

平成 20 年度 修士論文

アミノ酸の窒素同位体比による先史人類集団の
食性復元に関する方法論的検討
—タンパク質の炭素・窒素同位体比を併用した多角的アプローチ—

学籍番号：76541 内藤 裕一

東京大学大学院新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻 人類進化システム分野
(指導教官：米田 穰 准教授)

平成 21 年 1 月 30 日提出

目次

Summary	3
1. 研究の背景	5
2. 方法の原理	9
2-1. 同位体食性分析	9
2-2. アミノ酸の同位体分析	10
3. 本研究の構成	12
安定同位体による定量的な食性復元のための基礎研究	13
I. 背景	14
II. 材料と方法	16
1. 試料	16
2. 試料の前処理	17
2-1. 頭髪試料の前処理	17
2-2. 食物試料の前処理	17
3. 安定同位体比の分析	18
4. 食性推定モデルの妥当性評価	18
III. 結果	21
1. 食物試料の炭素・窒素同位体比	21
2. 頭髪試料の炭素・窒素同位体比	22
3. 食性推定モデルの妥当性評価	22
IV. 考察	24
1. 食物試料の炭素・窒素同位体比	24
2. 頭髪試料の炭素・窒素同位体比	24
3. 食性推定モデルの有効性評価	26
V. 小結	29
アミノ酸の窒素同位体比による北黄金貝塚人の海産物摂取量評価	30
I. 背景	31
II. 材料と方法	33
1. 試料	33
1-1. 考古学試料	33
1-2. 現生動物骨試料	33
2. 試料の準備	33
2-1. 骨コラーゲンの抽出	34
2-2. コンキオリンの抽出	36

2-3. アミノ酸の誘導体化	36
3. アミノ酸の定量分析	37
4. 安定同位体比の分析	37
III. 結果	39
IV. 考察	42
V. 小結	51
総括	52
謝辞	53
引用文献	54
図表	59
補遺	106

Summary

Quantitative estimation of dietary habits for ancient populations is the ultimate purpose of this study. This research consists of the 2 results of subprojects; (i) validation of calculation models that estimate the relative proportion of multiple foods consumed by humans based on carbon and nitrogen isotopic values of proteins; (ii) application of compound-specific nitrogen isotope analysis of individual protein amino acids in archaeological materials allowing a new indicator of marine protein consumptions by ancient humans.

A calculation model (CWLP abbreviated as: Concentration-Weighted Linear Programming method) was newly developed for this study that can reflect elemental concentrations of foods to results of the contribution ratio of each food. Traditional models have not employed this function. In order to validate the above models, hair samples from 1 subject in Indonesia, Jawa was analyzed for carbon and nitrogen isotopic analysis. This region has been investigated by human ecologists for health checks and quantitative records of foods consumption by some residents are available. As a result, the CWLP model shows the best agreement with the record of food consumption by the subject. This indicates the availability of the new model not only for human ecological studies but also for the dietary reconstruction of ancient humans.

Although ^{14}C analysis of archaeological materials can be used to quantify consumption of marine protein by past humans, this method often has difficulties with the detailed estimation of marine protein for specific individuals due to the variation of ^{14}C years observed in human remains even from the same stratigraphic sequence. However, it has been shown that the nitrogen isotopic composition of amino acids from

single and tiny amounts of biological sample is useful for estimating trophic levels of organisms in aquatic environments. In this study, we applied this analytical method to archaeological human and faunal samples from the Kitakogane shell midden in Hokkaido, Japan dating to the Early Jomon period (ca 4,800-6,100 BP) in order to evaluate trophic levels and the relative importance of marine protein consumed by individual humans at the site. Consequently, we were able to estimate the percentage of marine protein from the total dietary protein for 6 individual human remains at 68-81%. This analytical method has great potential to estimate consumptions of marine protein for specific individuals more accurately and more precisely than the analysis of bulk collagen.

序論

1. 研究の背景

先史時代の人々の食性（何を食べていたのか）を明らかにすることは、考古学や人類学などの分野において最も重要なテーマの1つである。何故なら、人々が利用した食物を知ることで、様々な自然環境に対する人々の適応メカニズムを解き明かす端緒を得ることができるからだ。しかし、現実には様々な要因によってその試みは困難なものとなる。例えば、植物や動物の軟組織は土壌に埋没している間にバクテリアの分解作用を受けるため、特別な条件下を除いて現代まで残存しない。つまり従来の考古学的手法では、断片的な食料残渣や土器、石器などといった出土遺物を頼りにするか、もしくは現代の狩猟採集民の生活から類推する以外に先史人の食性を推定する術に欠けるため、具体的な議論は容易ではない。

一方で、上記の考古学的手法とは異なるアプローチにより、従来困難であった定量的な先史人の食性復元を試みた研究がある。それはヒトを生態系における物質循環の1要素とみなす生物地球化学的な視点に立ち、食物網における物質の動態に着目することで、ヒトの食性を考察するという研究である。すなわち、古人骨に残存するタンパク質（コラーゲン）を抽出し、その炭素・窒素安定同位体比（以下 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ と略す）を測定することで、コラーゲンを構成する元素の由来、つまり食物の組成をある程度定量的に復元する手法である。安定同位体比とは、標準物質の同位体比（ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ あるいは $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ など）に対する試料の同位体比の偏差で定義される値である（「方法の原理」を参照）。この安定同位体比を利用した食性復元方法は、先史人の食習慣を客観的に評価できる利点がある。

このような同位体を利用して先史人の食性を復元する試みは 1970 年代の終わりに開発され、これまでに多くの研究でなされてきた [1, 2, 3, 4, 5, 6]。例えば、ハッチ・スラック回路による光合成を行うトウモロコシなどの C_4 植物が主要な作物として利用され

てきた南北アメリカ大陸では、古人骨コラーゲンに含まれる炭素同位体比の変化を検出することで、トウモロコシ農耕の重要性とその時代変化が評価された [3, 7]。

また、先史人の食事における海産物由来のタンパク質の重要性を陸の食物由来のタンパク質と比較した研究もある [8, 9, 10, 11, 12]。安定同位体による海産物摂取量の定量的な評価は、人骨の放射性炭素年代の変動を補正する上で極めて重要である。 ^{14}C は成層圏付近において二次宇宙線が ^{14}N に衝突して生成するが、不安定なため一定の間隔で放射壊変し、 ^{14}N になる。 ^{14}C が崩壊して初期濃度から半分の濃度に減少するのにかかる時間（半減期）はおよそ 5,730 年である。陸上動植物と大気の間で ^{14}C 濃度は平衡状態にあるが、生物活動の停止に伴い上記の一定間隔で減少する。海生動物の場合は、大気と海洋深層水から海洋表層水へと取り込まれた ^{14}C の濃度と平衡状態にある。しかし、海生動物は ^{14}C 濃度が希釈された海洋深層水の影響（海洋リザーバー効果）を受けることでみかけの ^{14}C 年代が古くなるが、それを食料とするヒトも海産物の摂取量に応じてみかけの ^{14}C 年代が古くなる [13]。

一方、 ^{14}C 濃度とは独立した海産物摂取量の影響として、食物連鎖が陸上生態系よりも長い海洋生態系では一般に魚貝類や海生哺乳類で高い安定同位体比がみられる [14, 15]。これは安定同位体のうち重い同位体 (^{13}C 、 ^{15}N) が動物体内に濃縮した結果であり、海産物の摂取により人骨の炭素・窒素同位体比も上昇することが期待される。これを利用して人骨の炭素・窒素同位体比から海産物摂取量を推定し、みかけの ^{14}C 年代を補正する試みがなされている [10]。しかし、人骨の炭素・窒素同位体から海産物摂取量を定量的に評価するアプローチには幾つかの問題点がある。

タンパク質の同位体比を用いた食性の定量的な復元に共通する問題として、①食物の同位体比に伴う変動、②食物タンパク質と骨コラーゲンの間で起きる重い同位体の濃縮効果（以下、 $\Delta_{\text{コラーゲン-食物}}$ と表示する）の大きさが挙げられる [1, 14, 16]。これらの問題のため、人骨の同位体比から直接食性を定量的に復元することはいまだに困難であり、

時代や地域の違いによる集団・個体間の比較による定性的な議論が大半を占めている [17]。

遺跡から出土する動物遺存体では、同種の動物の間でも食性の個体差などが原因で同位体比に変動がみられる。よって、できる限り多くの動物試料を分析し、彼らが摂取した動物の同位体比を評価する必要がある。また、生息環境によって、同種の動物でも同位体比が異なることが知られている [18]。植物質に関しては遺跡に残ることが少ないため、現代の植物の同位体比を平均して過去の植物の値として代用せざるを得ない。野生の動植物を含めて先史人が利用したと考えられる食物の同位体比データが不足しているという問題がある。

一方、②の問題である $\Delta_{\text{コラーゲン-食物}}$ 値について、幾つかの動物実験や野外調査から $\delta^{13}\text{C}$ で 3.7~6.0‰、 $\delta^{15}\text{N}$ で 1.7~6.9‰ という大きな変動が報告されている [1, 2, 19, 20, 21, 22]。食物の同位体比および $\Delta_{\text{コラーゲン-食物}}$ 値として採用する値によって、人骨の同位体比から推定される食物の割合が変化してしまう。場合によっては、食物の値と人骨の値が矛盾してしまうこともある。このような場合炭素・窒素同位体比から食物の利用割合を推定できない [23, 24]。

タンパク質の同位体分析による食性復元については他にも問題点がある。炭素と窒素、2つの安定同位体比を組み合わせれば、同位体比の異なる3種類のタンパク質源について利用割合を計算できると期待される [23, 24]。しかし、一般的にヒトの食性は雑食性が強く、3種類以上のタンパク質源を利用していた先史人類集団も珍しくはないと考えられる。よって、2つの安定同位体比のみから定量的に多くのタンパク質源の利用割合を推定することは容易ではない（問題③）。これまでも、モンテカルロ・シミュレーションやコンピューターによるシミュレーションモデル（以下食性推定モデルと呼ぶ）を用いて、3種類以上のタンパク質源を対象とした定量的な方法が検討されてきた [25, 26, 27, 28, 29]。これらは様々な食物の組み合わせからコラーゲンの同位体比を説明でき

る組み合わせを計算するものである。モンテカルロ・シミュレーションでは乱数によって作成した任意の組み合わせについて 1 日あたりの摂取エネルギー量やタンパク質量など栄養学的な条件が適切であるかも検討する。しかし、この手法では本来中心極限定理に従わない推定値を統計的に扱っており、さらに栄養学的な条件を疑問視する研究もある [30]。他にも、乱数ではなく線形計画法とよばれる計算手法によって、それぞれの食物が取りうる値の範囲を評価する手法もある。また、全てのエサの組み合わせパターンを試算して捕食者の同位体比と比較するコンピュータープログラム“IsoSource”が動物生態学で提唱されている。しかし、いずれの方法も食物の組み合わせによって数十%の幅を示すことが多い。さらに、これらの食性推定モデルは同位体比が既知のエサを動物に与える摂餌実験により有効性が評価されているものの、生理的メカニズムが実験動物と異なるヒトについてはこれまでに検討された例がない [31]。

そこで本研究では、これらの食性推定モデルのヒトに対する有効性の評価を目的の 1 つとした。具体的には、人類生態学的な調査によって食事内容が定量的に記録されている現代人集団を対象に、安定同位体分析と食性推定モデルによって導かれた食物利用割合の推定値と実際の食事内容の記録を比較した。また、過去の日本人集団に応用できるように、食品の類似するアジア人集団を研究の対象とした。

さらに、これまでのタンパク質を対象とした同位体分析とは異なる、新たな食性復元方法を確立するために、タンパク質（コラーゲン）の構成要素である個々のアミノ酸を対象にした同位体分析を検討した。タンパク質を構成する個々のアミノ酸ごとに炭素・窒素同位体比を分析する手法は、近年の技術的革新によって初めて可能になった。特に、アミノ酸の窒素同位体比分析は海洋生態研究で応用され始めている [32, 33, 34, 35]。これまでの研究法では生態系の様々な位置に属する多くの生物種を分析する必要があったが、この手法では 1 個体内のアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値を比較することによって、食物網における生物の位置（栄養段階：Trophic Level）を推定できるというメリットがある。本

研究では北海道の縄文時代人を対象にこのアミノ酸レベルでの分析法を応用し、海産物摂取量の定量的評価を試みた。

2. 方法の原理

2-1. 同位体食性分析

タンパク質を分析対象とした炭素・窒素安定同位体比による生物の食性復元は、大別して以下の3ステップを経て行われる。

まず、対象とする生物の体組織と、候補となるエサ（食物）の同位体比を測定する。古人骨などの考古学試料を対象とする場合は、遺跡から出土する動物遺存体が食物の候補となる。炭素安定同位体比は米国南カロライナ州にある PeeDee 層産ベレムナイトの安定同位体比に対する比、窒素の安定同位体比は大気中窒素の安定同位体比にからの偏差としてそれぞれ表記され、 δ の記号を用いて表される。

$$\delta X (\text{‰}) = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3$$

X は重い同位体を、 R_{sample} と R_{standard} はそれぞれ試料と標準物質における同位体の比を表し、単位は千分率（‰：パーミル）を用いる。炭素同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ ）により、例えば比較的低い値をもつ C_3 植物（-35‰～-22‰）と高い値をもつ C_4 植物（-20‰～-8‰）を区別することができる [36]。一方、窒素同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ ）により、低い値をもつ陸上の動植物と高い値をもつ海生動物を一般に区別できる。ただし、乾燥地域では陸上動植物の窒素同位体比が上昇する現象が報告されており、この関係が成り立たない場合がある [37, 38, 39, 40, 41]。

次に、 $\Delta_{\text{コラーゲン-食物}}$ 値をエサ（食物）の同位体比に加えることで、そのエサのみを食料とする消費者がもつ同位体比を推定する。あるいは消費者の同位体比からこの効果を差し引くことで、消費者の食事が有する平均的な同位体比を推定する。この $\Delta_{\text{コラーゲン-}}$

食物値は動物の種類、生息環境、性別、年齢などの違いによらずほぼ一定とされてきた。

しかし、前述したように野生動物の観察では大きな変動が報告されており、生息環境や種による違いなどがあると考えられる [14, 16, 19, 20, 22]。一方、動物実験によりエサと筋肉の間の炭素・窒素同位体比におよそ 0.8‰, 3.0‰の同位体濃縮効果が報告されている [16, 19]。Chisholm (1986) はマウスを用いた実験により炭素で $\Delta_{\text{コラーゲン}-\text{食物}}=4.5\text{‰}$ となることを示し、骨コラーゲンでは筋肉よりも濃縮効果が大きいことを示唆した [42]。しかし、窒素同位体比については骨コラーゲンと筋肉の間で効果に大きな差は観察されていない。先史人の食性復元では、炭素・窒素同位体比においていくつかの動物実験などから見積もられた 4.5‰, 3.4‰という $\Delta_{\text{コラーゲン}-\text{食物}}$ 値を採用することが多い(補遺-1)。

最後に、それぞれのエサのみを食料とする消費者の同位体比と消費者自体の同位体比を比較することで、あるいは消費者の食事の同位体比とエサの同位体比を比較することで、各エサの利用割合を推定する。この際、エサの数が 3 つ以内であれば基本的に利用割合を計算できる [23, 24, 43]。本研究では、エサの候補が 3 つを超える場合に各々のエサの利用割合を推定するモデルについて妥当性を検討する。これらのモデルは野生動物の食生態、汚染物質の起源推定などの研究で開発され、様々な分野で応用され始めている [26, 28, 29, 44, 45]。

2-2. アミノ酸の同位体分析

アミノ酸を対象とした炭素・窒素同位体分析は 1990 年代に確立され [46, 47, 48]、近年では様々な学問分野で応用され始めている [49, 50, 51]。Corr et al. [52] は、古人骨に残存するコラーゲンを構成するアミノ酸のうちグリシンとフェニルアラニンの炭素同位体比に着目することで、海産物食者と C₄ 植物食者を区別できる可能性を示唆した。先述したように、陸上動植物の窒素同位体比が上昇していた可能性がある乾燥地域では、

人骨の窒素同位体比から海産物食と植物食を見分けることができない。また、海産物と C₄ 植物は炭素同位体比が比較的類似するため、人骨の炭素同位体比からも海産物食か C₄ 植物食なのかは区別できない。この研究のように、従来のタンパク質レベルの分析ではみえない多くの情報をアミノ酸レベルの分析により引き出せる可能性がある。

一方、アミノ酸の窒素同位体分析は、考古学試料に応用された例がほとんどない。この分析手法は、水環境における食物網構造の解析に有効であることが近年の研究により報告されている [32, 33, 34, 35]。具体的には、ごく微量の生体試料から抽出したグルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比の比較から、食物連鎖における生物の栄養段階を推定できる点と、生態系中の生産者の窒素同位体比を推定できる点が重要である [34, 35]。この栄養段階の推定法は、アミノ酸ごとに異なるエサと消費者の間の同位体効果を利用している。例えば、グルタミン酸は代謝の初期反応でアミノ基の転移反応を受け、¹⁴N をもつアミノ基の方が遊離しやすいため、生体組織に取り込まれるものは ¹⁵N に富む（補遺-2） [53]。したがって、エサと消費者の間でグルタミン酸の窒素同位体比は大きく上昇する。一方で、フェニルアラニンやメチオニンはアミノ基の転移反応を受けないため、エサと消費者の間で窒素同位体比がほとんど上昇しない。さらに、このアミノ酸ごとに特徴的な濃縮効果は生物種間を問わず普遍的な可能性がある [32, 33, 34, 54]。Chikaraishi et al. [34] では、下記の式によって水環境に生息する生物の栄養段階（TL）をタンパク質の窒素同位体比よりも正確に評価できることを示した。

$$\text{栄養段階 (TL : Trophic Level)} = [\delta^{15}\text{N}_{\text{動物 Glu}} - (\delta^{15}\text{N}_{\text{動物 Phe}} + 3.4)] / 7.6 + 1 \quad (\text{A})$$

この推定式は、先に述べたエサと消費者の間で大きく窒素同位体比が上昇するグルタミン酸（濃縮：約 7.6‰）と、ほとんど上昇が起こらないフェニルアラニンの代謝的性質を利用している。ただし、グルタミン酸で約 8.0‰、フェニルアラニンで約 0.4‰のわず

かな濃縮がみられるという報告もあり（力石, 未発表データ）、摂食に伴うアミノ酸ごとの同位体濃縮効果についてはさらなる検討が必要である（補遺-3）。

3. 本研究の構成

本論文は第1部および第2部の2部から構成される。第1部では、現代人を対象にタンパク質の同位体分析による食性復元の方法論的検討および人類生態学への応用を試みた。具体的には、アジア各地域で伝統的な食生活を営む人々を対象とし、同位体分析と食性推定モデルによる食物摂取量の推定値と、実際の食事内容の記録を比較した。さらに頭髮の同位体比から推測される食性の集団間差・性差について議論した。また、伝統的な食物に関する同位体比データベースを作成する目的で、食物試料の分析を網羅的に行った。

第2部では、考古学試料に対するアミノ酸レベルでの窒素同位体比分析の手法を確立し、従来困難であった海産物摂取量の定量的な評価を試みた。分析対象である北黄金貝塚人は北海道の縄文時代前期（4800~6100年前頃）に暮らしていた人々であるが、動物遺存体から海獣類、魚類、貝類、さらに陸上の動植物と多種多様な食資源を利用していたと考えられる [55, 56, 57]。タンパク質を対象とした同位体分析において、多数の食物の利用割合を定量的に推定する際の問題点を克服するために、アミノ酸の窒素同位体比による栄養段階の推定という新たなアプローチを試みた。さらに、これまでの研究で提唱されている食性推定モデルをタンパク質（骨コラーゲン）の炭素・窒素同位体比に適用し、海産物摂取量を評価した。最後に、それぞれの手法による推定結果を比較することで、各手法のメリット・デメリットを考察した。

第 1 部

安定同位体による定量的な食性復元のための基礎研究

I. 背景

タンパク質の同位体分析による食性復元方法の検討をヒトに対して行った研究は少ない。特に炭素と窒素の同位体比から食物利用率の最大最小値を導く線形計画法や、近年提唱された掃き出し法などのモデルについて有効性を評価した研究はない。序論でも述べたように、これらのモデルは2つの同位体比から4つ以上の食物の利用割合を推定するために考案され、様々な割合で食物を組み合わせたときに消費者の同位体比を再現するような組み合わせだけを抽出するものである。しかし、食性推定モデルは動物に対する給餌実験により妥当性が評価されているに過ぎず、生理的に実験動物と大きく異なるヒトに対しても有効であるかは不明である。また、Phillips et al. [31] では野生動物を対象とし、食物の元素濃度を計算に加味することでより正確な食性推定が可能になることを提唱した。このように近年幾つかのモデルが新たに提唱されたものの、ヒトに対する有効性については未検討である。

そこで、本研究の第1部では現代人集団を対象とした各食性推定モデルの有効性評価を第1の目的とした。具体的には、人類生態学調査により定量的に食事内容が記録されているインドネシア人集団を対象とした。同集団は現在も伝統的な食生活を営んでいるため、食生活が多様化した日本人よりもモデルの評価に適した研究対象と言える。

また、人類生態研究に対する同位体による食性復元の応用を第2の目的に掲げた。人類生態学は生業・栄養・人口・環境などを切り口とし、様々な地域に暮らす人々を対象に自然環境への適応形態および自然環境へのヒューマンインパクトの解明を主な目的とする。フィールドワークにおける生体試料の収集やインタビューによる聞き込み調査、さらに実験室での試料の化学分析を通して生業－環境汚染－健康の関連などに着目した研究がなされている。このようなフィールドワークでは被験者全員に対するインタビューは大きな労力を要する上に、食事内容に関しては長期的な調査が困難である。従来、定量性に劣る聞き取り調査の弱点を補うために、直接秤量法と呼ばれる手法により定量

的な食事内容の調査がなされてきた [58]。この方法は、家庭に出入りする食物の重量を一定期間網羅的に秤量するものであり、被験者の食物摂取量に関する最も定量的かつ信頼性のあるデータが得られると期待される。しかし、数日から数週間におよぶ連続的調査は研究者に大きな負担がかかるうえ、対象となる世帯数にも限界がある。つまり、定量的かつ簡便な食性評価方法の確立が望まれている。

本研究では、パプアニューギニア・インドネシア・ベトナム・バングラディシュ・ネパールの 5 ヶ国における大規模な野外調査によって収集された頭髪および食物試料を利用して、同位体分析による各人類集団の定量的な食性復元を試みた (図 1)。パプアニューギニアについては、伝統的にサツマイモを主食とする東部高地地域 (GOROKA) の人々を対象とした。イモ類以外では野菜類やニワトリ、ブタなどの家畜類が利用され、近年では米やサバ缶、小麦粉などの購入食品の消費が増加しつつある [59]。インドネシアについては、西ジャワ州バンドンに居住するスンダ人と呼ばれる民族集団が調査対象である。スンダ人は米を主食とし、テンペ (大豆を発酵させた伝統食品) や豆腐などの大豆製品や野菜類のほかに、卵や魚の塩漬けが副食として好まれる。ベトナム、バングラディシュではコメや野菜類のほかに淡水魚の利用が特徴的である。ネパールではトウモロコシやヒエ、ヤムイモが食料として重要である。本論文では、食文化の大きく異なるこれらの集団を対象に頭髪と同位体分析から導かれる集団間差・性差などについて議論した。

一方で、先史時代の日本人集団が利用した可能性のある伝統的食物について同位体分析を行った。具体的には、インドネシア・パプアニューギニア・バングラディシュの 3 カ国を対象に収集された食物試料を分析した。

II. 材料と方法

1. 試料

本研究で使用した毛髪と食物試料は、環境省推進費プロジェクト「ENVRERA」の一環として採取したものである（表 1, 表 2）。このプロジェクトは、市場経済化が急速に進行するアジア各地域において住民の健康と化学環境の転換の関連を調査する目的で、平成 18 年度～平成 20 年度にかけて実施された。プロジェクトの詳細については、引用文献 [59] を参照されたい。

食物試料に関しては、安定同位体比のデータを収集する目的で、インドネシア（16 点）・パプアニューギニア（16 点）・バングラディッシュ（10 点）の試料（計 42 点）を分析に供した（表 2）。試料は全て -20°C で冷凍庫に保存されていたものを使用した。パプアニューギニアの食物試料は、平成 19 年 11 月 26 日～12 月 13 日および平成 20 年 8 月 3 日～8 月 23 日の 2 回にわたる現地調査において著者が自ら収集した。それ以外の地域では共同研究者によって収集された。

住民の頭髪試料は、各々の地域に精通する研究者らが設定した地域単位（多くは村単位）にて収集され、頭皮付近から任意の本数をハサミで切り取り、被験者ごとにプラスチックバックに保存した。また、試料の収集と同時に食事内容の調査も行ったが、その方法は地域ごとに異なる。調査歴の長いバングラディッシュ・インドネシア・パプアニューギニアではインタビューによる摂取頻度調査が行われたが、ネパールでは簡単な聞き込み調査、ベトナムでは未調査である。摂取頻度調査とは、日（あるいは月）にどの食物を何回食べたかを被験者に答えてもらう方法である（補遺-4）。インドネシアでは、大多数の被験者に対する摂取頻度調査のデータに加え、一部の少数の被験者について直接秤量法による食物摂取量データがとられている。

本研究では、インドネシア・バンドン市近郊にある Tarma Jaya 村に在住する IT106 被験者の頭髪（n=1）と、収集された食物試料を用いて食性推定モデルの妥当性評価を行

った ([59] 参照)。Tarma Jaya 村はバンドン市の 40km 南東に位置し、ENVRERA プロジェクトの一環で 2006 年 8 月に頭髪試料の収集が、2006 年 12 月には 15 世帯を対象に直接秤量法による食事調査が行われた。対象となる被験者については 1 週間の徹底した食事内容の記録があり、1 日のタンパク質摂取量やエネルギー摂取量などのデータが利用可能である。個人データはリサーチ ID によって管理・匿名化され、東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻人類生態学教室に保管されている。

2. 試料の前処理

2-1. 頭髪試料の前処理

他の多くのタンパク質と異なり頭髪は常に外部環境に曝されているため、試料表面の汚染を除去する必要がある。具体的な前処理方法は O'Connell et al. [60] に従い、以下の手順で行った。

- ① 頭髪試料 1 本をガラス製のバイアル中で純水に浸し、表面に付着した物質を取り除くために 10 分間超音波洗浄を行った。毛髪ケラチンの変性を避けるため、超音波洗浄器内の温度が上昇しすぎないように氷を適宜投入し、温度を一定に保つよう努めた。
- ② 上清を捨て、脂質を除去するためにクロロホルム/メタノール混合溶液 (2:1, v/v) に室温で 2 時間ほど浸した。
- ③ 再度上清を捨て、純水中で 10 分間超音波洗浄を 2 度繰り返した。
- ④ 60°C に設定したオーブン中で試料を一晩乾燥させた。
- ⑤ 試料を約 2~3cm ずつ切断した後、それぞれを元素分析用の錫カップに包んで同位体分析に備えた。

2-2. 食物試料の前処理

脂質は一般的にタンパク質よりも低い炭素同位体比を示すので、食物試料は表面の汚れとともに食物自身に含まれる脂質分を除去する必要がある。具体的な前処理方法は

Yoshinaga et al. [61] に従い、以下の手順で行った。

- ① 冷凍されていた食物試料を一晩凍結乾燥させて水分を除去した。
- ② フリーザーミルを使用し、乾燥試料 2~3g を液体窒素中で粉砕した。
- ③ 遠沈管に移した粉末試料にクロロホルム/メタノール混合溶液 (2:1, v/v) を 20~30ml 加え、10 分間超音波洗浄を行うことで脂質成分を除去した。
- ④ 2000rpm で 10 分ほど遠心した後上清を捨てた。
- ⑤ ③・④をもう一度繰り返した後、混合溶液の代わりにアセトンを用いて再度脱脂した。
- ⑥ 遠心した後上清を捨て、ドラフト中に放置しアセトンを蒸発させた。
- ⑦ 脱脂した試料を再び凍結乾燥させ、4℃ で保管した。
- ⑧ 粉末試料約 0.25mg を秤量し、錫カップに包んで安定同位体比の測定に備えた。窒素に乏しい植物質の窒素同位体比を測定する際は、窒素含有量を測定した後分析必要量を別途秤量した。

3. 安定同位体比の分析

頭髪試料および食物試料の炭素・窒素同位体比は、EA-IRMS (元素分析計 : Carlo Erba NA1500—同位体比質量分析計 : Finnigan MAT 252) を用いて測定した。内部標準物質 (よくホモジェナイズされたコラーゲン) の安定同位体比の標準偏差から、測定に伴う誤差は $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ とともに約 0.3‰ と見積もられた。また、元素分析計を用いて安定同位体比とともに炭素と窒素の元素濃度も測定した。

4. 食性推定モデルの妥当性評価

IT106 被験者頭髪試料の炭素・窒素同位体比および食物試料の炭素・窒素同位体比に各食性推定モデルを応用し、被験者の食物利用割合を推定した。頭髪試料は直接秤量調査が行われた時期に対応していないため、分析した 6 つの断片 (合計で約 15 ヶ月分に

相当)の平均値を代表値として使用した。食物試料としては、聞き取り調査および直接秤量調査により明らかにされた6つの主要タンパク質源(C₃植物、テンペ、卵、小麦粉、魚の塩漬け、イワシ)を用いた(表5)。ただし、小麦粉については現地の試料が手に入らなかったため、パプアニューギニアの小麦粉の同位体比データで代用した(Yoshinaga et al. [61]より抜粋)。数量調査から量的な評価を行うために、摂取頻度調査のデータは各食物について1週間に食べた回数の相対頻度を評価した(補遺-5)。また、直接秤量のデータを参考に食事における各食物の相対的タンパク質寄与を算出した。

食物群の数が多いと推定値が幅広くなり各手法の推定精度を比較できなくなるため、本研究では上記の6品目について推定を行った後、C₃植物とテンペを合計した利用割合についても試算した。この計算は各々のモデルの枠組み内で実行できる。具体的には、掃き出し法に用いられるシミュレーションプログラム“IsoSource”および線形計画法(以下LP法と略す)に加え、本研究で新たに考案した濃度加重線形計画法(CWLP法)の計3手法を応用した。以下、各食性推定モデルの特徴を説明する。

Phillips et al. [29]は「掃き出し法」と呼ばれる手法を用いて、炭素・窒素同位体比から4つ以上の食物の利用割合を推定する手法を提唱した。この手法はタンパク質源の同位体比を様々な割合で組み合わせ、人骨コラーゲンの同位体比を再現できるかを試算するものである。実際の計算はコンピューターソフト“IsoSource”を用いて行われる。このソフトは米国環境保護庁のホームページ(<http://www.epa.gov/wed/pages/models.htm>)からダウンロードすることができる。

