

象牙を用いた炭素・窒素安定同位体分析によるアフリカゾウの原産地判別の試み

石橋 浩¹⁾, 武内孝之²⁾, 小池裕子¹⁾

1) 九州大学大学院比較社会文化研究科
810-8560 福岡市中央区六本松 4-2-1
TEL & FAX 092-726-4611

2) 京都大学原子炉実験所
590-0494 大阪府泉南郡熊取町大字野田 1010
Tel: 0724-51-2457

1. はじめに

1970～1980年代の象牙の過大な需要がアフリカゾウ *Loxodonta africana* の減少を招いた。そのためアフリカゾウは、1989年10月の第7回ワシントン条約締結国会議においてCITES 付属書 I に掲載され、象牙の商取引が全面的に禁止された。1997年の第10回締約国会議では南アフリカ3ヶ国（ボツワナ・ナミビア・ジンバブエ）に関しては商取引管理体制の整備などの付帯条件を満たすことを前提として、1999年9月18日から付属書 II 移行することになり、昨年末これら南アフリカ3ヶ国から日本へ象牙が輸入された。象牙の正常な商取引をモニタリングする上からも、象牙の原産地判別技術を確立することは重要な事項と考えられている。アフリカゾウの象牙の原産地を推定する試みとして、我々はこれまでに、炭素・窒素安定同位体質量分析法 (Ishibahshi et al., 1999)、中性子放射化分析法 (Takeuchi et al., 1996)、DNA分析法 (Koike et al., 1998) を試みてきた。

象牙コラーゲンの安定同位体比は、ゾウの食物となった植物の安定同位体比を反映する。森林樹木や大半の栽培植物が属するC3植物の $\delta^{13}\text{C}$ 値の平均はおおよそ -26.5% 、乾燥地の草本植物に多いC4植物の $\delta^{13}\text{C}$ 値の平均はおおよそ -12.5% となる。コラーゲン蛋白はその動物体より約 $+3.5\%$ ずれた値となるので、象牙コラーゲンの $\delta^{13}\text{C}$ 値から食物とした植物の $\delta^{13}\text{C}$ 値を推定するには、動物体と食物との差 $+1\%$ にコラーゲンの差 $+3.5\%$ を加えた $+4.5\%$ の補正が必要であるということになる。Vogelら(1978a)によれば、南アフリカの植生はケープタウン近辺の湿潤した西南地域と、乾燥した東部及び島嶼地域に分けられ、前者にはC3植物(-26.5%)が、後者にはC4植物(-12.5%)が多く分布する。Vogel et al. (1990) およびvan der Merwe et al. (1990)によると、C3植物を主な食物とする草食動物の $\delta^{13}\text{C}$ 値は -21.5% であり、C3植物および部分的にC4植物にも依存している草食動物の $\delta^{13}\text{C}$ 値はそれより高いと考えられる。一方、窒素安定同対比 $\delta^{15}\text{N}$ については、さまざまな意見があるが、一例としては、Heatonら(1986)は、乾燥した環境に置かれると $\delta^{15}\text{N}$ 値が増加すると報告している。

そこで我々は、(1) 原産国既知の象牙試料を用いて、アフリカ全体の $\delta^{13}\text{C} \cdot \delta^{15}\text{N}$ の地理的分布を調べる、(2) 南アフリカのクルーガー国立公園の象牙試料を用いて、生息環境

のデータと比較する，（3）象牙年輪が明瞭に観察できる大型象牙試料を用いて，季節的変動をみようとした。

2 分析試料

原産国既知の象牙試料は、東京象牙美術工芸協同組合および大阪象牙美術工芸協同組合から提供された象牙試料(81点)で、その内訳は中央アフリカ諸国(コンゴ， ガボン， ザイール)49試料，東アフリカ諸国(ジブチ， エチオピア， スーダン) 4試料，南アフリカ諸国(モザンビーク， ボツワナ， ジンバブエ， ザンビア， 南アフリカ共和国) 221試料である (Table 1) . 後者のうち194試料は， 南アフリカのクルーガー国立公園の象牙保管庫に保管されていた象牙試料で1995年2月に得た81試料と， 後述の1997年5月に得た113試料である。

生息環境との比較に用いられた象牙試料は， 1997年5月に南アフリカのクルーガー国立公園を訪れ， 同国立公園のアフリカゾウの専門家であるDr. Ian Whyteらの協力で象牙保管庫に保管されていた象牙から得た113試料である。これらの象牙試料は， 1995年5月～7月にかけて国立公園内でカーリングされた個体で， Pafuri, Punda Maria など北部地域から4群， Malelane, Sukukuz a, Sabie, Crocodile Bridge など南部地域から11群の計15群で構成されている。これらの15群は採取地点に関しては， 植生， 平均雨量， 土壌タイプが知られている (Table 2) .

