

## 海生哺乳類の骨化石の脂肪酸・ステロイドの組成分布と 炭素同位体比～古食性・続成変化の評価への応用

新 村 龍 也<sup>\*,\*\*</sup>・沢 田 健<sup>\*</sup>

(2009年5月25日受付, 2009年12月19日受理)

### Compositions and stable carbon isotope ratios of fatty acids and steroids in fossil bones of marine mammals - Application to fossil diagenesis and palaeodietary analyses

Tatsuya SHINMURA<sup>\*,\*\*</sup> and Ken SAWADA<sup>\*</sup>

\* Department of Natural History Sciences, Faculty of Science, Hokkaido University,  
N10W8 Kita-ku, Sapporo 060-0810, Japan

\*\* Niigata Science Museum,  
3-1-1 Meike-Minami, Chuo-ku, Niigata 950-0948, Japan

Dietary preferences of archaeological and paleontological animals have been investigated based on stable carbon isotope ratios ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of collagen and non-collagenous proteins in fossil bones. The  $\delta^{13}\text{C}$  of individual compound in lipids from fossil bones were recently applied to the reconstruction of palaeodietary of animals. In the present study, we analyze the concentrations, class distributions, and  $\delta^{13}\text{C}$  values of fatty acids and steroids in the Pleistocene to Pliocene fossil whale and the Miocene fossil sea cow (*Dusisiren* sp.) bones, and evaluate their applicability as indicators of palaeodietary and fossil diagenesis. Biosynthetic steroids as cholesterol are detected in the Pleistocene whale bones, while the sterols are very poor in the older Pliocene whale samples, of which major steroids are their diagenetic compounds such as cholestanes and cholestenes. However, a large amount of cholesterol characterizes the Miocene fossil sea cow bone. We also can identify labile unsaturated fatty acids from all fossil whale and sea cow bones. It is suggested that the relative abundances of unsaturated to saturated fatty acids can be useful indicator for estimating diagenetic stage of fossil bones and checking contamination.

The  $\delta^{13}\text{C}$  values of fatty acids in the fossil whale and sea cow bones range widely from -25.7 to -16‰, and there are differences of 1 to 4‰ between several fatty acid homologues within the same sample. Thus, the  $\delta^{13}\text{C}$  analyses of fatty acids in fossil bones may be less applicable for reconstructing palaeodietary. On the other hand, the  $\delta^{13}\text{C}$  values of steroidal compounds within the same sample are almost similar, although these values vary ranging between -29.6‰ and -24.4‰ among the different whale samples. Furthermore, the steroidal  $\delta^{13}\text{C}$  value in the sea cow sample is -20.5‰, which is concordant with that of food in sea cow. From these results, the  $\delta^{13}\text{C}$  value of steroid in fossil bone can be strongly useful tool for reconstructing palaeodietary of paleontological animal.

