

土器モデル系を用いた考古学試料の 脂肪酸分析の限界解明と有機物分析の展望

堀内 晶子・高木 彰子・山根 知子・武石 奈津枝・押川 克彦

●キーワード：土器 (pottery), 脂肪酸 (fatty acid), グリセリド (glyceride), 脂質 (lipid),
モデル系 (model system)

1. はじめに

古代の人々の生活環境を検討する際、残存有機物は非常に魅力的な分析対象である。自然界には生物種に特異的な有機物質が多数存在することから、残留する有機物質を分析することにより、古代の営みが具体的に明らかにできる可能性があるからである。特にすべての生体の主成分の一つである脂質の分析は考古学の分野においても数多くの報告がなされている。脂質の中でも絶対残留量が比較的多く、しかも生物種によって炭素鎖の長さの分布や不飽和度の違いがある脂肪酸 (FA) の分析は、1970年代から注目されてきた分野である (Curri 1976)。アメリカ化学会の学術論文データベース SciFinder Scholar (American Chemical Society 2006) で「archaeology」と「fatty acid」の2つのキーワードで検索すると、1971年から1990年までの20年間に17報であった論文数が1991年から2000年までの10年間で30報、2001年から2007年春まで44報と激増しているのがわかる。一方国内の論文では、国立情報学研究所の「学術研究データベース・リポジトリ」から同様に検索すると1980年代は2報、1991年から2000年までの5年間は6報報告された以降は発表されていない (学術研究データベース・リポジトリに含まれている文化財科学文献データベースは2005年3月7日更新)。2001年7月28日、インターネットに公開された「残存脂質分析関連文献一覧」には1970年から2001年まで200を超え

る欧文、和文論文及び新聞記事、学会要旨、調査報告書等が紹介されているが、同年、脂質分析に対する問題点の指摘が活発になり (難波他 2001) (「残存脂肪酸分析—その科学性と成果の検証」など)、考古学試料の有機物分析一般が国内で急激に減少した。

この現象の背景には、すでに2001年以前から存在していた有機物分析に対する漠然たる不信感がある (例として坂井他 1995)。現代の分析結果がそのまま古代の状況を反映しているか否か、科学的な根拠が明確に提示されてこなかった事が原因ではないかと考えられる。有機物は水や土壌、空気、あるいは微生物により分解されやすい事は良く知られているが、考古学試料の保存状況において具体的にどのような環境下で、どの程度、何に分解されるのか、あるいは安定に残存するのかの説得力ある科学的根拠が提示されてこなかった。FA分析の信頼性は1985年にRottlaender (1985) が報告した土壌中に埋めた既知の脂肪酸メチルエステルの経時変化の報告に負う所が大きいと思われる。土壌中に放置すると、時間と共に既知の脂肪酸メチルエステルの総量は減少するが、一部は時を経ても残留し、その組成は変化しないというものである。また中村による石に付着させた加熱実験 (1995)、エゾジカの脛骨の脂質変化 (1989) 等の報告があるが、報告対象が文系である為か実験条件が詳しく提示されていない。一方Duddら (1998) は土器に吸着させた既知脂質の空气中 (30°C, インキュベーター中) における説得力ある分解実験をおこなっているが、

条件が限られている。つまり、科学的根拠になるデータの信頼性を十分検討する事無く結論のみを基にして、回収されたFAの組成のパターンから種を同定する多くの報告がなされてきた結果（難波他 2001）であるように思う。従って、科学的に何がハッキリ分かり、何が分からないかをより明確にし、多くの理解を得る事が、これまでの不信感を払拭し、様々な可能性を持っている考古学的試料の有機物分析の今後の発展のカギになると考えている。

そこで、これまでに我々がモデル系を使って検討してきた土器に吸着されたFAの基礎実験（泉他 1994）（堀内他 1995）（押川他 1996）（武石他 1997）（給田他 1997）（堀内他 1999）をまとめてFA分析の具体的な科学的問題点を提示し、研究過程で明らかになった有機物分析の展望についてここに述べる。

素焼き土器は油性分をよく吸収する。従って土器内部に吸収された油は土器鉱物のマトリックス内に捕獲されるため外部環境から影響をうけにくく、遺跡試料の中でも過去の成分を残しやすいのではないかと考えた。そこで、土器のモデルとして粘土から素焼き板を作成し、既知の脂質を吸着させたモデル系を、様々な環境下（封管中、空气中、土壌中、水中）に一定期間保管した後、脂質を回収し脂質の主成分であるグリセリドとFAが、異なった保存環境下でどのように変化するかを検討することにより、遺物試料のFA分析の信頼性を考察した。

2. 実験

2.1 試料

縄文遺跡が数多く発掘されている東京都三鷹市国際基督教大学構内から出土した粘土を800℃で一晩焼いた素焼き板を約1 cm³に切断し土器モデルとした。約0.1gの既知脂質を精密に量り取り土器モデルに吸着させた。既知脂質は飽和FAを比較的多く含む動物性と不飽和FAを比較的多く含む植物性の両方を用いた。植物性脂質の代表として国際基督教大学構内で採取したツバキの実から得た油を使用した。ツバキは外来植物であるが、簡単に入手できる事、油分が多く容易に圧搾可能であるため、植物性脂質として使用した。動物性脂質の例として、クマの脂身（福島県酒井商会）を購入し、ヘキサンで抽出

した脂質を試料とした。すべてのデータは、同一試料を3個ずつ作成し、得た値を平均したものである。

2.2 モデル土器の保管環境

土器モデルは1) 空气中（実験室内に置いたシャーレーに保管しホコリ等の混入を防ぐ）、2) 空気が遮断された封管中（試験管に試料を入れガラスを引き延ばして閉じている。空気量は20mL±2 mL）、3) 土壌中（国際基督教大学構内の草むらの中の地下約30cm）、4) 水中（魚を飼っている水槽内）にそれぞれ一定期間保管したのち回収した。封管中の試料は本来窒素置換、あるいは真空状態にすることが望まれるが、すべての試料が完全に窒素置換できているか、同一真空状態にできているか等の確認が困難であるため、試料を確実に同一条件で保管できる本方法を採用した。

2.3 脂質の抽出

一定期間経過後、脂質を吸着させた土器モデルから脂質を抽出した。土器表面に残留している脂質は、各土器モデルを50mLのジクロロメタン：メタノール=2：1溶液で30分超音波抽出し、その操作を3回繰り返してすべての抽出液を合わせてロータリーエバポレーターで溶媒を除き残差とし、-80℃の冷凍庫に保存した。土器深部に吸着された脂質は、一度表面の脂質を抽出した後の土器モデルを、粉碎器（Heiko Sample Mill TI-200）を用いて粉碎し、表面からの抽出方法同様、50mLのジクロロメタン：メタノール=2：1溶液で3回抽出後、遠心分離し、上澄みを分け取り、溶媒を除いてその残差とし-80℃の冷凍庫に保存した。

2.4 総脂肪酸の分析

0.09mLの回収した脂質（1 mg/0.1mL トルエン溶液）に内部標準物質として0.01mLの*n*-ペンタデカノイン酸（1 mg/0.1mL トルエン溶液）と、メチルエステル化剤として0.5mLの0.2M水酸化トリメチルスルホニウム・メタノール溶液を加え、30分室温で反応させFA及びグリセリドをトリメチルスルホニウム塩に変換した後、ガスクロマトグラフィーを用いて分析した。試料中のトリメチルスルホニウム塩はガスクロマトグラフ試料

気化室内でメタノール存在下、メチルエステルを生成する。この方法は脂肪酸（FA）をメチルエステル化するだけでなく、グリセリドのFA鎖を解離しメチルエステル化する為、遊離FAとグリセリドに含まれているFAの総量を同時に測定する事ができる。

