

第3章 骨コラーゲンの炭素同位体分析に基づく馬の食性復元

1. 背景

(1) 遺跡出土動物遺存体を用いた同位体分析とは

本研究では主に考古生物学としての研究姿勢で分析を試みている。考古生物学における研究の基本姿勢として、あくまで分析対象である生物の生き様を自然科学的な情報に基づいて評価することにある。対象となる生物がどのように生きたかという問いに答えるために、考古生物学では様々な手法が開発されており、現在までに形態学・遺伝学・地球化学・情報科学の大きく4つに大別できる研究手法が研究開発されてきた。本研究で取り扱う手法は、考古生物学の中の形態学と地球化学の研究領域で開発されたものである。形態学は主に動物種の同定、動物の体サイズや年齢の復元、病変の同定、遺伝的小変異形質の同定などが挙げられる。これらを復元することで、どのような形のウマがいたか、推定が可能である。一方、地球化学的手法は、形態学からは推定が困難な、動物の生態学的情報の抽出を得意とする。生態学的情報とは、平易な言葉でいうと「いつ・どこで・どのように生きていたか」という情報である。これらの情報を遺跡出土動物遺存体から抽出するために、骨や歯に含まれる元素や同位体という指標が注目されてきた。

骨や歯を用いた地球化学的分析で最初に登場した手法は、元素分析である。元素分析は、骨や歯に含まれる元素組成に基づいて、生態学的情報を抽出しなければならない。研究例としては、歯のエナメル質に含まれるカルシウム、ストロンチウム、バリウム、マグネシウムの濃度を比較し、肉食動物か草食動物か識別した研究が挙げられる。草食動物は、土壌から吸収されたバリウム、マグネシウムを豊富に含む植物を摂取している。一方、肉食動物は、バリウム、マグネシウムが相対的に少ない筋肉組織や内臓を摂取する割合が高い。このため、肉食動物になればなるほど、同じ骨や歯であったとしても、草食動物よりもバリウム、マグネシウムの比率が低くなる。つまり、これらの元素組成に基づいて、摂取食物の復元が可能といえる。しかし、元素組成は生息地域によって大きく異なる値を示すことが分かっており、異なる地域から移動してきた個体があった場合に、正確な生態情報を復元することが困難であった。さらに、飢餓や病気のために代謝の恒常性が維持できない場合、食性の復元が困難である場合もある。

一方、同位体分析は元素分析で得られた結果に対して、さらに正確な解釈を与える手法といえる。同位体とは、同じ元素の中でも異なる質量数を持つ物質を意味する。例えば、水素の中には陽子と電子が一つずつ存在するが、これとは別に、電気的な影響が生じない（電荷がない）中性子という粒子が入っている水素も存在する。この中性子の数が異なるものを同位体と呼ぶ。各同位体は中性子分の質量数が異なるものの、化学反応時の挙動は各同位体間ではほぼ同じである。唯一異なる点として、中性子分の質量数が変化することで、化学反応速度も変化するという点である。例えば、中性子数が多い同位体は、中性子数が少ない同位体と比べて、早く反応する。この反応速度の違いが原因となり、様々な物質で各同位体の存在割合が僅かに異なる。この存在割合を一般的に同位体比と呼ぶ。水を例に挙げると、常温の水を沸騰させる際に出てくる水蒸気に含まれる水素の同位体比は、沸騰し

たお湯の水素同位体比よりも低い（軽い）同位体比を示すことが分かっている。これは、質量数の少ない（軽い）水素同位体が、質量数の多い（重い）水素同位体よりも反応速度が速いため、水蒸気として先に反応して出てくるのは、移動速度の速い（軽い）同位体だからである。水蒸気の例に限らず、化学反応が生じるあらゆる現象において、物質内の同位体比は変化を伴い、多様な値を示す。このような現象を動的同位体分別効果と呼び、様々な物質間で動的同位体分別効果が生じている。