LP法はMicrosoft Excelの「ソルバー」機能を利用して複数の食物の利用割合を変化させ、人骨コラーゲンの同位体比を再現するような各タンパク質源の組み合わせの分布範囲を導く手法である[28]。掃き出し法は全ての組み合わせについて計算するため評価に時間がかかるが、LP法はそれぞれの食品が取りうる最大最小値を節約的な計算方法で評価するものである。これらの手法はいずれも骨コラーゲンの同位体比の値を作り

出す組み合わせで可能な値を評価しているに過ぎず、実質的には同じものを評価していると考えられる。

Phillips et al. [44] において提唱された濃度加重混合モデル (CWMM) は候補となる食物について同位体比だけでなく元素濃度も利用割合の計算に加味することができるモデルである。従来の手法ではエサの利用割合を計算できないような場合にも、同モデルの適用によって解決できることが、ミンクの摂餌実験データを用いて示された。このモデルを実用化したソフト “IsoConc” も米国環境保護庁のホームページ (同上) からダウンロードできる。ただし、このソフトでは3つまでの利用食物についてしか利用割合を計算できない。

そこで私は、4つ以上の利用食物について元素濃度を計算に加味できるモデル (濃度加重線形計画法: CWLP 法) を新たに考案した。このモデルは上記の LP 法を拡張したものであり、食物の利用割合を推定する際に元素濃度による加重を行うため、LP 法よりも分布範囲を絞り込むことができると考えられる (モデルの詳細な原理については補遺-5 を参照)。

本研究では、掃き出し法 (IsoSource)、線形計画法 (LP 法) および CWLP 法を用いて IT106 被験者の食物利用割合を推定し、直接秤量法による食物摂取量の推定値と比較することで、元素濃度加重の有効性について考察した。また、直接秤量データだけでなく摂取頻度調査のデータとも比較を行った。

III. 結果

1. 食物試料の炭素・窒素同位体比

分析に供したパプアニューギニア・インドネシア・バングラディシュ 3 カ国の全食物試料 42 点について炭素・窒素安定同位体比が測定された（表 3, 図 2）。

C₃ 植物については、パプアニューギニア ($\delta^{13}\text{C}$: $-25.9 \pm 1.8\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}$: $+3.6 \pm 2.6\text{‰}$) とインドネシア ($\delta^{13}\text{C}$: $-26.8 \pm 1.4\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}$: $+3.7 \pm 1.0\text{‰}$) で類似した同位体比の分布を示したが、バングラディシュは比較的低い窒素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$: $-27.7 \pm 1.4\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}$: $+1.6 \pm 3.1\text{‰}$) を示した。ただし、バングラディシュの C₃ 植物の中には、通常みられない高い炭素同位体比を示したシソ ($\delta^{13}\text{C}$: -15.0‰)、また通常よりも高い窒素同位体比を示したマメ科の植物 ($\delta^{15}\text{N}$: $+6.9\text{‰}$) が含まれていた。他にも、パプアニューギニアのカピヤック ($\delta^{15}\text{N}$: $+7.2\text{‰}$) やプランテン ($\delta^{15}\text{N}$: $+6.2\text{‰}$) も高い窒素同位体比を示した。一方、C₄ 植物についてはパプアニューギニアのトウモロコシ 1 点のみが分析されたが、得られた同位体比は一般的にみられる値であった ($\delta^{13}\text{C}$: -10.9‰ , $\delta^{15}\text{N}$: $+2.9\text{‰}$)。

パプアニューギニアの家畜類は -22.7‰ ~ -23.1‰ の炭素同位体比、 $+5.1\text{‰}$ ~ $+8.1\text{‰}$ の窒素同位体比を示した。このことは、これらの家畜類が C₃ 植物を主なエサとしていることを示す。また、インドネシアのミートボールは C₃ 植物に一般的な低い炭素・窒素同位体比を示した ($\delta^{13}\text{C}$: -24.1‰ , $\delta^{15}\text{N}$: $+4.5\text{‰}$)。これはミートボールがタピオカの粉 (C₃ 植物)・牛肉・卵からつくられていることと整合的である。

淡水魚に関して、インドネシア ($\delta^{13}\text{C}$: $-26.6 \pm 3.1\text{‰}$) とバングラディシュ ($\delta^{13}\text{C}$: $-28.5 \pm 2.9\text{‰}$) で炭素同位体比に大きな変動がみられた。海産魚類については各国ともに一般にみられる同位体比を示したが、インドネシア産のイワシはやや低い窒素同位体比を示した ($\delta^{15}\text{N}$: $+8.5\text{‰}$)。

また、伝統的な食物ではないがパプアニューギニアとインドネシアで採取された菓子類・スナック類の同位体比は、C₃ 植物と C₄ 植物の中間に位置する値であった。

2. 頭髪試料の炭素・窒素同位体比

表 4 および図 3 に測定された頭髪試料の炭素・窒素同位体比を示す。パプアニューギニア ($\delta^{13}\text{C}$: $-22.0 \pm 0.7\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}$: $+8.6 \pm 0.8\text{‰}$)・インドネシア ($\delta^{13}\text{C}$: $-21.2 \pm 0.9\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}$: $+8.4 \pm 0.5\text{‰}$)・ネパール ($\delta^{13}\text{C}$: $-21.4 \pm 0.6\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}$: $+8.6 \pm 0.5\text{‰}$) の 3 カ国は類似した同位体比の分布を示した。他方、ベトナムは比較的高い窒素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$: $-22.9 \pm 0.8\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}$: $+10.6 \pm 0.6\text{‰}$) を、バングラディッシュは炭素・窒素同位体比ともに低い値 ($\delta^{13}\text{C}$: $-24.5 \pm 0.9\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}$: $+7.1 \pm 0.6\text{‰}$) を示した。

分析個体数の多いパプアニューギニア、インドネシアについて地域集団ごとの同位体比を図 4・図 5 に示す。パプアニューギニアでは、3 地域集団の間に頭髪の炭素・窒素同位体比ともに有意な差はみられなかった (ANOVA)。またインドネシアでは、炭素・窒素同位体比ともに有意な差がみられた ($p < 0.01$, ANOVA)。

両国の 3 地域集団について、頭髪の同位体比にみられる性差を図 6・図 7 に示す。パプアニューギニアについては、全集団で有意な性差はみられなかった。一方、インドネシアについては、Taruma Jaya と Sekeloa では顕著な性差がみられなかったが、Pasir Pogor では炭素同位体比が男性で有意に高かった ($p < 0.01$, t 検定)。

3. 食性推定モデルの妥当性評価

図 8 に IT106 被験者の頭髪 (約 15 ヶ月分に相当) における炭素・窒素同位体比の季節変動を示す。炭素同位体比で $-22.3 \pm 1.2\text{‰}$ 、窒素同位体比で $8.5 \pm 0.5\text{‰}$ の変動がみられた。

図 9 に IT106 被験者の頭髪試料と食物試料の同位体比を示す。 C_3 植物・テンペ・卵・小麦粉・魚の塩漬け・イワシの 6 品目を対象にした場合、 C_3 植物とテンペ以外の食品について CWLP 法が最も狭い推定幅を示した (表 6-A)。特に小麦粉と魚の塩漬けに対しては他の 2 手法の推定精度を大幅に上回った。 C_3 植物とテンペについては 3 手法で近似

した推定幅を示した。一方 C_3 植物とテンペを合計した場合、IsoSource（1%-70%）と LP 法（6%-78%）は推定幅があまり変化しなかったが、CWLP 法（31%-82%）は大きく推定幅が狭まった（表 6-B）。全般的に IsoSource と LP 法については同程度の推定精度であった。

摂取頻度調査データ（FFQ）については、1 週間に対象食物を食べた回数の相対頻度を表示した。直接秤量法と摂取頻度調査による推定値を比較すると最大で 17%の違いがみられたが（補遺-6 参照）、摂取頻度調査の推定結果は各種の食性推定モデルによる推定値よりも直接秤量データに近い推定値を示した。ただしイワシの摂取量が見落とされているなど一部のデータで両者に相違がみられた。

IV. 考察

1. 食物試料の炭素・窒素同位体比

本研究で分析した食物試料の同位体比は、 C_3 植物、海産魚類といった大きなカテゴリーで区分すれば Minagawa et al. [26] および Yoshinaga et al. [61, 62] において測定された現代食品の炭素・窒素安定同位体比と類似している（図 10）。ただし、 C_3 植物や淡水魚についてはこれらの先行研究のデータよりも大きな変動を示しており、現代食品の同位体比についてより多くのデータを収集する必要がある。

国別の食物同位体比ではバングラディシュの C_3 植物が他国と比較して低い炭素・窒素同位体比を示すなど、同じカテゴリー内においても変動がみられた。植物の炭素同位体比が変動する例としては、樹木の高さに比例して葉の炭素同位体比が上昇する樹冠効果（canopy effect）が知られるが、炭素同位体比が減少する例はあまり知られていない [43]。ただし、測定された値（ $\delta^{13}C$: $-27.7 \pm 1.4\%$ ）は C_3 植物が理論的に取りうる炭素同位体比の範囲内（ $-35\% \sim -22\%$ ）に収まるため、生理的な異常などではなく、何らかの原因により植物体の主要な炭素源である大気中の二酸化炭素の同位体比が他国よりも低かった可能性が考えられる [35]。この原因としては、工場からの排気ガスや一般に低い炭素同位体比をもつ化石燃料由来の二酸化炭素の局所的な寄与が考えられる。

本研究の結果は、同じ種類の食物でも生態環境によって同位体比が変動することを示している。考古学遺跡に残存しにくい魚骨や植物質について、現代食品の同位体比データで代用する場合には注意する必要がある。

2. 頭髮試料の炭素・窒素同位体比

パプアニューギニアについては、集団全体で C_3 植物に偏った食性が示唆された。イモ類やバナナなどの食物がタンパク質源として重要であると考えられる。また、3 地域集団間で頭髮の同位体比に有意差はみられず、食生活の類似性を示唆している。

インドネシア・スンダ人の高い炭素同位体比は、高い炭素同位体比をもつ海産物（イワシ類）、あるいは C_4 植物をエサとして与えられたニワトリ等の家畜類の摂取により説明できる。ただし、食物摂取頻度調査では海産物の摂取頻度が極めて低いため、後者の推測が妥当と考えられる。また炭素・窒素同位体比ともに 3 地域集団間に有意な差がみられた原因として、Pasir Pogor の人々が塩漬けの魚を多く摂取している可能性が考えられる。これは Pasir Pogor において野菜類の摂取頻度が低いことと、高い窒素同位体比をもつ卵 ($\delta^{15}N$: +8.2‰) や塩漬けの魚 ($\delta^{15}N$: +6.6‰) の摂取頻度が高いという、インタビューによる摂取頻度調査の結果と矛盾しない（補遺-7）。この地域は同位体比の性差も大きく、男性で炭素・窒素同位体比がともに高いことから、イワシなどの海産物もしくは高い炭素同位体比をもつニワトリ ($\delta^{13}C$: -16.9‰) の摂取量が女性よりも多いと考えられる。

バングラディシュの人々は際立って低い炭素・窒素同位体比を示しており、 C_3 植物への強い依存が示唆された。食物摂取頻度調査のデータでは植物質以外に淡水魚を 1 日に 1 回食べる程度であり、動物性タンパク質の摂取頻度が非常に低いことからこの推測が裏付けられる（補遺-8）。

ベトナム人の高い窒素同位体比は、一般的に低い炭素同位体比・高い窒素同位体比をもつ淡水魚の摂取によるものと考えられる。ベトナムの食物試料は入手できなかったため具体的な推定は難しいが、淡水魚が被験者にとって重要なタンパク質源である可能性は高い。

ネパールについては食物試料・食事調査データともに入手できなかったため、具体的な食性の検討は困難である。今後食物試料の同位体分析を行う必要がある。頭髮の同位体比データからはパプアニューギニアやインドネシアと近似する値を示しており、何らかの動物性タンパク質の寄与が考えられる。背景で述べたように、今回比較した 5 集団はそれぞれ独自の食習慣をもつことが知られているが、パプアニューギニア、インドネ

シア、ネパールのように食物の組み合わせによってはみかけの同位体比が近似することが分かった。ヒトの同位体比はその食生態の文脈の中で理解することが至極重要であると考えられる。

3. 食性推定モデルの有効性評価

掃き出し法 (IsoSource) と線形計画法 (LP 法) はともに消費者の同位体比を再現できる食物の組み合わせの分布範囲を推定するため、入力する食物と消費者の同位体比が同じであれば結果として出力される値も近似した推定幅を示すと考えられる。C₃ 植物・テンペ・卵・小麦粉・魚の塩漬け・イワシの 6 品目を対象とした場合では、3 手法の推定精度に大きな差はみられなかった。しかし、C₃ 植物とテンペを合計した場合は CWLP の推定精度が他の手法を大幅に上回った。これは食物の元素濃度を計算に加味することで利用割合の分布について絞込み効果が働いたことを示している。

本研究の結果は、新たに考案した CWLP 法が従来の手法と遜色ないか、むしろより高精度な推定が可能であることを示す。しかし、これらの推定値よりもインタビューによる摂取頻度調査の推定値の方が直接秤量データに近かったため、必ずしも CWLP 法が有利とはいえず、この手法の長所として挙げられるのは食性解析に伴う労力が小さい点である。ただし、インタビューによる調査ではイワシのようにいくつかの食物について見落としている寄与がある。主要な食物について同位体比データが集められれば、CWLP 法の適用によってインタビューよりも定量的な推定が行える可能性もある。また、摂取頻度調査はある食品を食べた回数しか評価しないため、偶然直接秤量データに近い推定値を示した可能性も考えられる。この摂取頻度調査の妥当性については、より多くの被験者について直接秤量法のデータと照らし合わせることで検討できると考えられる。

上記の各食性推定モデルは一般に利用食物の数が多いほど推定精度が下がるので、食

物のレパートリーが少なく、かつ被験者の数が多い集団であるほど CWLP 法を適用するメリットが大きくなると考えられる。また、C₃植物は同一のカテゴリー内でも元素濃度に大きな変動がみられるため（表 5 参照）、CWLP 法の推定精度を下げる原因となった可能性がある。特にイモ類は元素濃度の変動が大きいため、CWMM や CWLP 法を適用する場合は注意が必要である。利用食物の候補が多数あるときにどの食物を同一のカテゴリーに含むかは主観的判断に委ねられ、食物の利用割合推定に元素濃度を加味する場合はこのカテゴリー分けがさらに複雑になる。Phillips et al. [63] はこのカテゴリー分けをする際の方法について触れており、食品の区分として似通った食物群（例；魚類と貝類）を 1 つのカテゴリーにまとめる方法を推奨している。この方法は、IsoSource プログラムの枠組み内で各々の食品の利用割合を足し合わせることで実行できる。しかし、食物の元素濃度に応じたカテゴリー分けについては触れておらず、現状では類似した元素濃度をもつ食品ごとに区分するしかない。特に、C₃植物の中でもマメ科の植物はタンパク質に富み窒素の元素濃度が高いため、CWMM や CWLP 法を応用する際には本研究のように他の C₃植物と別カテゴリーとして扱った方が良いと考えられる。ただし、それぞれの利用割合を計算した後に必要に応じて利用割合を合計することで、推定精度が高くなると期待される（[63] 参照）。

直接秤量法による食事調査を行った時期（2006 年 12 月）と本研究で分析した頭髮が採取された時期（2006 年 8 月）にタイムラグがあるため、直接秤量データを真の食物利用割合とすることにも問題がある。図 8 では、頭皮から 10cm を超えた辺りから同位体比に大きな変動がみられる。もし直接秤量の調査時にこのような食性の変化があったとしたら、推定される食物利用割合の分布と直接秤量データが大きく食い違うことになる。このような食い違いを避けるためには、食事調査と頭髮の採取をなるべく同時に行うことが良いと考えられる。同位体比が既知の食物を被験者に一定期間継続的に摂取してもらい、対応する期間に形成された頭髮を同位体比分析するのが理想ではある。被験

者になるべく負担をかけない研究方法を今後確立する必要がある。

その他食性推定モデルによる推定精度を下げる要因として、摂食に伴う同位体濃縮効果に伴う変動が考えられる。Yoshinaga et al. [61] では、パプアニューギニア低地に暮らすギデラ族 4 集団を対象に頭髪と食物の安定同位体比を測定し、生態環境が大幅に異なる集団間で食物—頭髪間の同位体濃縮効果（以下、 $\Delta_{\text{頭髪 - 食物}}$ と表示する）に差があることを示した（ $\Delta^{13}\text{C}_{\text{頭髪 - 食物}}$: 1.8~4.8‰, $\Delta^{15}\text{N}_{\text{頭髪 - 食物}}$: 5.0~6.9‰）。一方、Minagawa et al. [26] は現代日本人の頭髪と食物の同位体比を分析し、 $\Delta_{\text{頭髪 - 食物}}$ 値について、 $\Delta^{13}\text{C}_{\text{頭髪 - 食物}}$: 2.5‰, $\Delta^{15}\text{N}_{\text{頭髪 - 食物}}$: 4.1‰という値を示した。このように、野生動物だけでなくヒトにおいても摂食に伴う同位体濃縮効果に大きな変動がみられる。しかし、上記の先行研究以外にこの効果について個人差・集団間差・地域差などを評価した研究はほとんどない。ヒトを対象に食事コントロール実験を直接行えないことが主要因であるが、同位体による食性復元方法をより正確なものにするためには、ヒトの体内における同位体濃縮効果に対する正確な評価が今後不可欠である。

表 5 から分かるように、CWLP 法はインタビューによる摂取頻度調査より推定精度が落ちるものの、ある程度定量的な食性の推定が可能である。数百人という規模の被験者全てについて摂取頻度調査や直接秤量法を実施することは非常に大きな労力を要する。頭髪と代表的な食物試料の同位体分析による食性推定は今後人類生態学調査において有効な解析ツールとなることが期待されるが、さらなる改良が必要である。一方、これまでの人類生態学的研究では見逃されがちだった食性の季節的な変動の有無や家庭外での摂食を検出できる点は、同位体分析のメリットの 1 つであると評価できる。

V. 小結

主としてパプアニューギニアの伝統的食物についてこれまでの研究で報告されていない同位体比データを収集することに成功した。今後は他の地域の食物についてもさらに同位体比データを集積する必要がある。

掃き出し法・LP法と比較して本研究で新たに考案したCWLP法はやや高い推定精度を示した。ただし、インタビューによる摂取頻度調査よりも推定精度が落ちるため、本手法の長所として挙げられるのは、食性解析に伴う労力が少ない点および長期間での食性の変動の検出である。この手法は、今後大規模な野外調査において有効な解析ツールとなることが期待される一方で、さらに有効性の評価を行う必要がある。今後、食事調査の時期と頭髮などの生体試料を採取する時期を一致させ、より理想的な状態で評価せねばならない。

食性推定モデルで改善すべき点としては、元素濃度以外にも各々の食物カテゴリーに伴う同位体比の変動を計算に反映させることも考えられる。3つまでの食物群についてはPhillipsらが提唱した方法で誤差の評価が可能だが、4つ以上の食物群について誤差の反映が可能なモデルは提唱されていない[64]。食物利用割合の推定値に同位体比の誤差の反映できれば、より実際に近い推定値が得られるだろう。今後このようなモデルを考案し、妥当性の評価を試みる必要がある。

本研究ではインドネシアの伝統的食物についてタンパク質含量、炭水化物含量などの基礎データが不足していたため、 $\Delta_{\text{頭髮-食物}}$ 値を評価できなかった。今後食品に含まれる栄養成分を分析することでこの評価が可能になると考えられる。より多くの食物について網羅的に同位体分析ができれば、 $\Delta_{\text{頭髮-食物}}$ 値の集団間差・性差などについても議論が可能になるだろう。上記の検討を通して炭素・窒素同位体比による食性復元方法はより正確かつ信頼性の高い手法へと進化を遂げると考えられる。

第 2 部

アミノ酸の窒素同位体比による北黄金貝塚人の海産物摂取量評価

I. 背景

定量的な食性の復元は、遺跡から出土した古人骨の ^{14}C 年代を補正する上で必要不可欠である。この ^{14}C 年代の補正に重要な海産物摂取量の推定に関する方法を第 2 部で検討する。

本研究では、北海道伊達市に所在する縄文時代前期（約 4800~6100 年前）の遺跡、北黄金貝塚から出土した人骨を対象とした。これまでの研究により、北黄金貝塚人の炭素・窒素同位体比はオットセイやアシカなどの海生哺乳類の同位体比に近い値であることが示されている（ $\delta^{13}\text{C}$: -14.2‰, $\delta^{15}\text{N}$: +18.1‰ ; 補遺-9） [8, 25]。この分析結果は、動物考古学者たちが主張する海獣類や魚貝類の積極的利用に特徴づけられる北黄金貝塚人の生業と整合的であった [56, 57]。しかし、以下に述べる問題点のために具体的な海産物摂取量の推定は困難であった。

先史人の食性復元に広く用いられている食物—骨コラーゲン間の同位体効果（ $\Delta^{13}\text{C}$: 4.5‰, $\Delta^{15}\text{N}$: 3.4‰）を用いて北黄金貝塚人の食性を推定すると、人骨の同位体比が各食物群の同位体比の平均値で囲まれるスペースから外れてしまう（補遺-8）。このような場合、前述した食性推定モデルが応用できない。南川 [25] では、 $\Delta^{13}\text{C}$: 2.8‰、 $\Delta^{15}\text{N}$: 5.3‰ という同位体濃縮効果を採用し、モンテカルロ・シミュレーションによって北黄金貝塚人の海産物摂取量を推定した。その結果、魚介類が 32%、海生哺乳類が 46%（海産物として合計 78%）という推定値が得られている。しかし、この推定値は数十%の変動幅をもつと考えられる上に、同位体濃縮効果にも大きな不確定性が伴う。

Yoneda et al. [8] では、炭素・窒素同位体比に加えて放射性炭素 ^{14}C を利用して北黄金貝塚人の海産物摂取量を推定した。同一の時代に生きたと考えられる海生動物の遺存体と、人骨および陸上動物骨のみかけの ^{14}C 年代を比較することで、先史人の海産物摂取量を推定できる。 ^{14}C の分析は食物タンパクと骨コラーゲンの間の濃縮効果を考慮する必要がない。また、海洋生態系における ^{14}C の変動は ^{13}C によって補正可能であり、 ^{15}N

や ^{13}C を用いた場合と異なり海と陸の2つのエンドメンバーでの混合モデルを設定できるため、海産物摂取量をより高精度に定量評価できると期待される。しかし、北黄金貝塚では人骨と動物遺存体が幅の広い年代から出土したため、個体間でみられる大きい ^{14}C 年代の変動が、海産物摂取量の個人差によるものなのか、実年代の差によるものなのかを区別できなかった [55, 65]。集団全体の平均値として海産物摂取量を推定すると約 79%となり、モンテカルロ・シミュレーションによる推定結果とよく一致したが、個体ごとの海産物摂取量を定量的に評価するという課題は依然として解決されていない [8, 25]。

人骨の海産物摂取量の評価には、 ^{14}C 以外にもストロンチウム同位体比 ($\delta^{87}\text{Sr}$) や硫黄同位体比 ($\delta^{34}\text{S}$) などの指標を用いる方法もある [66, 67, 68]。しかし、北黄金貝塚のように海岸線近くに所在する遺跡では、海からの海水飛沫や潮風によって人骨に含まれる本来の同位体比が海洋の影響を受けている可能性がある (スプレー効果)。実際に、同貝塚から出土した陸上動物骨に含まれる硫黄同位体比を分析したところ、スプレー効果の影響と考えられる大きな変動がみられた (米田, 未発表データ)。また、ストロンチウム同位体比は他の地域からの移動を反映する上に、形態学的な情報の多い歯を分析することは難しいという問題もある。

そこで本研究の第2部では、人骨個体ごとの海産物摂取量を評価するために、従来の指標とは異なる新たな指標の確立を目的とした。具体的には、海洋生態研究で確立されつつあるアミノ酸の窒素同位体比分析を考古学試料に応用し、栄養段階の推定による当時の生態系構造の復元と、最終目標である海産物摂取量の評価を試みた。

II. 材料と方法

1. 試料

1-1. 考古学試料

北黄金貝塚は北海道伊達市の海岸線付近に位置し、噴火湾に面する丘上に所在する（図 11）。貝塚から出土する土器の形式（円筒下層式）によって、縄文時代前期（約 4800~6100 年前）の遺跡に比定される [69]。噴火湾一帯は貝塚の分布が多く、その学術的価値は大衆の知るところである。そのなかでも北黄金貝塚は無傷の状態で現存している大規模貝塚として著名である。札幌医科大学の人類学実習の一環として 1969~1979 年にかけて 11 次にわたる発掘調査が行われ、計 12 体の人骨が発見された [65]。動物遺存体は H-1 および I-1 グリッドの第 1 層から第 4 層にかけて出土しており、キタオットセイ (*Callorhinus ursinus*) などの海獣類や、シカ (*Cervus nippon*) が主な構成要素である（補遺-10）[55]。獣骨以外では、カキ (*Crassostrea gigas*) やイガイ (*Mytilus* sp.) を主体とする貝殻が豊富に出土している。人骨は貝塚の最下層から発見された。

本研究では、北黄金貝塚から出土した人骨（6 個体）から抽出されたコラーゲンをを用いて（表 7）、その構成要素である各アミノ酸の窒素同位体比を測定した。また、北黄金貝塚人のタンパク質源として考えられる動物遺存体（オットセイ・キツネ・シカ各 2 個体、クロソイ・カキ各 1 個体）についても（表 8）、人骨と同様に各アミノ酸の窒素同位体比を測定した。

1-2. 現生動物骨試料

土壌に埋没している間に試料が受ける化学的変化（続成作用）の影響を評価するために、現代の半野生状態にあるウマ（n=1, 与那国島産）の椎骨から抽出したコラーゲンをコントロールとしてアミノ酸の窒素同位体比分析に供した。

2. 試料の準備

動物骨試料は形態学的に年齢・性別などを判断するために、分析する前に写真を撮影

した。ヒト、シカ、オットセイについては、Yoneda et al. [8] によって既に抽出・保存されてあった骨コラーゲンを使用した。キツネ・クロソイについては本研究で新たにコラーゲンの抽出を行った。また、骨試料以外にもカキの貝殻に残存するタンパク質（コンキオリン）の抽出を試みた。

2-1. 骨コラーゲンの抽出

コラーゲンの抽出は、洗浄・脱灰・ゼラチン化の手順で行われる。具体的な抽出方法については、Longin et al. [70] を独自に改良した方法を用いた。洗浄とは骨試料に付着する様々な汚れを除去する一連の処理、脱灰は骨組織の主な無機成分であるハイドロキシアパタイトを溶解し、タンパク質（コラーゲン）と分離する処理である。ゼラチン化とは、その名の通り得られた有機成分をゼラチン状に変性させる処理を指す。各処理の詳細な手順については以下に譲る。

[洗浄]

- ① 種同定が可能な部位から形態学的な影響の少ない部分を選び、ダイヤモンドカッターを用いて、0.5~1.0 g を分析用に採取した。
- ② サンドブラスターを用いてアルミナ粉を骨試料表面に噴射し、汚れや接着剤などを除去した。また、骨組織のうち土壤に埋没している間汚染を受けやすいと考えられる海綿質の部分は極力取り除くようにした。アルミナの粉は 400°C で燃焼したものをを用いた。
- ③ 骨試料を 100 ml ビーカーに純水と共に入れ、氷冷しつつ超音波洗浄を行った（60°C 以上の温度ではコラーゲンが変性する恐れがあるため）。純水は汚れを確認しつつ適宜交換した。超音波洗浄中に骨試料が崩壊する場合は、途中で洗浄を中止した。
- ④ 土壤中有機物であるフミン酸、フルボ酸を除去するために、骨試料を水酸化ナトリ

ウム水溶液（0.2 M, 40 ml）に浸し、4℃ で 8 時間以上置いた。

- ⑤ 溶液の上澄みを捨て、骨試料を純水で 2、3 回洗浄した後純水中に 4℃ で浸した。1 時間ごとに pH を確認し、中性になるまで純水を交換した。
- ⑥ 中性であることを確認したら骨試料を凍結乾燥した。

[脱灰]

- ① タングステン製のハンマーと鉢を用いて洗浄した骨試料を粉碎した。さらにメノウ製の乳鉢を使用し、よりキメの細かい粉末にまで試料を粉碎した。粉碎に使用した道具は全て骨試料を換えるたびにアセトンあるいはエタノールで超音波洗浄を行った。粉碎後、試料の重量を記録した。
- ② 冷却しておいた塩酸（12N）を 3 ml ほどゆっくりと試料の入ったセルロースチューブ中に滴下した。炭酸塩が溶解し、生じてくる二酸化炭素が発泡し終わるのを 1 時間ほど待った。
- ③ チューブをクリップで閉じ、1.2N 塩酸 500ml 中に浸した。マグネットスターラーを用いて緩やかに攪拌しながら 4℃ で一晩（12 時間以上）放置し、脱灰を行った。
- ④ ビーカー中の塩酸を純水と交換した。pH を確認しつつ溶液が中性になるまで 1 時間ごとに純水を交換した。

[ゼラチン化]

- ① チューブの内容物を遠沈管に移し、3500 rpm で 15 分間遠心した。
- ② 塩酸を用いて約 pH3 に調整した試料溶液 10 ml を遠沈管に加え、ブロックバスで 90℃、12 時間加熱した。コラーゲンは熱変性し、可溶性となった。
- ③ 3500 rpm で 2 分間遠心した後ガラスフィルター（Watt man GF/F）を使用して上澄みだけを吸引ろ過し、凍結乾燥させて保存した。

2-2. コンキオリンの抽出

カキの貝殻試料については、骨試料と異なる前処理を施した。具体的な方法は以下に述べる。コンキオリン (conchiolin) とは、炭酸カルシウムなどと共に貝殻を構成するタンパク質群である。

- ① ブラシを用いて貝殻表面の汚れを取り除き、10 分程度純水中で超音波洗浄を行った。
- ② フリーザーミルを用いて貝殻を粉碎し、うち 1.5~2.0 g を過酸化水素水と反応させて土壌有機物を除去した。
- ③ 12 N の塩酸をごく微量ずつ滴下し、無機成分 (炭酸塩) を溶解した。
- ④ 二酸化炭素の発泡が終了したら内容物を乾燥させ、そのうちの一部をタンパク質 (コンキオリン) の炭素・窒素同位体分析に供した。残りの有機物はアミノ酸の窒素同位体比分析に供した。

2-3. アミノ酸の誘導体化

ガスクロマトグラフでアミノ酸ごとに分画するため、タンパク質の加水分解とアミノ酸の誘導体化を行った。具体的なアミノ酸の誘導体化方法は、Metges et al. [48] を改良した方法で行った。誘導体化とは、機器分析における感度を上昇させる、物質の安定性を高める、などの目的で行う化学処理を指し、ここでは難揮発性物質を揮発性の物質に変換する処理である。