2.5 脂肪酸とグリセリドの分離

薄層クロマトグラフィー（TLC）を用いてFAとグリセリドの分離を行った。抽出した脂質をトルエンに溶解し、10cm×10cmのTLC用ガラス板（Merck, Silica gel 60, 2mm）にバンド状にスポットし、ヘキサン：酢酸エチル：酢酸=80：20：1溶液で展開した。展開後、TLC板の両端を約7mmほど切り取り、発色させて各物質の位置を確認し、中央の発色させていないTLC板から対応する分画をバンド状にかき取った。発色剤にはモルシュタイン試薬（0.4g Ce(SO₄)₂, 20g(NH₄)₆Mo₇O₂₄, 400mL 10%H₂SO₄）を用いた。ジグリセリド（DG）とモノグリセリド（MG）は絶対量が少なく確認が難しい場合がある為、DGとMGの和としてTGとFAの間の分画を当てた。ツバキ油のTLCを図1に示す。Rf値：TG（トリオレイン）=0.86, FA（オレイン酸）=0.39,

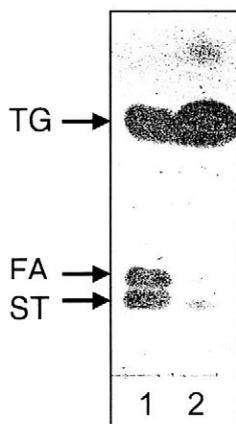


図1 脂質のシリカゲル薄層クロマトグラム（列1. 標準試薬：TG=トリグリセリド（トリオレイン）、FA=遊離脂肪酸（オレイン酸（C18：1））、ST=ステロール（コレステロール）。列2. ツバキ油。展開溶媒：（ヘキサン：酢酸エチル：酢酸=80：20：1）、発色剤：（モルシュタイン試薬=0.4g Ce(SO₄)₂, 20g(NH₄)₆Mo₇O₂₄, 400mL 10%H₂SO₄）

Fig. 1 Silica gel thin layer chromatogram of lipids (Lane 1. Standard reagents : TG=triglyceride (triolein), FA=free fatty acid (oleic acid (C18:1)), ST=sterol (cholesterol). Lane 2. Camellia oil. Developing solvent : (hexane : ethylacetate : acetic acid=80 : 20 : 1), coloring reagent : (Morstein Reagent=0.4g Ce(SO₄)₂, 20g(NH₄)₆Mo₇O₂₄, 400mL 10%H₂SO₄)

ST（ステロールの例としてコレステロール）=0.34。

2.6 シリカゲルからの抽出とエステル化

シリカゲルに吸着したFAとグリセリドは、ジクロロメタン：メタノール=2：1を用いても回収率が低い。そこでシリカゲルに吸着されたまま直接脂質をメチルエステル化することにした。グリセリドを含むシリカゲルには1mL 0.4M MeONa/MeOH, FAを含むシリカゲルには0.15mL 80% BF₃/MeOH及び0.15mL MeOHを加えた後、30分超音波抽出し、そのまま60℃でメチルエステル化（グリセリド：5分間、FA：3分間）後、ヘキサンと水で分配し、遠心分離後シリカゲルと水を除いた上澄みをガスクロマトグラフィー用試料とした。この方法を用いることにより、定量的に脂質をシリカゲルから回収し、測定する事ができるようになった。

2.7 分析機器

定性及び定量にはガスクロマトグラフを使用した。

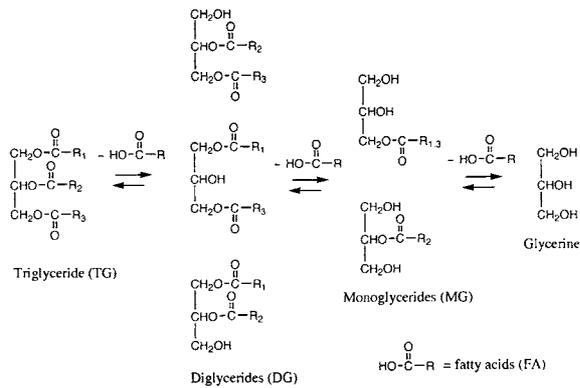
使用機器と条件は、ガスクロマトグラフ（島津GC-4B, FID付き）、カラム（SUPELCO, SPB™-1, 30m×0.32mm キャピラリカラム, 厚さ0.1mm）、カラム温度（142℃（3分）、昇温1℃/分、145℃（3分）、昇温1℃/分、147℃（15分））、試料気化室温度（220℃）、検出器温度（220℃）、キャリアガス流量（He：50mL/分）、注入方法（スプリットレス）である。必要に応じてマススペクトルメーター付きガスクロマトグラフ（島津GCMS-QP5050, J&W1221032カラム, 30m×0.25mm）を使用した。

2.8 定性及び定量方法

定性は標準物質の保持時間（Rt値）と試料のRt値とを比較することによって、また定量にはペンタデカノイン酸メチルエステルを脂肪酸エステル内部標準物質として使用した。

3. 結果と考察

まずグリセリド及びFAの化学的性質を説明したい。これらの化合物がどのような性質を持っている物質かは、分析結果を考察する上で重要になるからである。動植物



スキーム1 トリグリセリドの分解過程
Scheme 1 Decomposition pathway of triglycerides

に含まれているいわゆる油成分の主成分はトリグリセリド (TG) で、遊離 FA はわずかである。TG はグリセリン 1 分子につき 3 分子の FA がエステル結合している物質である。TG の分解過程は、まず 1 分子の TG が加水分解し、1 分子の FA とジグリセリド (DG) に、DG はさらに加水分解し 1 分子の FA とモノグリセリド (MG) に、そして MG も同様に 1 分子の FA を遊離し、最終的には TG 1 分子から 1 分子のグリセリンと 3 分子の FA が生成される (スキーム 1)。

一般的に加水分解反応は可逆反応であるため、エステル結合が切れる分解反応もエステル結合が生成する縮合反応も同時に進行する。従って、解離した FA の一部がグリセリン、あるいは DG, MG と再度結合して FA 鎖の交換反応が起きる可能性がある事を念頭に置く必要がある (野依他 2003)。また、二重結合を含む FA (不飽和 FA) は二重結合を含まない FA (飽和 FA) より化学的に不安定である。不飽和脂肪酸への付加や酸化反応、ラジカルによる開裂や重合反応などが良く知られている (二木 1992)。生体内で FA は炭素がカルボン酸側から 2 個ずつ解離してゆく β 酸化と呼ばれる過程を通して最終的には炭酸ガスと水に分解される。FA を表記する際、たとえばパルミチン酸は C16:0 の様に、含まれている炭素の数 (C=16) と不飽和結合の数 (=0) で表すのが通例である。