また年輪変動に用いられた大型象牙試料は， 象牙加工業者の間でハードタイプとソフトタイプと呼ばれるもので， 前者が森林タイプ， 後者がサバンナタイプだと言われている。分析試料として，ハードタイプの象牙試料から3回の透明帯とその間の3回の不透明帯の合計6試料を，ソフトタイプから4回の透明帯とその間の3回の不透明帯の合計12試料を採取した。

3 分析方法

ダイヤモンドディスクを着装したデンタルドリルを用いて， 各象牙試料の内面を約50 mg削り取った。その粉末試料をチューブに移し， 0.1N HCl 溶液 10mlを加え， 遠心しながらコラーゲンを沈澱させた後， 上澄み液を廃棄した。この操作を3回以上行い， 充分象牙試料を脱灰した。次にコラーゲンを含む残液に蒸留水を加え脱塩した。この操作を少なくとも3回以上，コラーゲンが疎水性になるまで繰り返し洗浄した。その後 -80℃の冷凍庫に約30分間入れ予備凍結を行った後， 凍結乾燥機で1昼夜凍結乾燥を行った。

$\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ 値の測定には，コラーゲン0.7mgを正確に秤量し，これを5x8mmのすずカプセルに封入して分析試料とした。今回の $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ 値の測定は，ANCA-MASS 2020 (Europa Scientific社)を用い，各象牙試料につき炭素・窒素各2回の測定を行いその平均値をもって測定結果とした。これらの象牙試料から抽出されたコラーゲンの精製状況を見るため，各試料の% C (Total ^{12}C)と% N (Total ^{15}N)の値を確認した (Fig. 1) . % Cは42-55%， % Nは15-19%に集中し， 回帰直線上にのっていることから，コラーゲン蛋白としてよく精製されていると考えられる。

4 原産国既知の象牙試料による地理的変動

原産国別の象牙試料コラーゲンの $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ 分布をFig. 2に示す。中央アフリカ諸国(コ

ンゴ, ガボン, ザイール)と, 南アフリカ諸国(モザンビーク, ボツワナ, ジンバブエ, ザンビア, 南アフリカ共和国)の $\delta^{13}\text{C}$ 値は, それぞれ $-26.1 \pm 1.6\%$, $-19.6 \pm 1.6\%$ で, それぞれ森林系・サバンナ系に由来すると考えられる明瞭な差異が認められた. この $\delta^{13}\text{C}$ 値における地域差は, 中央アフリカ諸国は $-23 \sim -29\%$ の範囲に, 南アフリカ諸国は $-16 \sim -22\%$ の範囲にあり, 原産地判別として有効と考えられる.

Vogel(1978)及びvan der Merwe *et al.*(1990)によると, C3植物を主な食物とするゾウの $\delta^{13}\text{C}$ 値は -21.5% であり, 今回の南アフリカ諸国の $-16 \sim -22\%$ という $\delta^{13}\text{C}$ 値は, C4植物をかなり摂取していることを示した. 一方, 中央アフリカ諸国の $\delta^{13}\text{C}$ 値が, C3植物の -26.5% と比べると, かなり負に偏った値を示した. このことは, Vogel(1978)およびvan der Merwe *et al.*(1989)が示唆したように, 密閉した森林のような大気の循環の悪いところで CO_2 の $\delta^{13}\text{C}$ が濃縮され, その結果として -30% 以下の低い値を示すものが現れるものであり, このような $\delta^{13}\text{C}$ 値は森林タイプの特徴であるといえる.

5. クルーガー国立公園の象牙試料による生育環境との比較

南アフリカのクルーガー国立公園の象牙保管庫に保管されていた象牙118試料は, 成長面に関して分析試料をサンプリングし, 炭素・窒素安定同位体分析によって死亡直前の食性を調べた. これらの試料は, サンプリング地点によって15の群で構成されている.