**Key words:** Fatty acid, steroid, fossil bone, lipid-specific carbon isotope ratio, palaeodiet, lipid diagenesis

\* 北海道大学大学院理学研究院・自然史科学部門・  
地球惑星システム科学分野

〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目

\*\* 新潟県立自然科学館

〒950-0948 新潟市中央区女池南3-1-1

## 1. はじめに

人類（ヒト）を含む大型哺乳動物の骨化石の化学分析は、過去のそれらの食性や生態などの古生物学または考古学の研究や、食性解析などから推定される周囲の植生やさらに環境条件の復元などに応用されている。骨化石の化学分析は、骨の硬組織（石灰質・リン灰質）部分の無機化学分析と、骨中に含まれるタンパク質などの生体有機成分の有機化学分析に大きく分けることができる。硬組織からの分析は、炭酸塩の炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) 分析 (Sullivan and Krueger, 1981; Clementz and Koch, 2001; Clementz *et al.*, 2003など), 炭酸塩・リン酸塩の酸素同位体比 ( $\delta^{18}\text{O}$ ) 分析 (Barrick and Showers, 1994), 金属元素組成 (例えば, Sr/Ca; Sillen, 1992など) が行われている。骨の硬組織（石灰質・リン灰質）部分は生体が死滅・堆積後に間隙水中の  $\text{CaCO}_3$  に置換されて、もとの生物的情報を失う場合が多い (Schoeninger and DeNiro, 1982)。また、硬組織の化石は続成変化の定量的評価が難しく、もとの情報がどれだけ残されているか判別しにくい問題がある。一方、骨化石中の有機物成分の分析においては、コラーゲン（硬タンパク質）がおもに用いられている。コラーゲンは、すべての脊椎動物の骨・歯中の象牙質や皮などにも含まれ、それを化石試料から取り出して  $\delta^{13}\text{C}$  分析 (van der Merwe and Vogel, 1978; Bocherens *et al.*, 2006など), 放射性炭素同位体 ( $^{14}\text{C}$ ) 年代測定 (沢田ほか, 1992; 中村ほか, 1996; Bocherens *et al.*, 2006など), 窒素同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) 分析 (Schoeninger and DeNiro, 1984; Bocherens *et al.*, 2006など) が行われている。コラーゲンの  $\delta^{13}\text{C}$  は、光合成経路の違う C3植物, C4植物などの動物の食性や、それから推定される生息地の植生をよく反映するため頻繁に用いられている。しかし、コラーゲンも生体が死んで堆積した後の続成作用により、分解や変質を受ける。コラーゲンの続成変化の定量的評価は、コラーゲン中の炭素含有率 (中村ほか, 1996), ゼラチン化コラーゲンと可溶性コラーゲンの収率 (沢田ほか, 1992; 中村ほか, 1996), 炭素/窒素比 (C/N 比; DeNiro, 1985; 沢田ほか, 1992) やアミノ酸組成 (Tuross *et al.*, 1988) が変化することを利用して行われている。コラーゲンが分解されずに残っているのは、一般的に数万~10数万年前の化石、つまり、地質時代において後期更新世の試料である。

近年、骨試料中の脂質成分の1つであるステロイドが注目され、コレステロール (Fig. 4) やそのさまざまな続成産物の骨試料中での濃集が報告されるようになった (Evershed *et al.*, 1995)。ステロイドの化合物組成は化石の続成過程の情報を提供し、 $\delta^{13}\text{C}$  は動物実験からその動物の食性の記録を提供すると考えられている (Evershed *et al.*, 1995; Stott *et al.*, 1997 a, b; Jim *et al.*, 2003; 2004)。さらに周囲の堆積物と骨試料の脂質組成は明らかに異なり、骨中の脂質が周囲からの移動および付加によるものでないことが示された (Evershed *et al.*, 1995)。また、ステロイドは続成作用に対して抵抗性があり、一般的に数百万年前に堆積した地層中にもよく残されていることが知られている。さらに、ステロイドの  $\delta^{13}\text{C}$  は続成作用の影響でほとんど変化しないことを示すデータも報告されている (Stott *et al.*, 1997 a)。これらの分析はガスクロマトグラフ燃焼同位体比質量分析計 (GC/C/IRMS) のような機器によるオンライン分析で行われている。この分析の利点は、1) バルク分析で含まれてしまう汚染物質を除けること、2) 測りたい分子を選んで測定できること、3) ナノグラムオーダーの化合物で同位体比測定が可能であること、4) 測定精度が高いこと (奈良岡ほか, 1997; Jim *et al.*, 2003) が挙げられる。この方法は、コラーゲンの残存が期待されない年代の古い古生物学試料 (特に更新世以前の化石試料) において特に有効である。

本研究では、中新世から更新世の堆積物 (岩) から産出したクジラ類やカイギュウ類といった海生哺乳類の古食性および化石の続成過程の評価を目的として、それらの化石中に残存する脂肪酸とステロイドの組成解析と  $\delta^{13}\text{C}$  解析を行い、その方法と分析結果について考察・検討を行った。

