出土骨から単離したアミノ酸の ^{14}C 測定は、従来法では汚染の取り除けない骨試料の年代測定を可能にすると期待されるが、考古資料へ応用し普及させるためには障害となる問題が残されている。そこで本研究では、遺跡出土骨の年代測定を主目的としてアミノ酸の ^{14}C 年代測定法をブラッシュアップする。そして実際の遺跡出土骨試料を使って、本手法によって文献にもとづく年代、もしくは共伴資料と同じ年代値が得られるかを検証することで、アミノ酸の ^{14}C 年代測定を考古学研究において実用的な手法とすることを目標とする。そして最終的には、年代が未知であり従来法では測定できなかった保存の悪い骨の年代推定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 第一に ^{14}C 年代測定およびその前処理の微量化を行う。コラーゲンを構成するアミノ酸の一部を測定するアミノ酸の ^{14}C 年代測定では、コラーゲンをまるごと測定する通常の方法に対して多くの骨を必要とする。従来と変わらない量の骨で年代を得るために AMS 測定の微量化を行い、測定に使用する炭素量を減らすことで対応する。また試料を微量化すると実験工程で混入するコンタミの影響も増大する。そのため、本研究では処理を微量化するだけでなく、コンタミの低減や除去を目的とした精製方法も検討した。

(2) 本研究では、放射性炭素年代測定室で保管されている文献や共伴する資料の ^{14}C 年代から正しい年代が分かっている汚染の残る骨コラーゲンでアミノ酸の年代測定を行う。これらの資料のアミノ酸 ^{14}C が想定される年代を示すか、またどのような資料ではアミノ酸 ^{14}C 測定でも信頼できる年代推定が得られないかを検証し、本手法を適用できる資料の条件を確定させる。

4. 研究成果

(1) 液体クロマトグラフィー (HPLC) および AMS 測定の微量化と実験工程での外来成分の混入を低減する手法 (図 1) を検討することで、50 μg の炭素を含むアミノ酸を単離することで ^{14}C 年代測定が可能となった。これは一般的な ^{14}C 年代測定に用いる炭素量 1 mg の 1/20、先行研究のアミノ酸の ^{14}C 年代測定で分析された 500 μg の 1/10 の量となり、元資料である骨の破壊も

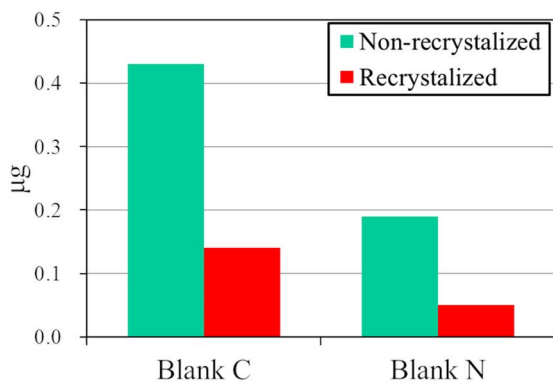


図1 精製処理による炭素と窒素混入量の低減

(2) 本手法により、これまでの研究でコラーゲンをを用いた従来法による ¹⁴C 年代測定により、信頼できる年代測定結果が得られている資料において、従来法と本研究で開発している単離アミノ酸 ¹⁴C 年代測定に補正が必要ながらも一貫する年代値が得られることを確かめた。

また、炭素・窒素含有比 (C/N 比) や炭素同位体比からコラーゲンに汚染が残ると判断され、従来のコラーゲンの ¹⁴C 年代が共伴遺物よりも新しい年代に推定され、信頼できる年代値ではないと判断された資料において (板橋 2020)、本手法で回収されたアミノ酸は共伴遺物と同様の年代値を示した。

一方で、従来法で汚染の残るコラーゲンとされていた資料の一部では、アミノ酸が全く回収されない例も確認された。これは従来法で分析に供されたコラーゲンとされた試料の一部には、実際にはアミノ酸以外の成分で構成された試料が含まれており、本手法を使用できない骨資料が多く存在していることを示している。

窒素含有量の多い試料では本手法によって外来炭素を除去し、微量のアミノ酸で信頼できる年代が得られると考えられる。骨試料およびコラーゲンの窒素含有率とアミノ酸の回収率には相関が示されたため、単離アミノ酸の ¹⁴C 年代測定年代測定が可能な試料のためのスクリーニング基準を設定した。今後はこの基準に従って資料を選別することで、より効率的に単離アミノ酸の ¹⁴C 年代測定による年代決定を行っていく。

