

(学術資料)

マーカー・グレインを用いた絶対花粉量分析法の検討 —プラスチック・マイクロスフィア利用の有効性—

山口健太郎¹⁾・安田 喜憲²⁾・北川 浩之²⁾・大野 照文³⁾¹⁾ 京大文学部地質学鉱物学教室 〒606-01 京都市左京区追分町²⁾ 国際日本文化研究センター 〒610-11 京都市西京区大枝山3-2³⁾ 京都大学総合博物館 〒606-01 京都市左京区吉田本町

(1997年10月15日受理)

The Study of the Absolute Pollen Influx using the Marker Grain
—Especially about the Case of Plastic Microsphere—

Kentaro YAMAGUCHI¹⁾, Yoshinori YASUDA²⁾, Hiroyuki KITAGAWA²⁾ and
Terufumi OHNO³⁾

¹⁾ Graduate School of Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto, 730 Japan²⁾ International Research Center for Japanese Studies, Kyoto, 730 Japan³⁾ The Kyoto University Museum, Kyoto, 730 Japan

Two types of marker grains : plastic microsphere and *Liquidamber* pollen, are examined for the absolute pollen influx of the lacustrine sediments taken from two different lakes: Lake Suigetsu and Lake Biwa. The plastic microsphere effectively worked as the marker grain in both of lacustrine sediments. While *Liquidamber* pollen did not work well in the samples collected from Lake Biwa. From our results, it can be said that the plastic microsphere is more effective as the marker grain of the absolute pollen influx of the lacustrine sediments than that of *Liquidamber* pollen.

Key words : absolute pollen influx, marker grain, lacustrine sediments

1. はじめに

日本の花粉分析において絶対花粉量の分析法を最初に行ったのは Tsukada (1966)⁽¹⁾ の野尻湖の分析結果である。それ以来、絶対花粉量の分析には単位重量法か単位体積法が用いられてきたが、マーカー・グレインを使用した絶対花粉量の分析はあまり行われてこなかった。さらにこれまでの絶対花粉量の算出におい

て大きな問題点は堆積速度の算出方法にあった。わずかに数点の¹⁴C年代から推定した堆積速度に基づいて得られた絶対花粉量/cm²/年は、詳細な議論に耐え得るようなレベルではなかった。

1991年に筆者らは福井県水月湖の湖底堆積物から年縞 (lacustrine annual varve) を発見した。年縞堆積物は年輪と同じく白黒の縞模様がセットになって毎年形成されたものであり、この年縞堆積物を分析す

ることによってこれまでとは比較にならないきわめて時間分解能の高い古環境研究を実施できるようになった⁽²⁾。

この年縞堆積物においては正確な堆積速度を評価できることから、花粉濃縮量 (pollen concentration = pollen grain/cm³ or g) をもとめることにより、はじめて本来の絶対花粉量 (pollen influx = pollen grain/cm²・year) の評価が可能となる。こうして得られた年縞堆積物の絶対花粉量から導かれる古植生についての定量的なデータは、古環境を復元するうえで非常に有力な情報となる。筆者らは現在この水月湖の年縞堆積物の花粉分析を実施中であるが、比重分離法を用いたマーカー・グレイン法によって絶対花粉量ははたして正しく求められているかどうかの検討が必要となった。そこで、本研究ではマーカー・グレイン法を用いて水月湖の年縞堆積物から絶対花粉量が、正しく求められているかどうかの検討を行なう。

2. 分析試料とマーカー・グレイン

分析試料は、福井県水月湖底で1991年に文部省重点領域研究「文明と環境」で採取された年縞堆積物⁽³⁾を使用した。さらに比較のため1995年に文部省重点領域研究「全地球史解説」において琵琶湖湖底で採取された堆積物⁽⁴⁾も使用し結果を比較した。

マーカー・グレインとして対象試料に出現しない花粉を使う方法がよく用いられる⁽⁵⁾が、本研究では扱いが容易な合成樹脂製のマイクロスフィア (直径25ミクロン、比重1.3) をマーカー・グレインとしてもちいて、比重分離法による花粉抽出処理したときの花粉濃縮量分析法の有効性を他の方法と比較検討した。なお、今回用いたマイクロスフィアについては、フッ酸処理を花粉抽出に用いた場合においてマーカー・グレインとして *Eucalyptus* 現生花粉と同等以上に有効であると報告されている⁽⁶⁾。また、比較のために、いずれの試料でも出現しない事が分かっているアメリカカワウ現生花粉 (直径50-70 μ 、1987年広島大学構内採取) もマーカー・グレインとして使用した。