年間降雨量との関係

クルーガー国立公園の地域は, 年間降水量によって $450\text{-}500\text{mm}$, $550\text{-}600\text{mm}$, $600\text{-}650\text{mm}$, $>650\text{mm}$ の4つの地域に大別されている. 分析された15の群の $\delta^{15}\text{N}$ 値 (Fig. 3) は, $>650\text{mm}$ の地域では平均 7.3% , $600\text{-}650\text{mm}$ の地域では平均 9.6% , $550\text{-}600\text{mm}$ の地域では平均 10.1% , $450\text{-}500\text{mm}$ の地域では平均 10.6% であった. このように年間降水量ごとにそれぞれは互いに有意な差が認められ, $\delta^{15}\text{N}$ 値が年間降水量の順に高くなる傾向が認められた.

Heatonら(1986)は, 乾燥した環境に置かれると $\delta^{15}\text{N}$ 値が増加することを報告しており, それと同様に乾燥した地域ではストレスなどにより $\delta^{15}\text{N}$ 値が高くなったと考えられる.

年間降雨量及び地質との関係

クルーガー国立公園の地域は, 地質によりBasalt, Sandvelt, Gabbro, Graniteの4つに大別されている. 分析された15の群の $\delta^{15}\text{N}$ 値 (Fig. 4) は, Basaltの地域では平均 10.2% , Sandveltの地域では平均 10.2% , Gabbroの地域では平均 10.1% , Graniteの地域では平均 9.0% であった. つまり Graniteと他のものとの間で有意な差が認められ, 他のものよりも高い値を示した.

6. ハードタイプ及びソフトタイプ象牙に見られる季節的変動

アフリカゾウの象牙年輪年輪ごとの $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ 値をFig.5に示す.

ハードタイプ象牙については年輪による $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ 値の大きな変動は認められなかった.

$\delta^{13}\text{C}$ 値はいずれも-24%付近を示し、C3植物(-26.5%)を食する際のコラーゲンの値(-21.5%)よりも低い値を示し、原産国別象牙試料の $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ 分布で述べたように、森林タイプの特徴を示した。

一方、ソフトタイプ象牙年輪については、 $\delta^{15}\text{N}$ 値の大きな変動は認められなかったが、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は年輪の透明帯と不透明帯とで値が変動した。不透明帯は解剖学的に成長が早い部分といわれているが、その不透明帯の $\delta^{13}\text{C}$ は-19%付近の値で、C3植物を食する際のコラーゲンの値(-21.5%)にほぼ近いものとなっている。透明帯は成長が遅い部分と考えられ、おおよそ-16%付近の値をとった。このように解剖学的に成長遅延帯といわれている透明帯の方が不透明帯に比べ $\delta^{13}\text{C}$ 値が高くなっていることから、透明帯はC4植物をより多く摂取する乾燥期すなわち、冬季に相当すると考えられる。

象牙のアイソトープ分析はアフリカゾウの原産地判別に有用な情報を与えるばかりでなく、そのゾウの生育していた環境をモニタリングする有用な手法として進展が期待される。今後さらに分析例を増やし環境モニターとして検討を重ねたい。

引用文献

- Heaton, Tim H. E., John C. Vogel, Gertrud von la Chevallerie and Gill Collett (1986) Climatic influence on the isotopic composition of bone nitrogen. *Nature* **322** : 822-823
- Ishibashi, H., T. Takeuchi, I. Whyte and H. Koike (1999) $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ measurements from the African elephant, *Loxodonta africana*, used for ivory sourcing. 比較社会文化 **5** : 1-8
- Koike, H., T. Okayama and Y. Baba (1998) Conservation and genetics for CITES animal species. in "Proceeding of the Sustainable Use of Lizards in Indonesia" *Mertensiella* **9** ; 37-44
- Takeuchi, T., Y. Nakano & H. Koike (1996) Neutron activation analysis of ivory of African elephants. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 205-2:301-309
- Vogel, J. C. (1978a) Isotopic Assessment of the Dietary Habits of Ungulates. *South African Journal of Science*. **74** : 298-301
- Vogel, J. C. (1978b) Recycling of carbon in a forest environment. *Oecologia Plantarum*. **1**: 89-94
- Vogel, J.C., Eglinton, B. and Aurct, J.M. (1990) Isotope fingerprints in elephant bone and ivory. *Nature*, **346**: 747-749.
- van der Merwe, N. J., J. A. Lee-Throp, J. F. Thackeray, A. Hall-Martin, F. J. Kruger, H. Coetzee, R. H. V. Bell and M. Lindeque (1990) Source-area determination of elephant ivory by isotopic analysis. *Nature* **346** : 744-746
- van der Merwe, N. J., and Medina, E (1989) *Geochim. Cosmochim. Acta* **53**, 1091-1094