## 2. 試料と分析方法

### 2.1 化石試料

本研究では、クジラ類とカイギュウ類の海生哺乳類化石5試料を用いて分析を行った。クジラ類化石は北広島クジラ No. 1試料, 北広島クジラ No. 2試料, 掛川クジラ No. 1試料, 掛川クジラ No. 2試料の4試料, カイギュウ類は沼田カイギュウ試料の1試料を用いた。北広島産, 掛川産のクジラ化石はそれぞれ更新世, 鮮新世の地層から採集された。ただし、掛川クジラ No. 2試料はクジラ類化石の産出のみ知られる露頭で転石として発見されたものであり、大型で緻密質も

見られないためクジラ類と同定した。沼田産カイギュウ化石は中新世の地層から採集され、*Dusisiren* sp. と同定されている (古沢, 1996)。沼田カイギュウ試料は、本研究の試料の中でもっとも古い年代の化石である。これらの試料は採集後、常温で保存されていた。詳細は Table 1 にまとめた。

化石試料は、5~20 g をジクロロメタン/メタノール (1/1 v/v) を入れたビーカーに2~3時間浸し、化石採集後の汚染を洗い流した。その後、乾燥させて、鉄乳鉢とメノウ乳鉢を用いてシルトサイズ (1/16 mm) 以下になるまで粉碎した。

## 2.2 脂質の抽出・分離

Sawada and Shiraiwa (2004) を一部改良した方法で、化石試料をアルカリ加水分解 (けん化) した。その方法は、粉末試料 (5~20 g) をその試料が十分浸かる程度の0.5%水酸化カリウム (KOH)/メタノール溶液 (10~15 ml) と共にアンプル管に入れて封かんし、110°C, 3時間加熱した。その後メタノール溶液を遠沈管に移し、さらに粉末試料が十分に浸かる程度のメタノール (5~10 ml) を用いて3度抽出を行い、蒸留水2~3 ml を加えた後、ヘキサン/ジエチルエーテル (9/1 v/v) で中性脂質を回収した。その後、内部標準 triacontane-*d*<sub>52</sub> (Aldrich 社製) を中性脂質画分に加えた。その中性脂質画分をロータリーエバポレーターで乾固させた後、シリカゲルカラム (5%不活性させたシリカゲル10 g) を使って次の3つの画分

(画分1 (F1):ヘキサン35 ml, 画分2 (F2):ヘキサン/酢酸エチル9:1 v/v 30 ml, 画分3 (F3):酢酸エチル/メタノール1:1 v/v 30 ml) に分画した。F1, F2, F3ではそれぞれ無極性脂質 (*n*-アルカンなど)、芳香族炭化水素、極性脂質 (ステロール, アルコールなど) を得た。なお、内部標準 tetracosane-*d*<sub>50</sub> (Aldrich 社製) を画分2 (F2) に加えた。さらに、極性脂質 (F3) はロータリーエバポレーターで乾固させた後、N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) を用いて、60°C, 30分間反応させてトリメチルシリル (TMS) 化を行い、内部標準 tetracosane-*d*<sub>50</sub> を加えた。中性脂質を回収した後のメタノール溶液に残った酸性脂質は、5 N 塩酸を用いて酸性化し、ジクロロメタン (10 ml) でそれを3度抽出した (酸性脂質画分)。その後、ジクロロメタンをロータリーエバポレーターで乾固させた。次に三弗化ホウ素 (BF<sub>3</sub>)/メタノール溶液を加えて、80°C で30分間加熱し、エステル化を行った。その後、蒸留水 (0.5~1 ml) を加えて、ヘキサン1 ml によりエステル成分の回収を3度行い、内部標準 tetracosane-*d*<sub>50</sub> を加えた。

## 2.3 GC および GC/MS 分析

これらの画分はガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) によって化合物の同定を行い、さらにガスクロマトグラフィー (GC) によって定量を行った。測定に利用した GC/MS は、北海道大学大学院理学研究院に設置されている Hewlett Packard (HP) 社製

Table 1 Sampling locations and formations collected fossil bone samples. Ages in the layers collected fossil samples and the museum storing them are also shown.