3.1 総脂質の回収率の変化

まず、吸着させた脂質が異なった環境下で保管された後どれくらい回収できるか、モデル土器から抽出した脂質の総量を回収率として求めてみた。クマの脂質を土器

モデルに付着させ、1) 封管中、2) 空气中、3) 土壤中に保管後脂質を抽出し、総脂質の回収率の変移を時間を追って調べると、図 2 に示すようにいずれの環境においても初期に著しく減少し、次第に一定になることがわかった。この傾向は Rottlaender (1985) や中村 (1995) の結果とよく一致していた。しかし、置かれた環境 (実験条件) によって回収率の減少率が大きく異なっていた。一番減少率が高い、つまり回収率が一番低い「土壤中」では約 170 日間で、もとの脂質の約 10% にまで減少していた。これは土壤中の水分や微生物、土壤の酸性度などによる分解や流出のためではないかと推測された。「空气中」に置かれた脂質は同じ期間にもとの約 60% に減少しており、空気酸化が主な原因と推測された。「封管した試料」は封管時に混入する空気以外は空気の出入りが無い状態である。従って、封管時に閉じ込められた空気や空気中の水分の影響により回収率は初期にわずかに減少するが、変化は少ないと予測した。しかし 130 日以上経過すると、もとの約 80% に減少していた。そこで、クマ脂質に含まれている二重結合の量と封管中に存在する酸素量を比較してみることにした。油脂に含まれている二重結合量の総量は油脂のヨウ素価 (油脂 100g に含まれている二重結合に付加するヨウ素の質量 (g) で、油脂中の二重結合量に対応する) を参考にすることができる (日本油化学会編)。一般的に二重結合を多く含む植物性油脂のヨウ素価は 100 以上、ヘッドやラードは 50 以下である。そこで牛脂や豚脂より二重結合を多く含むクマの油脂 (表 1) のヨウ素価をかりに 80 と設定すると、土器に吸着させたクマ脂質 0.1g に 0.3mmole のヨウ素が付加されることになり、二重結合量はヨウ素 0.3mmole 分となる。酸素はヨウ素と同様に二重結合と反応するので、空气中の酸素による二重結合の酸化反応が化学量論的に進むと仮定すると、クマの脂質に含まれている二重結合と反応する酸素量は、ヨウ素の付加量と同じ 0.3mmole 分に対応する。封管した空気約 20mL 中に含まれる酸素 (空気の約 20%) はおよそ 0.18mmole なので、封管中の酸素量では約半数強の二重結合しか酸化できないことになる。一方、無限に酸素が供給される空气中の試料では、すべての二重結合が酸化される可能性があり、封管中の試料より酸化される度

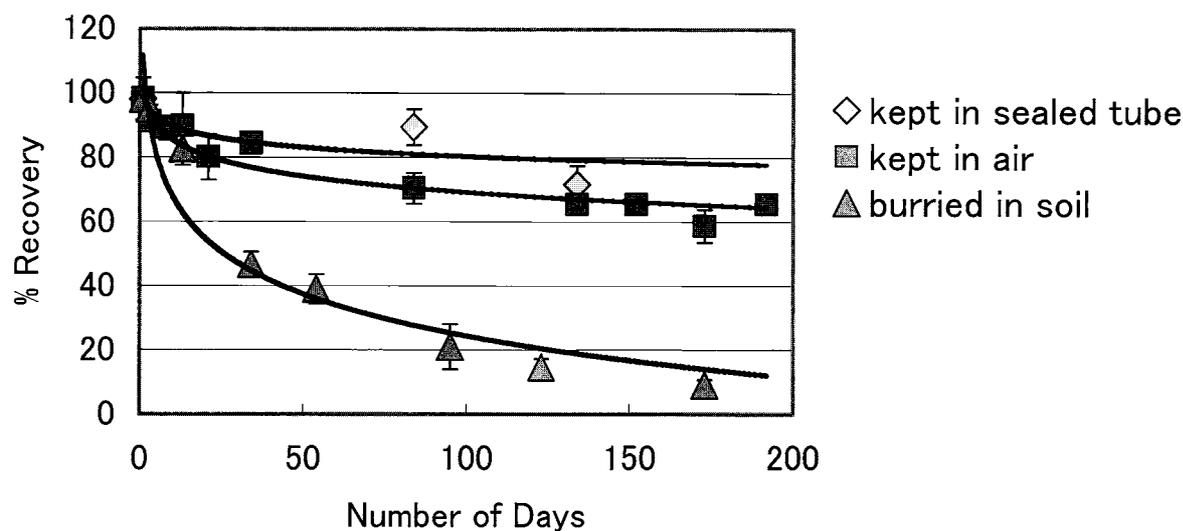


図2 土器モデルに吸着させ、様々な環境下に保存したクマの総脂質回収率の経時変化

Fig. 2 Time dependent recovery of total bear lipid adsorbed to the model pottery kept under various environments

合いが大きくなり、空気中の試料の回収率が少ない今回の結果と一致する。しかし、すべての二重結合が反応するとは限らず、また酸素と二重結合の反応は連鎖的に反応するラジカル反応も良く知られており（二木 1992）、重合反応も可能であることから、必ずしも計算値と実験値は一致しないであろう。また、回収率の減少は土器に吸着され、回収できない部分も含まれている可能性がある為、後記 3.4 でさらに検討を行った。

この結果から脂質の回収率は置かれた環境に強く依存する事がわかった。従って、脂質分析のみならずあらゆる有機物分析でも、試料として用いる考古遺物の保存状態を考慮する事が重要であろう。

3.2 遊離脂肪酸及びグリセリドの回収率変化

次に回収された脂質に含まれている FA 含有成分を測定することにした。FA とグリセリドは化学的に安定性が異なる事から、それぞれの成分を TLC で分離し、FA, DG と MG, TG の 3 種類の画分の回収率がそれぞれ時間と共にどのように変化するかを検討した。経時変化を見ることにより、どのように変化するかを検討するだけでなく、求められた実験結果がたまたま大きな誤差を生じた結果なのか、あるいは一定の変化の中で信頼できる値なのかを確認する事が出来るからである。

土器に吸着させる前のツバキ油は図 1 の TLC の各スポットの濃度からもわかるように、脂質のほとんどが TG で、TG は全 FA 含有脂質 (TG, DG+MG, FA の

総量) の $97.7 \pm 45.8\%$ を占め、DG と MG の和は $0.4 \pm 0.1\%$ 、遊離 FA は $1.92 \pm 1.56\%$ であった。ツバキ油を吸着させたモデル土器を試験管に入れ封管し、一定期間置いた後回収した脂質を TLC で TG, DG と MG, FA に分け、各画分の回収量の経時変化を求めた結果を図 3 に示す。封管された試料は、3.1 に示した総脂質の回収率の変化から環境の影響を一番受けにくいと考えられた条件下である。

ツバキ油に含まれていた TG の回収率は図 3 の「TG」に示すように、時間と共に減少し 1645 日後の土器モデルからは検出できなかった。DG と MG の総量は、「DG+MG」で示すように 108 日で最大の 1.97 ± 0.36 (もとの約 5 倍) になったのち減少し、1645 日後の土器モデルからは微量しか検出できなかった。一方、僅かにしか存在しなかった遊離 FA は時間と共に増加し、1645 日後はもとのツバキ油に含まれていた全 FA 含有脂質の $58.0 \pm 52.5\%$ になっていた。この結果は土器に吸着されたツバキ油が封管中に保存されると、スキーム 1 で示したように、TG から時間と共に FA が遊離し、DG, MG, を経てグリセリン (分析対象外) と FA に分解する過程を明らかにしている。TG が分解して FA を遊離する反応過程には、一般的に水分子が必要である。しかし本実験条件である封管環境中の水分は、脂質を吸着させる以前から土器に含まれている微量の水分と封管時に混入する微量の空気中水分のみであり、例えば土壌中や水中のように水分子がふんだんに存在する環境とは明らかに異