Table 1. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values for ivory collagen from country-known samples

Location	N	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)			$\delta^{13}\text{C}$ (‰)		
		Mean	SD		Mean	SD	
Central African Countries	49	10.2	\pm	2.0	-26.1	\pm	1.6
Congo	23	10.1	\pm	2.3	-25.3	\pm	1.4
Gabon	11	10.1	\pm	1.3	-27.2	\pm	1.5
Zaire	15	10.3	\pm	2.2	-26.7	\pm	1.2
East African Countries	4	7.7	\pm	3.2	-23.6	\pm	6.4
Djibouti	1	7.0			-18.8		
Ethiopia	1	12.4			-17.5		
Sudan	2	5.8	\pm	0.2	-29.1	\pm	1.2
Southern African Countries	221	9.4	\pm	1.2	-19.6	\pm	1.6
Botswana	3	8.9	\pm	3.7	-21.7	\pm	1.9
Mozambique	4	10.5	\pm	0.4	-25.3	\pm	3.4
South Africa	10	9.9	\pm	1.5	-19.4	\pm	2.3
South Africa (Kruger)	194	9.4	\pm	1.1	-19.3	\pm	1.0
Zambia	5	6.9	\pm	0.8	-21.0	\pm	0.9
Zimbabwe	5	10.5	\pm	2.2	-22.6	\pm	3.3

Table 2. Regional variation in the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of ivory collagen from Kruger National Park

	Date	Region	Ecozone ²	Rainfall ¹	Geology ²	N	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	
							Mean	SD	Mean	SD
1	7/6/95	FAR NORTH	L	450 - 500	Sandveld	11	10.5	\pm 0.4	-19.2	\pm 0.2
2	8/6/95	FAR NORTH	N	450 - 500	Sandveld	8	10.4	\pm 0.3	-18.9	\pm 0.7
3	6/6/95	FAR NORTH	L	450 - 500	Basalt	10	10.8	\pm 0.5	-18.8	\pm 0.7
4	9/6/95	FAR NORTH	N	600 - 650	Sandveld	6	9.2	\pm 0.7	-19.6	\pm 0.6
5	24/5/95	SOUTH	D	550 - 600	Granite	5	10.1	\pm 0.4	-19.3	\pm 0.2
6	16/5/95	SOUTH	D	600 - 650	Granite	6	7.8	\pm 0.3	-17.6	\pm 0.9
7	15/5/95	SOUTH	B	> 650	Granite	6	7.3	\pm 0.3	-18.6	\pm 0.4
8	18/5/95	SOUTH	A	600 - 650	Granite	6	9.4	\pm 0.3	-19.2	\pm 0.3
9	17/5/95	SOUTH	A	600 - 650	Granite	8	9.6	\pm 0.3	-19.0	\pm 1.3
10	19/5/95	SOUTH	A	600 - 650	Granite	9	9.5	\pm 0.2	-19.2	\pm 0.4
11	22/5/95	SOUTH	A	600 - 650	Gabbro	8	10.1	\pm 0.3	-18.5	\pm 0.6
12	23/5/95	SOUTH	A	600 - 650	Gabbro	10	10.1	\pm 0.4	-18.8	\pm 0.3
13	29/5/95	SOUTH	F	600 - 650	Basalt	6	9.5	\pm 0.3	-19.1	\pm 0.3
14	30/5/95	SOUTH	F	600 - 650	Basalt	6	10.2	\pm 0.4	-18.2	\pm 0.3
15	13/7/94	SOUTH	G	600 - 650	Basalt	8	10.2	\pm 0.3	-20.4	\pm 0.2

¹Data from Gertenbch (1980)²Data from "Kruger National Park MAKE OF THE MOST OF KRUGER"(1993)