- ① 抽出された骨コラーゲンおよび貝殻中有機物に 12 N の塩酸を加え、100°C で 12~24 時間加熱することでタンパク質の加水分解を行った。貝殻中有機物については、加水分解後に陽イオン交換カラム (AG 50W-X8 BioRad) を用いて脱塩処理を行った。詳細な方法は Takano et al. [71] を参照せよ。
- ② タンパク質を加水分解した後でアミノ酸溶液にヘキサン/ジクロロメタン (6/5, v/v) を 1 ml 加えて攪拌し、脂質を含む上層 (有機層) を捨てた。この操作を 2 回繰り返した。

- ③ 塩化チオニル/イソプロパノールを 1 ml 加えて 110°C にて 2 時間加熱し（エステル化）、冷却後窒素吹きつけで反応試薬を完全に除去した。
- ④ 塩化ピバロイル/ジクロロメタンを 1 ml 加えて 110°C にて 2 時間加熱し（ピバロイル化）、冷却後窒素吹きつけで反応試薬を再度除去した。
- ⑤ 純水 1 ml およびヘキサン/ジクロロメタン（6/5, v/v）1 ml を添加してボルテックスでよく攪拌し、分離した上層（有機層）のみを回収した。
- ⑥ 試料を窒素吹きつけで乾固した後ジクロロメタンに溶かして GC 用に濃度を調整し、窒素同位体比分析に供した。

3. アミノ酸の定量分析

GC/MS (Agilent HP 6890 ガスクロマトグラフ/HP MSD 5973N 質量分析計) を用いて、全考古学試料および現代ウマ試料から抽出したアミノ酸の相対存在量を測定した。

導入法は PTV 法を用い、50°C で 0.2 分間保持し 350°C まで 600°C /分で昇温した後、350°C で 10 分間保持した。分析カラムは J&W HP-5MS (30m 長・0.25mm 径・0.15mm 膜厚) を使用し、40°C で 4 分間保持し、90°C まで 10°C/分で昇温し、90°C から 220°C まで 5°C/分で昇温した後 220°C で 10 分間保持した。キャリアーガスの流速は、1.4 ml/分の定流速 (constant flow) モードで使用した。

4. 安定同位体比の分析

タンパク質の炭素・窒素同位体比は、EA-IRMS (元素分析計: Calro Erba NA1500—同位体比質量分析計: Finningan MAT 252) を用いて測定した。詳細な測定方法については第 1 章を参照されたい。

アミノ酸の窒素安定同位体比は GC-C-IRMS (燃焼管および還元管を経由したガスクロマトグラフィー: Agilent Technologies 6890N と同位体質量分析計: ThermoFinnigan Delta plus XP を連結した装置) を用いて測定した [46, 72]。

燃焼反応は酸化銅と酸化ニッケルおよび Pt ワイヤーの入った極微量セラミック製チューブ中で 1000°C において行った。また還元反応は還元された銅製ワイヤーの入った極微量セラミックチューブ中で 550°C において行った。GC オーブンの温度設定は次のようにした。40°C で 5 分間、次に 1 分間に 15°C の速度で 110°C まで上げ、さらに 1 分間に 3°C の速度で 150°C、1 分間に 6°C の速度で 220°C まで上昇させた。その後一定の温度で 13 分間維持した。キャリアーガス（ヘリウム）は 1.4 ml min⁻¹ の速度で GC カラムに流した。燃焼管で生じた二酸化炭素は液体窒素で捉えた。同位体測定の実験性を確かめるために、窒素同位体比が既知である 8 のアミノ酸の混合物からなる標準物質を 4 あるいは 5 サンプルごとに分析した。

III. 結果

図 12 に本研究で用いた全ての人骨試料と動物試料から抽出したアミノ酸、およびアミノ酸スタンダードのクロマトグラムを一部表示する。アミノ酸は N-ピバロイル/イソプロパノール (NP/iPr) エステルとして検出した。全試料に共通して、グリシン・プロリン・アスパラギン酸・トレオニン・グルタミン酸・リシンの 6 つの非必須アミノ酸、および必須アミノ酸であるフェニルアラニンについて明瞭なピークを確認できた。また全骨コラーゲンに共通してヒドロキシプロリンが検出された。ヒドロキシプロリンはコラーゲンに特有のアミノ酸であるため、カキの貝殻に含まれるコンキオリンの加水分解物中には存在しない。上記のアミノ酸に加えてロイシン・セリン・リシンは過半数の考古学試料にピークがみとめられたが、その他のアミノ酸 (アラニン・バリン・イソロイシン・メチオニン) は半数以下の試料についてのみピークがみられた。

考古学試料のアミノ酸組成に対する土壌からの続成作用の影響を評価するために、草食動物である北黄金貝塚出土シカ骨 (HF5) と現生のウマ骨から抽出したアミノ酸の組成を比較した (図 13)。グリシンは骨コラーゲンを構成するアミノ酸のおよそ 3 分の 1 を占めており、その相対的存在量は他のアミノ酸よりも際立って高いことが予想される [1]。しかし、両試料から検出されたグリシンの存在量はプロリンの 40%ほどであり、予想よりも低い値であった。この原因として、誘導体化処理後に分子量の小さいアラニンやグリシンなどのアミノ酸が一部揮発してしまったことが考えられる。ただし、考古シカと現生ウマの間でアミノ酸の相対存在量が非常に類似していたことから、考古学試料に対する続成作用の影響は少ないと考えられる。

また、北黄金貝塚人骨 6 個体から抽出したアミノ酸の組成を典型的な骨コラーゲンのアミノ酸組成とともに図 14 に示す。全個体に共通してグリシンの保存性が著しく低かった。ただし、現生ウマのグリシン相対存在量 (~ 0.40) と比較すると、2 号、4 号、7 号人骨は比較的近い相対存在量 (各 0.27, 0.35, 0.41) を示したため、続成作用の影響よ

りも実験過程における損失が主な原因と考えられる。一方 5 号、8 号、9 号人骨は現生ウマと比較しても低いグリシン相対存在量（各 0.09, 0.13, 0.09）を示した。グリシンは化学構造が単純なため、他のアミノ酸に比べて骨試料が土壌に埋没している間に続成作用の影響を多分に受けた可能性がある [73]。また、アラニンやバリン・ロイシン・イソロイシンなどの必須アミノ酸の保存性も低く、ほとんどピークが確認できない個体もあった。アスパラギン酸・トレオニン・セリン・グルタミン酸・フェニルアラニンの保存性は比較的良好であった。ヒドロキシプロリンとリシンに関しては、スタンダードを分析しなかったため定量分析ができなかった。

表 9・表 10 に、測定された全人骨試料および全動物試料のアミノ酸窒素同位体比、タンパク質の炭素・窒素安定同位体比、C/N 比をそれぞれ示す。人骨試料については 6~10 個のアミノ酸について、動物試料については 5~8 個のアミノ酸について窒素同位体比を測定できた。バリンとイソロイシンは 7 号人骨とカキ以外では窒素同位体比を測定できなかった。メチオニンはクロソイでのみ窒素同位体比が測定された。また、アスパラギン酸とトレオニンについてはピークが一部重複してしまい、両者の窒素同位体比を完全に識別できなかった。カキから抽出したコンキオリンについては同位体比を測定できなかった。

図 15 に測定された全試料のアミノ酸窒素同位体比を示す。アミノ酸の相対存在量と同様に、考古学試料のシカと現生ウマでアミノ酸の窒素同位体比パターンが似ていた。両者はともに生態系における一次消費者（草食動物）であるため、体組織に含まれるアミノ酸の窒素同位体比も類似したと考えられる。これはアミノ酸の窒素同位体比に対する続成作用の影響が少ないことを間接的に示している。また、全骨試料から抽出したコラーゲンの C/N 比が 2.9~3.6 の間にあることから、骨試料の保存状態が良好であることが裏付けられる（表 9, 10 参照） [8, 74]。

生物種内でのアミノ酸の窒素同位体比は、ヒトで 2.4‰~25.5‰、オットセイで 1.4‰

～25.9‰と比較的大きな幅を示したのに対し、キツネで1.3～15.0‰、シカで2.5‰～9.1‰、カキで1.0～14.5‰と比較的小さい幅を示した（図 15 参照）。また、ほとんどのアミノ酸について生物種間で大きな窒素同位体比の差がみられたが、フェニルアラニンだけは生物種間の差が極端に小さかった（1.0～5.0‰）。これはエサと消費者の間における窒素同位体比の上昇が、フェニルアラニンでは非常に小さいという先行研究の報告と整合的である [32, 33, 34]。また、ヒトとオットセイで窒素同位体比のパターンが類似していたものの、全アミノ酸の平均で約 2.5‰の差がみられた。この差はセリンの窒素同位体比に両者で大きな差があることに起因すると考えられる。

IV. 考察

本研究では、全アミノ酸のうち海洋生態系の栄養段階に対する評価式が提示されているグルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比に着目し、全考古学試料の栄養段階を式(A)により推定した（「方法の原理」を参照）。その結果、海生動物ではカキで 2.3、クロソイで 3.3、キタオットセイ 2 個体で 3.5 と 3.7 という値が得られた（表 11）。カキの 2.3 という値は、生産者（栄養段階 1）と動物プランクトンなどの一次消費者（栄養段階 2）の両方をエサとしていたことを示す。現生のカキで栄養段階 2.5 という値が得られているため（力石, 私信）、上記の推定値は妥当であると考えられる。クロソイについては現生動物試料の分析データがないが、メジナについて現生試料でおよそ栄養段階 2.9、クロダイについて 3.3 という値が得られており（力石, 私信）、クロソイの栄養段階 3.3 という値は的外れな値ではないと考えられる。キタオットセイについても現生試料の分析データはない。ただし分析に用いた 2 個体は当歳獣（生後 4 ヶ月から半年程度）および若獣（満 4 歳未満）と推定され、当歳獣は海表層付近で小型・中型魚類を捕食することが多いため上記の値（3.5）は妥当であると考えられる [75]。キタオットセイは成長に伴ってタラなどの大型魚類やイカ類を捕食するため栄養段階が高くなると推測される。若獣と推定された個体について当歳獣よりもやや高い栄養段階（3.7）を示したことから、この栄養段階推定法の信憑性が裏付けられる。以上の考察から、同手法は海生動物に関しては現生試料だけでなく考古学試料に対しても有効であると考えられる。また、各動物試料の栄養段階から当時の北黄金貝塚周辺の海洋生態系を復元した（図 16）。具体的には、以下の式を用いて当時の海の生産者のグルタミン酸およびフェニルアラニンの窒素同位体比を推定し、得られた値の平均値にグルタミン酸で 8.0‰、フェニルアラニンで 0.4‰の濃縮効果を順次足していくことで各栄養段階の窒素同位体比を復元した。

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \Delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} * (\text{TL}_{\text{animal}} - 1)$$

$\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ は各動物に含まれるグルタミン酸の窒素同位体比、 $\Delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ はグルタミン酸の濃縮効果、 $\text{TL}_{\text{animal}}$ は式(A)を用いて推定された各動物の栄養段階をそれぞれ表す。フェニルアラニンの場合も同様にして生産者の値を見積もった。

一方、推定されたシカの栄養段階 ($\text{TL}=0.9$) は、一次消費者に予想される栄養段階 ($\text{TL}=2$) と大きく異なった (表 11 参照)。これは、陸上生態系では一次生産者におけるアミノ酸の窒素同位体比に大きな変動がみられるため (補遺-11)、海洋生態系の一次生産者におけるアミノ酸の窒素同位体比をもとにつくられた栄養段階推定式(A)を、陸上生態系に属する生物に直接応用することはできないことを示す (「方法の原理」を参照)。そこで、シカの栄養段階を 2 と仮定して、海の生態系と同様の方法で当時の陸上生態系を復元すると、図 17 のようになった。グルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比の差からキツネの栄養段階を推定するとおよそ 2.8 となり、2 次消費者として妥当な値が得られた。北海道に生息する現生のキツネに関する生態研究では、げっ歯類などの小動物に加えて昆虫類、果実類もエサとすることが観察されており、理論的な 2 次消費者の栄養段階 ($=3.0$) よりも若干低い値を示したことは不合理ではないと考えられる [76, 77]。

陸上動物と同様に、陸上の食物をある程度利用していた可能性のある北黄金貝塚人の栄養段階 ($\text{TL}=3.2\sim 3.7$) も正確な値を反映しているとは言い難い (表 11 参照)。したがって、従来海洋生態系で用いられてきた栄養段階推定式(A)によって人々の食性を推定することは困難である。そこで、北黄金貝塚人が利用したと考えられる海の食料と陸の食料それぞれに含まれるアミノ酸の窒素同位体比の平均値を想定し、両者の混合モデルを構築した。具体的には、以下の連立方程式を用いて各人骨における海の食料の平均的な栄養段階 ($\text{TL}_{\text{海}}$) と、食事中に占める割合 (F および F') を推定した (詳細な計算方

法は補遺-12 を参照)。

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{HG}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{MG}} * F + \delta^{15}\text{N}_{\text{TG}} * (1-F) + 8.0 \quad (\text{B-1})$$

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{HP}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{MP}} * F' + \delta^{15}\text{N}_{\text{TP}} * (1-F') + 0.4 \quad (\text{B-2})$$

$\delta^{15}\text{N}_{\text{HG}} \cdot \delta^{15}\text{N}_{\text{MG}} \cdot \delta^{15}\text{N}_{\text{TG}}$ はそれぞれ、人骨・海の食料・陸の食料に含まれるグルタミン酸の窒素同位体比を表す。フェニルアラニンの窒素同位体比についてもグルタミン酸と同様に表記した。両アミノ酸の含有率は多くの食品で類似しているため(表 12)、海の食料と陸の食料における含有率も等しくなると仮定した ($F=F'$) [78]。ただし、未知数が 3 を超えると連立方程式が解けなくなるので違いの小さい陸上の食料資源の TL を 1 あるいは 2 と固定して $\text{TL}_{\text{海}}$ と F の値を推定した。

その結果、陸の食料をシカのみと仮定した場合、北黄金貝塚人が利用した海産物の栄養段階 ($\text{TL}_{\text{海}}$) は 2.8~3.1、陸の食料を生産者のみと仮定した場合は 3.0~3.6 となることが分かった(表 13)。一方、各人骨における海の食料の割合 (F) は陸の食料とは無関係に一定の値 (0.67~0.81: 集団の平均で $74 \pm 6\%$) を示した。個体ごとの F 推定値に伴う誤差は 5%~10%であった。また、個体ごとの $\text{TL}_{\text{海}}$ 値に注目すると、陸の食料をシカのみと仮定した場合、4 号・5 号・9 号人骨でやや高い値がみられた。このことは、同 3 個体が他の 3 個体よりも栄養段階の高い海生動物を多く摂取していたことを示唆する。一方、「陸の食料」を生産者のみと仮定した場合は、5 号人骨の $\text{TL}_{\text{海}}$ 値が際立って高かった。

Chikaraishi et al. [34] では、フェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ の濃縮効果を約 $0 \pm 1.2\text{‰}$ としている。もし食物連鎖の過程でフェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ 値が全く上昇しないとすると、海洋生態系と陸上生態系およびヒトのフェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ 値を比較することで海産物の寄与を評価できるはずである。そこで、考古学試料に含まれるフェニルアラニン

の $\delta^{15}\text{N}$ 値のみに着目し（図 18）、北黄金貝塚人の海産物摂取量を個体ごとに推定した。その結果、グルタミン酸とフェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ 値に基づく混合モデルによる推定値よりやや低い推定値（57~71%: $66 \pm 6\%$ ）が得られた（図 19）。しかし、図 16・図 17 をみて分かるように、栄養段階の高い生物ほどフェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ 値が高い。さらに、野生状態における様々な捕食者―被食者の関係を扱った近年の研究では、フェニルアラニンの濃縮率が $0.4 \pm 0.4\%$ と見積もられている（力石, 私信）。すなわち食物連鎖の過程でフェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ 値もわずかだが上昇すると考えられ、 0.4% の濃縮を仮定した式（B-1）、（B-2）による混合モデルの方が妥当な海産物摂取量の推定を行えると考えられる。

推定された海の食料の割合（F）から、本研究で分析した北黄金貝塚人 6 個体の海産物摂取量は基本的に類似しており、タンパク質源として 7~8 割を海産物に依存していたと考えられる。ただし女性で $69 \pm 4\%$ 、男性で $79 \pm 2\%$ と男女間で海産物摂取量に差がみられた。分析個体数が男女ともに 3 個体しかいないため統計的な取り扱いには注意を要するが、今後分析個体数を増やすことで食習慣の性差について議論できると考えられる。

過去の研究で用いられてきた手法、すなわち人骨コラーゲンの炭素あるいは窒素同位体比、および ^{14}C 年代から推定される海産物摂取量と、アミノ酸の窒素同位体比による推定結果を以下比較する。背景で述べたように、先史人の食性復元において広く用いられる食物―骨コラーゲン間の同位体濃縮効果（ $\Delta^{13}\text{C}$: 4.5% , $\Delta^{15}\text{N}$: 3.4% ）を北黄金貝塚人に適用すると、人骨コラーゲンの同位体比が利用食物の同位体比の平均値で囲まれるスペースから外れるため、炭素・窒素 2 同位体比による海産物摂取量の推定が不可能である。

コラーゲンの炭素同位体比のみから北黄金貝塚人の海産物摂取量を推定すると、海生哺乳類と C_3 植物をエンドメンバーとして選んだ場合は集団の平均値で約 75%、海生哺乳類と陸上草食動物をエンドメンバーとして選んだ場合は約 78% という推定値が得ら

れている [8]。この推定値はアミノ酸の窒素同位体比から推定した結果とよく一致する。しかし、1つの同位体比だけでは2つのタンパク質源の相対的な利用割合しか計算できない [23]。海生動物における炭素同位体比の変動は無視できるほど小さくなく、どの食物を最も重要なタンパク質源として選ぶかは、遺跡からの動物骨の出土量などといった同位体比とは別の証拠が必要である。

一方、コラーゲンの窒素同位体比のみからヒトの海産物摂取量を推定したところ、海生哺乳類と C_3 植物の組み合わせでは約 99%、海生哺乳類と陸上草食動物の組み合わせでは 98% となり、アミノ酸の窒素同位体比による推定と大きく異なる結果となった。この要因として、海産物に含まれるタンパク質の窒素同位体比に大きな変動があることが考えられる。海洋生態系においては食物連鎖が陸上生態系よりも一般に複雑なため、窒素同位体比にみられる変動も大きくなる [14, 15, 79, 80]。さらに、この変動の大きさは炭素同位体比にみられる変動よりも大きい場合が多い。したがって、どの動物をエンドメンバーとして選ぶかによって海産物摂取量の推定値が大きく変わりうる。炭素同位体比と同様に、3つ以上の食物源の利用を想定できない点で、この手法には大きな不確実性が伴う。以上の考察を踏まえると、1つの同位体比による海産物摂取量の推定は、一般に多くの食物源を利用するヒトに対しては有効ではないと考えられる。このことは北黄金貝塚人に対しても同様である。

Phillips et al. [44] では、元素濃度の大きく異なる 3 種類までの食物の利用割合を求める場合に、濃度加重混合モデル (CWMM) の利用を推奨している。陸の食料 (陸上植物およびシカ) と海獣類を北黄金貝塚人の主要な食料と仮定してこのモデルを応用すると、集団の平均で海獣類が 86%、陸の食料が合計で 14% となった。ただし、このモデルも食物を 3 つ以内に絞る必要があり、それ以外の食物 (ここでは貝類や魚類などを指す) の寄与を計算に反映できないという問題を克服していない。この点、アミノ酸の窒素同位体比分析は海産物全体の利用割合を計算に反映できるため、コラーゲンタンパク

の同位体比分析よりも実際に近い推定が可能である。また、タンパク質の同位体分析では食物―骨コラーゲン間の同位体濃縮効果にみられる変動が問題であったが、アミノ酸の窒素同位体比分析は比較的同位体効果の変動が小さいアミノ酸（e.g. グルタミン酸： $8.0 \pm 1.1\%$, フェニルアラニン： $0.4 \pm 0.4\%$ ）のみを利用して海産物摂取量を推定できる [32, 33, 34]。

一方、南川 [25] の中で提唱されている食物―骨コラーゲン間の同位体濃縮効果（ $\Delta^{13}\text{C}$: 2.5‰, $\Delta^{15}\text{N}$: 5.1‰）を北黄金貝塚人に適用すると、利用食物の同位体比の平均値で囲まれるスペースに人骨コラーゲンの同位体比が入るため、食性推定モデルによる海産物摂取量の評価が可能となる。そこで、この濃縮効果が正しいと仮定して掃き出し法（IsoSource）による海産物摂取量の推定を試みると、79%～96%という推定値が得られた（表 14）。個体ごとの海産物摂取量をみると 8%の推定幅を有しているが、IsoSource では食物の同位体比に伴う変動を推定結果に反映できないため、実際には表にみられる幅よりも大きな不確定性を伴うと考えられる。また、CWLP 法を用いて海産物摂取量を試算すると 75%～94%という推定値が得られた（表 14 参照）。全ての人骨について IsoSource よりも低い推定値を示したが、推定幅は同程度であった。しかし、この手法も IsoSource と同様に食物同位体比の変動に由来する不確定性を伴う。さらに、これらの手法に共通して問題となるのがヒトにおける食物―骨コラーゲン間の同位体濃縮効果（ $\Delta^{13}\text{C}$: 2.5‰, $\Delta^{15}\text{N}$: 5.1‰）が正確に見積もられていない点である。

人骨と動物骨の ^{14}C 年代を利用した、ヒト集団全体の平均的な海産物摂取量の推定値（約 79%）は、本研究による推定値（約 $74 \pm 6\%$ ）とよく一致する（図 20） [8]。 ^{14}C による海産物摂取量の推定では、食物の炭素・窒素同位体比にみられるような変動を考慮する必要がない。しかし、北黄金貝塚のように地層の ^{14}C 年代にある程度の幅がある場合は、個体ごとに ^{14}C から海産物摂取量を評価することは困難である。つまり集団全体の平均値として海産物摂取量を評価するしかない。この点、アミノ酸の窒素同位体比

析は個体ごとに海産物摂取量の評価が可能のため、 ^{14}C 分析よりも有効であるといえる。

本研究で考案したグルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比による混合モデルでは、海の食料の具体的な内容について推定するのは難しい。海の食料の栄養段階 ($\text{TL}_{\text{海}}$) がその内容に関する唯一の情報であるが、この値は海の食料を構成する海生動物がもつ平均的な栄養段階を指し示すものである。本研究では陸の食料を生産者、もしくはシカと仮定したとき、それぞれの場合における $\text{TL}_{\text{海}}$ の値を推定した（各々集団の平均値で 3.3、2.9）。またオットセイでは当歳獣で 3.5、若獣で 3.7 という値が示された。先述したように、骨コラーゲンの同位体比では魚類よりもオットセイが重要なタンパク質源であったと考えられる。そこで各人骨コラーゲンの窒素同位体比と $\text{TL}_{\text{海}}$ 値について相関関係を調べたが、陸の食料が生産者、シカどちらの場合であっても両者に有意な相関はみられなかった（図 21）。よって、コラーゲンの窒素同位体比と $\text{TL}_{\text{海}}$ 値の相関では、陸の食料における植物とシカの重要性を判断できない。しかし、鵜澤 [57] ではオットセイの遺存体に当歳獣が高い割合で含まれることが指摘されている。陸の食料を生産者（植物）とした場合の $\text{TL}_{\text{海}}$ (=3.3) の方が本研究で分析したオットセイ当歳獣の栄養段階 (=3.5) に近く、人骨コラーゲンの高い窒素同位体比と整合的である。陸の食料をシカのみと仮定した場合の栄養段階 (~2.9) は、マグロなどの大型魚類を除く中型魚類の $\text{TL}_{\text{海}}$ (~3) に近い値であった。もっとも、海の食料の内容が中型魚類中心であったのか、あるいは中型魚類よりも栄養段階の高い海生動物（例：オットセイやマグロ）と中型魚類よりも栄養段階の低い海生動物（例：貝類）を組み合わせで利用していたのかは、 $\text{TL}_{\text{海}}$ 値のみからは判別できない。遺跡からの出土量で判断すれば、魚骨よりも海獣類やカキなどの貝類の方が多いため、後者の推定の方が妥当であると考えられる [55]。ただし、魚骨は比較的小さく遺跡に残りにくいため、出土量にバイアスがかかっている可能性は否定できない。さらに、海の食料の栄養段階が集団の平均で 2.9 であるとする、人骨コラーゲンの高い窒素同位体比を説明できない。以上の考察から、海の

食料およびオットセイの栄養段階 (TL_海) と人骨コラーゲンの同位体比の双方と整合的な生産者 (植物) が、シカよりも陸上のタンパク質源として重要であった可能性が考えられる。

植物は遺跡に残りにくいため、陸の食料のタンパク質源としてシカと植物のどちらがより重要であったのかを直接判断することはできない。陸の食料についても海の食料と同様に栄養段階 (TL_陸) を推定できれば、陸の食料と海の食料両方の栄養段階を推定できる可能性がある。しかし、この推定を行うにはグルタミン酸とフェニルアラニン以外の第3のアミノ酸を用いて式 (B-1)、(B-2) 以外にもう1つ式を立てなければならない。今回アミノ酸とグルタミン酸から見積もられた栄養段階 (TL) に基づき海の生態系における同位体濃縮効果を評価したところ、この2アミノ酸以外に栄養段階の推定に利用できそうなアミノ酸としては、アラニンが有望な候補であった (図 22)。アラニンはこれまでの研究により、エサと消費者間の濃縮効果が $6.2 \pm 1.9\%$ と見積もられている (補遺-13) [35]。本研究で分析した海生動物の栄養段階から評価される濃縮効果は約 6.8‰ であり、上記の値と整合的である。他のアミノ酸については先行研究の評価と大きく異なる値を示した。しかし、分析個体数が少ないこともあってどのアミノ酸についても栄養段階と窒素同位体比に有意な相関はみられなかった。今後分析個体数を増やすことで、栄養段階推定における各アミノ酸の有効性を評価できると考えられる。他にはフェニルアラニンと同様に窒素同位体比の濃縮が小さいメチオニンが挙げられる [32, 33, 34]。しかし、骨コラーゲンに含まれるメチオニンはごく微量 (約 0.5%) であるため、窒素同位体比を検出できるほど考古学試料に残存していない可能性が高い [1]。本研究においてもクロソイ以外の考古学試料については窒素同位体比を測定できなかった (表 9, 表 10 参照)。アミノ酸の炭素同位体比を測定できれば、2つのアミノ酸でも式が4つ導けるため、上記の問題を解決できるかもしれない。

TL_海 の値は特定の海産物を指し示すことはできないが、海の食料の性質を表す1つの

指標にはなり得る。例えば、2号人骨と4号人骨の海産物摂取量はほぼ等しいが（各々68%, 67%） $TL_{海}$ の値は両者で異なっており（各々2.8~3.3, 3.1~3.6）、4号人骨の方が栄養段階の高い海生動物を多く摂取していた可能性がある。

以上の考察から、アミノ酸の窒素同位体比分析は陸の食料の栄養段階を推定できない点、それぞれの海生動物の利用割合を推定できない点で未完成ではあるが、以下の3点において有効な手法であると考えられる。①人骨の海産物摂取量を個体ごとに推定できる、②タンパク質の同位体分析で問題となる食物—コラーゲン間の同位体濃縮効果を考慮する必要がない、③一定の幅をもった海の食料の栄養段階を推定できる。

V. 小結

アミノ酸の窒素同位体比分析を考古学試料に応用することで、人骨個体ごとの海産物摂取量の評価に成功した。このことは人骨に対する ^{14}C 年代の補正に大きく寄与すると考えられる。また、この手法はタンパク質の同位体分析で問題となる食物—コラーゲン間の同位体濃縮効果を考慮する必要がない点、ごく微量のアミノ酸に対しても分析可能な点で、人骨などの貴重な考古学試料に対する食性復元方法として画期的である。

また、海の食料の栄養段階 ($\text{TL}_{\text{海}}$) は海獣類などを対象とした狩猟、あるいは貝類などの採集のどちらがより重要であったのかを解明する重要な指標となる。 $\text{TL}_{\text{海}}$ の推定をより正確にするためには、陸の食料の栄養段階 ($\text{TL}_{\text{陸}}$) についても推定する方法を確立せねばならない。今後アミノ酸の炭素同位体分析、あるいはグルタミン酸とフェニルアラニン以外のアミノ酸の利用によって $\text{TL}_{\text{陸}}$ の推定が可能になると期待される。堅果類やコメなどの植物と、シカやイノシシなどの陸上動物の重要性を判別できれば、先史日本人の食生態の変遷についてより深い洞察が可能になると考えられる。

グルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比を利用した栄養段階推定法はまだ応用され始めたばかりであり、その理論的基盤となるデータはいくつかの野外研究と実験室における培養実験のデータに限られている [32, 33, 34, 35]。今後多くの生態系を対象とした研究もしくは実験的研究により生物の栄養段階とアミノ酸の窒素同位体比に関するデータが蓄積すれば、考古学試料に対する食性復元法としての応用もさらなる飛躍をみせるだろう。

総括

第1部では現代人を対象に食性推定モデルの妥当性評価、および人類生態研究への応用を、第2部では北黄金貝塚人を題材にアミノ酸の窒素同位体比による海産物摂取量評価を検討した。

本研究で新たに考案したモデル（CWLP法）はこれまでに提唱された各種のモデルよりやや高い推定精度を示したものの、摂取頻度調査より高精度とはいえなかった。今後さらなるモデルの改善を図ることで、人類生態研究への積極的応用が可能になるだろう。

アミノ酸の窒素同位体分析は人骨個体ごとの海産物摂取量を評価するという課題を克服した点で、人骨の ^{14}C 年代補正に大きく寄与する手法といえる。海の食料の栄養段階に加えて陸の食料の栄養段階を推定する手法が確立できれば、先史人の食習慣を客観的に評価する強力な解析ツールとなるだろう。

また、アミノ酸の窒素同位体比による栄養段階推定法は水環境における生物以外では有効性が未検討である。よって食性推定モデルの有効性評価と同様に、ヒトに対する有効性を検証するために定量的な食事内容の記録がある現代人を対象とした検討を行う必要がある。この検討に関しては、イモ類などの陸上の食物と漁撈によって得られた魚介類を主食とした伝統的な食生活を営むパプアニューギニア低地の人々が格好の調査対象になると考えられる。

謝辞

本研究における機器分析は、国立環境研究所（NIES）ならびに海洋研究開発機構（JAMSTEC）にてなされた。

現代人類集団の頭髮試料および食物試料は、ENVRERA プロジェクトメンバーの方々からご提供頂いた。インドネシア試料は渡辺知保教授（東京大）、関山牧子博士（東京大）より、バングラディシュ試料は稲岡司教授（佐賀大）、ベトナム試料は清水華博士（東京大）、ネパール試料は小西祥子博士（東京大）より提供して頂いた。稲岡司教授（佐賀大）、梅崎昌裕准教授（東京大）、須田一弘教授（北海学園大）、田所聖志博士（首都大）、夏原和美准教授（福岡県立大）、古澤拓郎博士（東京大）にはパプアニューギニアにおける現地調査に際し、様々なご指導を賜った。また、パプアニューギニア国立医学研究所（IMR）の方々には、試料の保管や実験設備の使用に際しお世話になった。

百々幸雄教授（北海道文教大）・石田肇教授（琉球大）には北黄金貝塚の人骨試料を、大島直行博士・青野友哉氏（伊達噴火湾文化研究所）には同貝塚の動物骨試料をご提供頂いた。また、覚張隆史氏（東京大）には現生ウマの骨試料を提供して頂いた。動物試料の種同定に際し、鵜澤和宏准教授（東亜大学）、江田真毅博士（鳥取大）、三谷智広氏（洞爺湖町教育委員会）からご協力を得た。大河内直彦博士、小川奈々子博士、柏山祐一郎博士、高野淑識博士、力石嘉人博士（海洋研究開発機構・IFREE4）には、アミノ酸の窒素同位体比分析に関して多くのご指導を賜った。NIES の向井人史博士にはEA-IRMS の測定においてお世話になった。また、Noah V. Honch 氏（University of Oxford）には考古学試料の前処理においてご協力頂いた。

指導教官である米田穰准教授（東京大）には、論文執筆にあたり懇切なご指導を賜った。また、人類進化システム分野（東京大・新領域）の方々には、実験その他多くの場面でお世話になった。以上の方々に謹んで感謝の意を記したい。

引用文献

1. Ambrose SH. In *Investigations of Ancient Human Tissue-Chemical Analyses in Anthropology*. 1993; 59-130.
2. van der Merwe NJ. *American Scientist*. 1982; **70**: 596-606.
3. van der Merwe NJ, Vogel JC. *Nature*. 1978; **276**: 815-816.
4. Deniro MJ. *American Scientist*. 1987; **75**: 182-191.
5. Fogel ML. *Org. Geochem*. 1997; **27**: 275-287.
6. Sealy JC. In *Handbook of Archaeological Science*. Brothwell DR, Pollard AM (eds). John Wiley & Sons: Chichester, 2001; 269-279.
7. Vogel JC, van der Merwe NJ. *American Antiquity*. 1977; **42**: 238-242.
8. Yoneda M, Morita M. *J. Archaeol. Sci.* 2002; **29**: 529-536.
9. Chisholm BS, Swarcz HP. *Science*. 1982; **216**: 1131-1132.
10. Arneborg J. *Radiocarbon*. 1999; **41**: 157-168.
11. Chisholm BS, Swarcz HP. *Current Anthropology*. 1983; **24**: 396-398.
12. Tauber H. *Nature*. 1981; **292**: 332-333.
13. Stuiver M, Brasiunas TF. *Radiocarbon*. 1986; **28**: 980-1021.
14. Minagawa M, Wada E. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1984; **48**: 1135.
15. Schoeninger MJ. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1984; **48**: 625-639.
16. Deniro MJ, Epstein S. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1981; **45**: 341.
17. 米田穰. *Anthropological science (Japanese Series)*. 2006; **114**: 5-15.
18. Van Klinken GJ, Hedges REM. *Geophysical Research Letters*. 1994; **21**: 445-448.
19. Deniro MJ, Epstein S. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1978; **42**: 495-506.
20. Vogel JC. *Oecologia Plantarum* 1978; **13**: 89-94.
21. Lee-Thorp JA. *J. Archaeol. Sci.* 1989; **16**: 585-599.