引用文献

- Longin, R. *Nature* 1971, 230. 241-242.
 Marom, A.; McCullagh, J. S. O.; Higham, T. F. G.; Sinitsyn, A. A.; Hedges, R. E. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109. 6878-6881.
 Yokoyama, Y.; Koizumi, M.; Matsuzaki, H.; Miyairi, Y.; Ohkouchi, N. *Radiocarbon* 2010, 52. 310-318.
 Ishikawa, N.F.; Itahashi, Y.; Blattmann, T.M.; Takano, Y.; Ogawa, N.O.; Yamane, M.; Yokoyama, Y.; Nagata, T.; Yoneda, M. Haghypour, N.; Eglinton, T.I.; Ohkouchi, N. *Analytical Chemistry* 2018, 90. 12035-12041.
 板橋悠 「分析試料の正しい取り扱いかた 考古資料」『ぶんせき』2020, 548. 276-281

1/10 に抑えられることを意味する。本手法については *Analytical Chemistry* で発表した (Ishikawa et al. 2018)。

また遺跡出土骨のコラーゲンから Hyp を単離精製し、¹⁴C 年代測定を行うメソッドも確立させた。2 段階の HPLC による分取で Hyp を単離させた (図 2)。その他のアミノ酸は植物や微生物由来の有機物にも存在するためコンタミの危険性がある。一方で、コラーゲンが形成される際にプロリンが修飾されて作られる Hyp を含むタンパク質は限られており、土壤中から骨に混入してくる可能性が低い。そのためアミノ酸の中でも目的の骨に由来する可能性が高い成分である。

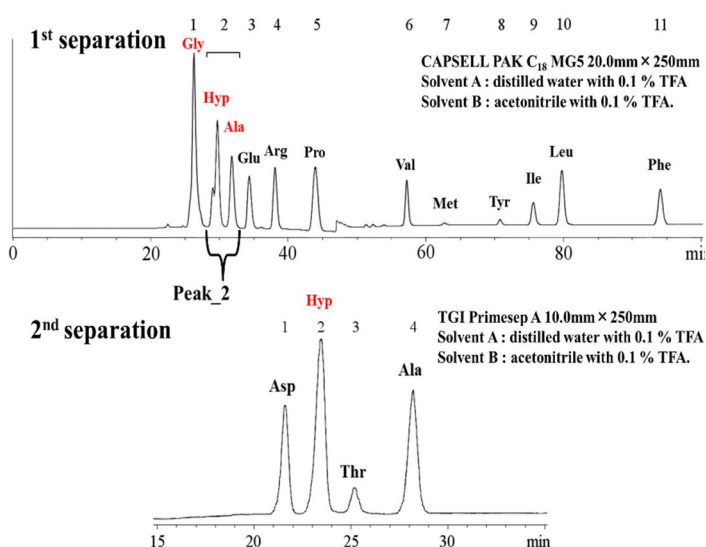


図2 骨コラーゲン加水分解物の HPLC クロマトグラム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 板橋 悠	4. 巻 548
2. 論文標題 分析試料の正しい取り扱いかた 考古資料	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ぶんせき	6. 最初と最後の頁 276-281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Naoto F., Itahashi Yu, Blattmann Thomas M., Takano Yoshinori, Ogawa Nanako O., Yamane Masako, Yokoyama Yusuke, Nagata Toshi, Yoneda Minoru, Haghypour Negar, Eglinton Timothy I., Ohkouchi Naohiko	4. 巻 90
2. 論文標題 Improved Method for Isolation and Purification of Underivatized Amino Acids for Radiocarbon Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 12035 ~ 12041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.8b02693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Okazaki Kenji, Takamuku Hirofumi, Yonemoto Shiori, Itahashi Yu, Gakuhari Takashi, Yoneda Minoru, Chen Jie	4. 巻 24
2. 論文標題 A paleopathological approach to early human adaptation for wet-rice agriculture: The first case of Neolithic spinal tuberculosis at the Yangtze River Delta of China	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Paleopathology	6. 最初と最後の頁 236 ~ 244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpp.2019.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 板橋悠、大森貴之、尾寄大真、山崎孔平、大河内直彦、高野淑識、小川奈々子、石川尚人、米田穰
2. 発表標題 アミノ酸の微量グラファイト化による遺跡出土骨14C年代測定の高精度化
3. 学会等名 文化財科学会 第36回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎大真, 大森貴之, 板橋 悠, 山崎孔平, 金澤礼雄, 上原加津維, 内田啓子, 関根紀子, 米田穰
2. 発表標題 東京大学総合研究博物館Compact-AMS の現状 (2018 年度)
3. 学会等名 第21回AMS シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板橋悠
2. 発表標題 先史時代人骨の化合物レベル同位体分析により 古代文明以前の社会を探る
3. 学会等名 日本有機地球化学会 若手・学生オンライン研究発表会2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	米田 穰 (Yoneda Minoru)		
研究協力者	大森 貴之 (Omori Takayulki)		
研究協力者	尾崎 大真 (Ozaki Hiromasa)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石川 尚人 (Ishikawa Naoto)		
研究協力者	大河内 直彦 (Ohkouchi Naohiko)		
研究協力者	高野 淑識 (Takano Yoshinori)		
研究協力者	小川 奈々子 (Ogawa Nanako)		
研究協力者	横山 祐典 (Yokoyama Yusuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関