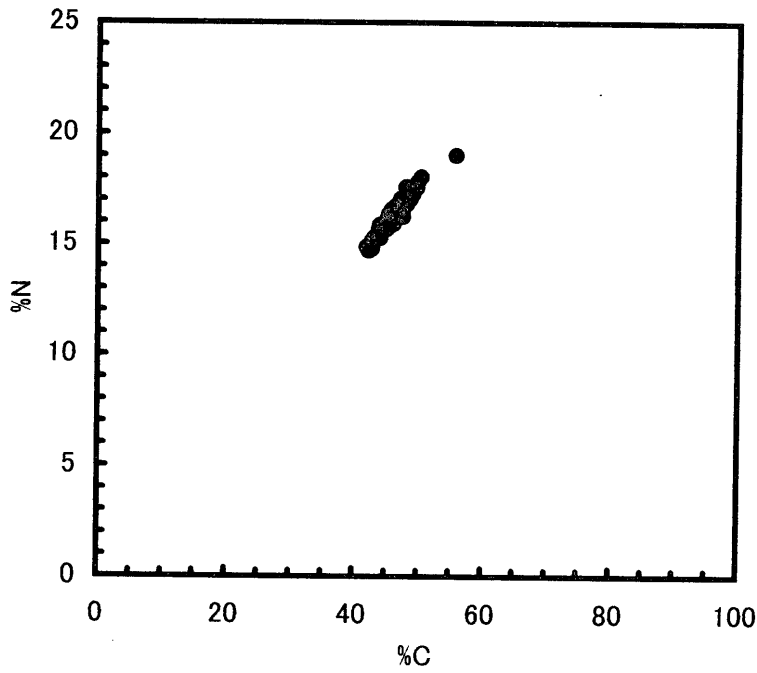


Fig.1 C/N distributions for ivory samples from Kruger

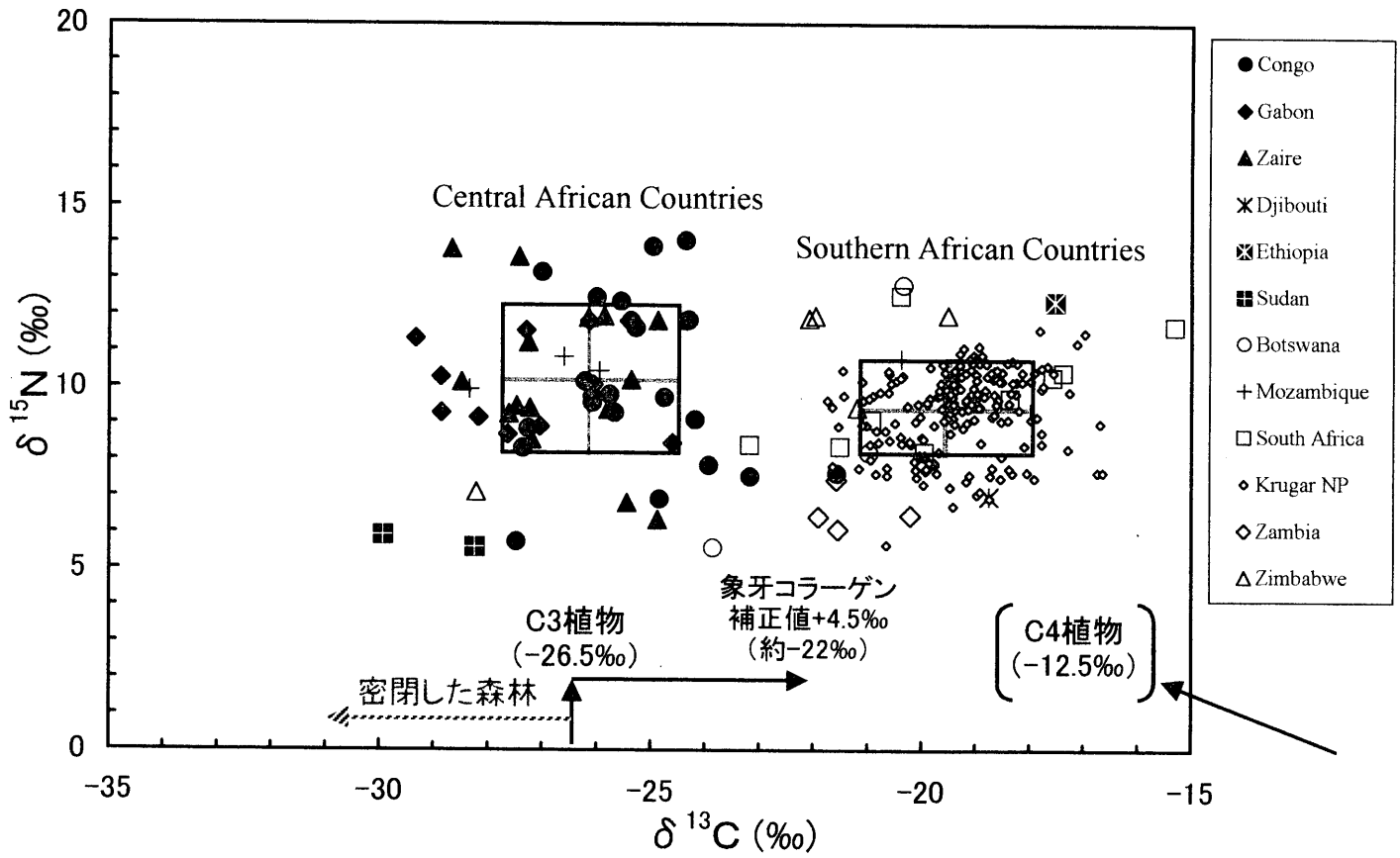


Fig. 2 Distribution of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values for country-known ivory samples