22. Robbins CT. *Oecologia*. 2002; **133**: 10-13.
23. Schwarcz HP. *J. Archaeol. Sci.* 1991; **18**: 261-275.
24. Phillips DL. *Oecologia*. 2001; **127**: 166-170.
25. 南川雅男. 炭素・窒素同位体分析により復元した先史日本人の食生態. 2001.
国立歴史民族博物館研究報告, **86**: 333-357.
26. Minagawa M. *Applied Geochemistry*. 1992; **7**: 145-158.
27. Minagawa M, Akazawa T. In *Pacific Northwest Asia in Prehistory: Recent Research into the Emergence of Hunter-Fisher-Gatherers, Farmers, and Sociopolitical Elites*, Aikens CM, Rhee SN (eds). University Washington Press: Pullman, 1991; 59-67.
28. Little JDC, Little EA. *J. Archaeol. Sci.* 1997; **24**: 741-747.
29. Phillips DL. *Oecologia*. 2003; **136**: 261-269.
30. 山口昌美. *アルカ研究論集*. 2004; **2**: 45-56.
31. Koch PL, Phillips DL. *Oecologia*. 2002; **133**: 14-18.
32. McClelland JW, Montoya JP. *Ecology*. 2002; **83**: 2173-2180.
33. McClelland JW, Holl CM, Montoya JP. *Deep Sea Res. Part I* 2003; **50**: 849-861.
34. Chikaraishi Y, Ohkouchi N. *Marine Ecology Progress Series*. 2007; **342**: 85-90.
35. 力石嘉人, 柏山祐一郎, 小川奈々子, 大河内直彦. 生態学指標としての安定同位体 : アミノ酸の窒素同位体比分析による新展開. *RADIOISOTOPES*. 2007; **56**: 35-49.
36. O'Leary MH. *Phytochemistry*. 1981; **20**: 553-567.
37. Heaton THE, Collett G. *Nature*. 1986; **322**: 822-824.
38. Heaton THE. *Oecologia*. 1987; **74**: 236-246.
39. Sealy JC, Lanham JL. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1987; **51**: 2707-2717.
40. Grocke DR, Mariotti A. *Earth and Planetary Science Letters*. 1997; **153**: 279-285.
41. Schwarcz JC, Fairgrieve SI. *J. Archaeol. Sci.* 1999; **26**: 629-636.

42. Chisholm BS. *Reconstruction of prehistoric diet in British Columbia using stable carbon isotopic analysis*. 1986. Doctor thesis of Simon Fraser Univ.
43. Brian F. In *Stable Isotope Ecology*. 2006. Springer. pp119-182.
44. Phillips DL. *Oecologia*. 2002; **130**: 114-125.
45. Newsome SD, Phillips DL, Koch PL. *J. Archaeol. Sci.* 2004; **31**: 1101-1115.
46. Hays JM, Hoham CH. *Org. Geochem.* 1990; **16**: 115-1128.
47. Merritt DA, Hayes JM. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1994; **5**: 387-397.
48. Metges CC, Young VR. *J. Mass. Spectrom.* 1996; **31**: 367-376.
49. Metges CC, Young VR. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; **70**: 1046-1058.
50. Fogel ML, Tuross N. *Oecologia*. 1999; **120**: 336-346.
51. Metges CC, Daenzer M. *Anal. Biochem.* 2000; **278**: 156-164.
52. LT Corr, RP Evershed. *J. Archaeol. Sci.* 2005; **32**: 321-330.
53. Macko SA. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1986; **50**: 2143-2146.
54. Hare PE, Hoering TC. *J. Archaeol. Sci.* 1991; **18**: 277-292.
55. Uzawa K. *Historical change in faunal resource usage from the Jomon period to the Ainu cultural period in Usu area of Volcano bay, Hokkaido: a taphonomic research*.
Ph. D. Thesis, University of Tokyo: Tokyo, 1998 (in Japanese).
56. Nishimoto T. In *Bulletin of Research at the National Museum of Japanese History*.
1985; **6**: 53-74 (in Japanese).
57. Uzawa K. *Journal of Archeological Society of Nippon*. 1998b; **83**: 174-239 (in Japanese with English summary).
58. Gibson RS. *Principles of nutritional assessment*. 2005. New York: Oxford University Press.
59. アジア地域における経済発展による環境負荷評価およびその低減を実現する政策研究. 2008. 東京大学大学院医学系研究科人類生態学教室編.

60. TC. O'Connell, REM. Hedges. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1999; **108**: 409-425.
61. J. Yoshinaga, A. Tomoya. *Ecol. Food Nutr.* 1991; **26**: 17-25.
62. Yoshinaga J, Tomoya A. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1996; **100**: 23-34.
63. Phillips DL, JW Gregg. *Oecologia.* 2005; **144**: 520-527.
64. Phillips DL. *Oecologia.* 2001; **127**: 171-179.
65. 峰山巖. 北黄金貝塚 (北海道伊達市北黄金貝塚における詳細分布調査の概要報告) .
1986. 北海道伊達市教育委員会編. pp1-3.
66. Giesemann A, Brand WA. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 2816-2819.
67. Macko SA, Hedges REM. *Transaction of the Royal Society of London Series B-Biological Science.* 1999; **354**: 65-75.
68. Richards MP, Hedges REM. *Palaeogeogr. Palaeoecol.* 2003; **193**: 261-267.
69. Keally CT, Mutou Y. In *Research of Jomon Culture I*. Yuzankaku: Tokyo, 1982; 246-275 (in Japanese).
70. Longin R. *Nature.* 1971; **230**: 241-242.
71. Takano Y, Ohkouchi N. *Anal. Chem.* 2009; **?**: ?-?.
72. Brand WA, Hilkert A. *Org. Geochem.* 1994; **21**: 585-594.
73. Tuross N, Fogel ML, Hare PE. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1988; **52**: 929-935.
74. Deniro MJ. *Nature.* 1985; **317**: 806-809.
75. 和田一雄, 伊藤徹魯. 鰭脚類. 1999. 東京大学出版会. pp92-100.
76. 高槻成紀, 塚田英靖, 辻大和, 小池伸介. 哺乳類学. 2008; **48**(1): 189-197.
77. 今泉吉典. 日本の動物. 1987. 平凡社.
78. 改訂日本食品アミノ酸組成表. 1986. 科学技術庁資源調査会編.
79. Schoeninger MJ. *J. Hum. Evol.* 1985; **14**: 515-525.
80. Bocherens H, Drucker D. *International Journal of Osteoarchaeology.* 2003; **13**: 46-53.

81. Nardoto GB, Martinelli LA. *Sci Agric*. 2006; **63**(6): 579-582.

图表

表 1. 頭髪の同位体分析を行った被験者数（地域別）

Country	Region	No. of individuals analyzed
Papua New Guinea	Kotiufa	10
	Massy	9
	Sameriga & Sapsap	10
Indonesia	Taruma Jaya	40
	Pasir Pogor	11
	Sekeloa	11
Bangladesh	Telikanda	2
	Chandali	2
	Sonarkandi	2
Vietnum	PhanLam	7
	CuEbur	7
Nepal	Pokhara	2
	Chitwan	2
	Kokhana	3

表 2. 食物試料のリスト。学名について不明なものは「？」マークを付した。

Country	Common name	Local name	Scientific name	Element	Place
Papua New Guinea	sweet potato	kaukau	<i>Ipomea batatas?</i>	tuber	Goroka
	sweet potato	kaukau	<i>Ipomea batatas?</i>	tuber	Madang
	tapioca		<i>Manihot esculenta</i>	tuber	Goroka
	taro	taro	<i>Colocasia esculenta?</i>	tuber	Goroka
	yam	jam (yam)	<i>Discorea alata</i>	tuber	Madang
	banana		<i>Musa</i> sp.	flesh	Madang
	plantain		<i>Musa</i> sp.	flesh	Goroka
	pumpkin		<i>Cucurbita</i> sp.	edible part	Goroka
	corn		<i>Zea mays</i>	seed	Goroka
	wild grass	apa	?	leaf	Goroka
	kapiyak		?	leaf	Goroka
	pig		<i>Sus scrofa</i>	body hair	Goroka
	goat		?	body hair	Goroka
	chicken	kakaruk	<i>Gallus gallus</i>	feather	Goroka
	duck		<i>Dendrocygna guttata?</i>	feather	Goroka
	flesh water fish		?	mascle	Madang
	marine fish?	marine	?	mascle	Madang
	yellowfin tuna	tuna	<i>Thunnus albacares</i>	mascle	Madang
	biscuit		-	whole	Madang
Indonesia	rice	nasi	<i>Oryza sativa</i>	seed	
	rice	nasi putih	<i>Oryza sativa</i>	seed	Bongas
	tempe	tempe	-	whole	
	legume	kacarg merah	?	seed	
	potato	kantang	<i>Solanum tuberosum</i>	tuber	
	boiled egg	telar ayam kampu	<i>Gallus gallus</i>	whole	
	boiled egg		<i>Gallus gallus</i>	whole	Bongas
	chicken	doging ayam	<i>Gallus gallus</i>	mascle	
	meat ball	baso	-	whole	Bongas
	flesh water fish	nile	?	mascle	
	flesh water fish	ikan mas	?	mascle	
	sardine	ikan asin	?	whole	
	anchovy	? (salty fish)	<i>Stolephorus indicus</i>	whole	Bongas
	sweets	roti	-	whole	
	sweets	kue bol	-	whole	
	sweets	kue tambang	-	whole	
Bangladesh	rice		<i>Oryza sativa</i>	seed	Telikanda
	rice		<i>Oryza sativa</i>	seed	Chandali
	legume	sim	?	seed	Telikanda
	potato		<i>Solanum tuberosum</i>	tuber	Chandali
	onion		<i>Allium cepa</i>	bulb	
	cucurbit		?	flesh	
	perira		<i>Perilla frutescens</i>	leaf	
	flesh water fish		?	mascle	Chandali
	flesh water fish	koi	?	mascle	Chandali
	boiled egg		<i>Gallus gallus</i>	whole	

表 3. 全食物試料の炭素・窒素安定同位体比

Country	Common name	Local name	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Wt (%) [C]	Wt (%) [N]	C/N
Papua New Guinea	sweet potato	kaukau	-25.4	5.2	30.8	0.4	77.0
	sweet potato	kaukau	-29.2	2.8	50.0	0.6	83.3
	tapioca		-24.5	5.6	30.2	0.3	91.6
	taro		-26.4	5.1	30.2	1.1	27.5
	yam	jam (yam)	-27.5	-0.2	47.8	1.2	39.8
	banana		-26.9	1.7	48.4	0.5	96.8
	plantain		-22.5	6.2	14.6	0.6	30.8
	pumpkin		-24.9	2.2	29.2	1.1	26.5
	corn		-10.9	2.9	36.2	2.1	17.2
	wild grass	apa	-25.4	0.2	41.0	3.0	13.7
	kapiyak		-26.0	7.2	26.0	2.7	11.6
	pig		-22.8	7.7	54.1	18.4	2.9
	goat		-22.7	5.1	55.5	16.6	3.3
	chicken	kakaruk	-23.0	8.8	55.9	16.3	3.4
	duck		-23.1	8.7	56.8	17.3	3.3
	flesh water fish		-28.1	7.7	26.6	8.2	3.9
	marine fish?	marine	-16.2	14.6	53.5	16.5	3.2
	yellowfin tuna	tuna	-16.4	10.8	53.6	16.0	3.4
	biscuit		-22.9	4.0	51.4	2.2	23.4
Indonesia	rice	nasi	-28.4	2.6	41.4	1.3	30.9
	rice	nasi putih	-27.3	4.6	41.6	1.4	35.2
	tempe	tempe	-25.8	2.7	44.3	10.1	4.4
	legume	kacang merah	-27.7	3.7	42.0	3.5	11.9
	potato	kentang	-25.1	4.6	41.3	3.3	12.5
	boiled egg	telur ayam kampung	-24.1	8.2	46.5	13.6	3.4
	boiled egg		-22.5	4.7	45.4	12.3	4.4
	chicken	doging ayam	-16.9	3.8	40.4	13.5	3.0
	meat ball	baso	-24.1	4.5	40.3	1.9	25.4
	flesh water fish	nila	-25.6	10.9	42.2	13.8	3.0
	flesh water fish	ikan mas	-24.2	6.6	41.8	14.2	2.9
	salty fish	ikan asin	-30.1	6.6	28.9	8.9	3.9
	sardine		-18.5	8.5	42.4	12.5	3.4
	sweets	roti	-18.3	1.9	50.4	1.4	35.5
	sweets	kue bol	-23.9	1.8	51.6	2.3	22.4
	sweets	kue tambang	-20.7	4.8	43.8	2.3	19.4
Bangladesh	rice		-28.9	0.0	40.9	1.1	39.0
	rice		-29.4	0.8	41.6	1.1	38.9
	legume	sim	-26.1	6.9	41.3	1.6	25.7
	potato		-28.6	-0.3	40.0	1.6	24.7
	onion		-27.9	-1.8	40.9	1.4	29.0
	cucurbit		-25.4	2.7	39.1	1.5	26.9
	perira		-15.0	-0.7	22.6	2.4	9.5
	flesh water fish	koi	-26.4	7.7	32.7	10.5	3.1
	flesh water fish		-30.6	8.6	44.3	14.3	3.1
	boiled egg		-27.4	1.9	39.0	2.4	16.4

表 4. 全頭髪試料の炭素・窒素安定同位体比

Country	Research ID	Age	Sex	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Papua New Guinea	PK001	25	M	-22.2	9.1
	PK007	26	F	-23.2	8.4
	PK008	30	M	-22.3	7.8
	PK013	34	F	-21.3	8.6
	PK024	32	F	-23.5	8.6
	PK063	30	F	-22.3	8.9
	PK072	26	M	-22.4	8.1
	PK166	30	M	-22.6	8.1
	PK182	31	F	-21.8	8.5
	PK208	34	M	-21.2	8.6
	PM226	25	M	-21.4	9.3
	PM235	22	M	-21.5	9.2
	PM240	34	F	-22.0	10.5
	PM243	32	F	-21.3	9.2
	PM259	20	M	-23.3	7.6
	PM292	33	F	-22.9	9.9
	PM326	35	M	-20.7	10.1
	PM340	36	M	-21.5	7.7
	PM379	36	F	-22.0	8.6
	PS427	24	M	-22.0	8.6
	PS441	33	F	-22.0	8.6
	PS447	23	F	-23.1	8.9
	PS471	32	M	-21.5	7.4
	PS485	29	F	-21.9	7.8
	PS520	38	M	-21.5	9.4
	PS543	24	F	-22.0	7.1
	PS591	21	M	-21.6	8.8
	PS621	26	F	-21.4	8.8
	PS643	34	F	-22.1	7.5
	Average			-22.0	8.6
	1σ			0.7	0.8
Indonesia	IT005	12	F	-22.2	7.6
	IT006	35	F	-21.5	8.1

Indonesia	IT007	40	M	-21.7	8.9
	IT008	9	M	-21.8	8.1
	IT009	11	F	-21.7	7.8
	IT010	33	F	-21.1	7.6
	IT011	34	M	-22.1	8.7
	IT012	9	M	-21.0	8.1
	IT021	12	F	-21.0	8.7
	IT022	45	F	-21.0	8.5
	IT023	49	M	-20.7	8.7
	IT024	6	M	-20.5	8.7
	IT025	12	F	-21.4	N.D.
	IT026	27	F	-20.2	8.7
	IT027	37	M	-20.2	8.9
	IT028	6	M	-20.2	8.4
	IT037	10	F	-20.2	7.8
	IT038	27	F	-20.5	8.2
	IT039	34	M	-20.7	7.4
	IT040	6	M	-20.2	8.1
	IT049	11	F	-20.8	8.5
	IT050	32	M	-21.2	8.3
	IT051	40	M	-21.1	8.8
	IT052	6	M	-20.4	8.3
	IT065	11	F	-21.3	7.7
	IT066	31	F	-21.6	8.0
	IT067	34	M	-21.8	8.4
	IT068	8	F	-21.9	7.9
	IT089	11	F	-21.3	8.1
	IT090	28	F	-21.4	8.5
	IT091	30	M	-21.7	8.4
	IT092	9	M	-22.0	8.1
	IT097	11	F	-20.6	7.9
	IT098	30	F	-21.5	8.7
	IT099	43	M	-21.4	8.0
	IT100	13	F	-20.9	7.6
	IT105	11	M	-20.6	8.1
	IT106	33	F	-20.3	8.2

	IT107	39	M	-20.5	8.6
	IT108	5	F	-19.5	8.5
	IP006	35	F	-23.9	7.9
	IP015	40	M	-21.9	9.4
	IP022	28	F	-22.3	9.3
	IP071	40	M	-19.4	8.9
	IP082	40	F	-22.7	9.0
	IP103	37	M	-19.8	9.0
	IP106	37	F	-22.8	9.5
	IP134	31	F	-22.9	8.4
	IP147	20	M	-22.1	9.4
	IP166	32	F	-22.1	8.1
	IP183	36	M	-21.5	9.2
	IS002	31	F	-21.4	8.3
	IS006	37	F	-21.8	8.5
	IS019	33	M	-20.7	8.6
	IS039	37	M	-21.8	8.1
	IS073	35	M	-21.4	8.4
	IS084	32	F	-20.3	8.4
	IS108	37	F	-20.4	8.5
	IS120	36	M	-20.5	8.9
	IS127	34	F	-20.8	8.4
	IS149	37	F	-22.0	8.9
	IS162	23	M	-21.0	8.8
	Average			-21.2	8.4
	1σ			0.9	0.5
Bangladesh	BC005	35	F	-25.2	6.6
	BC151	25	M	-23.7	7.2
	BS001	30	F	-24.7	7.4
	BS026	28	M	-23.4	7.1
	BT042	35	F	-25.6	6.2
	BT062	22	M	-24.1	8.0
	Average			-24.5	7.1
	1σ			0.9	0.6

Vietnam	VC001	35	F	-23.4	11.0
	VC002	37	M	-22.8	10.5
	VC049	38	M	-23.6	10.4
	VC050	35	F	-23.7	9.9
	VC057	38	M	-22.4	11.6
	VC058	35	F	-21.6	11.0
	VC066	32	F	-24.1	9.8
	VP018	25	F	-23.0	10.2
	VP019	28	M	-22.2	11.0
	VP057	32	M	-23.1	10.0
	VP058	32	F	-23.3	10.3
	VP079	39	M	-22.8	10.7
	VP080	39	F	-23.1	10.4
	VP093	36	F	-21.3	11.6
	Average			-22.9	10.6
	1σ			0.8	0.6
Nepal	NC001	57	M	-21.9	8.9
	NC160	24	M	-21.5	9.0
	NK034	25	F	-22.3	7.8
	NK186	36	M	-20.9	8.3
	NP011	26	M	-21.3	8.7
	NP075	37	F	-20.9	9.3
	NP090	20	M	-20.9	8.4
	Average			-21.4	8.6
	1σ			0.6	0.5

表 5. 食性推定モデルの妥当性評価に用いた食物の炭素・窒素同位体比および元素濃度。
「ミートボール入り麺」は、タピオカの粉で作られた麺のタンパク寄与が大きいため
C₃植物と同一カテゴリーとした。

Common name	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Wt (%) [C]	Wt (%) [N]	C/N
Rice1	-28.4	2.6	41.4	1.3	30.9
Rice2	-29.4	4.6	41.6	1.4	35.2
Potato	-25.1	4.6	41.3	3.3	12.5
Legume	-27.7	3.7	42.0	3.5	11.9
Noodle with meat ball	-24.1	4.5	40.3	1.9	25.4
C₃plant average	-26.9	4.0	41.3	2.3	21.6
Tempe	-25.8	2.7	44.3	10.1	4.4
Egg1	-24.1	8.2	46.5	13.6	3.4
Egg2	-22.5	4.7	45.4	12.3	4.4
Egg average	-23.3	6.5	45.9	12.9	4.3
Flour	-21.5	3.2	41.8	1.5	31.9
Sardine	-18.5	8.5	42.4	12.5	3.4
Salted fish	-30.1	6.7	28.9	8.9	3.9

表 6. 食性推定モデルによる被験者の食物摂取量推定値と食事調査記録の比較。LP: 線形計画法, CWLP: 濃度加重線形計画法, Survey data: 直接秤量法, FFQ: 摂取頻度調査法をそれぞれ示す。A): C₃植物・テンペ・卵・小麦粉・魚の塩漬け・イワシの6品目を用いて推定した場合、B): C₃植物とテンペを合計し、5品目による推定を行った場合。

A)

	IsoSource	LP	CWLP	Survey data	FFQ
C ₃ plant	0-72%	0-61%	0-62%	50%	41%
Tempe	0-69%	0-67%	0-72%	15%	8%
Egg	0-45%	0-43%	0-43%	13%	19%
Flour	0-62%	0-59%	0-46%	10%	7%
Salted fish	0-37%	0-35%	0-23%	2%	19%
Sardine	0-22%	0-22%	0-19%	5%	0%
Other foods	—	—	—	6%	6%

B)

	IsoSource	LP	CWLP	Survey data	FFQ
C ₃ plant+Tempe	1-70%	6-78%	31-82%	64%	49%
Egg	0-45%	0-43%	0-43%	13%	19%
Flour	0-62%	0-59%	0-46%	10%	7%
Salted fish	0-37%	0-35%	0-23%	2%	19%
Sardine	0-22%	0-22%	0-19%	5%	0%
Other foods	—	—	—	6%	6%

表 7. 本研究で使⽤した北⾦貝塚⼈骨試料

Research ID	No.2	No.4	No.5	No.7	No.8	No.9
Sex	female	male	female	male	female	male
Age	adult	adult	adult	adult	adult	adult
Skeletal element	costa	costa	costa	costa	costa	costa

表 8. 本研究で使⽤した北⾦貝塚動物遺存体試料

Common name	Scientific name	Research ID	Element	Note
Northern fur seal	<i>Callorhinus ursinus</i>	HF2	radius	yearling
Northern fur seal	<i>Callorhinus ursinus</i>	HF55	radius	juvenile
Jacopever	<i>Sebastes schlegelii</i>	UH1F	dentary	
Japanese oyster	<i>Crassostrea gigas</i>	KT7	shell	
Red fox	<i>Vulpes vulpes</i>	UH1V	humerus	
Red fox	<i>Vulpes vulpes</i>	UH3V	-	
Japanese deer	<i>Cervus nippon</i>	HF5	tibia	
Japanese deer	<i>Cervus nippon</i>	HF6	tibia	

表 9. 人骨試料のアミノ酸窒素同位体比。() の中は測定に伴う誤差 (1 標準偏差) を表す。

	Alanine	Glycine	Valine	Leucine	Isoleucine	Proline	Serine	Methionine	Glutamic acid	Phenylalanine	Hydroxyproline	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Bulk}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$	C/N
No.2 Human	ND	16.8 (0.4)	ND	ND	ND	25.0 (0.5)	21.2 (0.1)	ND	22.9 (0.5)	2.7 (0.4)	24.7 (0.3)	-14.2	17.8	3.3
No.4 Human	22.1 (0.8)	17.7 (0.6)	ND	ND	ND	24.8 (0.6)	21.6 (0.2)	ND	25.5 (0.7)	2.4 (0.3)	23.4 (0.3)	-13.5	18.7	3.2
No.5 Human	ND	15.9 (0.8)	ND	ND	ND	23.7 (0.6)	22.7 (1.5)	ND	24.0 (0.4)	2.8 (0.6)	28.0 (0.7)	-14.3	17.5	3.3
No.7 Human	23.8 (0.4)	16.8 (0.9)	23.1 (0.7)	24.6 (1.3)	16.4 (0.9)	24.8 (0.4)	20.7 (0.6)	ND	23.2 (0.9)	2.4 (0.5)	24.5 (0.3)	-14.4	17.5	3.2
No.8 Human	ND	17.6 (0.7)	ND	ND	ND	23.4 (0.6)	22.8 (0.5)	ND	23.4 (0.5)	2.5 (0.7)	24.1 (0.2)	-14.2	17.8	3.2
No.9 Human	ND	17.3 (0.8)	ND	ND	ND	24.4 (0.7)	25.0 (0.0)	ND	26.1 (1.1)	2.4 (0.5)	25.2 (0.2)	-13.6	18.7	3.2

表 10. 動物試料のアミノ酸窒素同位体比。() の中は測定に伴う誤差 (1 標準偏差) を表す。

	Alanine	Glycine	Valine	Leucine	Isoleucine	Proline	Serine	Methionine	Glutamic acid	Phenylalanine	Hydroxyproline	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Bulk}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$	C/N
HF2 Seal	22.4 (0.3)	13.9 (0.3)	ND	18.6 (0.4)	ND	21.8 (0.4)	ND	ND	23.5 (0.6)	1.4 (0.5)	23.1 (0.4)	-13.5	17.3	3.2
HF55 Seal	22.7 (0.4)	17.4 (0.9)	ND	17.9 (0.7)	ND	24.4 (0.7)	3.5 (0.8)	ND	25.9 (0.2)	1.9 (0.5)	23.2 (0.6)	-14.0	17.0	3.1
UH1 Fish	ND	7.5 (0.6)	ND	11.4 (1.4)	ND	16.5 (0.6)	2.2 (0.9)	-2.0 (1.0)	22.0 (0.2)	1.4 (0.3)	18.3 (0.4)	-11.3	15.0	3.3
KT7 Oyster	13.8 (2.4)	5.3 (1.4)	12.6 (0.4)	9.1 (2.4)	10.2 (0.9)	13.7 (0.4)	ND	ND	14.3 (0.2)	1.0 (0.3)	—	ND	ND	ND
UH1 Vulpes	ND	8.5 (0.0)	ND	9.9 (0.2)	ND	15.0 (0.7)	2.7 (0.3)	ND	13.6 (1.5)	4.7 (0.7)	13.3 (1.9)	-19.9	7.8	3.4
UH3 Vulpes	ND	7.3 (0.3)	ND	9.0 (1.6)	ND	11.9 (1.1)	1.3 (0.3)	ND	13.3 (0.3)	5.0 (2.0)	10.1 (0.2)	-19.1	6.5	3.4
HF5 Deer	9.1 (0.6)	4.6 (0.2)	ND	2.5 (0.3)	ND	6.8 (0.4)	2.7 (0.7)	ND	7.1 (0.2)	4.2 (0.3)	5.7 (0.2)	-20.7	3.2	3.2
HF6 Deer	ND	4.9 (0.2)	ND	ND	ND	6.6 (0.3)	ND	ND	6.8 (0.7)	4.6 (0.0)	5.9 (0.4)	-20.7	3.3	3.2
YG1 Horse	10.2 (0.8)	4.7 (0.3)	ND	5.3 (0.2)	ND	9.7 (0.4)	0.5 (0.5)	ND	7.5 (0.4)	4.4 (0.2)	7.9 (0.4)	-12.9	4.2	3.2

表 11. 推定された全考古学試料および現代ウマ試料の栄養段階 (TL)

Human		Marine animal		Terrestrial animal	
Bone sample	TL	Bone sample	TL	Bone sample	TL
No.2 Human	3.2	HF2 Seal	3.5	UH1 Vulpes	1.7
No.4 Human	3.6	HF55 Seal	3.7	UH3 Vulpes	1.6
No.5 Human	3.4	UH1 Fish	3.3	HF5 Deer	0.9
No.7 Human	3.3	KT7 Oyster	2.3	HF6 Deer	0.8
No.8 Human	3.3				
No.9 Human	3.7			YG1 Horse	0.9

表 12. 陸の食料と海の食料に含まれるグルタミン酸とフェニルアラニンの含有率。
Glu/Phe はフェニルアラニンに対するグルタミン酸の含有量を表す。() の中は 1 標準偏
差を示す。

