

中間とりまとめ素案

目次

1. はじめに
 1. 1 本検討会の背景・目的
 1. 2 本資料の構成

2. 同位体比分析について
 2. 1 同位体比分析の基本
 2. 2 主な同位体元素の特徴

3. 同位体比分析の応用例
 3. 1 ^{14}C 年代測定
 3. 2 食品・添加物（起源や産地の判定）の識別法
 3. 3 禁止物質によるドーピングの識別法

4. 同位体比分析の活用に向けて
 4. 1 同位体比分析の活用に向けた課題
 4. 1. 1 遺骨鑑定プロセスの現状
 4. 1. 2 現時点において考えられる主な課題
 4. 1. 3 今後の方針
 4. 2 活用のための方策

5. おわりに

構成員名簿

4. 1. 2 現時点において考えられる主な課題

同位体比分析を戦没者遺骨へ応用するにあたっては、検討が必要な事項もあると考えられるところ、同位体比分析をどのように活用するのか、活用するためにクリアすべき課題はどういったことがあるのか、整理が必要。

現時点において考えられる主な課題としては、以下のとおり。

- 1 品質管理に資するため、検体処理に関する標準作業手順書（SOP：Standard Operating Procedure）の作成（前処理から試料分析に至るプロトコル）が必要ではないか。

(1) コラーゲン分析（炭素、窒素、酸素、硫黄）

ア 前処理（骨、歯象牙質からのコラーゲン抽出）

試料の切り出し、クリーニング、有機物除去、脱灰、ゼラチン化、凍結乾燥、秤量及び梱包

【課題】防衛医科大学で実施しているプロトコルの妥当性（別添1）

イ 分析

炭素・窒素安定同位体比分析（CN-IRMS）、硫黄安定同位体比分析（S-IRMS）、放射性炭素年代測定（AMS）による分析手順（試料調整、機材設定条件、精度管理、計測値補正方法等）

【課題】品質確保のため、標準品の管理はどのように行うべきか。

(2) アパタイト分析（ストロンチウム、酸素）

ア 前処理（骨、歯エナメル質に含まれるアパタイトの精製）

試料切出し、クリーニング、有機物除去、脂質除去、非アパタイト鉱物の除去

【課題】防衛医科大学で実施しているプロトコルの妥当性（別添2）

イ 分析

各種含有元素濃度分析装置（ICP-MS）、ストロンチウム、鉛安定同位体比分析（ICP-MS、マルチコレクターICP-MS）、酸素同位体比分析（炭酸塩・リン酸塩-IRMS）による分析手順（試料調整、機材設定条件、精度管理、計測値補正方法等）

【課題】品質確保のため、標準品の管理はどのように行うべきか。また、ストロンチウムの分析法について、標準的な分析法を確認する。

2 年代測定判定及び所属集団判定に資するためには判定基準が必要ではないか。

(1) 年代測定（古墓由来遺骨判定）における判断基準

現状、沖縄収容遺骨における古墓由来か否かの判定は、放射性炭素年代測定、安定同位体比分析の他、戦史情報（住民証言を含む）、収容場所、収容状況、形質鑑定の結果をみて総合的に行っている。

ア 放射性炭素年代測定

収容状況から戦没者であると考えられるものの遺骨から得られた¹⁴C年代測定をもとにした判定

【課題】

判断基準の妥当性について、沖縄ではこれまで収容された确实戦没者遺骨の¹⁴C年代値をもとに、古墓由来と推定する（暫定）基準として原則**300BP**以上を用いることの是非。

イ 炭素・窒素安定同位体比分析（食性分析）

現代日本人毛髪（Homogeneous diet of contemporary Japanese inferred from stable isotope ratios of hair（髪の毛の安定同位体比から明らかとなった現代日本人の均質化した食性）、研究用歯牙（防衛医科大学）、収容状況から戦没者であると考えられるものの遺骨（琉球大学鑑定）、考古学的調査で得られた古人骨から得られた $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ の分布域を参考にしている。