化学反応の仕組みが類似した物質間では、物質内の同位体比も近似した値を示す。例えば、植物の代謝のしくみが異なる C3 植物と C4 植物の炭素同位体比が代表的な例として挙げられる。C4 植物は C3 植物と異なり、乾燥した環境下に適した植物群で、C3 植物が持たないハッチスラック回路という特殊な代謝経路をもつ。この代謝の違いによって、大気中の二酸化炭素の取り込みが変化し、C3 植物と C4 植物に含まれる主要成分であるセルロースの炭素同位体比は大きく異なる同位体比を示す。このように、何もわからない植物体の同位体分析によって、その植物体が C3 植物か C4 植物か判別することができるのである。この識別法および評価法を遺跡出土の動物遺存体に応用したのが、本研究である。

(2) コラーゲン分子の同位体比に基づく食性復元

近年、遺跡出土動物遺存体の同位体分析から、動物の食性を復元する試みが行われてきた。なかでも、骨コラーゲンの炭素・窒素同位体比は、動物の生存時における約 10 年間の内で得られたタンパク質由来の炭素・窒素同位体比の平均値を表すため、動物の平均的な食生態を復元する上で、重要な指標として扱われている。ウシなどの反芻類を除いて、哺乳動物の代謝系はそれぞれ類似しており、その影響は同位体比にもみられる。現生実験動物の給餌実験から、同一の餌を給餌した場合、各動物種は近似した炭素・窒素同位体比を示すことが知られている (Jim *et al.* 2004)。また、餌の内容が異なる 2 つのグループの炭素・窒素同位体比を調べると、動物の種類に関係なく、同じ餌を摂取した個体同士で同位体比が近似することが分かっている。このことから、消化吸収のしくみが大まかに類似した動物間であれば、餌の同位体比とその餌を摂取した動物の同位体比の間で、常に一定の関係性をもつことが分かるのである。また、この餌と動物間の炭素・窒素同位体比の関係性は数式で表現するために、動物の炭素・窒素同位体比を測定することで、餌の炭素・窒素同位体比に変換することが可能となる。

この技術は、文献情報が乏しい先史時代の試料に対して数多く応用されてきた。とくに、様々な動物種の家畜化に関わる兆候を検出する際に応用されるなど、強力なツールとして一般化し始めている (Minagawa *et al.* 2005、Barton *et al.* 2009、Hu *et al.* 2014)。一方、これらの研究手法は、文献史料が充実した歴史時代の動物考古学研究にはほとんど応用されておらず、多くの研究課題が残されている。

炭素・窒素同位体比は食べ物の情報を表す指標であるため、同位体情報から家畜に与えていた飼料情報を抽出することが可能である。例えば、炭素同位体比は植物の中でも光合成代謝回路が異なる C3 植物と C4 植物の摂取割合を評価する際に利用可能である。C4 植物は栽培植物のアワ・ヒエ・キビなどの雑穀類が挙げられる。C4 植物は東アジアの自然環境下では優占種ではなく、ほぼ C3 植物が優占している。そのため、C4 植物の摂取割合が野生動物よりも大きく異なれば、栽培植物を摂取していたことを示唆できる。この特性を利用して、動物に雑穀類を給餌する時代の特定が行われた。

古くから雑穀類を栽培していた黄河流域の遺跡出土イノシシが分析され、約 7000 年前からイノシ

シは栽培植物を与えられていたことが示されている (Barton *et al.* 2009)。また、同様に、ネコにおいても約 5000 年前から、栽培植物を摂取した兆候が検出された (Hu *et al.* 2014)。このように、今まで形態学的な議論や発掘状況を考慮して家畜の可能性を議論してきたが、同位体比は動物 1 個体ごとの生態を復元するという全く異なる情報を提示する。とくに、遺跡から出土する動物遺存体の炭素同位体分析は、過去の動物飼育の有無を検証する上で重要な示唆を与える。

日本においては、中国と同様に、C4 植物は馬飼育以前からアワ・ヒエ・キビなどの雑穀類が先行して利用されていた。また、日本の里山や森林地帯、半自然草原下では C3 植物が優占するために、C4 植物摂取の兆候が強い場合、その個体が雑穀類の人為的な給餌を受けた可能性を示唆する。一方、沖縄や南西諸島では沿岸部における半自然草原に C4 植物が優占しており、沿岸部における限定飼育の兆候をとらえることも可能である (覚張 未発表データ)。したがって、遺跡出土馬の炭素同位体比からは、雑穀類の摂取と島嶼地域からの移動の可能性を示唆する上で有用な指標となり得る。