Terrestrial food		Marine food	
Category	Glu/Phe value	Category	Glu/Phe value
millet (<i>Enchinochloa</i> sp.)	3.90	fin fishes	3.59 (0.23)
tuberous crops	3.24 (1.55)	shell fishes	3.95 (0.28)
nuts and seeds	4.06 (0.30)	other animals	3.88 (0.75)
domestic animals	3.80 (0.08)		
Average	3.69 (0.76)	Average	3.71 (0.45)
Average without tuberous crops	3.84 (0.15)		

表 13. 北黄金貝塚人の海の食料の栄養段階 (TL_海) とその割合 (F)。1: 陸の食料を生産者 (植物) のみとした場合の TL_海, 2: 陸の食料をシカのみとした場合の TL_海。

Research ID	No.2	No.4	No.5	No.7	No.8	No.9
Sex	female	male	female	male	female	male
TL _{marine} ¹	3.31	3.27	3.58	3.02	3.16	3.34
TL _{marine} ²	2.84	3.03	3.08	2.72	2.81	3.10
	2.8~3.3	3.0~3.3	3.1~3.6	2.7~3.0	2.8~3.2	3.1~3.3
F	0.68	0.80	0.67	0.77	0.74	0.81

表 14. アミノ酸の窒素同位体比による人骨の海産物摂取量の推定値と食性推定モデルによる推定値の比較。() 内は誤差 (1SE) を表す。

Research ID	No.2	No.4	No.5	No.7	No.8	No.9
Sex	♀	♂	♀	♂	♀	♂
$\delta^{15}\text{N}_{\text{amino acid}}$	0.68 (0.10)	0.80 (0.05)	0.67 (0.06)	0.77 (0.05)	0.74 (0.06)	0.81 (0.05)
IsoSource	0.81-0.89	0.88-0.96	0.79-0.87	0.79-0.87	0.81-0.89	0.88-0.96
CWLP	0.77-0.87	0.85-0.94	0.76-0.85	0.75-0.84	0.77-0.87	0.84-0.94

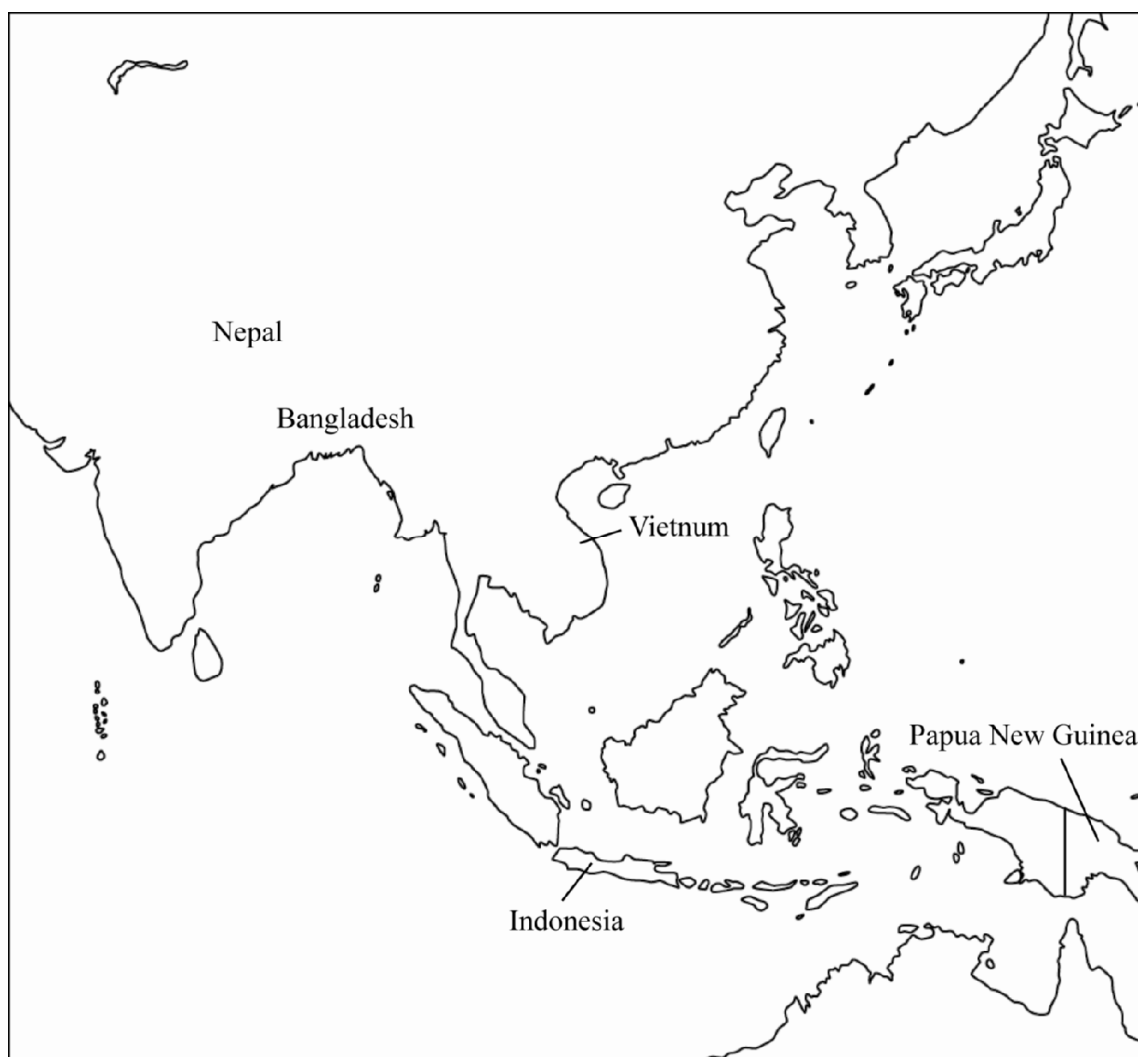


図 1. 本研究で対象とした現代人集団の居住地域

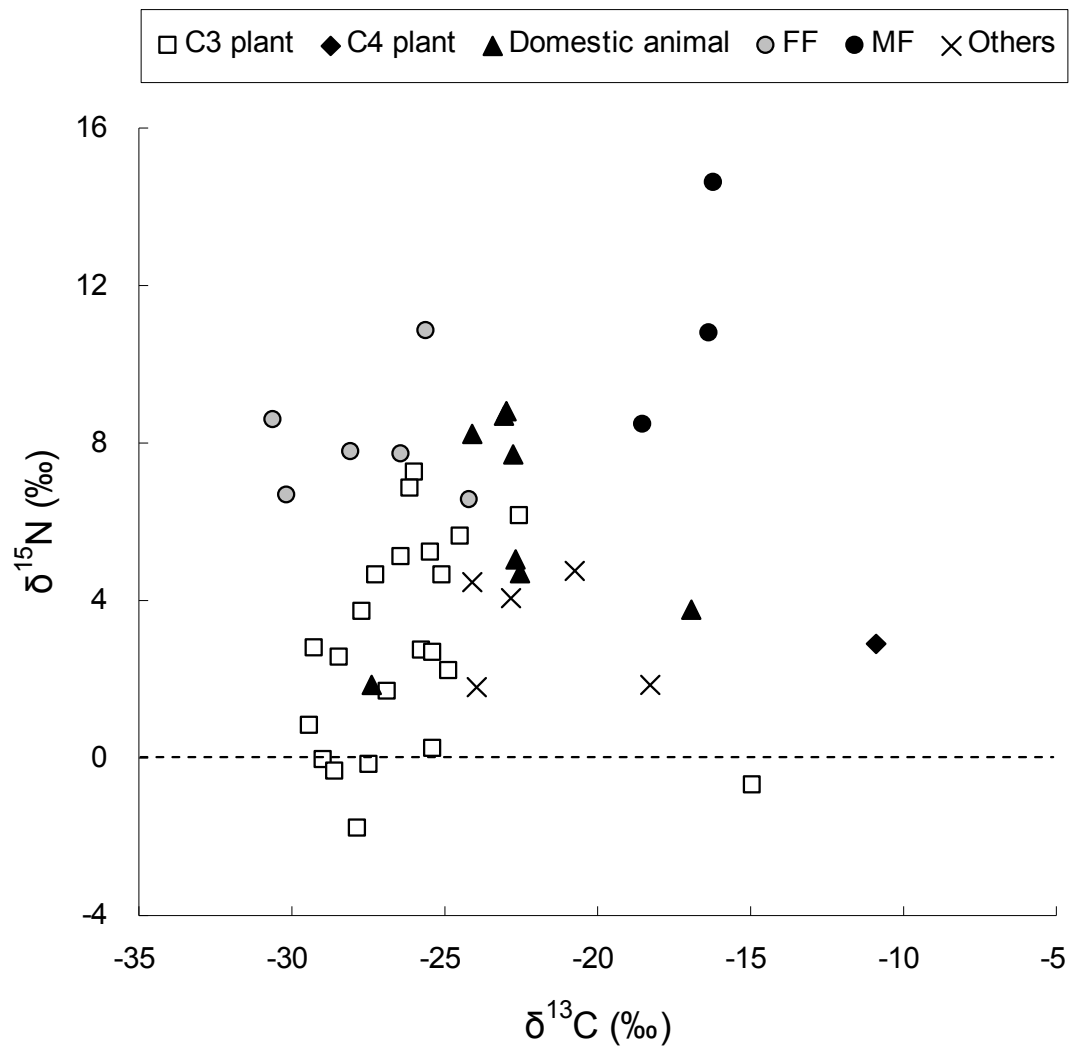


図 2. パプアニューギニア・インドネシア・バングラディシュにおける食物試料の炭素・窒素同位体比。FF: 淡水魚 (Fresh water fish)、MF: 海産魚類 (Marine fish) をそれぞれ表す。

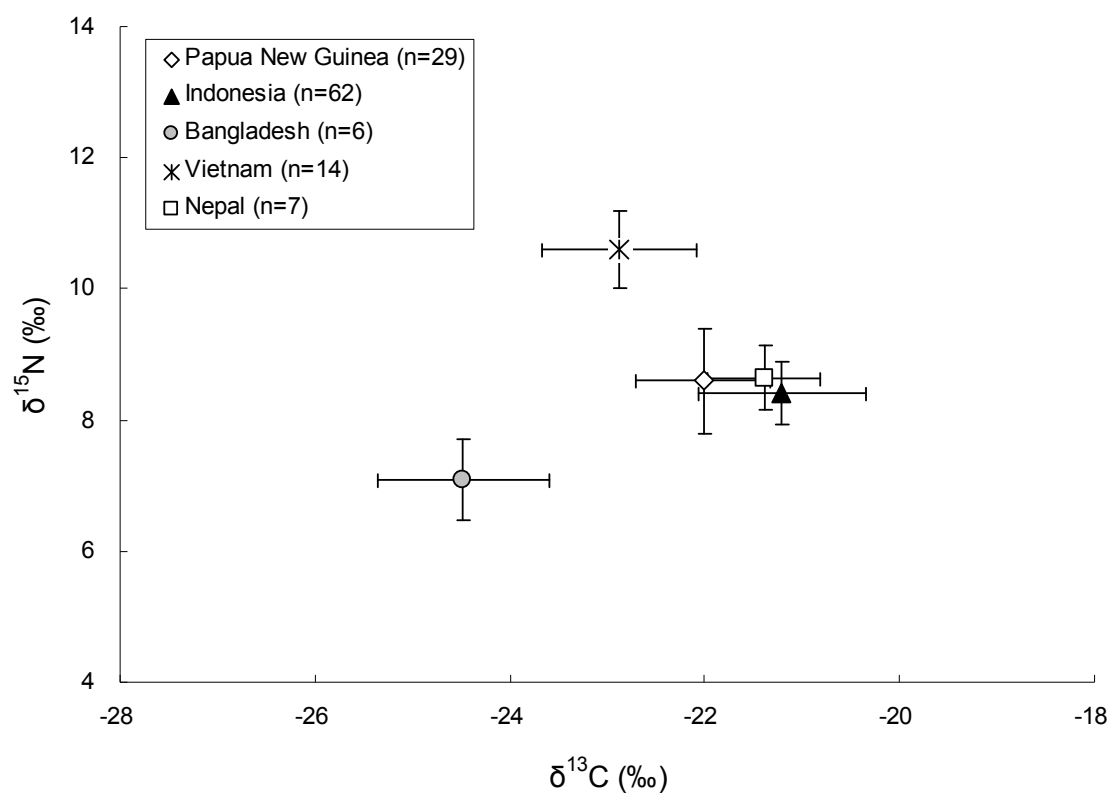


図 3.5 カ国における頭髮の炭素・窒素同位体比。エラーバーは 1 標準偏差を表す。

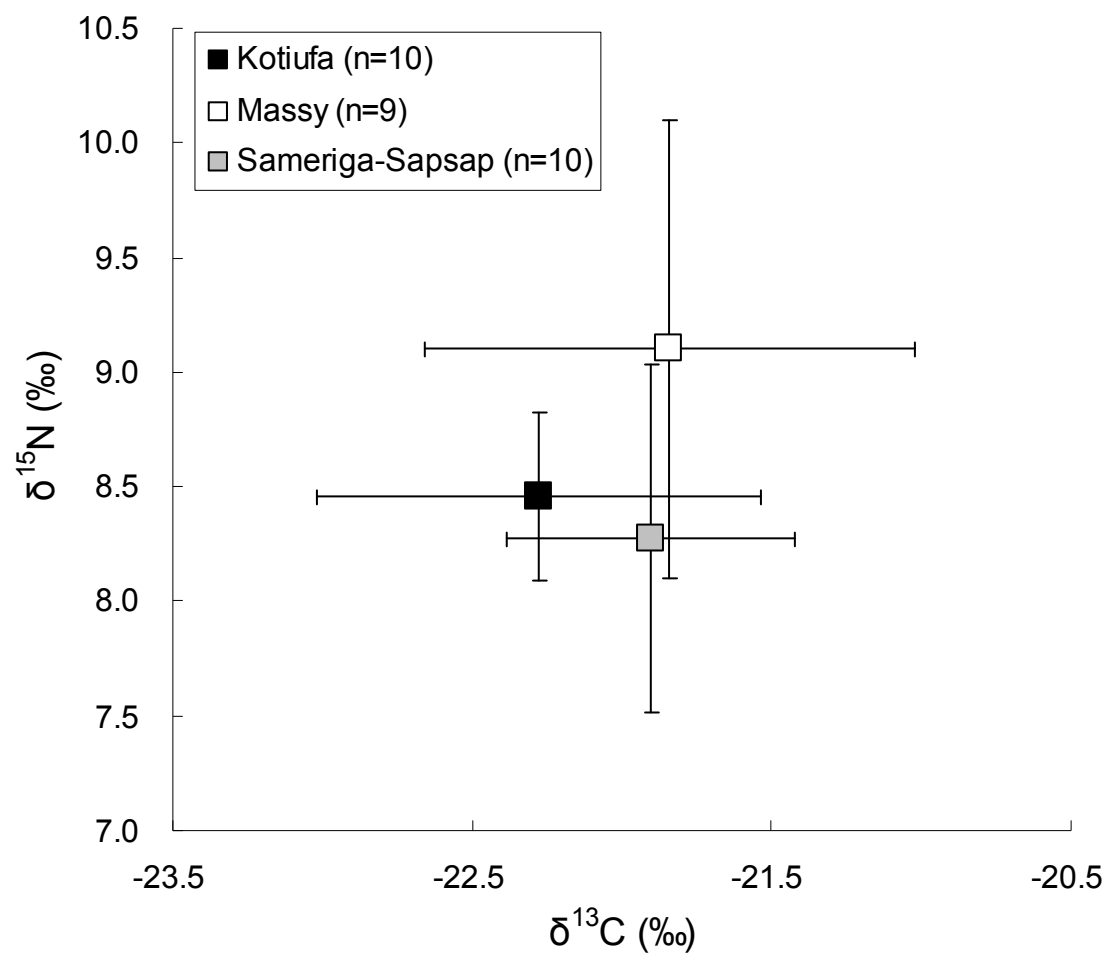


図 4. パプアニューギニア 3 地域集団における頭髪の炭素・窒素同位体比。エラーバーは 1 標準偏差を表す。

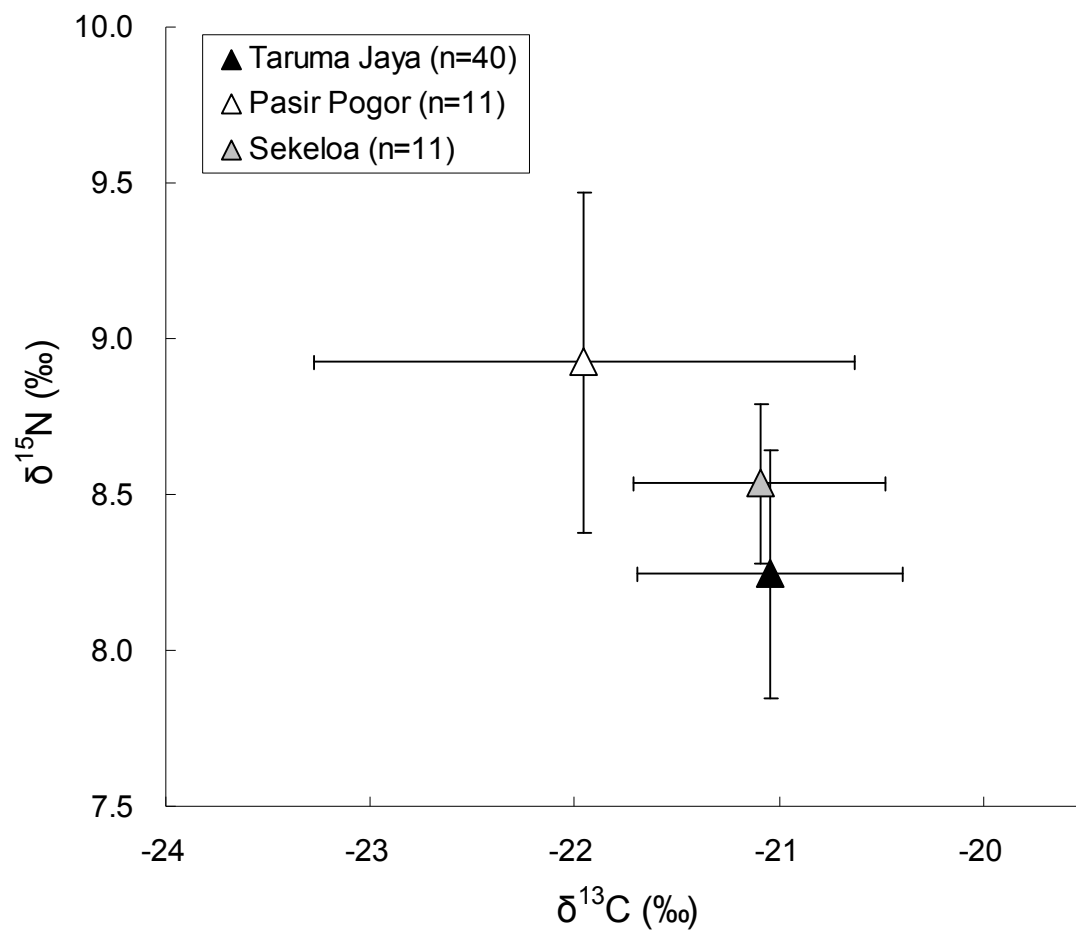


図 5. インドネシア 3 地域集団における頭髪炭素・窒素同位体比。エラーバーは 1 標準偏差を表す。

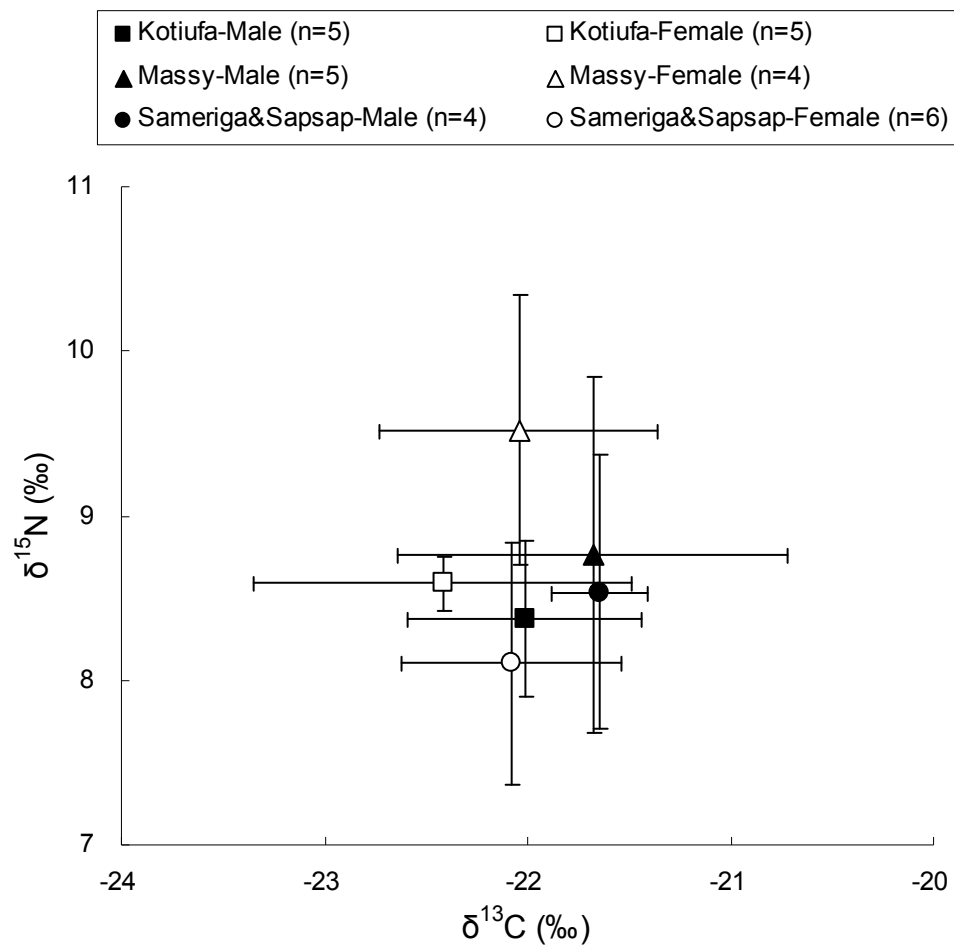


図 6. パプアニューギニア 3 地域集団における頭髮の炭素・窒素同位体比にみられる性差。エラーバーは 1 標準偏差を表す。

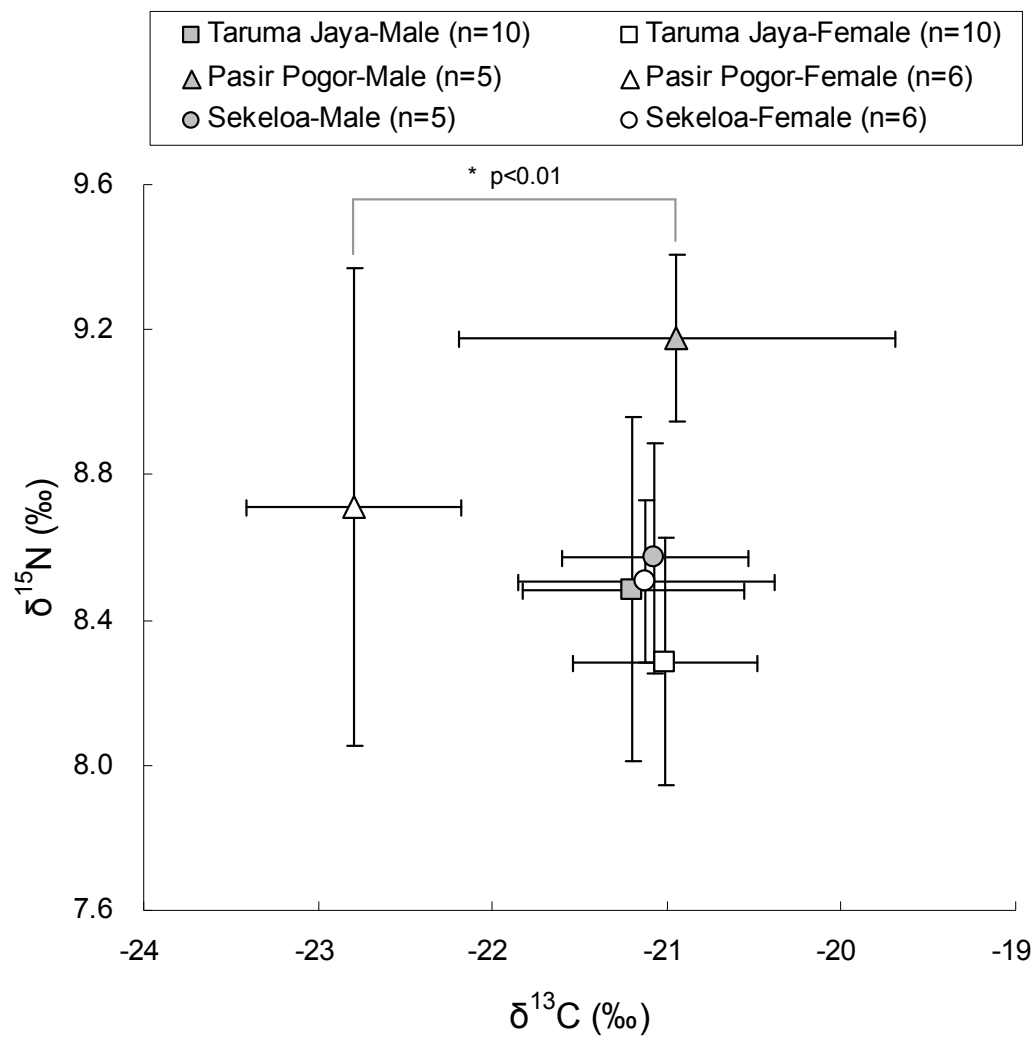


図 7. インドネシア 3 地域集団における頭髮の炭素・窒素同位体比にみられる性差。エラーバーは 1 標準偏差を表す。

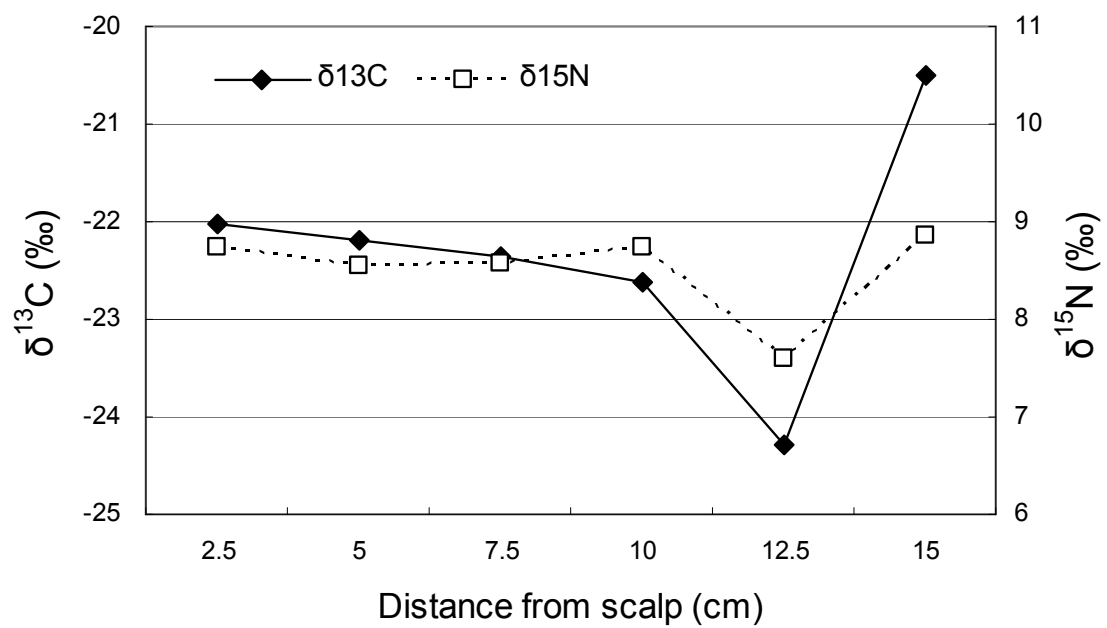


図 8. IT106 被験者頭髪にみられる炭素・窒素同位体比の季節変動

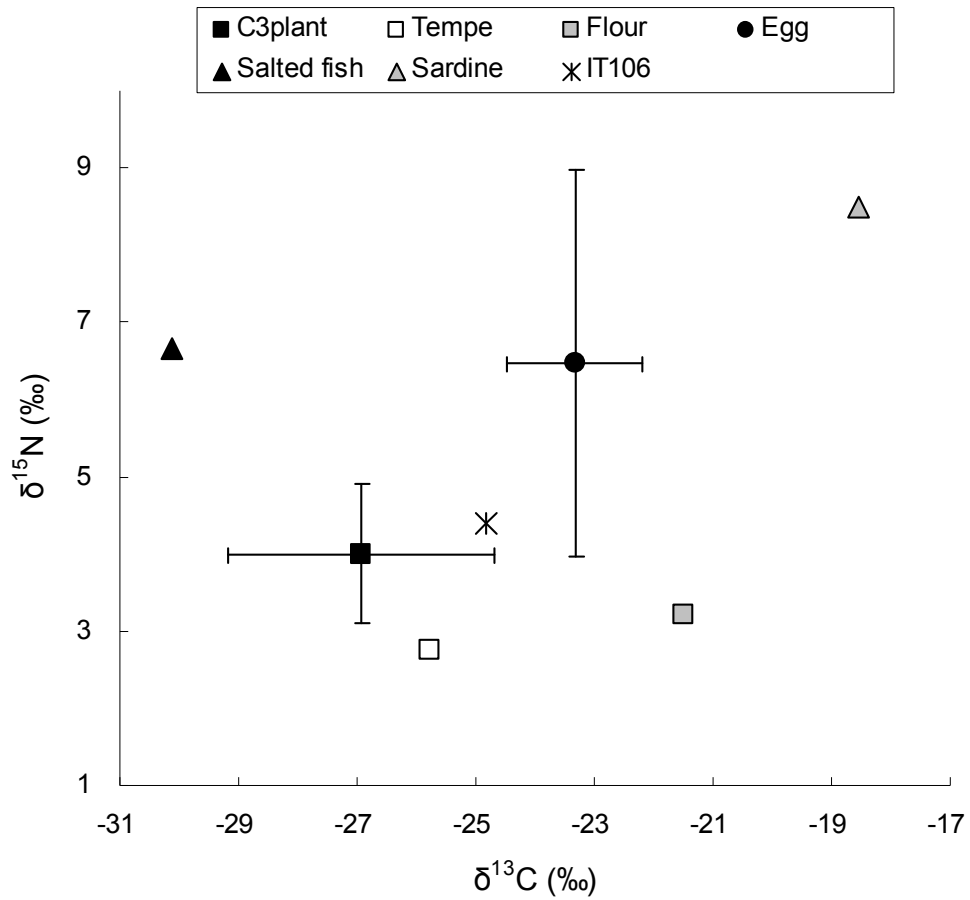


図 9. IT106 被験者の頭髪および食物試料の炭素・窒素安定同位体比。頭髪の同位体比は $\Delta_{\text{頭髪-食物}}$ 値を差し引いた値を示す。1: 小麦粉についてはパプアニューギニアの小麦粉同位体比データを示す。エラーバーは 1 標準偏差を表す。