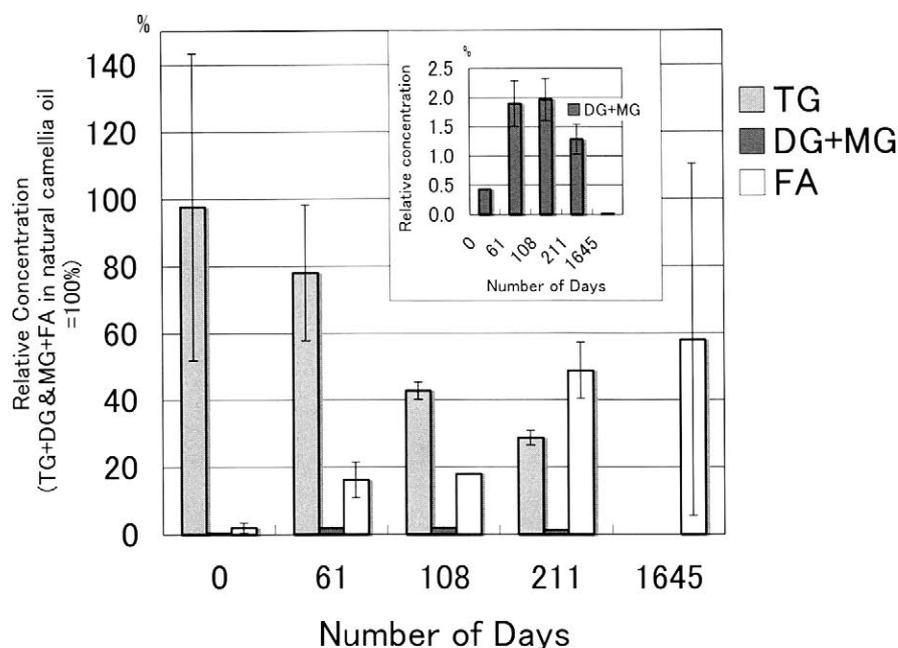


図3 土器モデルに吸着させ、試験管に入れ封管したツバキ油の脂質回収率の経時変化（0日を100%とする）（トリグリセリド（TG）、モノグリセリド+ジグリセリド（MG+DG）、遊離脂肪酸（FA））

Fig.3 Time dependent changes of lipid recovery rate of camellia oil from the pottery model kept in sealed tube (day0=100%) (Triglyceride (TG), Monoglyceride+diglyceride (MG+DG), Free fatty acid (FA))

表1 脂質中脂肪酸組成の百分率（C14：0は脂肪酸の炭素鎖に含まれている炭素数が14；不飽和結合数が0を意味する）

* 香川芳子監修，食品成分表（5訂），女子栄養大学出版部，2003

Table 1 Percentage compositions of fatty acids of various lipids (C14：0 signifies number of carbons contained in fatty acid chain =14；number of unsaturated bonds=0)

* Y.Kagawa ed, Standard Tables of Food Composition in Japan 5th Ed, Womens Nutrition Univ Press, 2003

	C14:0 %	C16:0 %	C16:1 %	C18:0 %	C18:1 %	C18:2 %
Bear triglycerides	1.2	20.1	3.0	4.8	50.7	20.2
Bear free fatty acids	<1	13.0	1.3	4.7	42.3	38.0
Camellia oil triglycerides	-	11.9	<1	1.4	81.2	5.5
Camellia oil free fatty acids	-	25.2	<1	2.9	66.4	5.5
Beef fat*	3.6	26.7	7.5	10.4	44.6	2.1
Pork fat*	1.5	24.9	3.0	13.3	42.6	11.3
Olive oil*	-	9.9	0.7	3.2	75.0	10.4

なる。従って、土器内部では例えば土器胎土に含まれている金属化合物やケイ酸，など，水分による加水分解だけではなく，別の分解機構が複雑に関与している事を示唆している。TG，DG+MG，FAの総量は時間が経過すると共に減少しており，図2の総脂質回収率の変化傾向と一致している。他の環境に置かれた試料の回収率を比較すると，変化の大きい順から土壌中>空气中>>水中>封管中となり（データ不記載），図2の総脂質回収率が少ない試料ほどTGの減少が顕著であった。

3.3 回収された遊離脂肪酸とトリグリセリドの脂肪酸鎖組成の変化

クマの脂質を吸着させた土器を土壌中に埋め，時間と共にFA組成がどのように変化するかを調べるため，回収された脂質中のTG画分と遊離FA画分に含まれているFAの種類を同定定量した。前記のFAとグリセリドの回収率の経時変化の結果より，実験期間は4ヶ月と決めた。用いたクマの脂質のTG画分と遊離FA画分に含まれている各FAの平均含有率を表1に示す。牛や豚の脂肪よりC18：0が少なくC18：2が多く含まれている

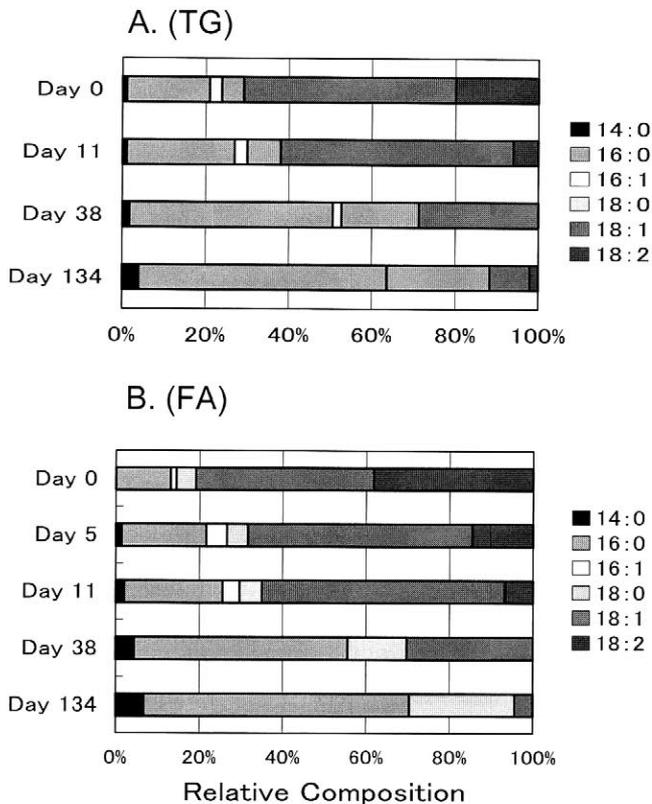


図4 土器モデルに吸着させ、土壌中に保管後回収したクマ脂質中脂肪酸組成の経時変化 (A. トリグリセリド (TG) 画分。B. 遊離脂肪酸 (FA) 画分。縦軸=実験開始後の経過日数、横軸=総脂肪酸量を100%とした時の組成百分率。)

Fig. 4 Fatty acid composition changes of bear lipid recovered from the pottery model buried under ground after certain period of time (A. From triglyceride (TG) fraction. B. From free fatty acid (FA) fraction. Vertical axis=days after start of experiment. Horizontal axis=% composition where total fatty acids equal 100%.)