現在の動物考古学的研究に基づくと、藤原宮が造営された 7 世紀後半は、日本列島では本州・四国・九州から馬が出土しているが、同時期の琉球列島における遺跡からは未だ馬が検出されていない。これを仮定した場合、藤原宮跡から出土した馬の炭素同位体比は、琉球列島以北における馬の食生態や給餌様式を反映すると期待される。

(3) C3 植物・C4 植物とは

C3 植物とは、二酸化炭素を吸収した後に、光合成によって最初に合成される物質 (Phosphoglyceric acid (PGA)、 $C_3H_5O_6P$) の炭素数が 3 つであることに由来する植物の総称である。生物種の分類とは異なり、光合成のしくみの違いに基づいた分類群を示す。C3 植物は、葉の気孔から二酸化炭素を吸収し、カルビンベンソン回路で光合成する。世界の植物のうちその多くは C3 植物であり、ツンドラ地帯から熱帯気候まで全球的に広く自生している。栽培植物ではイネ・コムギ・オオムギ・ダイズなどが挙げられる。また、木本類のほぼすべての種は C3 植物である。馬の飼育に関連する植物の中で、イグサや稲わらなどは C3 植物に分類される。

C4 植物とは、二酸化炭素を吸収した後に、光合成によって最初に合成される物質 (Oxaloacetic acid (オキサロ酢酸)、 $C_4H_4O_5$) の炭素数が 4 つであることに由来する植物の総称である。C4 植物は、大気中の二酸化炭素を葉の気孔から取り込み、葉肉細胞中で二酸化炭素とホスホエノールビルビン酸 (PEP) からオキサロ酢酸を合成する。また、オキサロ酢酸はリンゴ酸 (Malic acid、 $C_4H_6O_5$) を合成した後に、維管束鞘細胞に輸送される。維管束鞘細胞内のリンゴ酸は二酸化炭素を遊離した後にオキサロ酢酸として、葉肉細胞に輸送される。維管束鞘細胞内はリンゴ酸由来の二酸化炭素で満たされた後に、カルビンベンソン回路を経て光合成が行われる。C4 植物は主に温帯および熱帯地域に自生する草本植物が多くを占めている。亜寒帯気候の乾燥地帯において、アワ・ヒエ・キビなどの雑穀類が栽培されており、これらの植物は現在では半自然草原において再野生種として自生していることが多い。馬の飼育に関連する植物の中で、アワ・ヒエ・キビなどは C4 植物に分類される。

2. 目的

本分析は藤原宮跡出土獣骨の骨コラーゲンが実際に抽出できるかを検証し、抽出した骨コラーゲン

の炭素・窒素同位体比を測定した。とくに、炭素同位体比に焦点を当て、藤原宮跡出土馬が雑穀類にどれだけ依存していたかを評価した。これらの分析結果に基づいて、藤原宮で出土した馬の雑穀利用の復元を試みた。

3. 試料

本分析では、藤原宮造営期にあたる溝から分析資料を採取し分析に供した。採取した試料はウマと、C3植物食者の動物であるニホンジカの計5点を用いた。

4. 方法

(1) 分析器具について

東京大学先史人類学研究室において実施されるコラーゲン抽出で使用されるガラス器具類は、マッフル炉内で高温燃焼することで外部有機物由来の炭素汚染を最小限にするように心がけている。また、試料が直接触れる器具も同様に、外部汚染の影響に対する対策を実施している。