Sample No.	Materials	Epoch	Age (Ma)	Formation	Location	Museum storing No.	Reference
Kitahiroshima Whale No.1	fragmental mandible	latest Early or earliest Middle Pleistocene	-	Shimonoppo Fm.	Kitahiroshima, Hokkaido	Historical Museum of Hokkaido	-
Kitahiroshima Whale No.2	fragmental rib	latest Early or earliest Middle Pleistocene	-	Shimonoppo Fm.	Kitahiroshima, Hokkaido	Historical Museum of Hokkaido	-
Kakegawa Whale No.1	rib	Late Pliocene	ca. 2	Kakegawa Group, Duinichi Fm.	Kakegawa, Shizuoka Pref.	Natural History Museum of Tokai (NHMT-221)	Shimmura <i>et al.</i> , 2001
Kakegawa Whale No.2	fragmental bone	Late Pliocene	ca. 2.5	Kakegawa Group, Higashiyokochi Fm.	Kakegawa, Shizuoka Pref.	-	-
Numata Sea Cow	articulated skeleton	Late Miocene	9-7	Shintotsukawa Group, Mashike Fm.	Numata-cho, Hokkaido	Numata Fossil Museum (NFL11)	Furusawa, 1996

6890シリーズ GC を連結した HP 社製四重極質量分析計 MSD5973 である。キャピラリーカラムは DB-5HT (J&W Scientific 社製; 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.1  $\mu\text{m}$ ) を用いた。GC の注入口温度は 300°C とした。オープン温度は 80°C で 2 分間保持し, その後 15°C/分 で 300°C まで昇温し, 300°C に達した後は 15 分間保持した。キャリアーガスは高純度ヘリウムを使い 1.0 ml/分の流量に調節した。質量分析計によるイオン化は電子衝撃法 (EI) であり, イオン化電圧 70 eV で行った。イオン検出は  $m/z$  50~550 の範囲で 2.94/秒 のスキャン間隔で行った。GC は水素炎検出器 (FID) を搭載した Hewlett Packard 社製 6890 を使用し, GC/MS と同様のキャピラリーカラム, 昇温プログラム等の条件で測定した。

#### 2.4 GC/C/IRMS 分析

ガスクロマトグラフ燃焼同位体比質量分析計 (GC/C/IRMS) によって各化合物の炭素同位体比を測定した。使用した GC/C/IRMS は北海道大学大学院理学研究院に設置されている HP 社製 6890 シリーズ GC を連結した Thermoquest 社製同位体質量分析計 Finnigan MAT252 である。キャピラリーカラムは DB-5 (J&W Scientific 社製; 内径 0.25 mm, 長さ 60 m, 膜厚 0.1  $\mu\text{m}$ ) を用いた。GC の注入口温度は 315°C とした。炭化水素とステロールを測定する際は, オープン温度は 80°C で 2 分間保持し, その後 15°C/分 で 315°C まで昇温し, 315°C に達した後は 15 分間保持した。脂肪酸を測定する際は, オープン温度は 80°C で 2 分間保持し, 15°C/分 で 300°C まで昇温し, その後 15 分間保持した。キャリアーガスは超高純度ヘリウムを使い 1.0 ml/分の流量に調節した。測定して得られた炭素同位体比は, PDB 標準に対する相対千分偏差 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) で表した。本研究における  $\delta^{13}\text{C}$  値の測定精度は  $\pm 0.4\%$  である。