3. 分析 方 法

マーカー・グレインによる花粉濃縮量の測定が正しく行われるためには対象花粉とマーカー・グレインの比が、花粉抽出処理の前後において同等に保存されていなければならない。そのため、花粉抽出処理の行程

に応じて、適切な物理的・化学的性質をもったマーカー・グレインを用いる必要がある。

本研究では、花粉抽出処理に塩化亜鉛溶液による比重分離法を用い、以下の手順で行なった。

- (1) 塩酸処理 (10% 塩酸溶液, 30分程度)
- (2) KOH 処理 (10% KOH溶液, 10分湯煎)
- (3) 塩化亜鉛溶液 比重分離処理 (重液比重1.9, 1800回転/分, 30分)
- (4) アセトリスス処理
- (5) 酢酸処理
- (6) 水洗
- (7) 検鏡

なお、各処理過程で水洗、もしくは、氷酢酸置換等を行なう場合、2200回転/分で3分の遠心分離を行なった。

花粉の比重は、湿っているかまたは乾燥しているかといった測定時の状態によっても大きく左右され、花粉と花粉を構成する有機物の比重は1.7以下⁽⁷⁾であり、主に花粉分析の対象となる花粉・胞子の外壁をつくる物質 (スポロポレニン) の比重は約1.4を示す⁽⁸⁾といわれており、花粉粒子が中空であり中身が溶媒によって満たされているとすると、その実効比重はとくに溶媒によって変化し1.04 (溶媒比重1.00) ~1.85 (溶媒比重1.90) 程度と考えられる。

マーカー・グレインとしてマイクロスフィアの有効性を調べるために、アメリカカワウ現生花粉をマイクロスフィアとともに試料にいれ、両者の回収率および、両者から予測される花粉濃縮量の比較を行なった。さらに、同一層準から取り分けた複数のサンプル間においても比較、検討した。

マーカー・グレインの回収率を調べるために、マーカー・グレインによらない花粉粒子濃縮量をあわせてもとめた。体積を正確に測定することはやや困難である⁽⁹⁾ので、重量法による粒子濃縮量測定を行った。実験室での作業による誤差を抑えるために、サンプルの重量の測定は全て電子天秤を用いて0.1mg以上の精度で行なった。したがってこれら測定の誤差は0.1%程度以下と見積もられる。

作業は以下の手順に実施した。

- (1) マーカー・グレイン懸濁液の作成

使用するマーカー・グレインに、界面活性剤および少量の酢酸を加え、適当な量の蒸留水でわたった。それらを約10 μ リットルずつ何度か検鏡し、マーカー・グレインの数をもとめて、以下の濃度を得た。マイクロスフィア懸濁液；

1941±96 (grain/g)
アメリカフウ現生花粉懸濁液
3534±319 (grain/g)

(2) 分析試料の採取

水月湖コア SG-4 の 2 層準 (SG-A, SG-B) および琵琶湖コア BIW95-4 の 1 層準 (BIW) を実験に使用した. SG-A, SG-B から 0.2g をそれぞれ 2 試料, BIW からは 0.5g ずつ 3 試料を採取し, そのおのおのに 2 種類のマーカー・グレイン懸濁液を分量を変化させていた (表 1).

(3) 花粉抽出処理

3. 分析方法に示したとおりの比重分離法によりサンプルを処理した.

(4) プレパラート作成～検鏡

処理によって得られた懸濁液にグリセリンを混ぜ定量しておき, マイクロピペットを用いてプレパラートに封入した. その際に, 封入された懸濁液の量も定量した (表 2). プレパラートの全面を検鏡し, 総化石花粉数 (胞子も含む), マイクロスフィアおよびアメリカフウ現生花粉の出現数を記録した. それらの値を用いて花粉濃縮量を計算し, 表 1 の値を使って補正して表 2 を作成した.