(2) コラーゲン抽出の分析手順

骨コラーゲンの抽出法は、Yoneda *et al.* (2002) の方法に基づいて実施した。はじめに、歯科用デンタルドリルを用いて、馬および鹿の骨片を採取した。採取した骨の表面はサンドブラスターで土壌物質を除去した。超純水中で超音波洗浄し、表面の微細な汚染を除去した。洗浄した試料は0.2N NaOHに浸し、4℃下で12時間反応させ、表面に付着する有機物汚染の影響を除去した。0.2N NaOHを除去し、超純水で洗浄する。試料を浸した超純水の酸性度が中性になったことを確認し、凍結乾燥器にて12時間乾燥させた。乾燥させた試料は粉碎器具にて粉末化した。粉碎した試料はセルロースチューブ内で1.2N HClに反応させ、炭酸カルシウムを除去した。反応が終わったことを確認し、1.2N HCl内にて4℃下で12時間の脱灰反応を行った。脱灰後は、1.2N HClを除去し、セルロースチューブ内が中性に戻るまで超純水を繰り返し交換した。中性に戻した後に、12時間超純水内に入れた。脱灰後の試料溶液をガラス管に移し、遠心分離して上澄みを凍結保存した。沈殿物に超純水を加え、ブロックバスにて90℃で12時間の反応を行い、コラーゲンをゼラチン化させた。ガラス管を遠心分離し、上澄みに溶解しているゼラチン化したコラーゲンをガラスフィルターにて濾過した。濾過された試料溶液は2日間凍結乾燥させた。

(3) 炭素・窒素同位体測定

抽出されたコラーゲンは国立科学博物館の元素分析計一同位体比質量分析計 (EA-IRMS) を用いて $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ および炭素・窒素比 (C/N) を測定した。EA-IRMSの測定系は、はじめに元素分析計 (FLASH2000, Thermo) で固体試料 (コラーゲン) が燃焼・還元され、生じたガスはキャピラリーガスクロマトグラフによって二酸化炭素・窒素ガスに分離される。分離されたそれぞれのガスを同位体比質量分析計 (MAT253, Thermo) に導入するために、ガスの流量を調節するインターフェイス

(ConFlo IV、Thermo) を接続することで、元素分析計で分離したガスから一度に両同位体比の測定が可能になった実験系である。炭素・窒素同位体比の測定は測定用の精製コラーゲン 0.5mg をスズ箔に包み、上述した EA-IRMS で測定を実施した。

測定された炭素・窒素同位体比は国際標準物質の値を基準に補正した値を後の解析に用いる。炭素同位体比の標準物質は PDB、窒素同位体比は現代大気 (AIR) を基準とし、これらの標準物質の同位体比からの差分を千分率 (‰: パーミル) で表記する。この値は δ (デルタ) と表記する。同位体比の補正計算は (式 1) の通りである。また、本分析における同位体比の測定精度は、炭素同位体比は標準偏差 ± 0.1 ‰、窒素同位体比は標準偏差 ± 0.1 ‰であった。

$$\delta^*X = \left[\left(\frac{(^*X/X)_{\text{sample}}}{(^*X/X)_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ (‰)} \right] \cdots \text{(式 1)}$$

X は同位体、 $^*X > X$

土壌由来の有機物汚染の影響がある分析試料を除外するために、生体のコラーゲンがもつ C/N=2.9 ~ 3.6 の基準から逸脱した試料は、同位体比の比較には用いなかった (Deniro 1985)。

5. 結果

コラーゲン抽出に使用した骨重量と抽出したコラーゲン重量から骨コラーゲン抽出率を求めた結果、コラーゲン抽出率は 1.36 ~ 7.54 % を示した (表 3-1)。骨から 1 % 以上のコラーゲンが抽出された場合、同位体分析の信頼性が高いことを意味する (Deniro 1985)。比較的にコラーゲンの保存状態が良いとされる縄文時代における貝塚出土の骨コラーゲン抽出率は 1 % を超える試料は少ないが、本分析では 1 % 以上の個体が複数確認された。さらに、生体時のコラーゲンが示す炭素・窒素比 (C/N) は 2.9 ~ 3.6 を示すが (Deniro 1985)、本分析では全ての個体が C/N = 3.1 を示した。この結果に基づくと、藤原宮跡出土獣骨の骨コラーゲンは、非常に保存状況が良いといえる。また、コラーゲン残存率が非常に高いことから、骨含有有機物が総じて良く保存されている可能性が高いと推察され、古代 DNA 分析や他の有機物に関する分析が将来的に実施できると思われる。