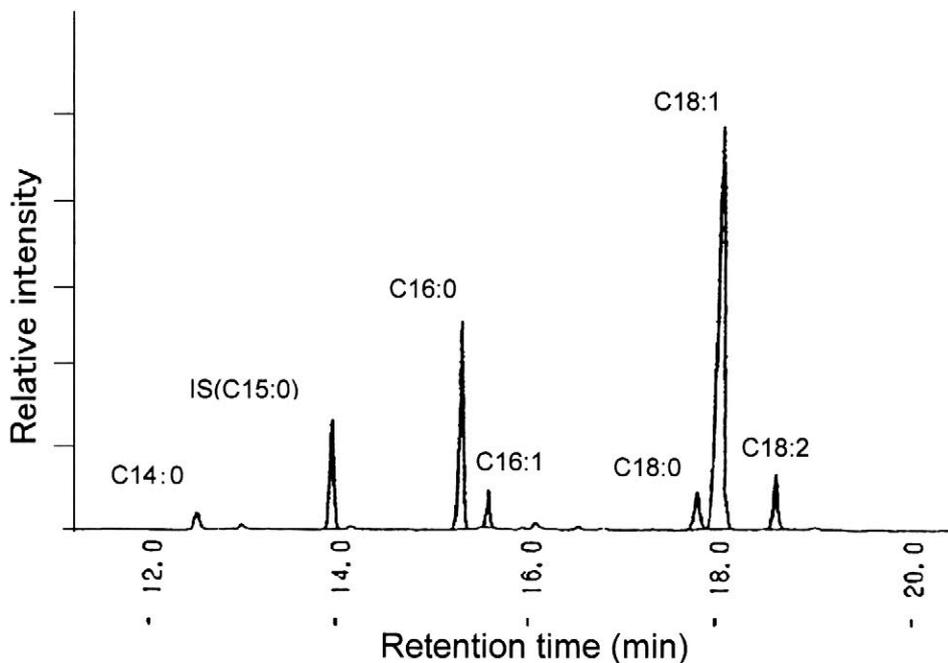


図5 モデル土器に吸着させ、土壌中に11日間保存後回収したクマ脂質中遊離脂肪酸のガスクロマトグラム (IS=内部標準物質 (C15:0))

Fig. 5 Gas chromatogram of free fatty acids recovered from bear lipid adsorbed to the pottery model buried under ground for 11days (IS=internal standard (C15:0))

のが特徴である。含有率が1%未満のFAは回収時の誤差が大きくなるため、含めていない。

図4-A, Bに土壌中に保存したクマの脂質中のFA組成の経時変化を示す。図4-AはTG画分、図4-Bは遊離FA画分である。TG画分も遊離FA画分も同様に、不飽和FAであるC16:1, C18:1, C18:2の割合が経時的に減少すると共に飽和FAであるC14:0, C16:0, C18:0の割合が増加していることがわかる。遊離FAの組成変化の主な理由は二重結合部分への水の付加、酸化などにより二重結合を含むFAの分解や重合が促進され、その結果として分析対象としたFAの割合が変化したためと推測される。Lalmanら(2000)は、嫌気性条件下でC18:2がC16:1, C18:1を経て、C14:0, C16:0, になり、最終的にメタンと酢酸に分解される事を報告しており、今回の結果は分解過程の途中であると推測できる。従来、遊離FAは分解しやすい組成が変化するが、TGとして結合しているFA組成は変化しないと言われて来た。しかしTG中のFA鎖もまた大きく変化する事がわかった。TGの絶対量が急激に減少することから、この結果はグリセリドとして結合しているFA鎖が結合したまま変化したのではなく、時が経つに従ってより不安定なTGの分解が進行し、より安

定な TG が残った結果であると推測される。空気中に保存された試料も同様の結果を示したが、封管中の試料は変化が緩慢であった。この結果から、たとえ TG 中の FA の組成パターンを用いたとしても、FA パターンから生物種を同定することは困難である事が明らかになった。

図 4-B のデータを得るために使用したガスクロマトグラム为例として、クマの脂質を土器モデルに吸着させ土壌中に 11 日間保存後回収した遊離 FA 画分のガスクロマトグラムを図 5. に示す。

3.4 土器表面と土器内部に吸着された脂質

土器に吸着された後、回収できなかった脂質は本当に全部分解してしまったのだろうか。特に分解の原因となる微生物や水分、空気などが非常に少ない封管中でも回収率が減少した事から、分解、系外に流出する等以外の理由があるのではないかと考えた。そこで土器に強く吸着し、これまで用いた方法では回収できない脂質が存在する可能性を検討した。脂質を土器からそのまま直接ジクロロメタン：メタノール=2：1 溶液で 3 回超音波抽出するこれまでの方法は、吸着後 1～3 日以内であれば

92±0.7～98±0.7% 回収できる。しかし、長期間吸着されたままの状態の場合、脂質は土器の深部まで浸透し表面からは抽出しきれない可能性がある。そこで、土器を従来通りそのまま超音波抽出した「表面」と、一度抽出した土器をさらに粉碎し、粉末から再度抽出した「深部」に分けて分析することにした。

「表面」と「深部」の回収率の変化：ツバキ油を土器に吸着させ時間を経過させると、予想されたように脂質は「表面」のみならず、「深部」からも検出された。図 6-A, B, C にツバキ油を土壌中に保管した試料の TG, DG と MG, 遊離 FA の回収率の経時変化をそれぞれ「表面 (surface)」と「深部 (core)」に分けて示す。

「深部」(core) の TG, DG+MG, FA 量は、一度増加すると実験条件内では時間が経過してもあまり変化しないが、「表面」(surface) の量は変動し、440 日後にはいずれも「深部」の残存量が相対的に「表面」の量より多くなった。この結果は「深部」が重要な分析対象である事を示している。「表面」の変化は、図 3 で示した「封管中」の結果と同様に「土壌中」でも TG が DG, MG を経由して最終的に FA に分解される過程を示唆しているが、遊離 FA 量の変化は時間と共に増加した封管

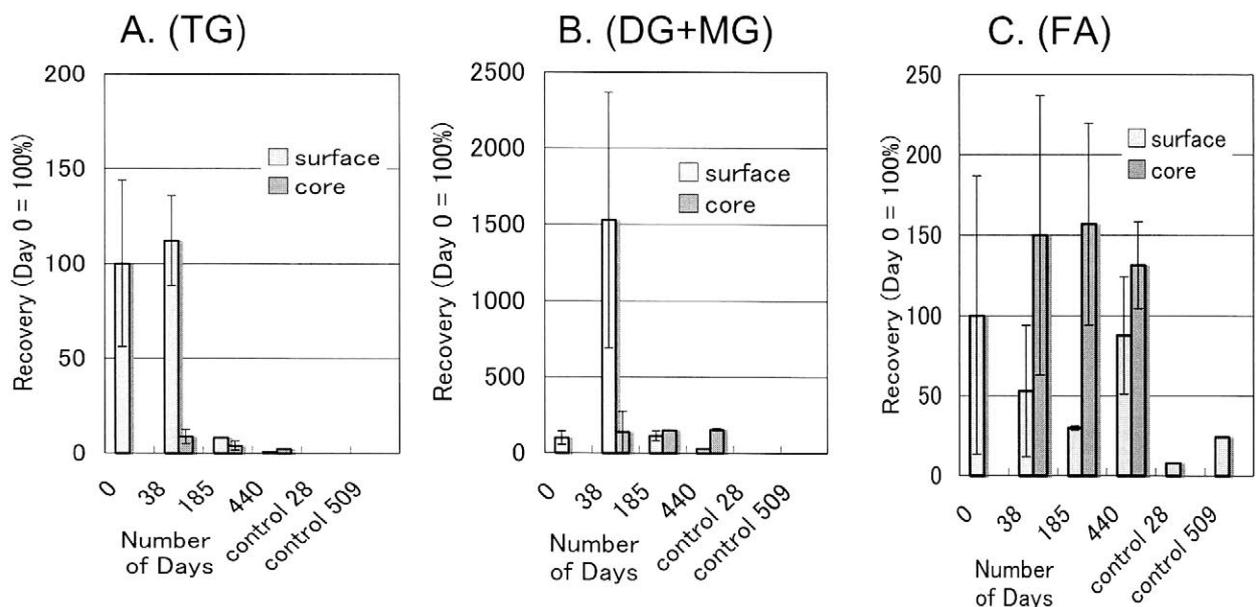


図 6 土器モデルに吸着させ、土壌中に保管したツバキ油を土器表面と土器深部からそれぞれ回収した際の脂質回収率の経時変化 (0 日 = 100%) (A. トリグリセリド (TG) 画分. B. モノグリセリド + ジグリセリド (MG+DG) 画分. C. 遊離脂肪酸 (FA) 画分. Control = 土器のみを土壌中に一定期間保管し回収した試料. Control の後の数字は経過日数.)