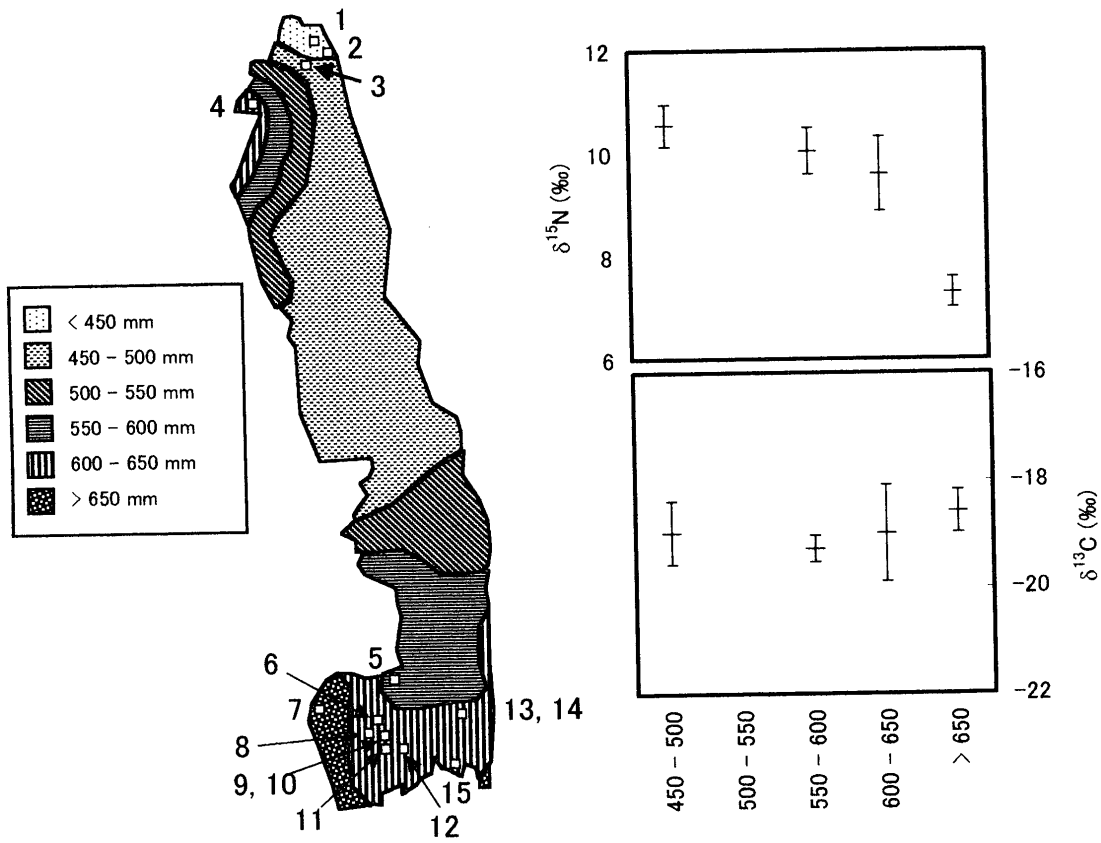


Fig. 3 Comparison of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values (means and standard deviation) in elephant ivory collagen by rain fall