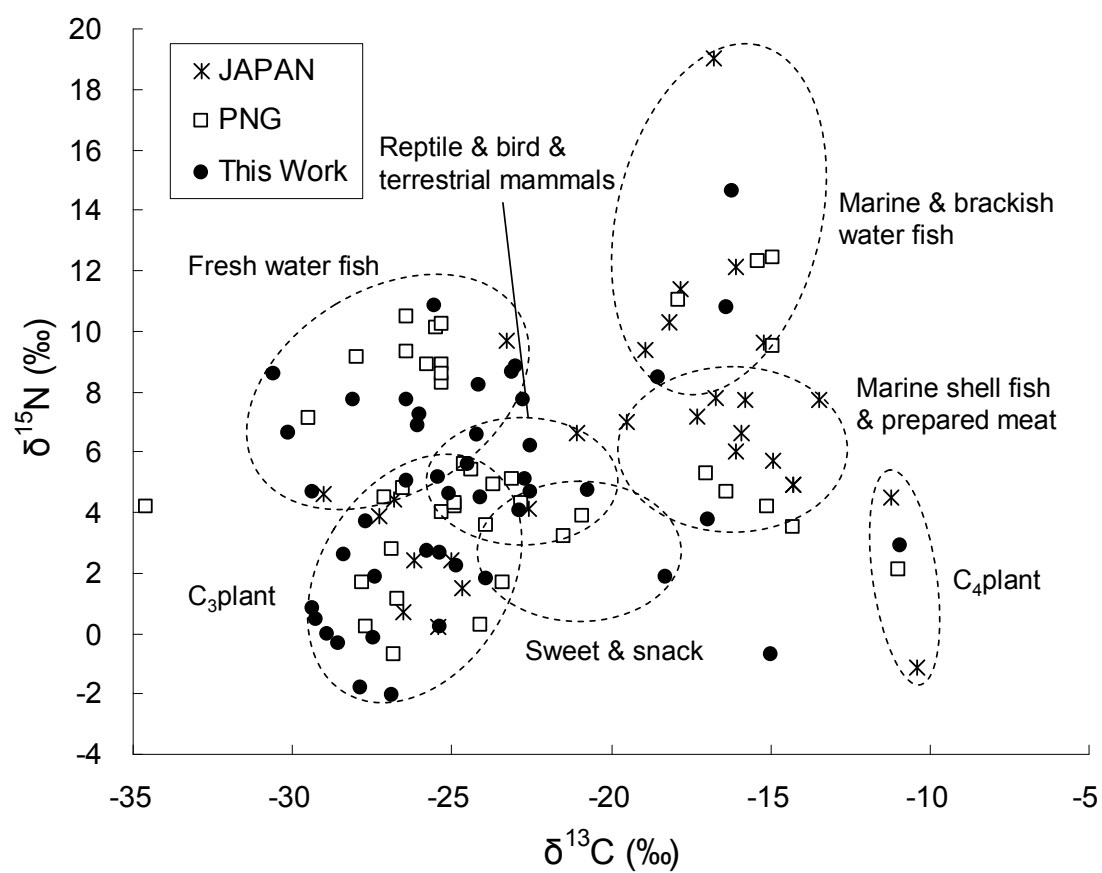
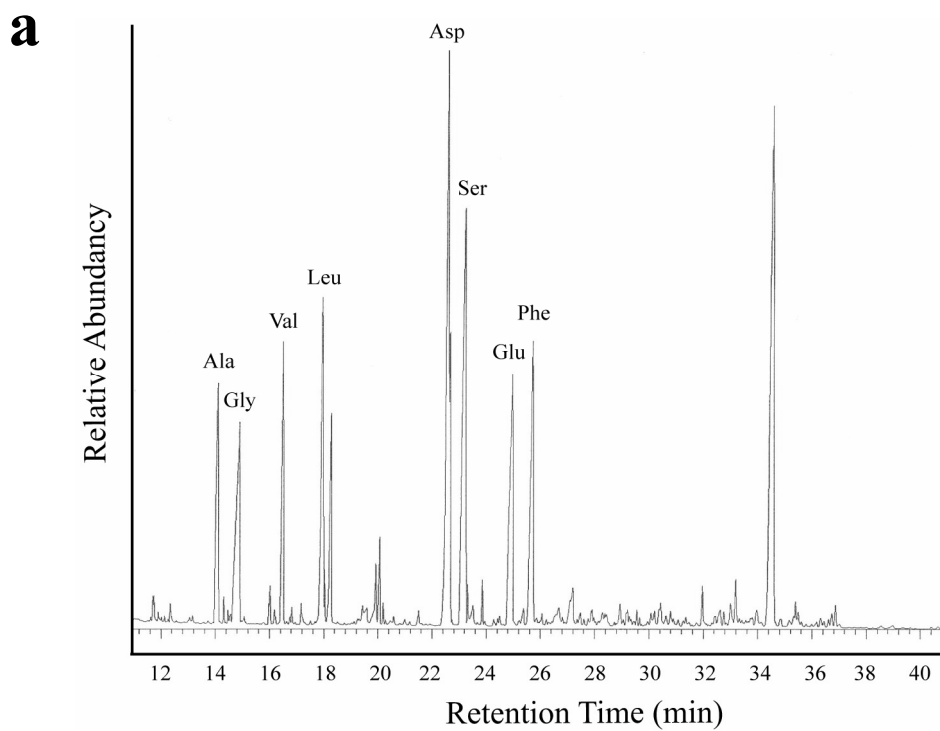


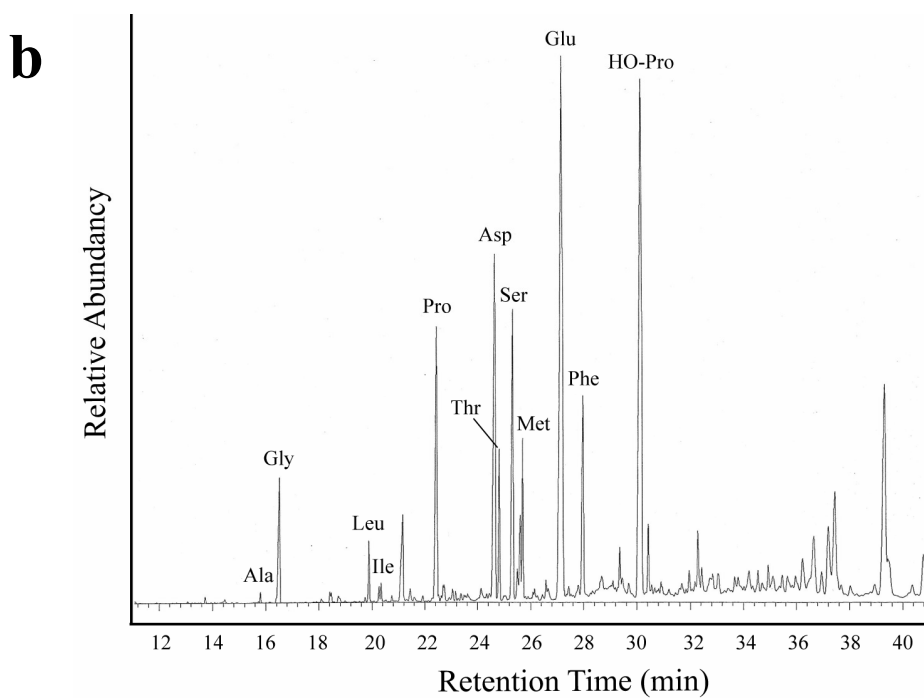
図 10. 先行研究における現代食品の炭素・窒素同位体分析結果と、本研究による食物試料の分析結果。破線で示した楕円は大まかな食品のカテゴリーを示す。PNG は Papua New Guinea を指す。□ : Yoshinaga et al. (1991, 1996)、* : Minagawa et al. (1992)よりそれぞれ抜粋。



図 11. 北黄金貝塚の所在。トーン部分は詳細な調査が行われた区域を示す。

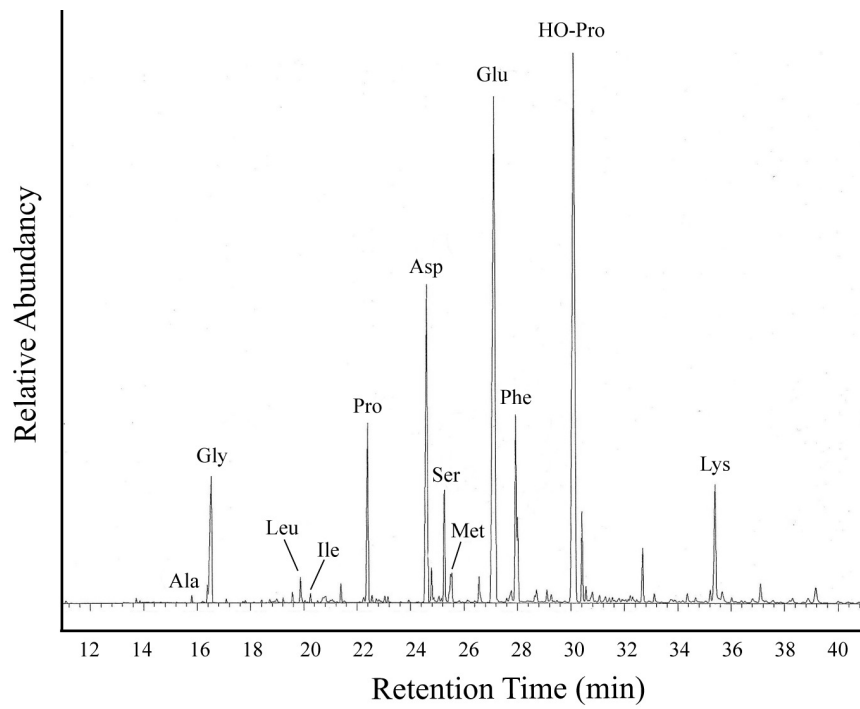


8 amino acid standards

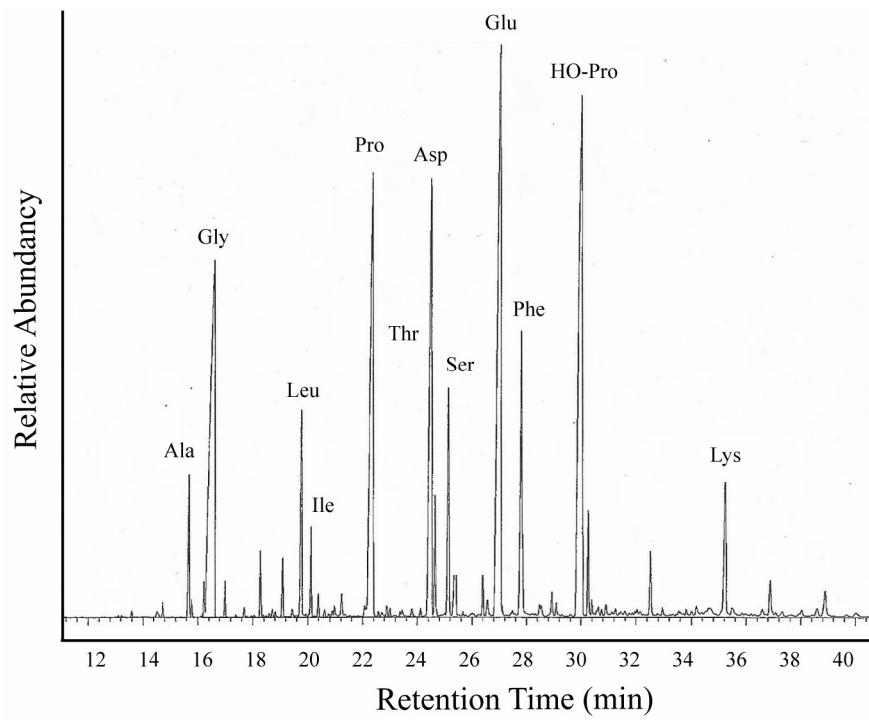


YG1 modern horse

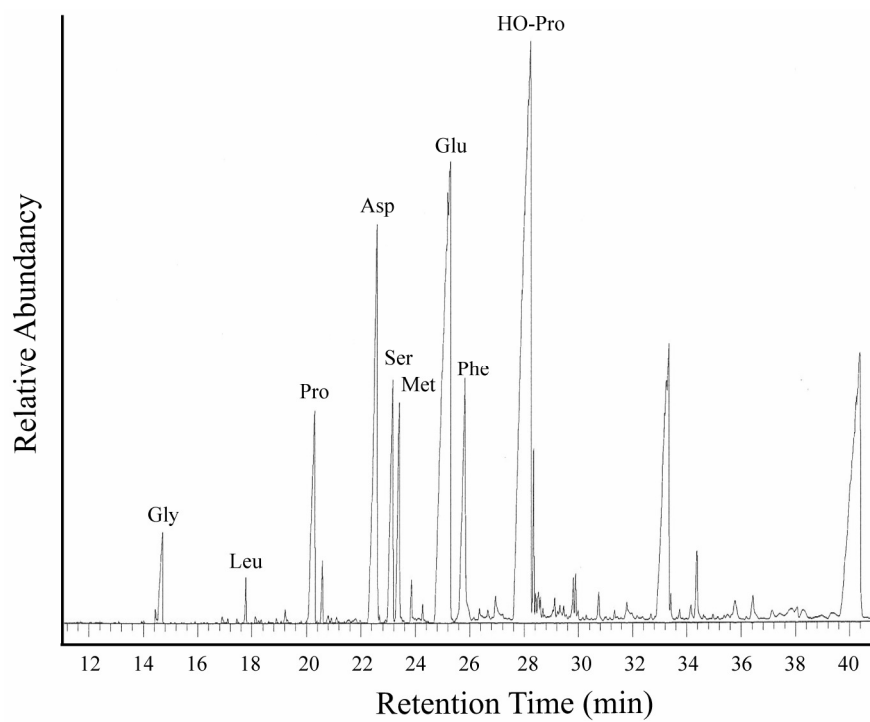
図 12. GC-MS クロマトグラムデータ。横軸はリテンションタイム (分)、縦軸は相対存在量を示す。**a** : アミノ酸スタンダード, **b** : 現代ウマ, **c~p** : 考古学試料。