骨コラーゲンの炭素・窒素同位体比測定の結果、炭素同位体比は $\delta^{13}\text{C} = -20.0 \sim -15.2$ ‰ (Mean = -17.6 ‰、SD = 1.7 ‰)、窒素同位体比は $\delta^{15}\text{N} = 3.5 \sim 5.7$ ‰ (Mean = 4.3 ‰、SD = 0.8 ‰) であった (表 3-1 参照、図 3-1)。とくに、C3 植物食であるシカの炭素同位体比が -22.0 ‰であり、ウマと比べると相対的に低い炭素同位体比を示した。また、ウシもしくはウマの四肢骨の炭素同位体比は $\delta^{13}\text{C} = -18.8$ ‰、窒素同位体比は $\delta^{15}\text{N} = 5.5$ ‰であった。

表 3-1 藤原宮跡出土動物遺存体の炭素・窒素同位体比

資料番号	分析番号	遺構	時期	動物種	部位	左右	窒素同位体比 (骨コラーゲン) ‰	炭素同位体比 (骨コラーゲン) ‰
153-29	TG102206	SD1901A	藤原宮造営期	ウマ	下顎骨	左右	3.5	-15.2
153-28	TG102207	SD1901A	藤原宮造営期	ニホンジカ	肩甲骨	左	5.1	-22.2
153-10	TG102208	SD1901A	藤原宮造営期	ウマ	上腕骨	左	5.7	-20.0
20-1	TG102209	SD1901A	藤原宮造営期	ウマ	下顎骨	右	4.0	-17.3
20-2	TG102210	SD1901A	藤原宮造営期	ウシ・ウマ	四肢骨	-	5.5	-18.8

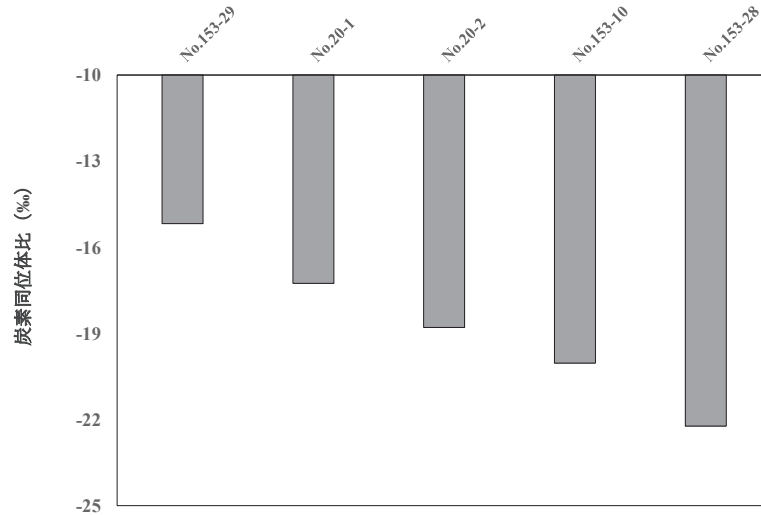


図3-1 骨コラーゲンの炭素同位体比

6. 考察

本分析で得られた同位体比が、実際にその動物の食生態を反映しているか評価するために、窒素同位体比に着目した。動物骨の窒素同位体比は、栄養段階が高いほど高い値を示し、草食動物よりも肉食動物が高い値を示す (Minagawa&Wada 1984)。また日本列島において、肉食動物や雑食動物は約8‰以上の値を示し、草食動物はそれよりも低い値を示すことが分かっている。本分析では、草食動物の特徴である3‰～6‰の範囲を示しており、縄文遺跡から出土している日本列島の野生草食動物 (Minagawa *et al.* 2005) と有意な差は無かった (U 検定、 $P > 0.05$)。したがって、本分析で得られた窒素同位体比は、草食動物に期待される同位体比の範囲から逸脱しておらず、矛盾がない。さらに、野生動物であるシカの炭素同位体比は、-22‰を示しており、ウマに比べて低い同位体比を示した。シカは木の葉を食べる動物 (ブラウザー) で、ウマは下草を食べる動物 (グレイザー) であり、食生態が異なる。また、木の葉の大半はC3植物であるが、下草にはわずかに野生のC4植物があり、同一生態系に生息していたとしても、シカの方がより軽いC3植物由来の炭素を摂取する。本分析で得られた結果は、動物種間における生態情報の違いも保持していると推察される。