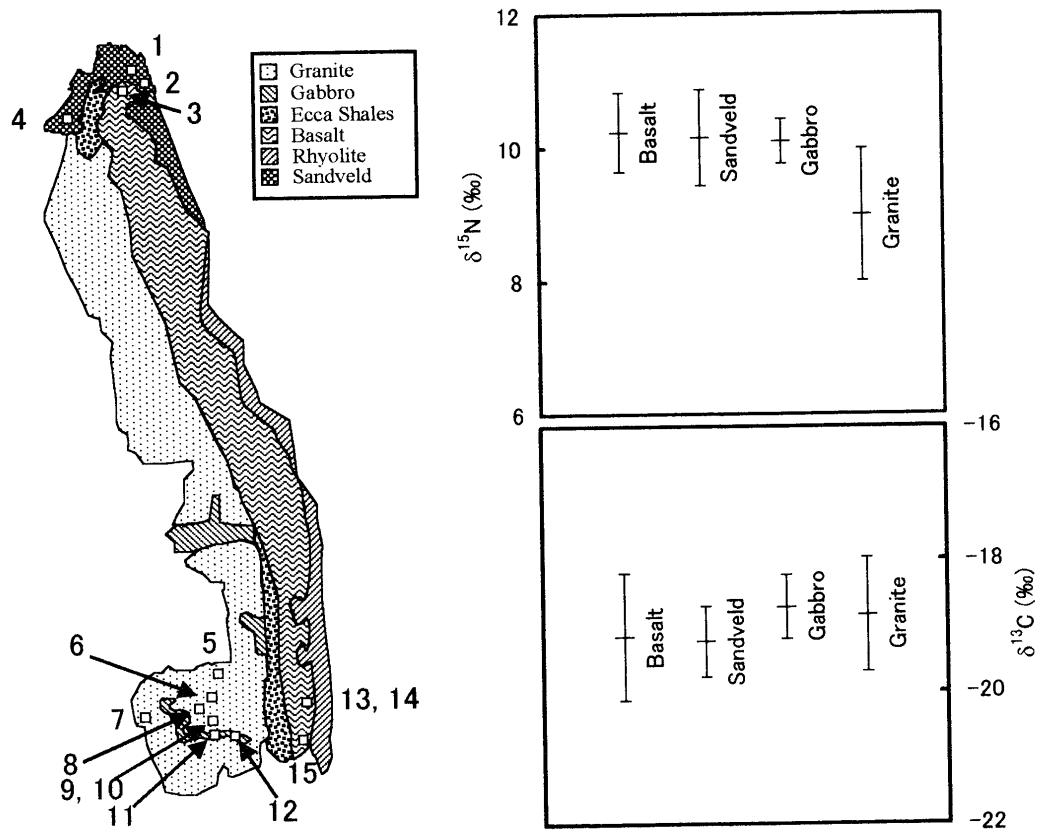


Fig. 4 Comparison of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values (means and standard deviation) in elephant ivory collagen by geology