c

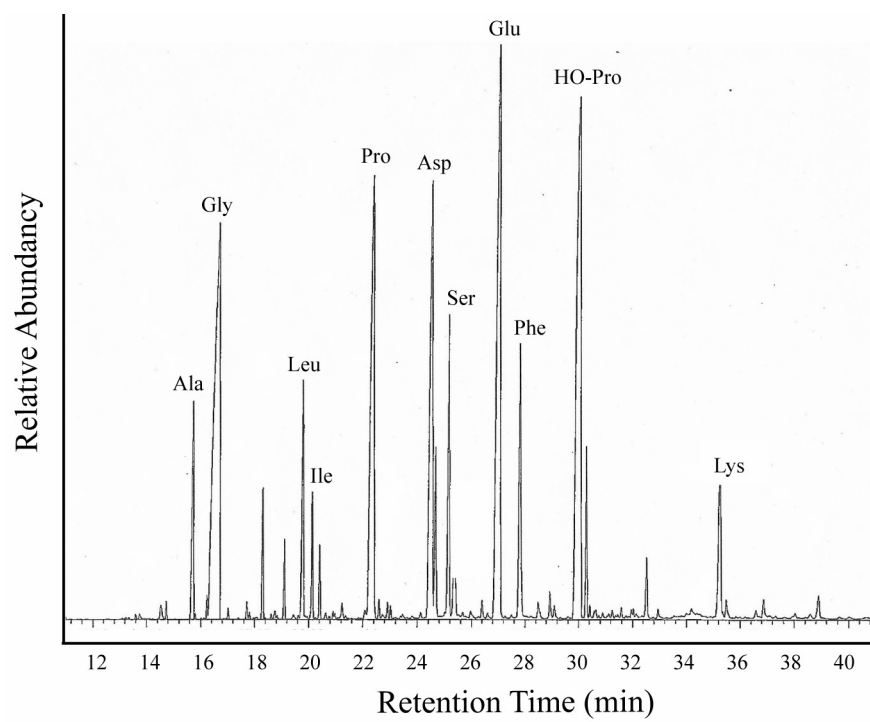
No.2 human

d

No.4 human

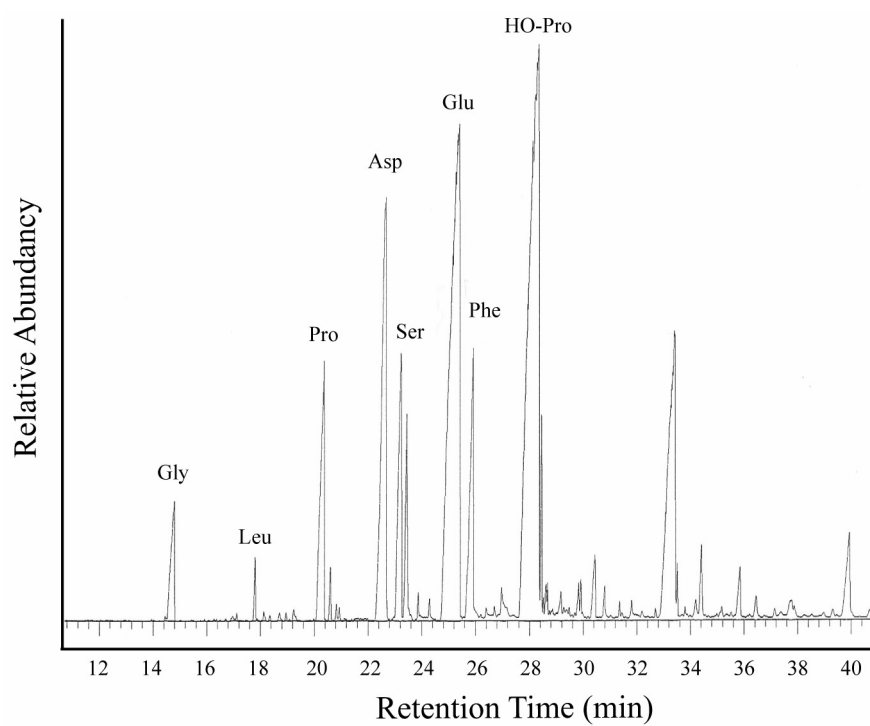
e

No.5 human

f

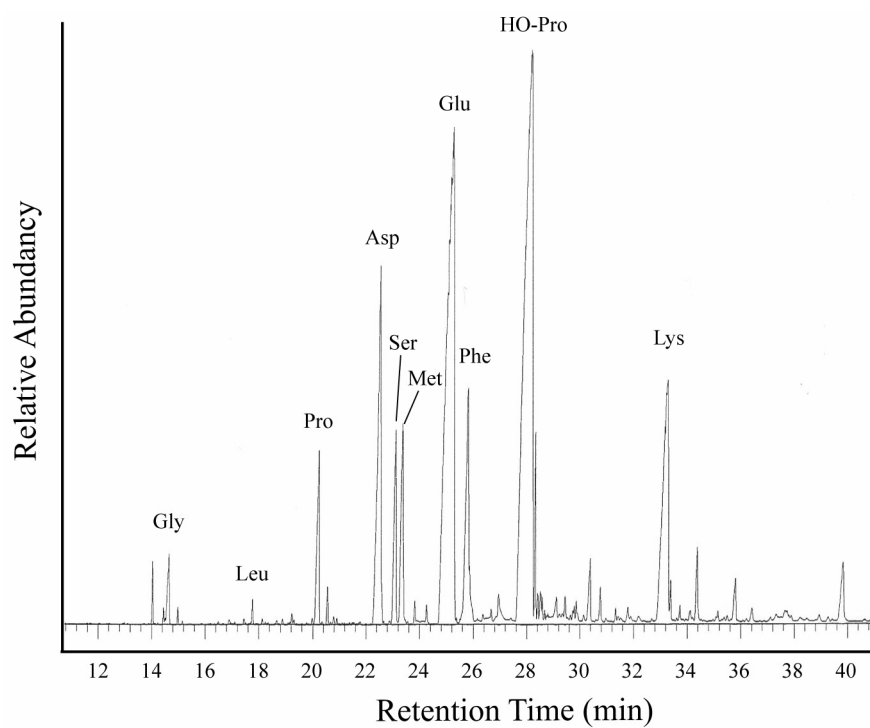
No.7 human

g

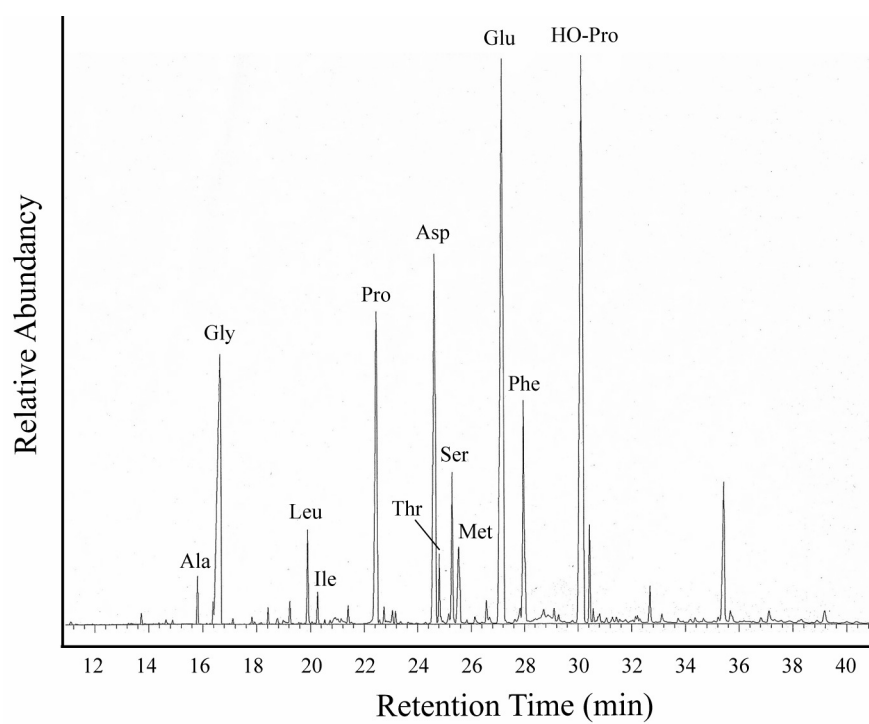


No.8 human

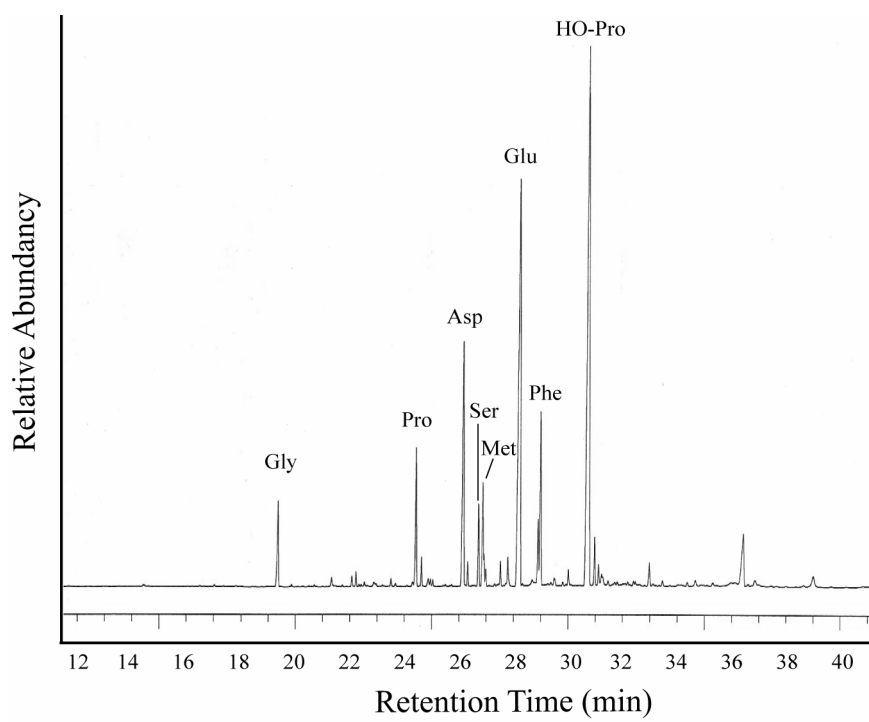
h



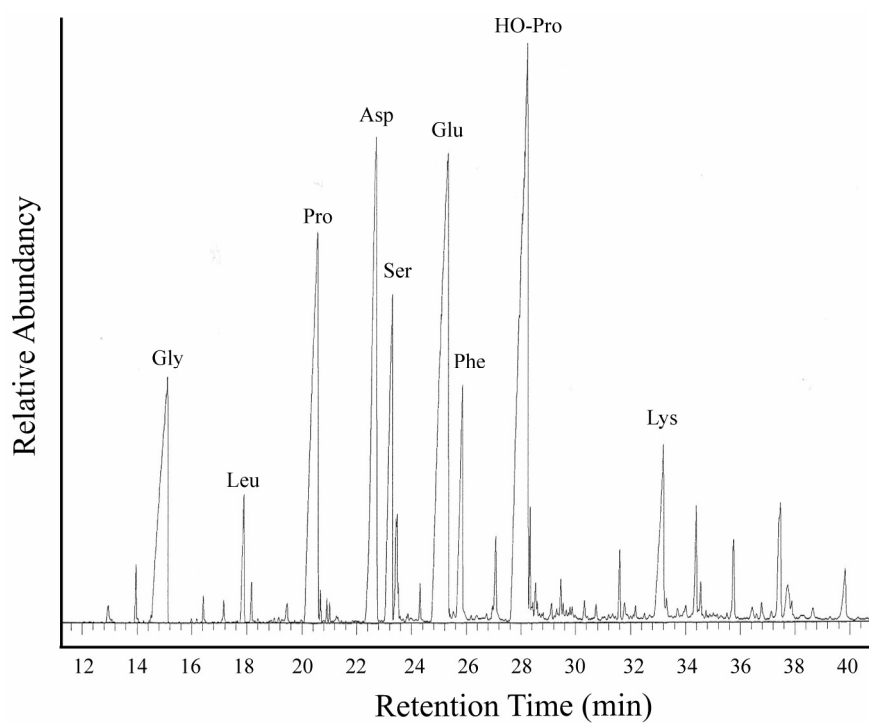
No.9 human

i

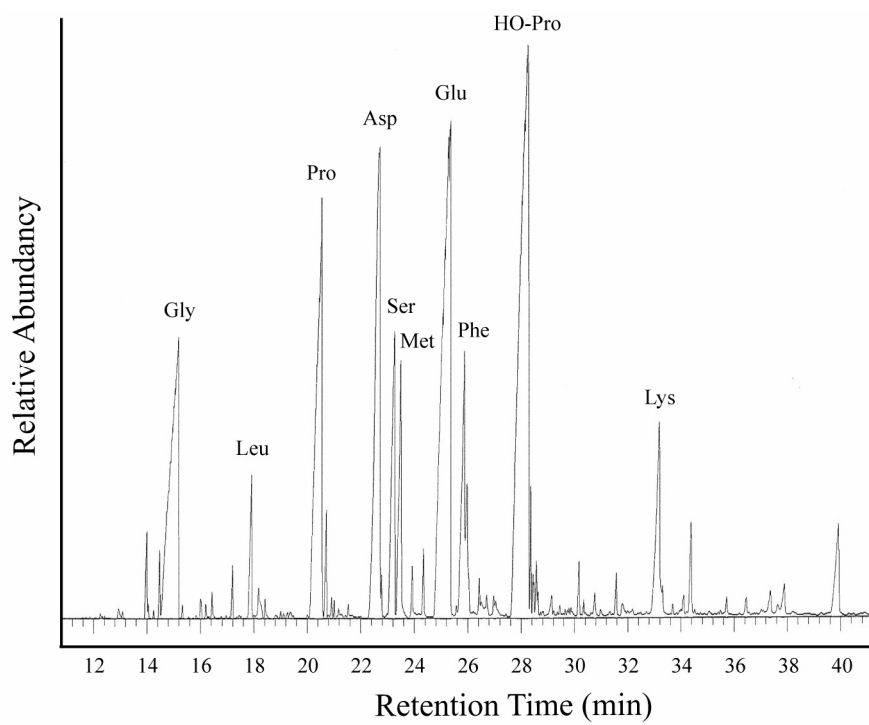
HF5-deer

j

HF6-deer

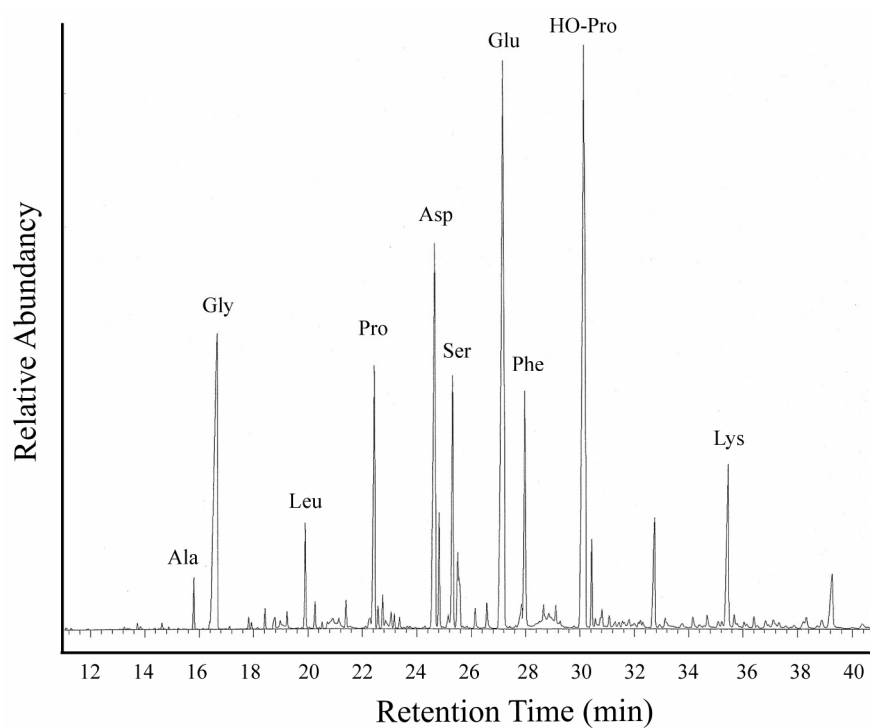
k

UH1. vulpes

l

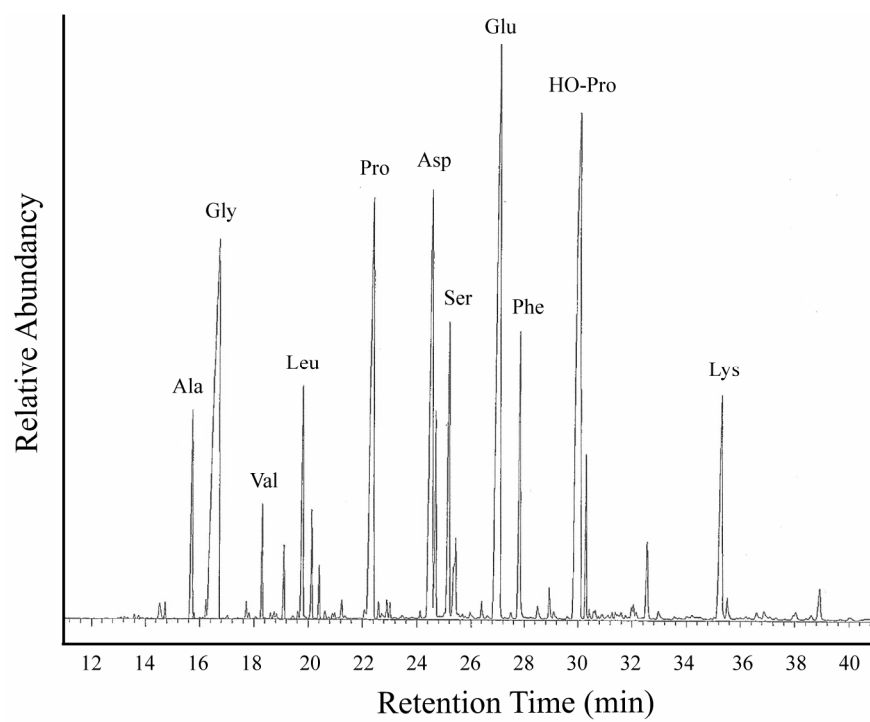
UH3. vulpes

m



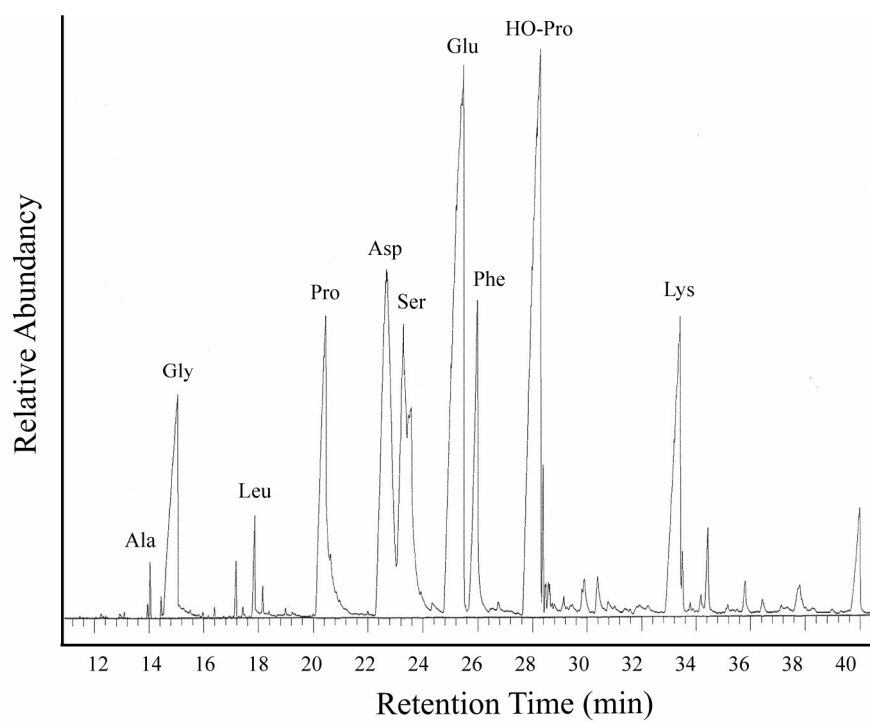
HF2 seal

n



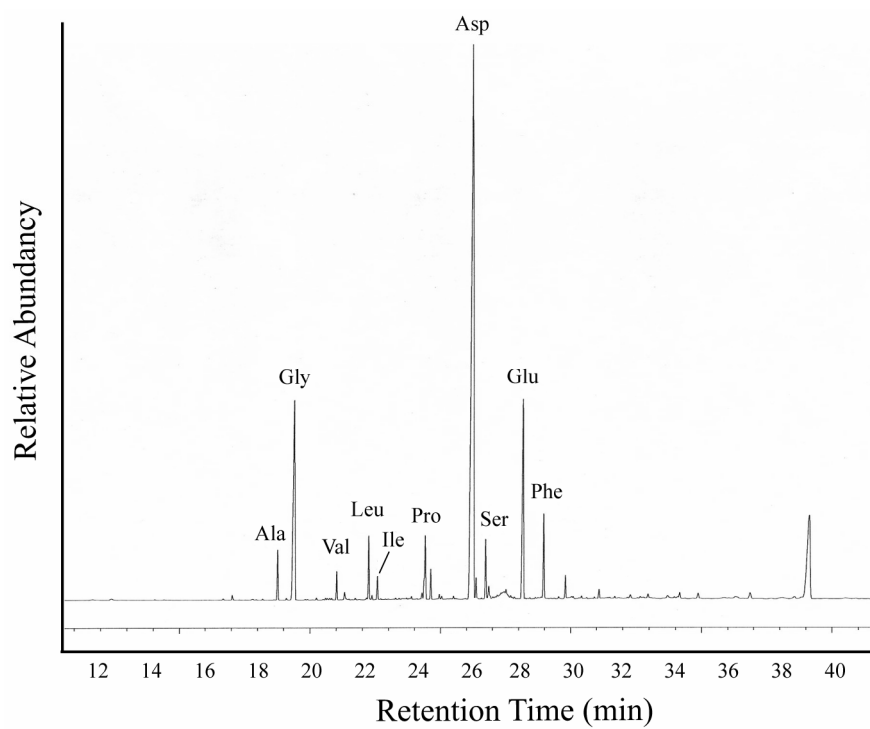
HF55 seal

o



UH1.fish

p



KT7 oyster

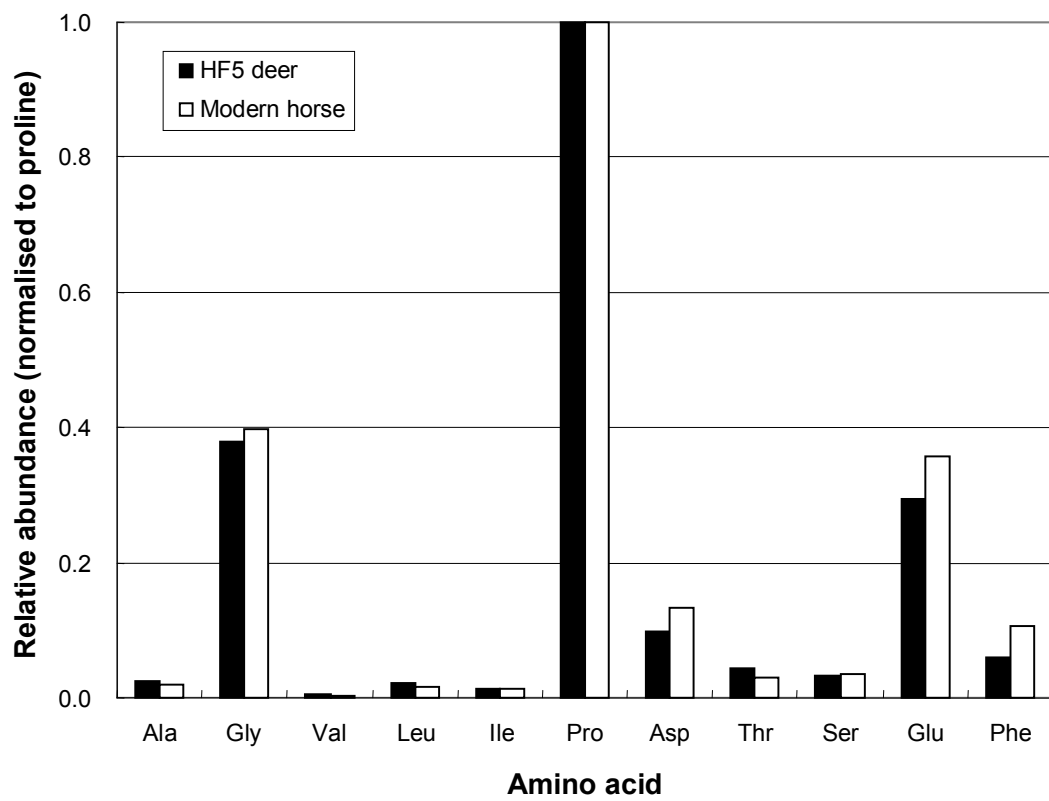


図 13. 北黄金貝塚出土シカ骨 (HF5) および現生のウマ骨から抽出したアミノ酸の組成。各アミノ酸の存在量はプロリンに対する相対量を示す。

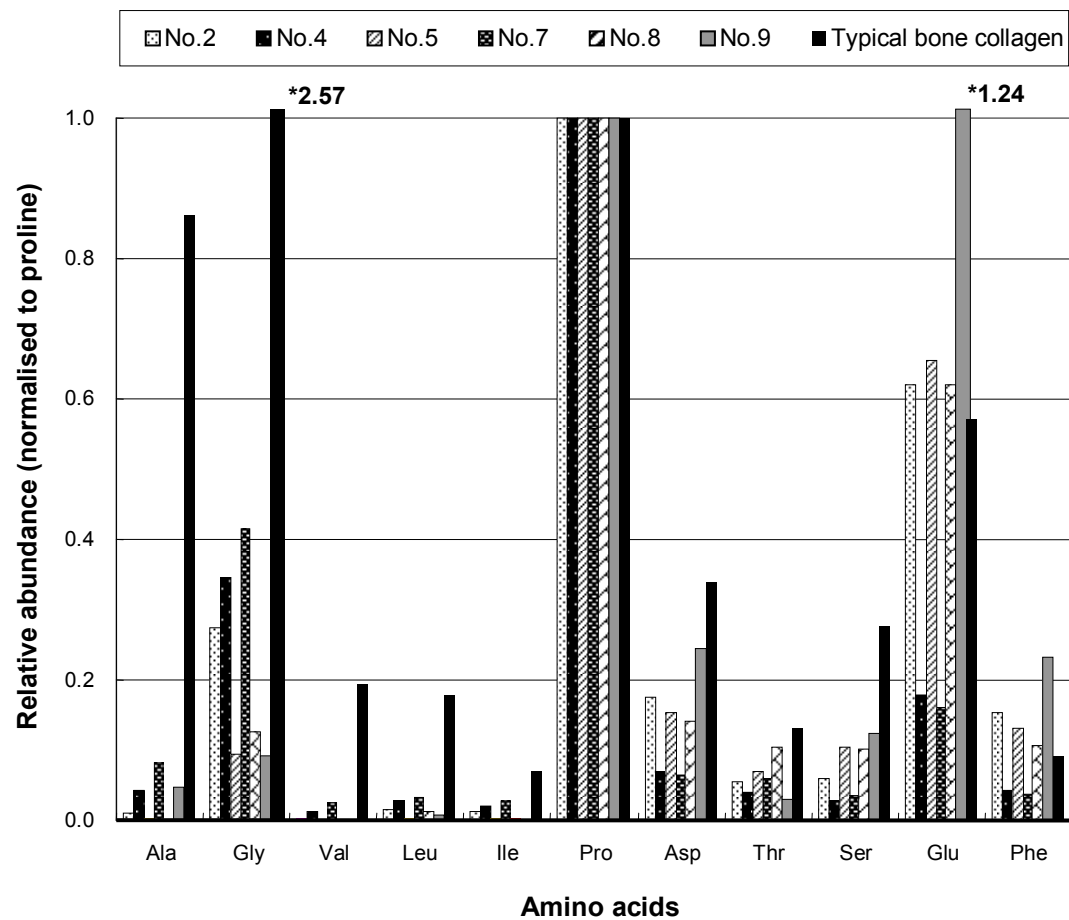


図 14. 北黄金貝塚人骨 6 個体から抽出したアミノ酸の組成。各アミノ酸の存在量はプロリンに対する相対量を示す。黒のバーは典型的な骨コラーゲンのアミノ酸組成を表す [1]。

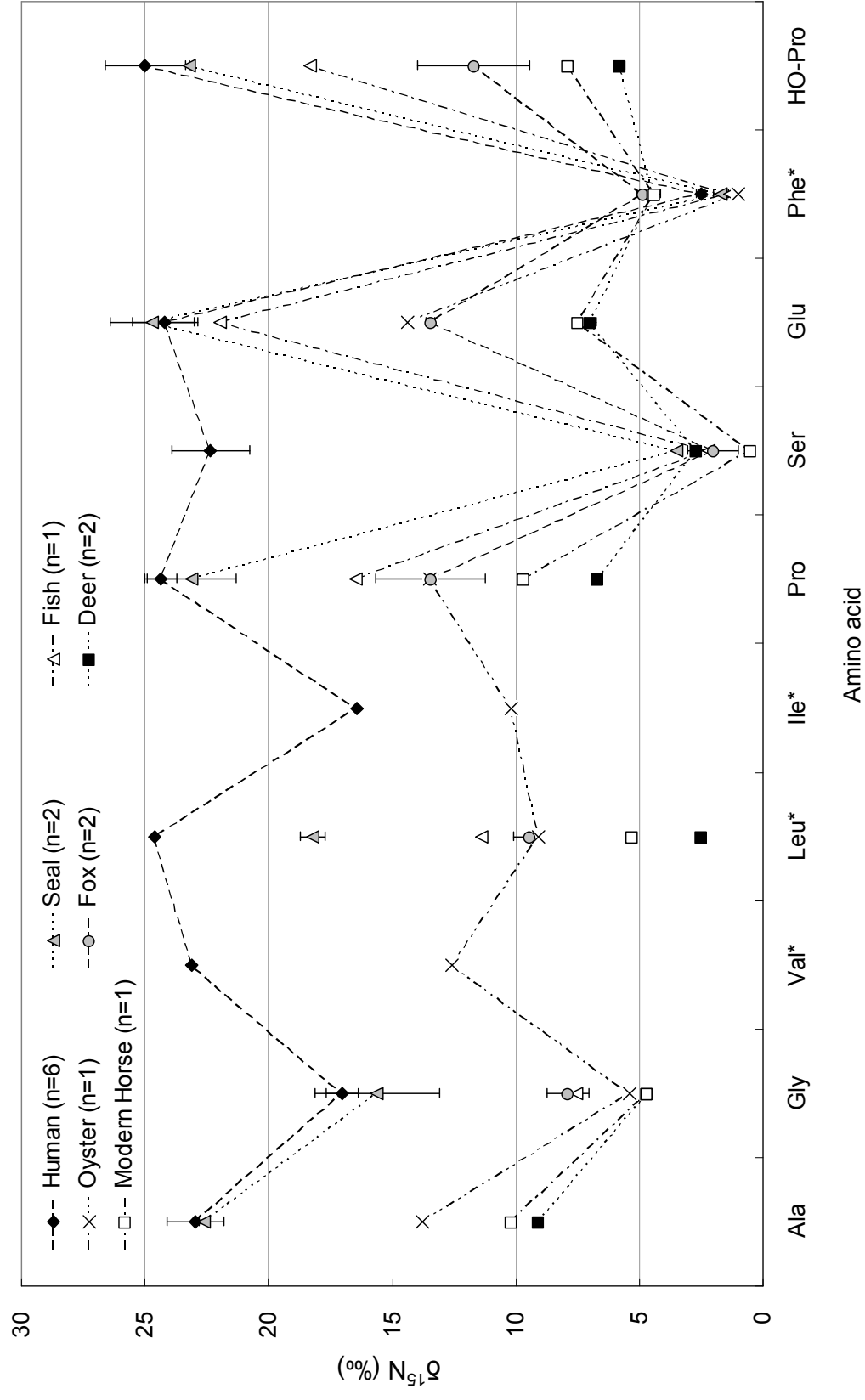


図 15. 全考古学試料および現代ウマのアミノ酸窒素同位体比。*は必須アミノ酸を、エラーバーは 1 標準偏差を表す。

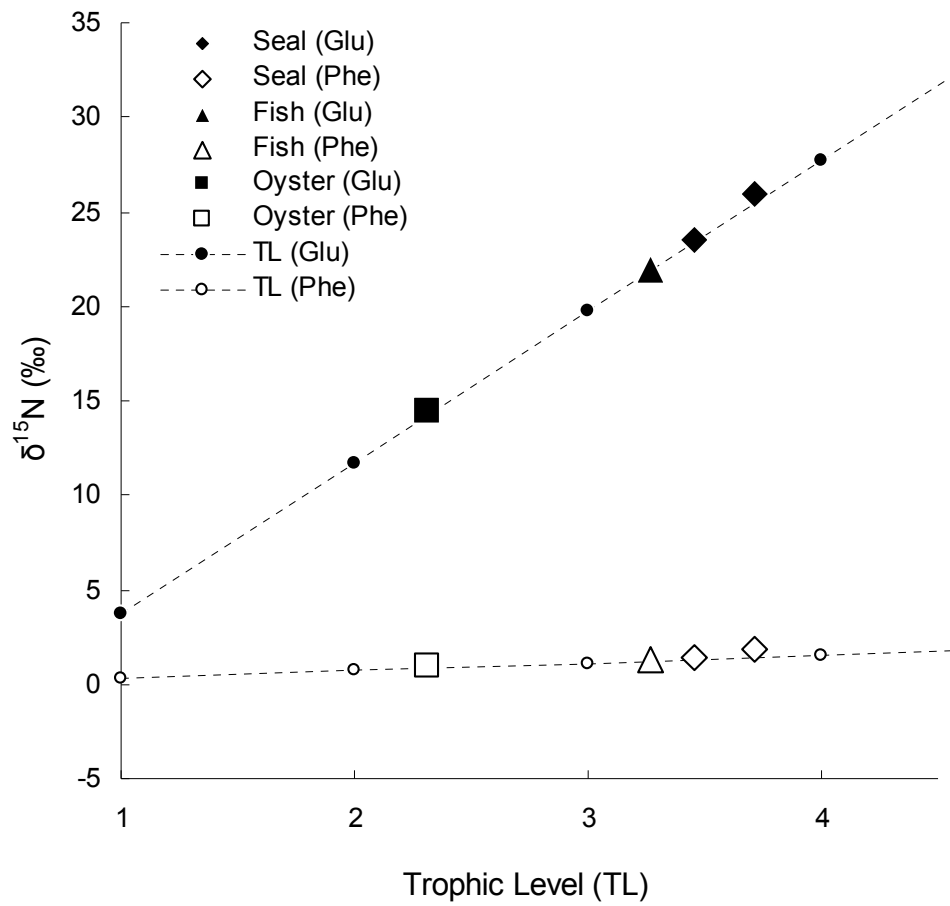


図 16. 復元された北黄金貝塚周辺の食物網。横軸に栄養段階 (TL)、縦軸に窒素同位体比をとり、生態系中の各栄養段階に対応するグルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比が示されている。

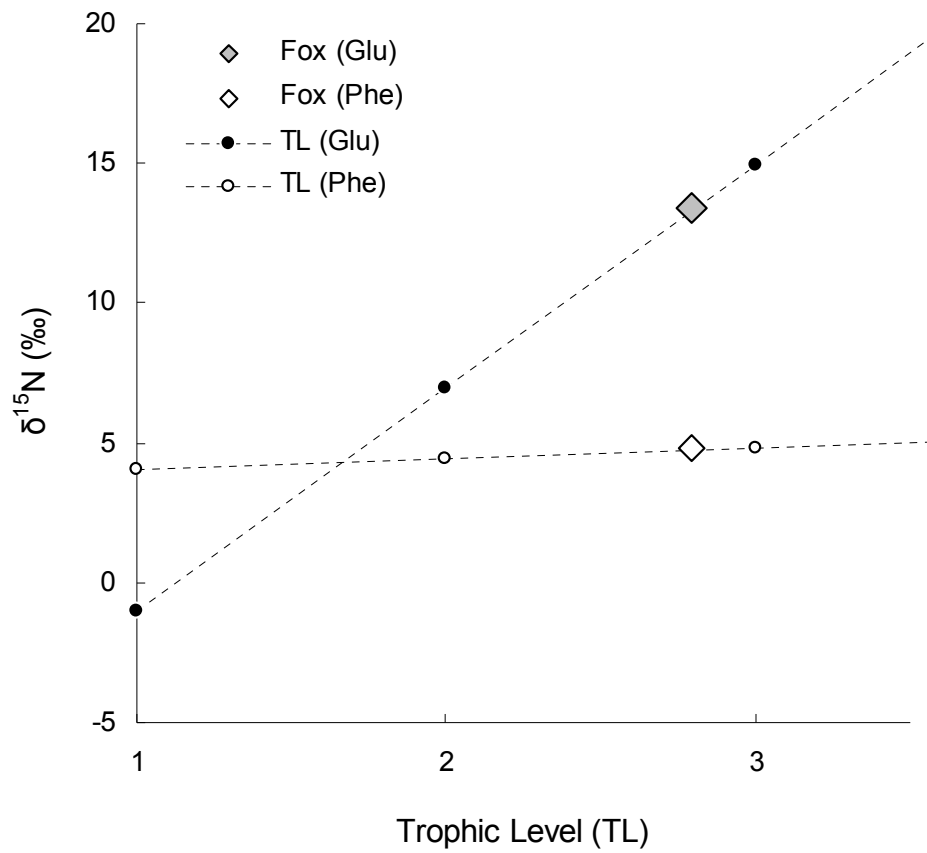


図 17. 復元された北黄金貝塚周辺の陸上生態系。横軸に栄養段階 (TL)、縦軸に窒素同位体比を示す。栄養段階 2 (一次消費者) におけるグルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比は、シカの窒素同位体比平均値で代用した。

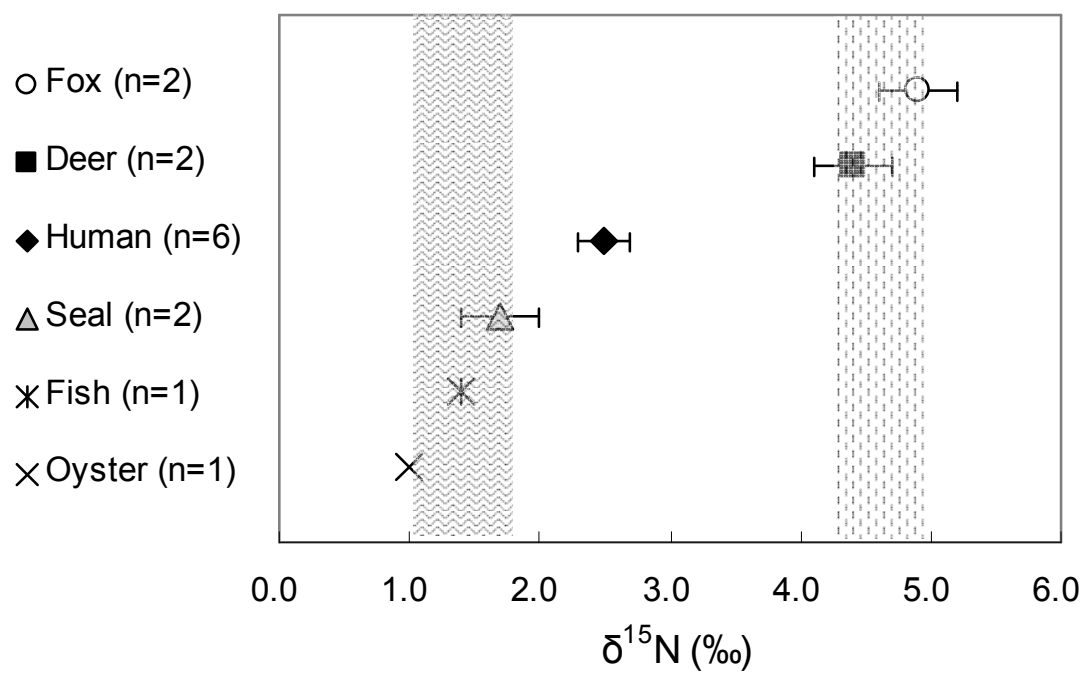


図 18. 人骨試料および動物試料に含まれるフェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ 値。エラーバーは標準偏差 (1σ) を示す。波線と破線で示した領域は、海生動物の平均値 $\pm 1\sigma$ および陸上動物の平均値 $\pm 1\sigma$ の範囲をそれぞれ表す。

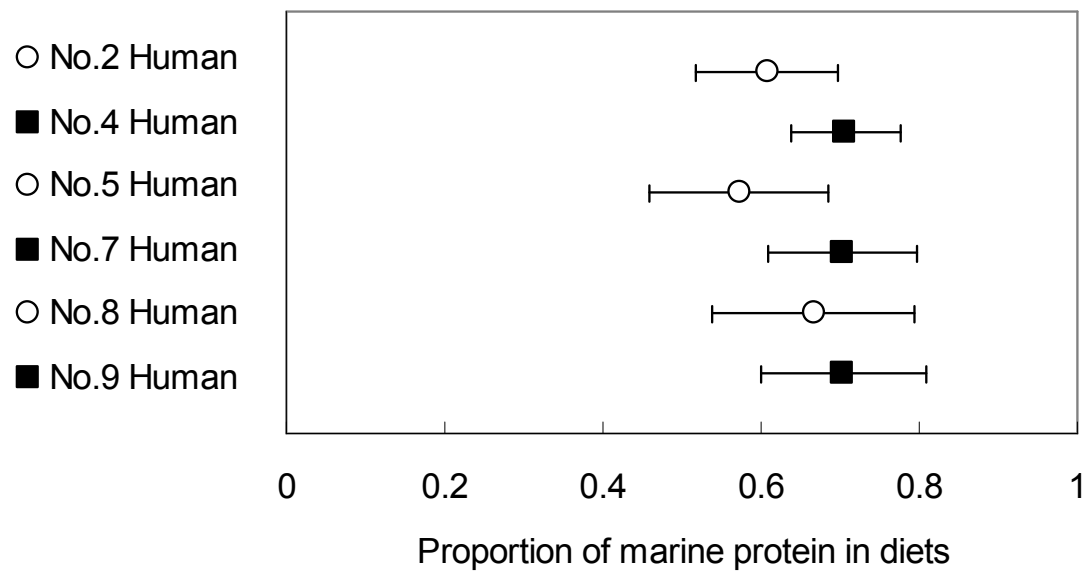


図 19. フェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ 値のみから推定した北黄金貝塚人の海産物摂取量。○は女性を、■は男性を表す。エラーバーは標準誤差（1SE）を示す。

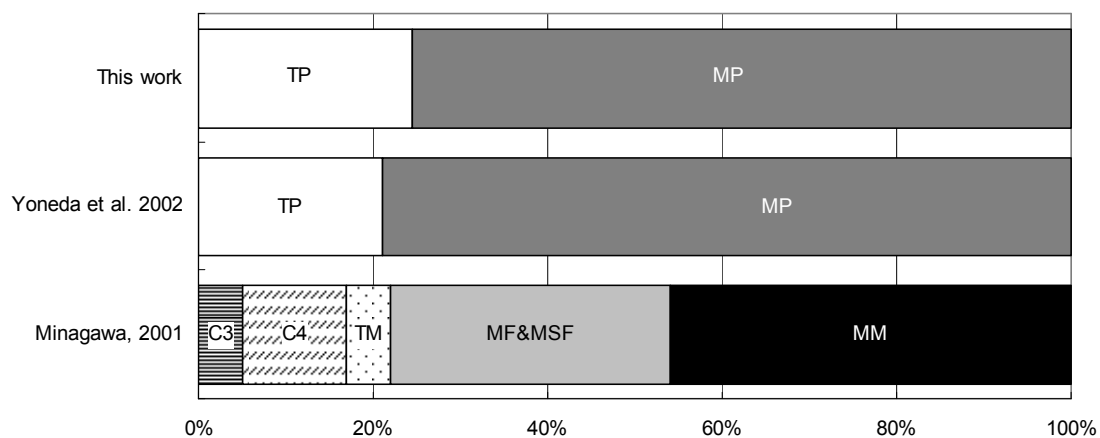


図 20. 先行研究および本研究における北黄金貝塚人の海産物摂取量推定値。TP: terrestrial protein, MP: marine protein, C3: C₃ plant, C4: C₄ plant, TM: terrestrial mammal, MF: marine fish, MSF: marine shell fish, MM: marine mammal をそれぞれ表す。

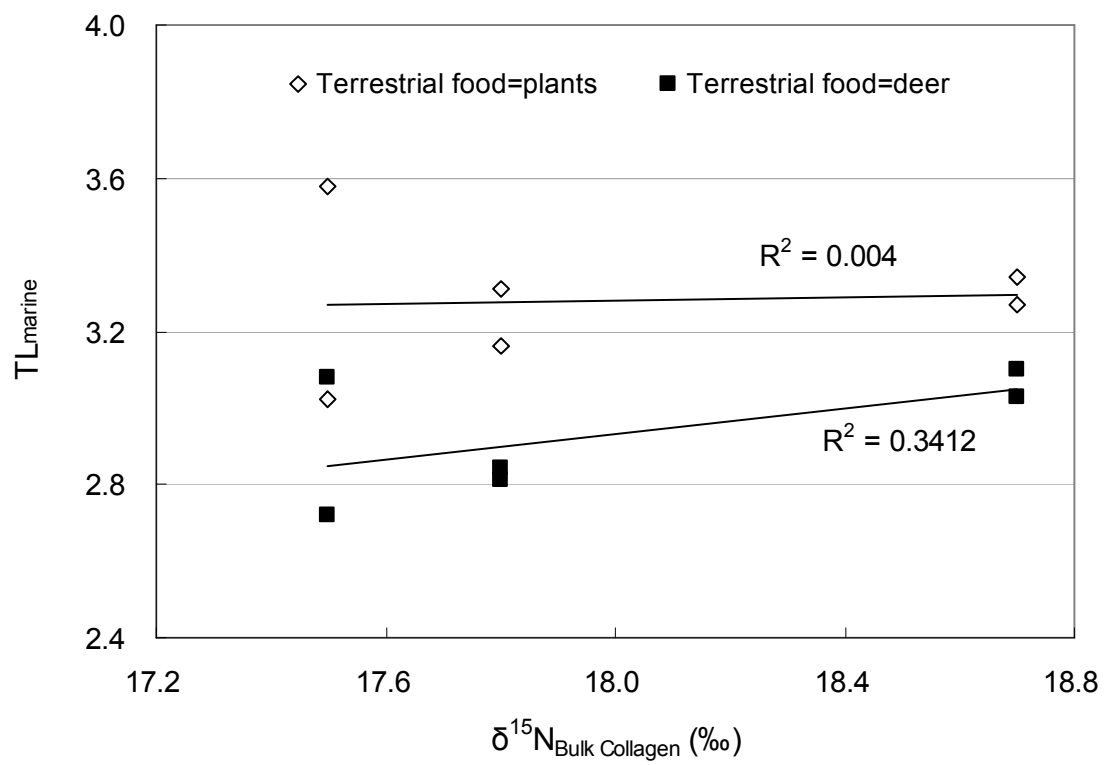


図 21. 人骨コラーゲンの $\delta^{15}\text{N}$ 値に対する海の食料の栄養段階 ($\text{TL}_{\text{海}}$)