Fig. 6 Changes of lipid recovery rate of camellia oil from the surface and the core of the pottery model buried under ground (day0=100%) (A. Triglyceride fraction (TG) . B. Monoglyceride + diglyceride fraction (MD+DG). C. Free fatty acid fraction (FA). Control=sample from lipid free pottery models kept under ground. Number after "control" indicate number of days after start of experiment.)

中の試料とは違い、一時減少した後再度増加している。土壌中の「表面」遊離 FA の減少の原因としては、土器外部への流出、水分や微生物、土壌中の金属や pH などによる分解が、また、増加の原因としては後で詳しく述べる土壌からの FA の浸透が考えられる。このように脂質は土器深部に浸透し残留するが、「表面」と「深部」から回収された脂質の総量は時間と共に減少することから深部への浸透だけではなく、脂質の分解や流出による減少が大きいと考えられる。さらに、一部の脂質は土器を粉砕し抽出してもまだ回収できずに残っている可能性もある。

次に土壌成分が土器に吸着される可能性を検討した。何も付着させていないモデル土器 (control) を土壌中に保管し、脂質が回収できるかを調べたところ、TG, DG, MG は土器「表面」からも、「深部」からも全く検出されなかったが、図 6 の「control 28」「control 509」に示すように、遊離 FA が土器「表面」のみから検出され、TG, DG と MG は土器「表面」からも、「深部」からも全く検出されなかった。土器表面の遊離 FA は実験開始後 509 日 (control 509) で 28 日 (control 28) の約 3 倍に増加していることから、これらは土器回収後に付着したのではなく経時的に土壌成分が混入したものと考えられる。土器表面から FA が検出されたにもかかわらず土器「深部」には脂質が残存していないことから、「深部」の脂質は外部からの混入を免れる事を示唆している。先に述べたように、時間と共に「深部」の脂質量が「表面」を上回る事も考慮すると、一般的な土器吸着物質の分析には一度表面の脂質などを抽出除去した後、土器を粉砕し「深部」を分析する方法が望ましいことがわかった。

土壌成分の混入問題はこれらの混入が最終結果にどれほどの影響を及ぼすかである。条件を一定にコントロールしたモデル系を使用しているとはいえ、土壌中という不均一な環境下に置かれた試料はデータのバラツキが大きく相対標準偏差は、時には 50% 以上になった。従って、微小変化は誤差に含まれてしまい、統計的に有意ではなくなる。この結果は、脂質分析では細かい値の検討より、大きな変化を総合的に把握することが重要であることを示している。さらに、これらの脂質が土器「深部」

に浸透し残留するという事は、ステロールなどその他の脂質や生理活性を持つ個特有の有機物も同様に外部環境からの汚染を免れ、深部に残留する可能性を示しており、今後の土器分析の重要な指針になった。

「表面」と「深部」の脂肪酸鎖の変化：外部からの影響を受けにくい土器深部にも脂質が残留することが明らかになったので、次に、「表面」と「深部」から回収された脂質の脂肪酸鎖の変化を検討した。モデル土器に吸着させたツバキ油を 1) 封管中、2) 空气中、3) 土壌中、4) 水中に一定期間保管した試料をそれぞれ「表面」と「深部」に分けて回収し、残存していた TG に含まれていた FA 鎖の平均組成を 100 分率としてまとめた結果を図 7-A に、遊離 FA の平均組成を同様にまとめた結果を図 7-B に示す。吸着させる前のツバキ油に含まれていた TG 画分及び FA 画分の平均 FA 組成 (表 1) はオリーブ油同様 C18:1 が多く含まれているのが特徴である。

不安定と言われている遊離 FA の組成は検討したすべての環境条件下で、「表面」、「深部」にかかわらず原料の組成から大きく変化していた。変化の度合いは置かれた環境によって異なり、嫌気性条件である「封管中」や「水中」に置かれた試料は時間と共に C16:0, C18:2 の割合が減少し、相対的に C18:1 が増加するが、好気性条件である「空气中」の試料は C18:1 が減少し、相対的に C16:0, C18:0 が増加し、土壌中ではその中間であった。酸素と FA の二重結合との反応は C18:2 の反応性が C18:1 より富んでいる事が良く知られており (二木 1992)、僅かな酸素しか存在しない「封管中」や「水中」では C18:2 との反応が優先され、まず C18:2 が減少すると考えられる。十分酸素が供給できる「空气中」では含有量が一番多い C18:1 が主に反応していると考えられる。この結果は、酸素の有無など、考古学遺物の存在状態によって脂質の分解過程が異なっている事を示唆しており、発掘後の試料保管条件の重要性を示している。

安定とされていた TG はツバキ油の場合もクマの脂質同様土器表面では分解されている可能性があるが、深部に捕獲された場合、外部からの影響を免れて FA 鎖の変動は少ないと期待された。しかし、残念ながら TG 中の

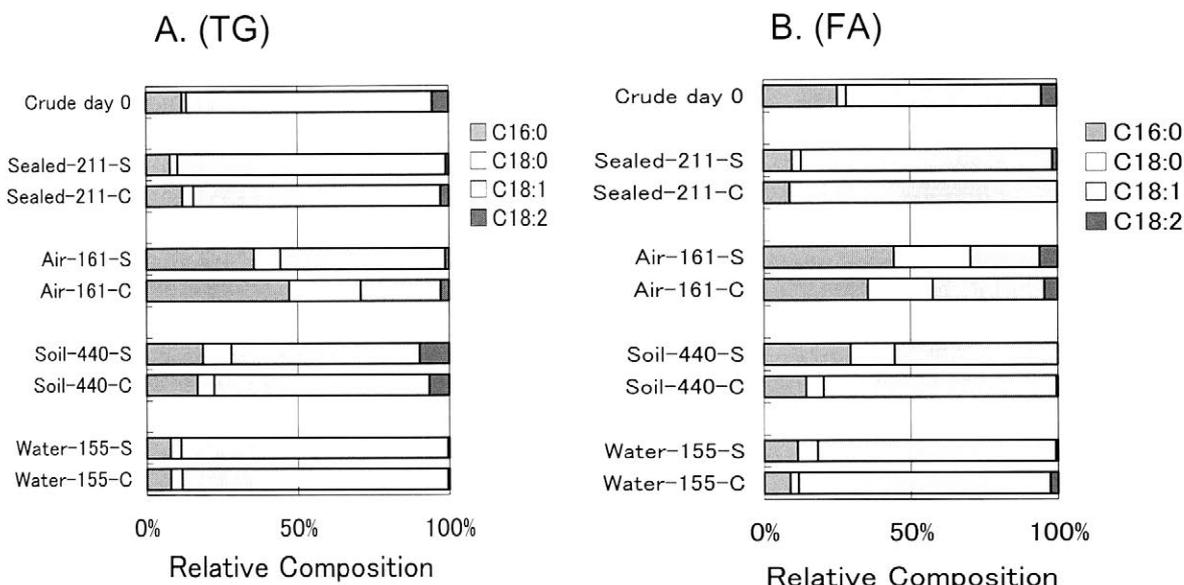


図7 モデル土器に吸着させたツバキ油から回収された平均脂肪酸組成と保存環境 (A.トリグリセリド (TG) 画分。B.遊離脂肪酸 (FA) 画分。縦軸の数値=保管日数, S=surface 土器表面から回収, C=core 土器深部から回収。横軸=総脂肪酸量を100%とした時の各脂肪酸の平均百分率。)

Fig. 7 Average fatty acid compositions of camellia oil recovered from model pottery kept under various environment (A. From triglyceride (TG) fraction. B. From free fatty acid (FA) fraction, Numbers on vertical axis=number of days, S=recovered from pottery surface, C=recovered from pottery core. Horizontal axis=the average percentage of each fatty acid where total fatty acids equal 100%.)