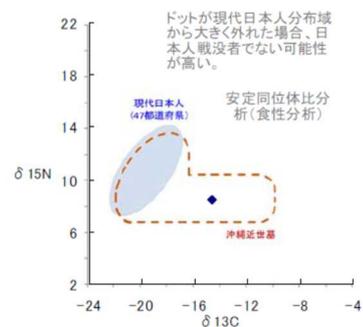
【結果例】

例1 古墓由来と推定された例

安定同位体比分析 (食性分析)	$\delta^{13}\text{C}$ <input type="text" value="-14.7"/> $\delta^{15}\text{N}$ <input type="text" value="8.5"/> C/N比:
14C年代測定	731 ± 21 BP 0 - 300BP: 戦没者or古墓骨 300BP以上: 古墓骨

判定: 古墓由来のものとして推定される

分析機関

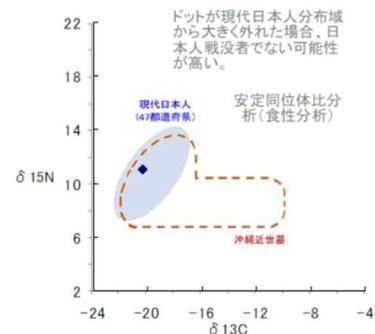


例2 古墓由来でないとして推定された例

安定同位体比分析 (食性分析)	$\delta^{13}\text{C}$ <input type="text" value="-20.35"/> $\delta^{15}\text{N}$ <input type="text" value="11.02"/> C/N比:
14C年代測定	200 ± 21 BP 0 - 300BP: 戦没者or古墓骨 300BP以上: 古墓骨

判定:

分析機関



(2) 所属集団判定における判断基準

日本人の各種元素の安定同位体比の分布域を把握し、そこから外れるものについては日本人遺骨である蓋然性が低いと判断する。

ア コラーゲンの場合

イ アパタイトの場合

【課題】標準化に向けて基準の考え方

- ・各元素の安定同位体比を判定基準とする場合の値設定をどのようにするか。
- ・多元素を用いた多変量解析の導入が可能か、可能な場合値設定をどのようにするか。

4. 1. 3 今後の方針

(1) 検体処理に関する SOP の作成について

- ・標準品の管理 等

(2) 判定基準について

- ・判定基準の信頼性 等

(3) 委託研究、厚労科研費研究等の活用

- ・特定地域における同位体比分析結果の検証
- ・各種文献調査
- ・研究用歯牙の収集 等

コラーゲンの抽出について

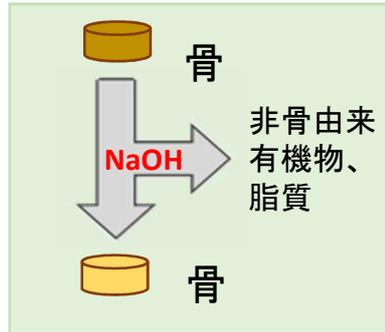
別添 1

1 試料切り出し、クリーニング

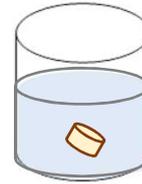


グラインダーで表面を一層除く
炭素窒素分析 0.4mg
硫黄分析 8mg

2 有機物除去(1回目)

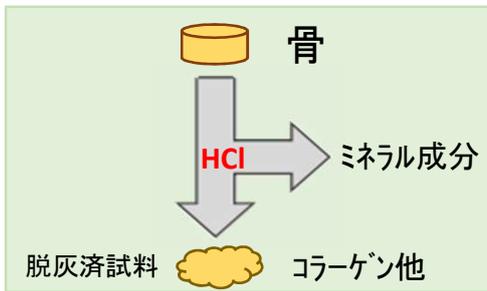


アルカリ溶液で非骨由来の有機物、脂質を除去

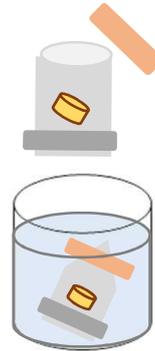


試料を超音波洗浄後に **0.2 M の NaOH** 水溶液に一晩浸けて脂質やフミン酸、フルボ酸を除去し、純水で洗った後、冷凍乾燥する。

3 脱灰 酸で骨中ミネラル成分を溶かし出す。

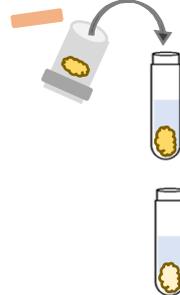
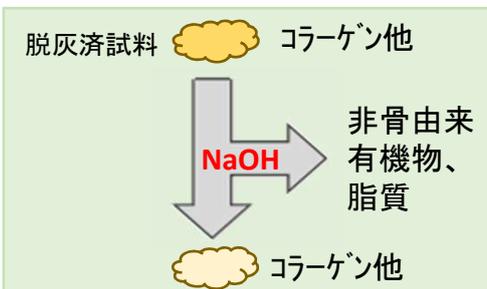