次に、藤原宮跡出土馬のC4植物の摂取について評価を行った。C3植物食の草食動物の炭素同位体比の平均値は約-20‰、C4植物食の草食動物の炭素同位体比の平均値は約-10‰であることを考慮すると (Barton *et al.* 2009)、藤原宮跡出土馬はその中間的な値を示しているため、C3植物とC4植物の両方を摂取していたといえる。また、ウマの個体間でも炭素同位体比が多様な値を示しており、個体間におけるC4植物の摂取割合が異なっていた可能性が推察される。なかでも、炭素同位体比が-15.2‰を示した個体 (No.153-29) が検出されたが、この炭素同位体比は本州および九州本土において分析された馬のなかでも最も高い値を示した。これは、藤原宮跡出土馬が他の地域よりも何らかのC4植物に相対的に強く依存していた可能性が考えられる。

厩牧令ではC4植物であるアワを給餌する制度が記されており、体格の優劣を考慮してアワの給餌割合をかえていることが明記されている。一方、体格が優れたウマであったとしても、アワ以外にコメや乾草などいくつかのC3植物も与えられていたとされている。例えば、豆・干し草・青草・木葉・

イネなどの C3 植物を馬が多く摂取した場合、シカなどのブラウザーがもつ炭素同位体比に近似した値を示すと期待される。しかし、本分析結果はシカとは異なる炭素同位体比を示しており、栽培植物のイネの藁などを多量に与えていた積極的な証拠は無い。また、アワとイネが半々くらいで与えられていた場合、炭素同位体比は C3 植物と C4 植物を同じ割合で摂取した場合の範囲に収まる。これらの結果を合わせて考慮すると、本分析で得られた結果は、C3 植物と C4 植物の両者の摂取兆候が見えるだけ各植物を給餌していたと考えられ、既牧令に記載された給餌内容と矛盾はない。

今後、分析個体数を増やして議論した場合、C4 植物摂取傾向の高いウマが多数検出されると期待される。しかし、本分析で得られた結果では、同一産地における給餌内容の差異を反映しているか、複数産地における自然植生および給餌内容の差異を反映しているか、炭素同位体比のみでは区別できないため、既牧令の詳細な内容を炭素同位体比のみで評価することはできない。

このように、一集団内における雑穀給餌量の差か、異なる生態系からの移入個体なのかを識別するには、炭素同位体比では困難であるため、移入個体が識別するための新たな指標が求められる。藤原宮周辺域で飼育された個体であるか、比較的に遠方の異なる地域から移入された個体であるかを識別することで、ウマの飼育に関する文献記録の乏しい藤原宮跡造営期におけるウマのより具体的な利用形態の一端が評価できると期待される。

(覚張隆史・米田穰)

引用文献

- Barton, L., Newsome, S. D., Chen, F., Wang, H., Guilderson, T. P., Bettinger, R. (2009) Agricultural origins and the isotopic identity of domestication in northern China, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 14, pp. 5523-5528
- Deniro, M. J. (1985) Postmortem preservation and alteration of in vivo bone collagen in relation to palaeodietary reconstruction, *Nature*, 317, pp. 806-809
- Hu, Y., Hu, S., Wang, W., Wu, X., Marshall, F. B., Chen, X., Hou, L., Wang, C. (2014) Earliest evidence for commensal processes of cat domestication, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, pp. 116-120.
- Jim, S., Ambrose, S. H., Evershed, R. P. (2004) Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite: implications for their use in palaeodietary reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 68. pp. 61-72
- Minagawa, M., Matsui, A., Ishiguro, N. (2005) Carbon and nitrogen isotope analyses for prehistoric *Sus scrofa* bone collagen to discriminate prehistoric boar domestication and inter-islands pig trading across the East China Sea, *Chemical Geology*, 218, pp. 91- 102.
- Minagawa, M. and Wada E. (1984) Stepwise enrichment of $\delta^{15}\text{N}$ along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal ages. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48, pp. 1135-1140
- Yoneda, M., Tanaka, A., Shibata, Y., Morita, M., Uzawa, K., Hirota, M., Uchida, M. (2002) Radiocarbon marine reservoir effect in human remains from the Kitakogane site, Hokkaido, Japan. *Journal of Archaeological Science*. 29. pp. 529-536.