FA 組成も「空气中」や「土壌中」では「表面」, 「深部」にかかわらず遊離 FA 同様の变化を示しており, TG の FA 組成パターンから脂質の由来を検討する事は困難である事が明らかになった。一方「封管中」, 「水中」に保管された TG は遊離 FA より変化が少なく, また「表面」と「深部」の差も少ない。沼地等で木製品などがよく保存されている考古学的知見と一致している。

以上のツバキ油の FA 変化は先に図4で示した土壌中に保管した土器中のクマ脂質の変化傾向と異なっており, 同じ環境下でも動植物の種類によって脂質変化が異なる事が分かった。ツバキ油とクマの脂質の FA 変化の違いに関しては更なる検討が必要である。

3.5 C16:0とC18:0の比率

比率は絶対量に変化しても影響を受けないことから, 脂質分析を考古遺物に応用する際, FA 組成パターンより FA 量の比率は変動が少ないと考えられており, 坂井(1995)やEerkens(2005)らが他の指標と共に土器の用途や食生活の検討に用いている。そこで, ツバキ油を用いた図7のデータを基に化学的に安定と言われているC16:0とC18:0の比を求め, 表2に示した。もとの

ツバキ油に含まれていたC16:0/C18:0値は遊離FA中もTG中も同等のおよそ8で, これまでに報告されている値(Eerkens 2005)の範囲内に入っている。しかしモデル土器に吸着させたツバキ油中のTG中と遊離FA中のC16:0/C18:0値は, 置かれた環境とは無関係に共にC16:0の割合が減少し, 数ヶ月から1年でおよそ2~4と約1/2~1/4に減少した。

Shillingら(1996)は油画に用いる乾性油のC16:0/C18:0値が時間を経過してもほとんど変化しない事を報告しており, 今回の結果と一致しない。しかし, 乾性油は不飽和脂肪酸量が非常に多いため重合しやすく, 空气中で熱や光により短時間でラジカル重合し, いわゆる「乾燥」する特殊な性質を持つ為, ラジカル重合に関与しにくいC16:0やC18:0が重合したポリマー内にトラップされ比較的安定に残留するのではないかと考えられる。一方, 今回用いたツバキ油は乾性油より不飽和脂肪酸量が少なく, 空气中で保管した場合には一部重合が生じる可能性があるものの, 酸素量の少ない「封管中」やラジカル重合を阻止しやすい水などの分子が存在する「水中」や「土壌中」では図3の「封管中」, 図6の「土壌中」のツバキ油のFA変化で示したようにTGから

FA が生成する分解反応が主反応であると考えられ、Shilling らの条件とは明らかに異なっている。反応条件が異なっているので、飽和脂肪酸が分解されることは十分可能であり、C16:0 が C18:0 より減少する今回の傾向は、パルミチン酸 (C16:0) の分解がステアリン酸 (C18:0) より速い Lalman ら (2001) の報告と一致している。

土器を用いて様々な動植物を調理し、土器に付着した総 FA を分析した Malainey ら (1999) の報告を基に、動植物の C16:0/C18:0 値を算出し、a) 動植物そのもの、b) 土器で調理後室温で 4 日間放置、c) 土器で調理後室温で 84 日間放置後 75°C で 3 日間加熱し実験的に時間経過を促進させた試料の値を比較してみると、バイソンは a) 0.87, b) 0.68, c) 0.80 と、ほとんど変化しないが、ナマズは a) 4.00, b) 3.70, c) 2.44, ユリ科の *Smilacina racemosa* は a) 6.67, b) 0.98, c) 1.85 と C16:0/C18:0 値は約 1/2 から 1/4 に減少していた。動植物の種類によって異なるが、魚や植物は今回のツバキ油の結果と同様の傾向を示している。また、植物油の脂肪酸組成は収穫時期やその年の天候等に左右されるため、ツバキ油と FA 組成が類似しているオリーブ油の FA 組成変動の報告 (Beltrán ら 2004) にも示されているように、2 倍程度の C16:0/C18:0 値の変動は自然変化とみなす事ができる。これらの結果は、様々な現代食物の C16:0/C18:0 値をそのまま古代の土器試料に

当てはめる事の困難さを示しており、用いるのであれば適切な C16:0/C18:0 値許容範囲の設定と FA 以外の信頼できる分析結果も含めた相関等を注意深く検討することが必要であろう。

4. まとめ

以上の結果をまとめると 1) 土器に吸着されたグリセリドは分解され、FA が生成する事が実験的にも確認された。2) 土器表面に付着した脂質は表面に留まらず、土器深部に浸透し残留することが明らかになった。3) 土器表面には土壤中の遊離 FA が微量混入するが土器深部は混入を免れている。従って、土壌成分による汚染が問題になる場合には汚染の影響を受けにくい土器「深部」を試料として分析する事が望ましい。また、脂質のみならず脂質以外の化合物も土器深部に捕獲され残留している可能性がある。その性質をうまく活用すれば、土器は例えば炭素同位体分析など、古代環境を調べる様々な方法の有効な試料になるであろう。4) TG の FA 組成も、遊離 FA の組成も時間と共に変化することが明らかになった。従って FA の組成パターンから脂質の由来や種を検討することは困難であることが分かった。特に空気中や土壌中に保管した試料は変化が著しいが、空気を遮断した封管中、水中の TG は変化が少なかった。TG や FA は、どの生体関連遺物にも含まれている為、生体関連遺物は発掘後試料の「劣化」を極力抑える為に、空気を

表 2 ツバキ油をモデル土器に吸着させ、異なった環境に保管後回収されたトリグリセリド画分と遊離脂肪酸画分中の C16:0/C18:0 比
Table 2 C16:0/C18:0 ratios of triglyceride and free fatty acid fractions of camellia oil adsorbed to the model pottery kept under different environment

Environment	Number of Days	Pottery parts	C16:0/C18:0 of Triglyceride fraction	C16:0/C18:0 of Free fatty acid fraction
Crude	0		8.53 ± 0.44*	8.54 ± 0.56
Sealed tube	211	surface	3.08 ± 0.14	1.77 ± 0.92
		core	3.34 ± 0.11	3.17 ± 0.89
Open air	161	surface	4.08 ± 1.16*,**,***	1.69 ± 0.26**
		core	2.04 ± 0.88***	1.60 ± 1.44
Under water	155	surface	2.30 ± 1.42	1.71 ± 0.93
		core	2.16 ± 1.19	3.28 ± 0.75
Under ground	440	surface	1.88 ± 1.61	1.98 ± 1.46
		core	3.84 ± 1.69	2.45 ± 0.12

* P=0.005<, ** P=0.05<, *** P=0.10<

きるだけ遮断し速やかに低温保存する事が望ましい事が脂質分析からも裏付けられた。5) ツバキ油の場合、C16:0とC18:0の比率も数ヶ月～1年程度で数分の一に減少するため、土器に吸着された脂質の分析ではC16:0/C18:0値のみを基準に古代の状況を考察する事は難しく、適応する場合には信頼できるその他のデータと共に注意深く用いる事が必要である。

このようにFA分析法のみによって過去を復元することは困難である事が明らかになった。そこで、次に脂質のうちFAと比べより安定なステロール類から古代環境を知る可能性を検討する予定である。