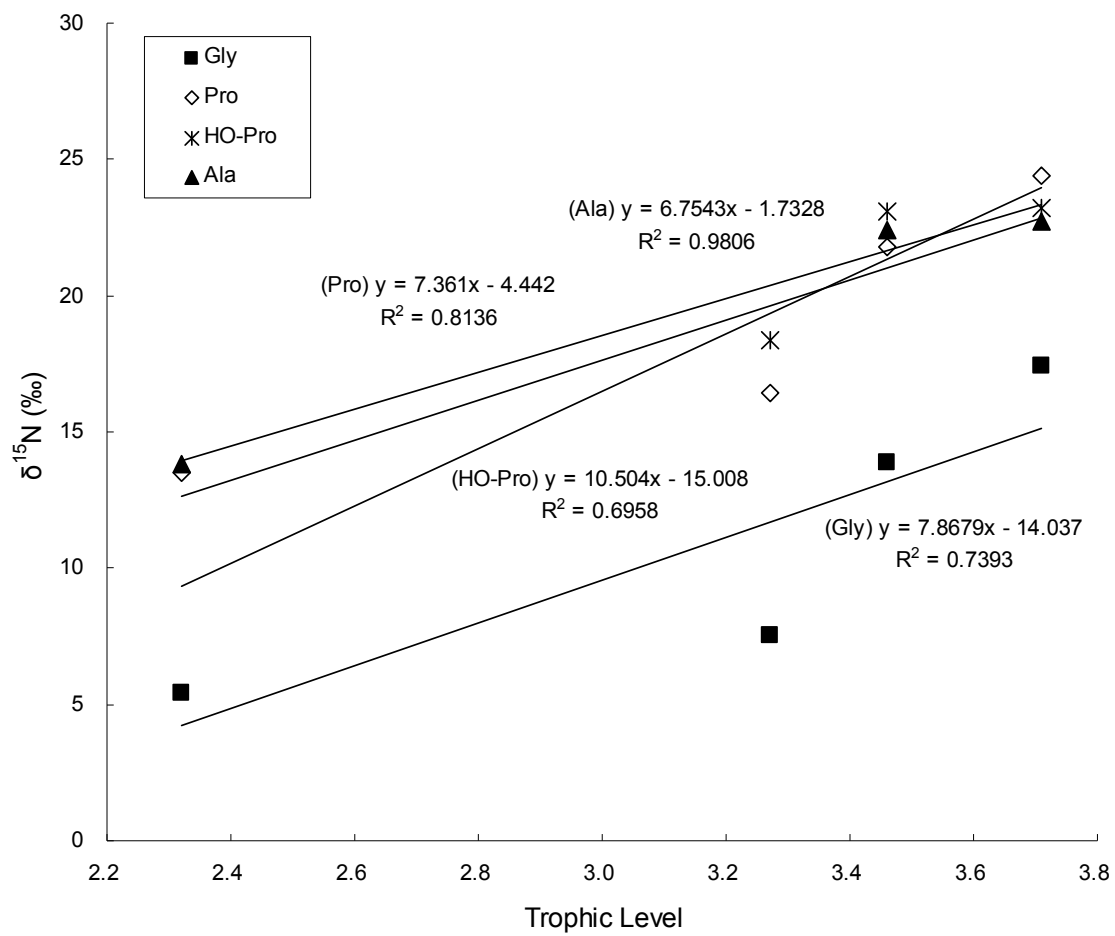
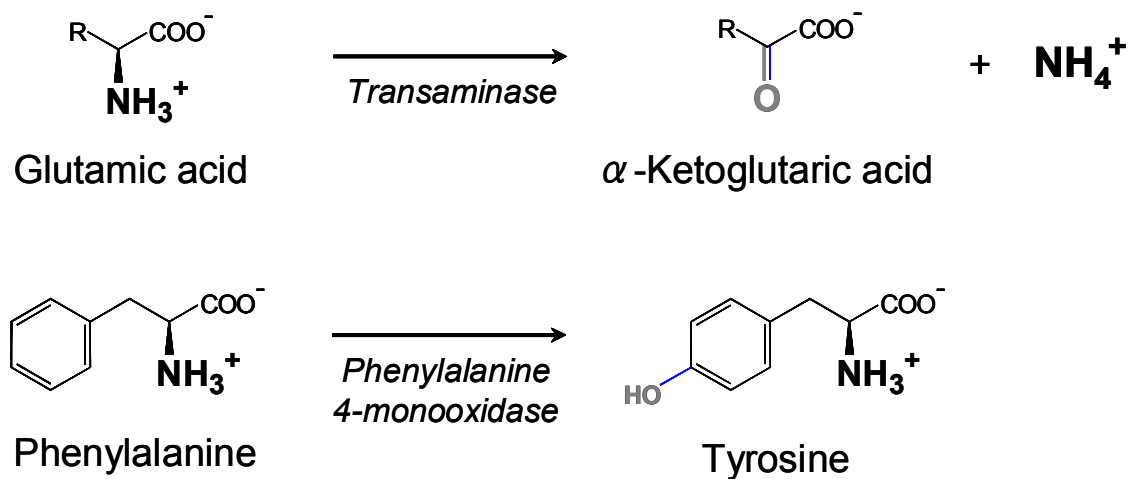


図 22. 海生動物試料の栄養段階 (TL) に対する各アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値。回帰直線とともに決定係数 (R^2) を示す。

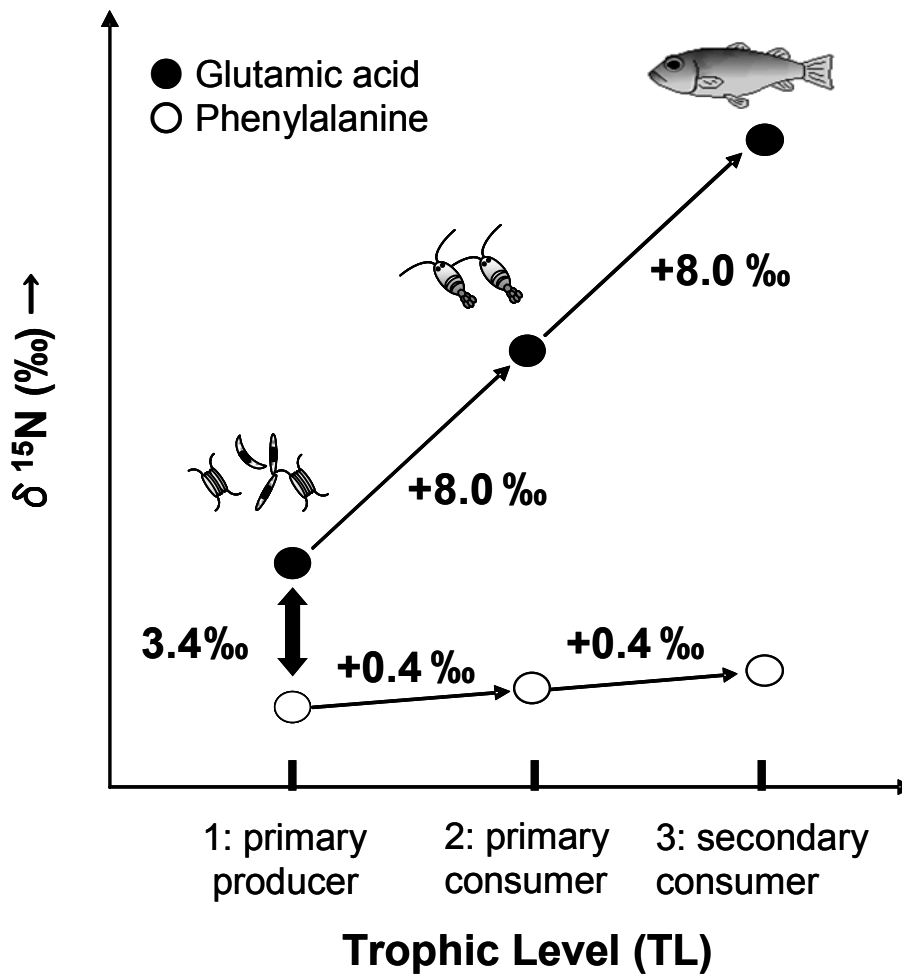
補遺

補遺-1. 頭髪—食物タンパク質間および骨コラーゲン—食物タンパク質間にみられる同位体濃縮効果

Reference	Subject	$\Delta_{\text{hair-dietary protein}} (\text{‰})$		$\Delta_{\text{collagen-dietary protein}} (\text{‰})$	
		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Chisholm et al. [42]	rat			4.5	
Hare et al. [54]	pig			1.4-3.2	2.2-2.3
Minagawa et al. [26]	human	1.4-2.0	4.3		
Ambrose et al. [1]	rat&mouse			0.5-4.6	3.0-4.0
Yoshinaga et al. [62]	human	1.8-4.8	5.0-6.9		
O'Connell et al. [60]	human	1.0-2.0	2.0-3.0		
Minagawa [25]	human	2.5	4.1	2.8	5.3
Nardoto et al. [81]	pig	0.2	2.7		



補遺-2. アミノ酸が代謝の初期に受ける酵素反応。グルタミン酸やその他の多くのアミノ酸はトランスアミラーゼによって C-N 結合が断たれ、アミノ基が遊離する。この時、軽い窒素同位体 (^{14}N) を含むアミノ基の方が熱統計力学的に反応しやすいため、アミノ酸プールに残って体組織に取り込まれるアミノ酸との間で大きな同位体分別が起きる。一方、フェニルアラニンやメチオニンなどの一部のアミノ酸は、代謝の初期にアミノ基の転移を受けないため同位体分別がほとんど起きない。



補遺-3. 海洋生態系における食物連鎖に沿ったアミノ酸窒素同位体比の上昇。濃縮率についてはグルタミン酸 (Glu) で $8.0 \pm 1.1\text{‰}$ 、フェニルアラニン (Phe) で $0.4 \pm 0.4\text{‰}$ と見積もられている (力石, 未発表データ)。また、1 次生産者 (栄養段階=1) におけるグルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比の差は、およそ 3.4‰ と推定されている [35]。

補遺-4a. ENVRERA プロジェクトにおける各国の食事調査概要。Survey data: 直接秤量データ, FFQ data: 摂取頻度データ, Recall method: 24 時間思い出し法をそれぞれ表す。

Country	Subjects	Survey data	FFQ data	Other method	Food samples
Papua New Guinea	12house hold	○	—	—	○
Indonesia	15house hold	○	○(all subjects)	—	○
Bangladesh	all subjects	—	○	—	○
Vietnum	—	—	—	—	—
Nepal	?	—	—	Recall method	—

○: available

補遺-4b. 食物摂取頻度調査に用いた質問紙表

Food Frequency Questionnaire House No.: _____ Name: _____ Age: _____ M / F

For each food listed, check (✓) the box indicating the frequency, **on average**, you have eaten/bought **during the last one month**.

	FOOD	MAIN SOURCE A=Make by themselves B=Given by others C=Buy in the village shop D=Buy in the city market	6 + per day	4-6 per day	2-3 per day	1 per day	5-6 per week	2-4 per week	1 per week	1-3 per month	Almost never	Size	Price
EATING	Rice												
	Potato												
	Tofu / Tempe												
	Vegetables (fresh)												
	Vegetables (cooked)												
	Fruits (indigenous)												
	Fruits (nonnative)												
	Egg												
	Salted fish												
	Freshwater fish												
	Sea fish												
	Chicken meat												
	Beef												
	Goat meat												
	Duck meat												
	Noodle												
	Tea / Coffee												
	Milk												
	Meat ball												
	Fried sweets												
	Bread												
	Snacks												
	Freshwater snail												
	Water grass												
	Leaves												
	Oranges / Grapes / Apples												
BUYING	Rice												
	Flour												
	Sugar												
	Cooking oil												

補遺-5. 濃度加重線形計画法の原理

f_i ($i=1\dots n$) を利用食物の割合、 $a_i \cdot b_i$ をそれぞれ i 番目の食物の炭素・窒素同位体比、また $\delta^{13}\text{C}_{\text{diet}} \cdot \delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$ を利用食物全体（食事）の炭素・窒素同位体比とすると、

$$a_1f_1+a_2f_2+\dots+a_if_i+\dots+a_nf_n = \delta^{13}\text{C}_{\text{diet}} \quad (1)$$

$$b_1f_1+b_2f_2+\dots+b_if_i+\dots+b_nf_n = \delta^{15}\text{N}_{\text{diet}} \quad (2)$$

$$f_1+f_2+\dots+f_n = 1 \quad (3)$$

$$f_i (i=1\sim n) > 0 \quad (4)$$

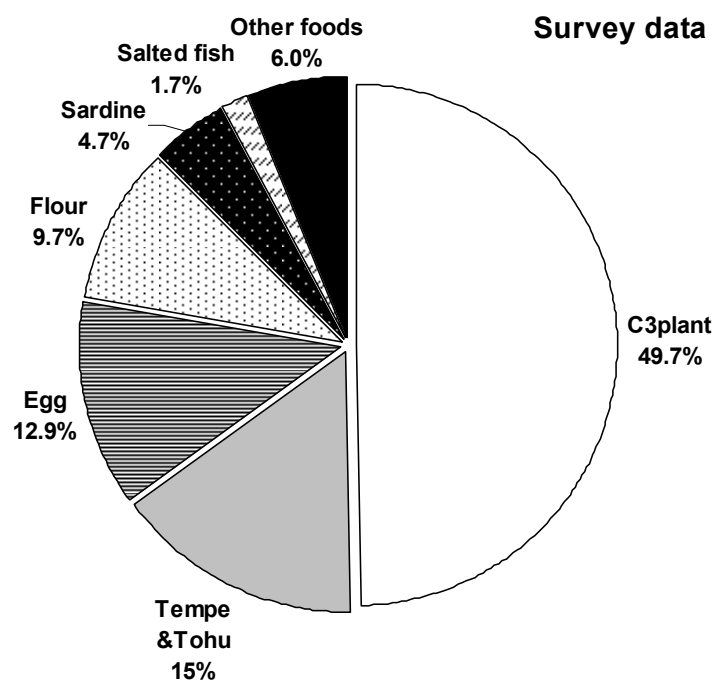
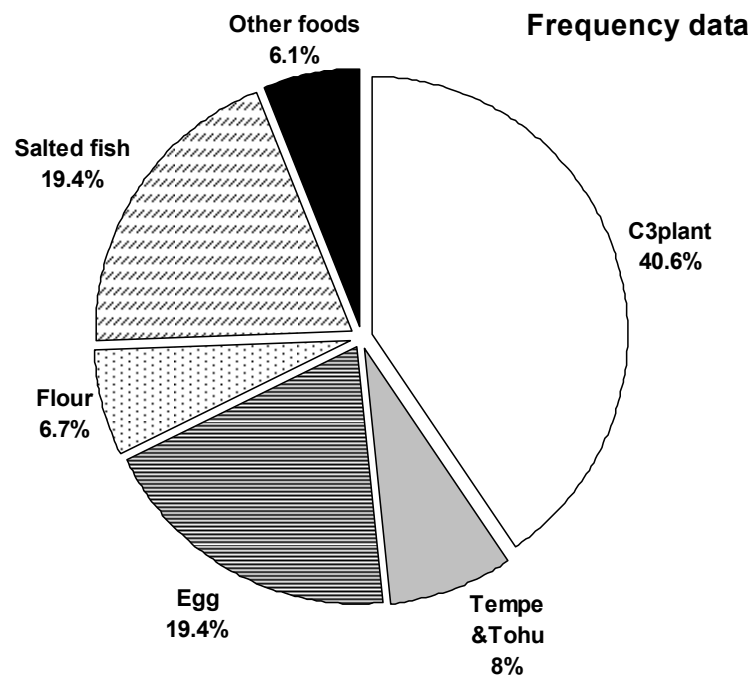
が成り立つ。食物の利用割合が負の値をとることはないため、不等式(4)は自明である。この条件下で、Microsoft Excel の“ソルバー機能”などを用いて利用割合 f の最大最小値を導く手法が従来の線形計画法である [28]。

本研究では、利用食物の同位体比を説明する上記の等式(1)~(3)および不等式(4)に加え、利用食物の元素濃度 ($[C] \cdot [N]$) を説明する等式を新たに考案した。 i 番目の食物の炭素濃度・窒素濃度（モル%）を $[C]_i \cdot [N]_i$ とすると、

$$\Sigma (X_i / \Sigma X_i) = 1 \quad (i = 1\dots n) \quad (5)$$

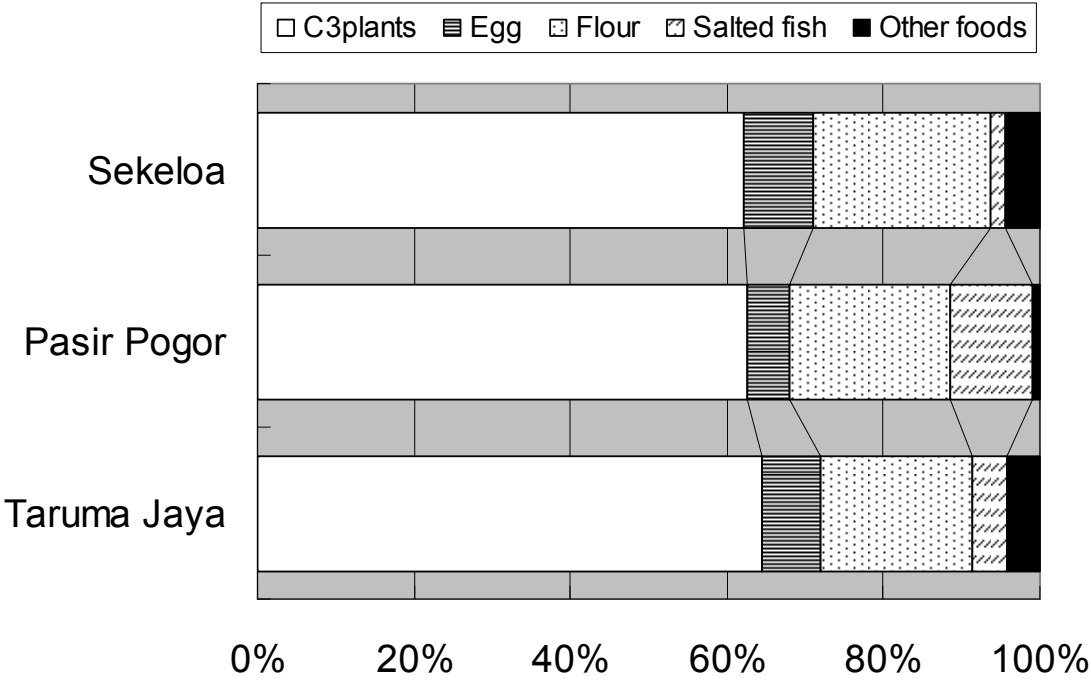
$$X = (f_i * [N]_i) / [C]_i$$

が成り立つ。以上の式(1)~(5)の条件下で、線形計画法と同様にソルバー機能を用いて f の最大最小値を導くことができる。本研究では、この手法を濃度加重線形計画法（Concentration-Weighted Linear Programming Method: CWLP 法）と呼ぶことにする。

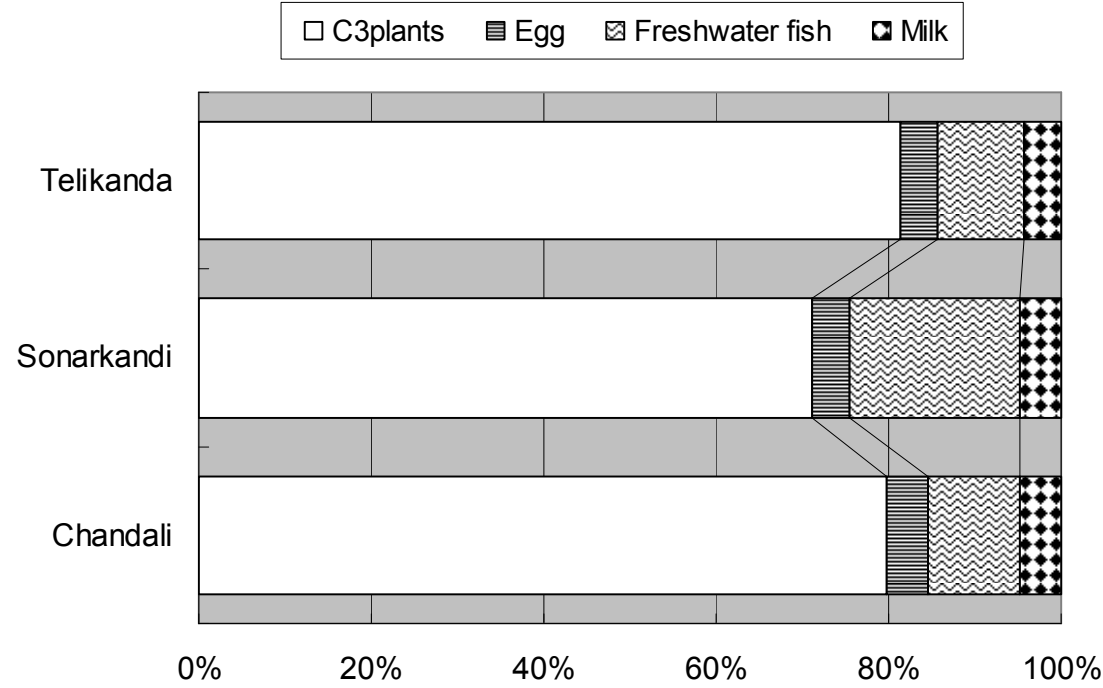


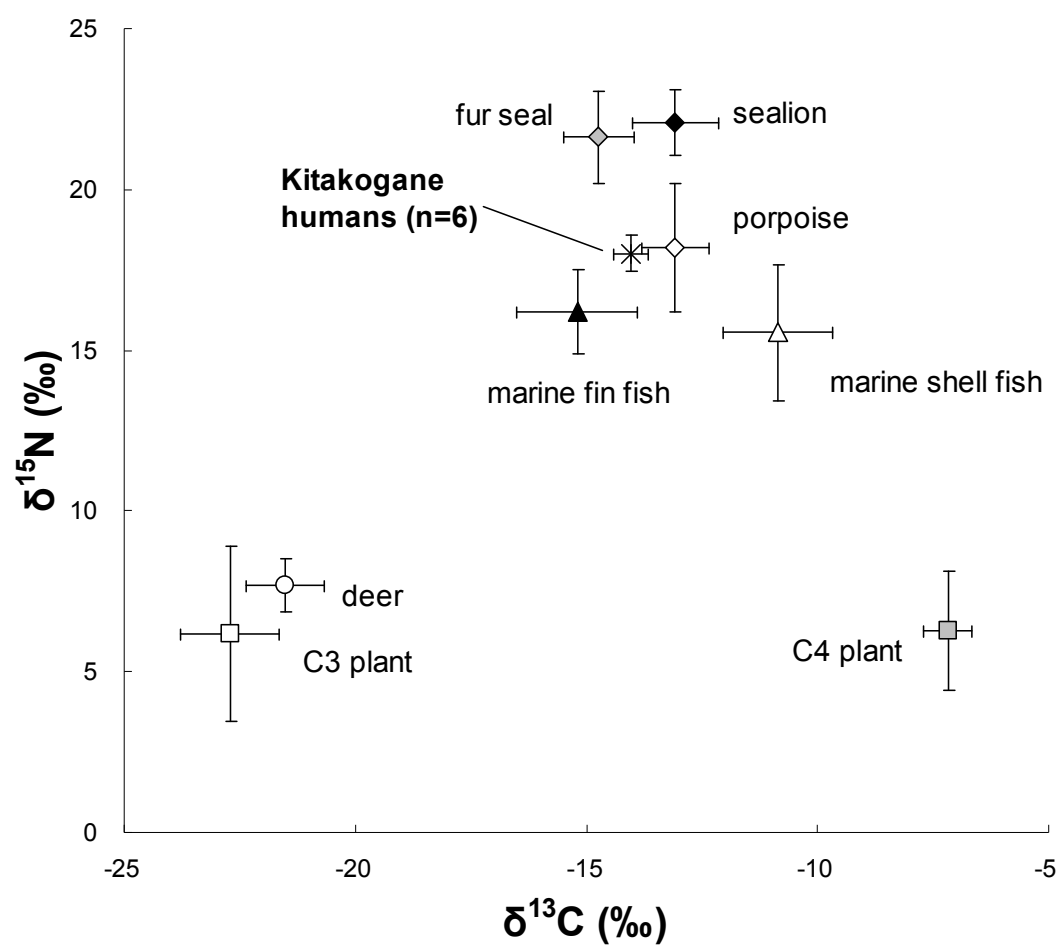
補遺-6. IT106 被験者の食物摂取量内訳。グラフはタンパク質源としての各食物グループの相対摂取量を示す(関山, 未発表データ)。Frequency data: 摂取頻度調査データ, Survey data: 直接秤量データ。

補遺-7. インドネシア 3 地域集団を対象とした食物摂取頻度データ（関山，未発表データ）。週に 1 回以下の頻度で利用される食品についてはデータから除いた。



補遺-8. バングラディッシュ 3 地域集団を対象とした食物摂取頻度データ（稲岡，未発表データ）。週に 1 回以下の頻度で利用される食品についてはデータから除いた。

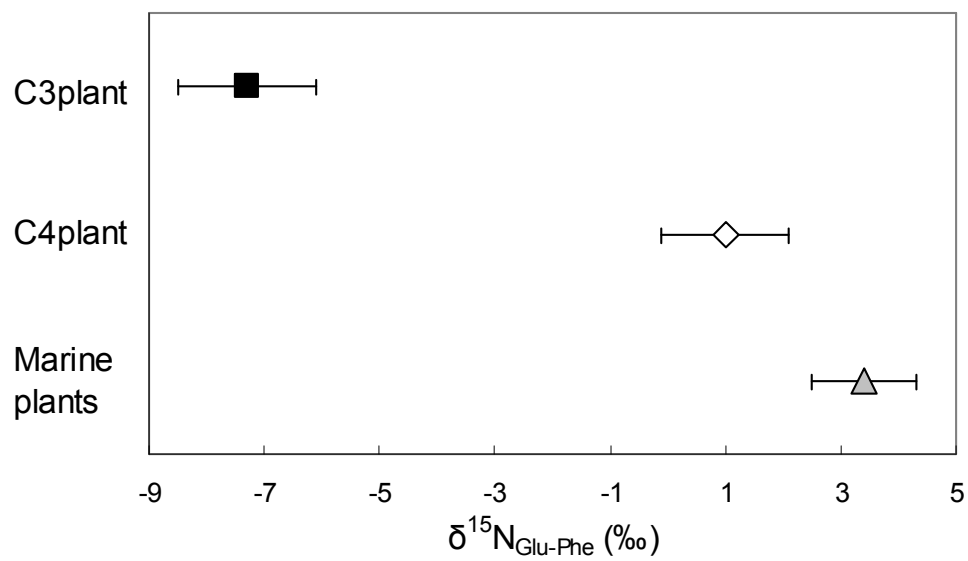




補遺-9. 北黄金貝塚人骨と利用食物の炭素・窒素同位体比

補遺-10. 北黄金貝塚動物骨出土状況（鵜澤 [58] より抜粋）。1: Number of identified specimen（種および部位レベルで同定可能な破片数）、2: Minimum number of individuals（最小個体数）をそれぞれ表す。

	Total	Callorhinus	%	Cervus	%	Zalophus	%	Delphinids	%	Canis	%
NISP ¹	709	609	86	40	6	14	2	22	3	24	3
MNI ²	36	22	61	5	14	4	11	2	6	3	8



補遺-11. 生産者に見られる $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu-Phe}}$ 値の変動（力石, 未発表データ）。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu-Phe}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ で定義される。エラーバーは1標準偏差を表す。

補遺-12. 海の食料の栄養段階 (TL_海) とその割合 (F) の導出

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{HG}} = \{a + \alpha(x-1)\} * F + \{c + \alpha(y-1)\} * (1-F) + \alpha \quad \dots \textcircled{1}$$

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{HP}} = \{b + \beta(x-1)\} * F' + \{d + \beta(y-1)\} * (1-F') + \beta \quad \dots \textcircled{2}$$

x : TL_海, y : TL_陸, F : 海産物の割合, α : $\Delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ (+8.0), β : $\Delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ (+0.4)

a : 海の生産者 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$, b : 海の生産者 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$, c : 陸の生産者 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$,

d : 陸の生産者 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$. F=F' と仮定する (表 12 参照)。

{a + $\alpha(x-1)$ } と {c + $\alpha(y-1)$ } は式 (B-1) における $\delta^{15}\text{N}_{\text{MG}}$ と $\delta^{15}\text{N}_{\text{TG}}$ にそれぞれ対応する。

* 海の生産者の $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ 値は、それぞれの海生動物において

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - \Delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} * (\text{TL}_{\text{animal}} - 1)$$

で導いた値を平均することで算出した (図 16)。TL の推定については「方法の原理」で説明した式 (A) を用いてなされた。海の生産者の $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ 値は、海の生産者 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ に+3.4‰することで得られた。陸の生産者の $\delta^{15}\text{N}_{\text{amino acid}}$ は、シカ (ATL=2 と仮定) の値から Δ 値を引くことで算出した (図 17)。

このとき、①と②の連立方程式を F について解くと、

$$F = (\alpha * \delta^{15}\text{N}_{\text{HP}} - \beta * \delta^{15}\text{N}_{\text{HG}} + \beta c - \alpha d) / \{(c - a) * \beta + (b - d) * \alpha\}$$

となり、F は TL_海・TL_陸 と関係なく濃縮率 Δ と陸海の生産者の $\delta^{15}\text{N}$ 値で定まる。また、TL_海 と TL_陸 はどのアミノ酸を用いても下記の一次関数の関係となり (F は一定)、どちらか一方を固定しなければ x(y) について解けない。

$$x = \{\delta^{15}\text{N}_{\text{HG}} + (c - a) * F + (F - 1) * \alpha y - c\} / (\alpha f) \quad \text{あるいは}$$

$$x = \{\delta^{15}\text{N}_{\text{HP}} + (d - b) * F + (F - 1) * \beta y - d\} / (\beta f)$$

本研究では、陸の食料を生産者 (TL_陸=1) あるいはシカ (TL_陸=2) で代用することで y の値を固定し、x (TL_海) を導いた。

補遺-13. 植食動物（動物プランクトン・貝類）における各アミノ酸の窒素同位体濃縮効果（引用文献 [35]より抜粋）

	$\delta^{15}\text{N}_{\text{consumer}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{prey}} (\text{‰})$
Alanine	6.2 ± 1.9
Glycine	3.2 ± 2.3
Valine	4.7 ± 1.8
Leucine	4.5 ± 2.6
Isoleucine	4.7 ± 2.2
Proline	5.5 ± 1.7
Serine	3.2 ± 3.5
Glutamic acid	7.6 ± 1.4