表 1. 各サンプルに混入させたマーカー・グレイン数

サンプルNo.	処理した堆積物 (g)	マイクロスフィア			フウ現生花粉		
		混ぜた懸濁液の量(g)	濃度補正	粒子数	混ぜた懸濁液の量(g)	濃度補正	粒子数
BIW(×1)	0.5048	1.0137		1967.5	1.0035		3546.4
BIW(×2)	0.5028	2.0308		3941.9	1.9846		7013.5
BIW(×4)	0.5025	4.0495		7860.1	4.0460		14298.6
SG-A(×1)	0.2002	1.0243		1988.1	0.9952		3517.0
SG-A(×4)	0.2030	4.0144		7792.0	3.9433		13935.5
SG-B(×2)	0.2002	2.0000		3882.0	1.9909		7036.0
SG-B(××)	0.2007	1.0050	23.8倍	46424.5	2.0298	5.0倍	35865.7

各サンプルに混入させたマーカー・グレイン懸濁液量と, その濃度から算出される粒子数. 濃度補正には, 濃縮して使用した際の粒子濃度倍数.

表 2. 化石花粉およびマーカー・グレインの出現数と推定される絶対花粉量

サンプルNo.	検鏡率	出現花粉数	重量法	マイクロスフィア				フウ現生花粉			
			推定花粉数	出現数	ポアソン誤差	回収率	推定花粉数	出現数	ポアソン誤差	回収率	推定花粉数
BIW-×1	7.24%	170	4652.9	66	12.3%	46.3%	10038.7	0	***	***	
BIW-×2	7.14%	218	6071.0	179	7.5%	63.6%	9547.4	1	***	***	
BIW-×4	4.96%	140	5618.7	252	6.3%	64.7%	8689.5	4	***	***	
SG-A(×1)	6.51%	2270	174131.0	111	9.5%	85.7%	203071.0	168	7.7%	73.4%	237392.1
SG-A(×4)	1.47%	463	154877.7	88	10.7%	76.7%	201943.7	148	8.2%	72.1%	214774.7
SG-B(×2)	1.14%	1216	535027.0	37	16.4%	84.0%	637233.7	57	13.2%	71.4%	749818.6
SG-B(××)	1.18%	1320	555332.5	441	4.8%	80.2%	692329.0	352	5.3%	82.9%	670193.0

それぞれのサンプルから作成したプレパラートにおいて, 処理した各サンプル全体に占めるプレパラート上のサンプル量を検鏡率とし, 化石花粉およびマーカー・グレインの出現数と当初に混入した量に対する回収率をしめす. 重量法および 2 種のマーカー・グレインより算出される堆積物 1g あたりの推定絶対花粉量を推定花粉数のコラムに, また, 誤差のコラムは出現粒子数にポアソン分布を仮定したときの標準誤差の百分率表示.

4. 結果と考察

マーカー・グレインの回収率および推定される各サンプル 1g あたりの花粉濃縮量を表 2 にしめす。ただし、これらの値にはマーカー・グレイン懸濁液の濃度の誤差分を評価していない。そのためマーカー・グレインの回収率および推定花粉濃縮量は表 2 の値より、マイクロソフィアでは約 ±5%、アメリカフウ現生花粉では ±9% の不正確さを伴う。

今回、花粉濃縮量の推定のために用いたマーカー・グレインのカウント数は表 2 にしめすとおりであり、少なからぬ統計誤差を伴う。粒子の出現数がポアソン分布すると仮定したときの誤差を表中にしめした。このことを考慮した場合、今回の実験で得られた同一層準に対する推定値、ならびに異なるマーカー・グレインによる推定値はともにおおむね良好な一致を見せている。また、SG-A(×4) では SG-A(×1) に比べマーカー・グレインの回収率が 10% 程度落ちるが、それぞれのマーカー・グレインの回収率の比をとると約 9:10 であり、また重量法でもとめた推定花粉濃縮量の比も約 9:10 をしめしている。これは、花粉抽出処理の段階でマーカー・グレインと化石花粉がともにほぼ同じ比率で失われたためと考えられ、処理過程での不意の損失に対してもマーカー・グレインが正しく機能したことを示唆している。水月湖の試料においてはマイクロソフィアおよびアメリカフウ現生花粉ともにマーカー・グレインとして有効に機能していると考えられる。

琵琶湖コア試料においては、アメリカフウ現生花粉の回収率が著しく低い。比重分離処理時に沈んだ堆積物を調査したところ、その中に大量のアメリカフウ現生花粉が見つかった。琵琶湖コア試料の他の層準についてアメリカフウ現生花粉の比重分離時の挙動を調べたところ表 3 のような結果がえられた。なお、いずれ