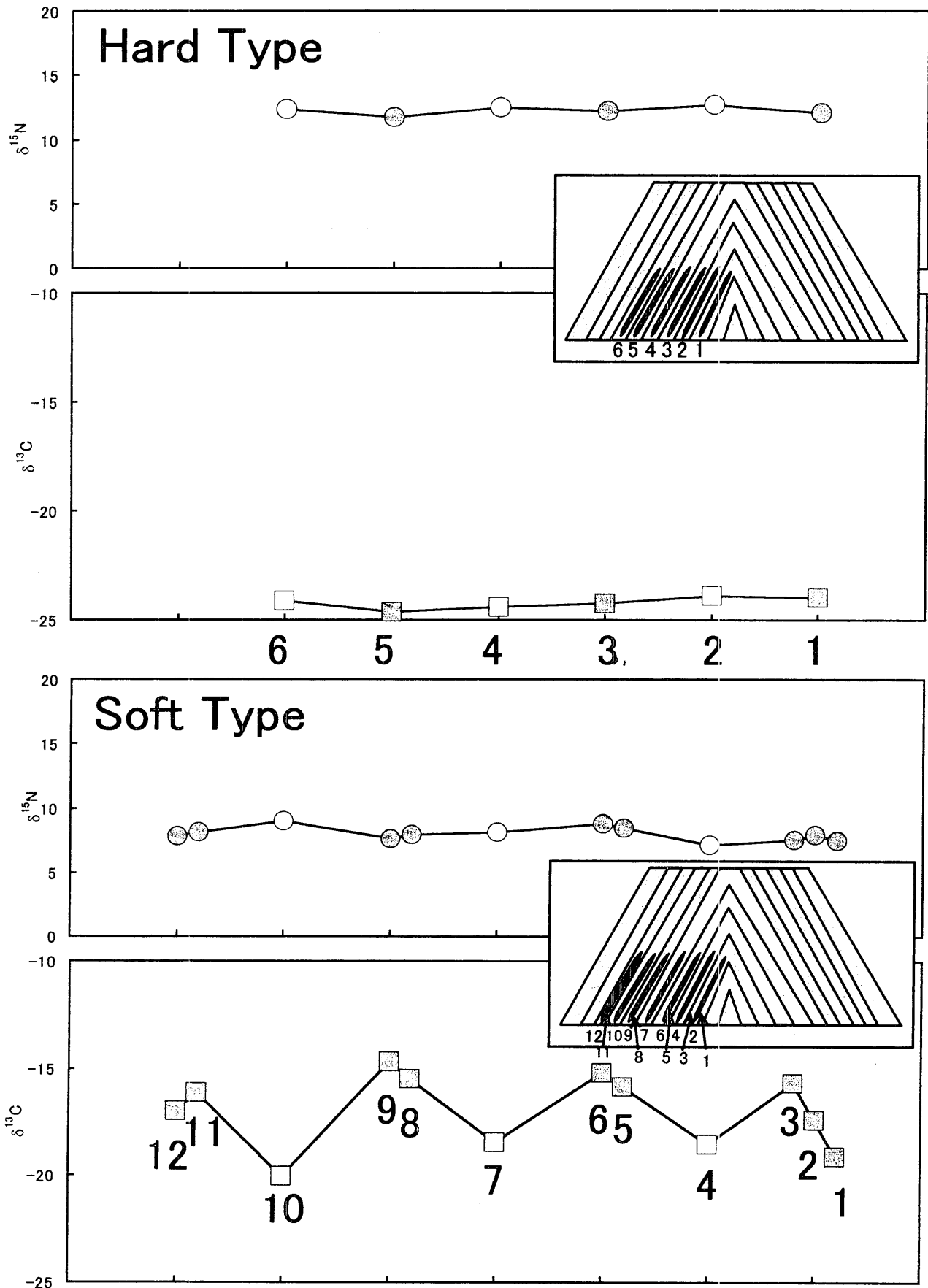


Fig 5. Comparison of seasonal variations in hard type and soft type ivories

Ivory sourcing using $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ measurements

Hiroshi ISHIBASHI

Graduate School of Social and Cultural Studies, Kyushu University, Japan

Takayuki TAKEUCHI

Research Reactor Institute, Kyoto University, Kumatori-cho, Osaka, Japan

Hiroko KOIKE

Graduate School of Social and Cultural Studies, Kyushu University, Japan

Abstract

For country sourcing using ivory, a total of 81 country-known ivory samples from the southern African countries (South Africa, Botswana, Mozambique, Zambia, Zimbabwe), the central African countries (Congo, Gabon and Zaire), and the eastern African countries (Sudan, Djibouti, and Ethiopia) were measured to obtain $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values conducted by an ANCA-MS (Automatic Nitrogen and Carbon Analysis mass-spectrometry, Europa Scientific Ltd.).

C/N, that is, ratio of %C to %N, is obtained from total ^{12}C and total ^{14}N data from the ANCA-MS. C/N for the collagen samples fell along the expected regression line for this protein, suggesting that the collagen extracted from the ivory samples were well purified protein.

$\delta^{13}\text{C}$ values for collagen from South African ivory samples ($-19.6 \pm 1.6\text{‰}$) indicate a stronger dependence on C4 plants than do those from Central African samples ($-26.1 \pm 1.6\text{‰}$).

$\delta^{13}\text{C}$ values for the 113 ivory samples from Kruger National Park in South Africa indicated that the $\delta^{15}\text{N}$ values for these samples had a correlation with a mean rainfall. High $\delta^{15}\text{N}$ values for samples from areas with lower rainfall was also suggested by van der Merwe et al.(1990).

Seasonal variations in $\delta^{13}\text{C}$ values were obtained from so-called "soft ivory" samples, where the $\delta^{13}\text{C}$ values for transparent zones in annual layer indicated relatively stronger dependence on the C4 plants during a dry season.