試料をセルロース膜にいれる。



1 M の HCl 水溶液500ml 中で一晩かけて攪拌しながら脱灰(冷蔵庫内)

4 有機物除去(2回目) アルカリ溶液で非骨由来の有機物、脂質を除去

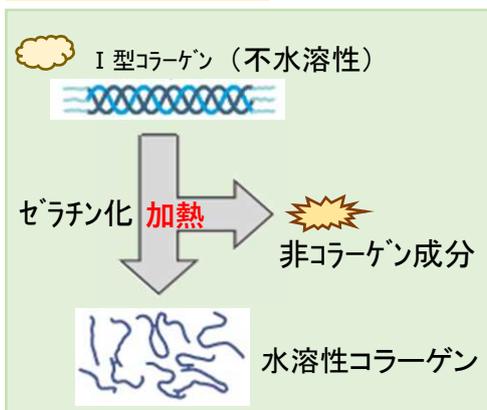


脱灰済試料 を遠沈管へ移す

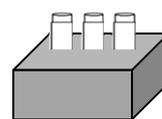
純水で洗い遠心分離後、上澄み溶液を捨て、沈殿物に **0.2 M の NaOH** 水溶液を加える。10分間攪拌転倒、遠沈、上澄み除去

希塩酸(pH3)で中和、遠沈、上澄み除去後、**希塩酸(pH3)**中で保存。

5 ゼラチン化 コラーゲンを加熱し、水に溶け出させる。



脱灰及び非骨由来の有機物、脂質を除いた試料 (不溶性コラーゲンを含む、希塩酸中で保存)



ブロックヒーターで90度12時間熱する。加熱によりゼラチン化(コラーゲンの水溶性化)させ、コラーゲンを水に溶け出させる。

ガラスフィルターで吸引濾過し、コラーゲン水溶液のみを分離。

6 凍結乾燥 冷凍乾燥により、水分を除く

コラーゲン水溶液から水分を除き、コラーゲンのみを単離し秤量する。

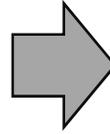


骨・象牙質のアパタイト精製について

別添 2

1 試料の切り出し

チタン製粉碎カプセル

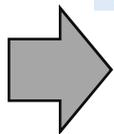


Sr分析 1~2mg
炭酸塩CO分析 0.5~1mg
リン酸塩CO分析 5~10mg

2 脂質除去

測定値には影響は少ないが、測定機材の保護のために行う

アセトン
1ml
2回

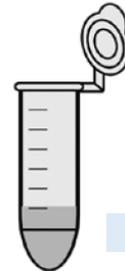
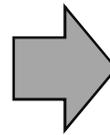


転倒攪拌、振動攪拌後、
常温1晩



翌日、遠沈→
液交換→攪拌
→遠沈、排液

計 2回洗浄

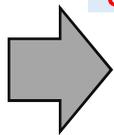


自然乾燥

3 有機物除去

骨、象牙質に含まれるコラーゲン等の有機物を除くために行う

4% NaOCl
1ml
3回

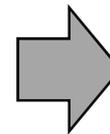


振動攪拌20分(サイクロン状態攪拌)
→遠沈→液交換



液交換時に泡がでるか否かが有機物残存の目安となる

3回目は排液前に
一晩常温でおく

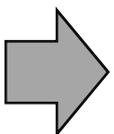


純水による洗浄
3回

4 非アパタイト鉱物の除去

土中で受けた続成作用の除去のために行う

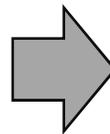
酢酸バッファー
3回



転倒攪拌又は振動攪拌



回数やりすぎると溶解による試料ロスが多くなる(3回まで)



純水による洗浄
3回