の試料でも沈んだ堆積物中に化石花粉は確認されなかった。なぜアメリカフウ現生花粉が塩化亜鉛溶液のなかで沈むかというメカニズムは現時点では明らかにできないが、表 3 の結果から堆積物に含まれていた何かが、化学的に作用したためと現在のところ解釈される。そのリソースの量の多少によって表 3 のようなアメリカフウ現生花粉の挙動の違いとなって現れていると考えられる。

一方、マイクロソフィアによる推定花粉濃縮量は回収率が水月湖試料の場合に比べ低かったもののまずまず安定している。したがって工業製品であるマイクロソフィアの方が、アメリカフウ現生花粉よりもマーカー・グレインとして有効であるとみなされる。

さらにこれまで実施してきた比重分離法は堆積物の性質によって、その結果が大きく左右されることも明らかとなった。比重分離法を導入する場合には、沈んだ堆積物の中に化石花粉が残存していないかどうかを調べ、比重分離法が正しく機能しているかどうかをチェックする必要があることも明らかとなった。

5. ま と め

マーカー・グレインは水月湖コアの試料では問題無く機能するが、琵琶湖コアの試料では少なくともアメリカフウ現生花粉は異常な挙動をし、アメリカフウ現生花粉はマーカー・グレインとしては、工業製品のマイクロソフィアに比べより信頼性に欠けるとということが明らかとなった。比重分離法を適用した場合、堆積物によっては、花粉やマーカー・グレインなどの微粒子の物理化学的な挙動が堆積物の性質から影響を受け、有効に機能しないことが明らかになった。しかし、水月湖コアの試料においては、花粉濃縮量を求める上でマイクロソフィアとアメリカフウのマーカー・グレインはともに有効に作動し、マーカー・グレインを用い

表 3. 比重分離時に沈殿した堆積物試料の観察結果

層準	深度 (m)	フウ現生花粉の出現状況
BIW-a	2.94	皆無
BIW-b	3.18	皆無
BIW-c	3.88	時々見られる
BIW	4.94	多量に見られる
BIW-d	5.96	多量に見られる

コア BIW95-4 の 5 層準について、アメリカフウ現生花粉を混入した後、比重 1.9 に調整した塩化亜鉛溶液で比重分離を行い沈殿物を観察した結果をしめす。

る絶対花粉量分析法が、水月湖の堆積物においては有効に機能することが明らかとなった。

謝辞

本稿はファースト・オーサーの山口が京都大学大学院理学研究科に提出した修士論文の一部である。ご指導いただいた京都大学理学部教授瀬戸口烈司教授に末筆ながら厚くお礼申し上げます。

引用文献

- (1) Tsukada, M. : Late postglacial absolute pollen diagram in lake Nojiri. *Bot. Mag. Tokyo*, 79, 179-184 (1966).
- (2) 福沢仁之 : 天然の「時計」・「環境変動検出計」としての湖沼の年縞堆積物. 第四紀研究, 34, 135-150 (1995).
- (3) 竹村恵二ほか : 三方湖・水月湖・黒田低地の堆積物の層相と年代—三方低地の最終間氷期以降の堆積環境—. 地学雑誌, 103, 233-242 (1994).
- (4) 鳥居雅之ほか : 大陸—大洋境界域での古環境変動解析を目指して : 琵琶湖マルチ・ピストンコア研究プロジェクト. 地球惑星科学関連学会1996年合同大会予稿集, 21 (1996).
- (5) Heusser, L. and C. Stock : Preparation techniques for concentrating pollen from marine sediments and other sediments with low pollen density. *Palynology*, 8, 225-227 (1984).
- (6) Ogden, J. An alternative to exotic spore or pollen addition in quantitative microfossil studies. *Can. J. Earth Sci.* 23, 102-106 (1986).
- (7) Faegri, K and J. Iversen : *Textbook of pollen analysis (3rd ed.)*. Munksgaard, Copenhagen (1975).
- (8) Traverse, A : *Paleopalynology*. Unwin Hyman, Boston (1988).
- (9) 内山 隆 : 花粉分析法. 花粉誌 36, 163-170 (1990).