考古学試料の科学分析を行う際、データを数値として得る事は容易である。しかし、もともと不均一である生

体関連遺物が不均一である自然界に長い年月置かれた試料には必ず大きな誤差を伴う。誤差の大きさの受け止め方がどうも自然科学者と考古学者では違うように思えない。統計的な差が果たして考古学的な値分布の許容範囲と一致するのか、数値として得られたデータが、たとえば目的である古代の生活環境をどれだけ反映できるか十分検討するためには、科学者と考古学者が共同で検討する必要がある。そのためには自然科学者の考古学に対するリテラシーと専門分野以外の人々に理解できるよう説明する責任があると共に、考古学者の自然科学に対するリテラシーをこれまで以上に高め共有する事が必要であろう。

文 献

- 泉 愛子・堀内晶子・デビット・ローリガー 1994「土器に吸着された脂質の基礎的研究」日本文化財科学会第11回大会研究発表要旨集 pp.111-112
- 押川克彦・堀内晶子 1996「土器に吸着された脂質の基礎的研究(3)」日本文化財科学会第13回大会研究発表要旨集 pp.107-108
- 坂井良輔・小林正史 1995「脂肪酸分析の方法と問題点」考古学ジャーナル 386 pp.9-16
- 給田茂哉・堀内晶子 1997「土器に吸着された脂質の基礎的研究(5) -土器表面近くの脂質と内部に浸透した脂質」日本文化財科学会第14回大会研究発表要旨集 pp.79-80
- 高木彰子・堀内晶子 2001「土器に吸着された脂質の基礎的研究(7) -土器深部に強く吸着された脂質は環境と時間の影響を受けにくい」日本文化財科学会第18回大会研究発表要旨集 pp.236-237
- 武石奈津枝・堀内晶子 1997「土器に吸着された脂質の基礎的研究(4) -環境と時間による動物性脂質の変化」日本文化財科学会第14回大会研究発表要旨集 pp.77-78
- 中野益男 1989 「残留脂肪酸による古代復元」『新しい研究法は考古学になにをもたらせたか』クバプロ pp.114-131
- 中野益男 1995「残存脂肪酸分析の現状と課題」考古学ジャーナル 386 pp.2-8
- 難波紘二・岡安光彦・角張淳一 2001「考古学的脂肪酸分析の問題点」日本考古学協会第67回総会要旨 pp.138-141
- 日本油化学会編 2007『油脂・脂質の基礎と応用-栄養・健康から工業まで』pp.143 日本油化学会
- 堀内晶子・押川克彦・北有紀子 1995「土器に吸着された脂質の基礎的研究(2)」日本文化財科学会第12回大会研究発表要旨集 pp.155-156
- 堀内晶子・山根知子 1999「土器に吸着された脂質の基礎的研究(6) -環境と時間が動物性脂質に含まれているグリセリドと脂肪酸にどのような影響を及ぼすか」日本文化財科学会第16回大会研究発表要旨集 pp.210-212
- 二木鋭雄 1992「脂質の酸化」脂質の化学と生化学(季刊 化学総説 16) pp.71-79 学会出版センター

- 野依良治・奥山 格・柴山正勝・檜山爲次郎監訳 2003『ウオーレン有機化学』 pp.292 東京化学同人
- Beltrán, G., del Rio, C. Sánchez, S., Martínez, L. 2004 Influence of harvest date and crop yields on the fatty acid composition of virgin olive oils from Cv. Picual. *J. Agric. Food Chem.* 52 3434-3440
- Curri, S.B., Forni, G., Fedeli, E., Curri, C. 1976 Lipids in ancient pottery. *Actes Congr. Mond. - Soc. Int. Etude Corps Gras* 13th Sect.H pp.53-67
- Dudd, S.N., Redert, M., Evershed, R.P. 1998 Assessing microbial lipid contributions during laboratory degradations of fats and oils and pure triacylglycerols adsorbed in ceramic potsherds. *Org.Geochem.* 29 pp.1345-1354
- Eerkens, J.W. 2005 GC-MS analysis and fatty acid ratios of archaeological potsherds from the Western Great Basin of North America. *Archaeometry* 47 pp.83-102
- Lalman, J.A., Bagley D.M. 2000 Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acids. *Water Res.* 34 (17) pp.4220-4228
- Lalman, J.A., Bagley D.M. 2001 Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. *Water Res.* 35 (12) pp.2975-2983
- Malainey, M.E., Przybylski, R., Sherriff, B.L. 1999 The effects of thermal and oxidative degradation on the fatty acid composition of food plants and animals of Western Canada : Implication for the identification of archaeological vessel residues. *J. Archaeol. Sci.* 26 pp.95-103
- Shilling, M.R., Khanjian, H.P. 1996 Gas chromatographic determination of the fatty acid and glycerol content of lipids. I. The effects of pigments and aging on the composition of oil paint. *ICOM Committee for Conservation Preprints, 11th Triennial Meeting, Edinburgh, Scotland*, Bridgland, J. ed., vol. 1, pp.220-227
- Rottlaender, Rolf C.A. 1985 Detection and identification of archaeological fats. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 87 pp.314-17
- 「学術研究データベース・リポジトリ」国立情報学研究所
(http://dbr.nii.ac.jp/infolib/meta/CsvDefault.exe?DEF_XSL=default&GRP_ID=G0000008&DB_ID=G0000008OUDAN&IS_TYPE=csv&IS_STYLE=default)
- 「残存脂質分析関連文献一覧」2001.07.28 公開
(http://homepage2.nifty.com/ash/1_paleo_fake/biblio_04.html)
- 「残存脂肪酸分析－その科学性と成果の検証」2001.10.21 公開
(<http://www.asahi-net.or.jp/~XN9H-HYSK/godhand/yamaguti/sibousan.htm>)
- SciFinder* Scholar Copyright© American Chemical Society

(2007年1月12日受付, 2007年4月3日受理)

A study on the limitations of fatty acid analysis in archaeological materials using model systems and the perspectives of organic analysis

Akiko HORIUCHI, Akiko TAKAGI, Tomoko YAMANE, Natsue TAKEISHI, Katsuhiko OSHIKAWA
International Christian University, 3-10-2 Oosawa, Mitaka City, Tokyo 181-8585, Japan

The time dependent changes of fatty acids (FA), and glycerides adsorbed to the pottery under different environment were analyzed using the model systems to determine the limitations of fatty acid analysis in ancient pottery. A known amounts of bear fat or camellia oil were adsorbed to the model pottery cubes and kept 1) in open air, 2) in sealed tube to avoid contact with fresh air, 3) buried underground, 4) in water, for up to 1645 days. The decomposition of triglycerides (TG) to FA via formation of diglycerides (DG) and monoglycerides (MG) was confirmed by time dependent decrease of TG and transitional increase followed by decrease in DG and MG and ultimate increase in FA within several months.

The relative composition changes of free FAs and FA chains from triglycerides (TG) were monitored with time. Under all conditions above, the FA compositions changed. In oxygen rich open air, the percentage of C18:1 decreased while saturated FAs increased. However, under oxygen poor conditions in sealed tube or in water, the percentage of C18:1 increased. These results indicated the presence of different decomposition mechanisms under different environmental conditions and the preservation conditions could be important factors for future analysis of excavated samples.

Relatively stable C16:0/C18:0 ratio was monitored using camellia oil, and was found to decrease by 2~4 fold within several months. Accordingly, C16:0/C18:0 ratio should not be used alone but used with other reliable informations with care.

The lipids were found trapped within deep core of pottery matrix free from contaminations, but trapped FA also changed. However, more stable lipids such as sterols and other potent biomarker compounds could be safely trapped within the pottery core free from contaminations. Efficiently unitizing this unique property, the pottery could be an excellent resources for the study of ancient living environment.