TMS 化により 3 つの炭素原子を測定対象の成分に付加することになるが, その  $\delta^{13}\text{C}$  補正をコレステロールの標準試料の GC/C/IRMS 測定により, 以下の式で行った (Stott and Evershed, 1996)。

$$27\delta_{\text{OH}} + 3X = 30\delta_{\text{OTMS}}$$

$\delta_{\text{OH}}$  は目的 (標準試料) のコレステロールの  $\delta^{13}\text{C}$  値

$\delta_{\text{OTMS}}$  は誘導体化されたコレステロールの  $\delta^{13}\text{C}$  値

X は TMS 化により付加する 3 つの炭素原子の  $\delta^{13}\text{C}$  値

一方, 脂肪酸の  $\delta^{13}\text{C}$  測定の際はエステル化により 1 つの炭素原子が付加される。この  $\delta^{13}\text{C}$  補正は脂肪酸

標準試料の GC/C/IRMS 測定から, 以下の式で行った。

$$N\delta_{\text{COOH}} + X = (N+1)\delta_{\text{COOCH}_3}$$

N は脂肪酸の炭素数

$\delta_{\text{COOH}}$  は目的 (標準試料) の脂肪酸の  $\delta^{13}\text{C}$  値

$\delta_{\text{COOCH}_3}$  はエステル化された脂肪酸の  $\delta^{13}\text{C}$  値

X はエステル化により付加する炭素原子の  $\delta^{13}\text{C}$  値

TMS 化とエステル化による  $\delta^{13}\text{C}$  補正を行うと, 測定して得られた  $\delta^{13}\text{C}$  値よりそれぞれ 2~3%, 1~2% 変化することになる。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 化石試料の脂肪酸組成

Fig. 1 に海生哺乳類の骨化石から得られた酸性脂質画分のマスフラグメントグラムを示した。すべての試料において, 炭素数 10~24 ( $\text{C}_{10}\sim\text{C}_{24}$ ) 飽和脂肪酸が検出された。これは, Ackman and Lamothe (1989) による多くの現生の海生哺乳類の脂肪酸組成と同様である。脂肪酸の濃度は化石乾燥重量 1 g あたり 100 ng ~ 10  $\mu\text{g}$  オーダーであり, 最大で, 掛川クジラ No. 2 試料における  $\text{C}_{16}$  飽和脂肪酸 13  $\mu\text{g}$  であった (Table 2)。また,  $\text{C}_{16}$ ,  $\text{C}_{18}$  の不飽和脂肪酸も同定された。掛川クジラ No. 2 試料では, 飽和脂肪酸よりも不飽和脂肪酸の濃度が大きく, 50.7  $\mu\text{g/g}$  乾燥重量もの  $\text{C}_{16:1}$  不飽和 (モノエン) 脂肪酸が含まれていた。他の試料は不飽和脂肪酸より飽和脂肪酸が圧倒的に優勢であった (Fig. 3 a)。

骨化石から得られた脂肪酸の組成分布を Fig. 3 a に示した。すべての試料で  $\text{C}_{16}$  脂肪酸の占める割合が圧倒的に高いことがわかる。これは生体脂肪酸の組成分布と同様である。北広島クジラ No. 1 試料, 北広島クジラ No. 2 試料では  $\text{C}_{16}$  脂肪酸だけでなく,  $\text{C}_{24}$  脂肪酸にも組成比の極大値を持つバイモーダル分布を示すが, それ以外は  $\text{C}_{16}$  脂肪酸に極大値を持つユニモーダルである。すべての試料で偶数炭素数の飽和脂肪酸の優位性がみられるが, 北広島, 掛川採集のクジラ化石よりもカイギュウ化石の方が  $\text{C}_{13}$ ,  $\text{C}_{15}$ ,  $\text{C}_{17}$  の奇数炭素脂肪酸の割合が低く, より偶数優位性がみられた。

#### 3.2 化石試料のステロイド組成

中性脂質の画分 1 (F1) と画分 3 (F3) の部分的なガスクロマトグラムを Fig. 2 に示した。すべての骨化石試料の F3 においてコレステロール (cholesterol), cholest-5-ene-3 $\beta$ -ol-7-one のようなコレステ

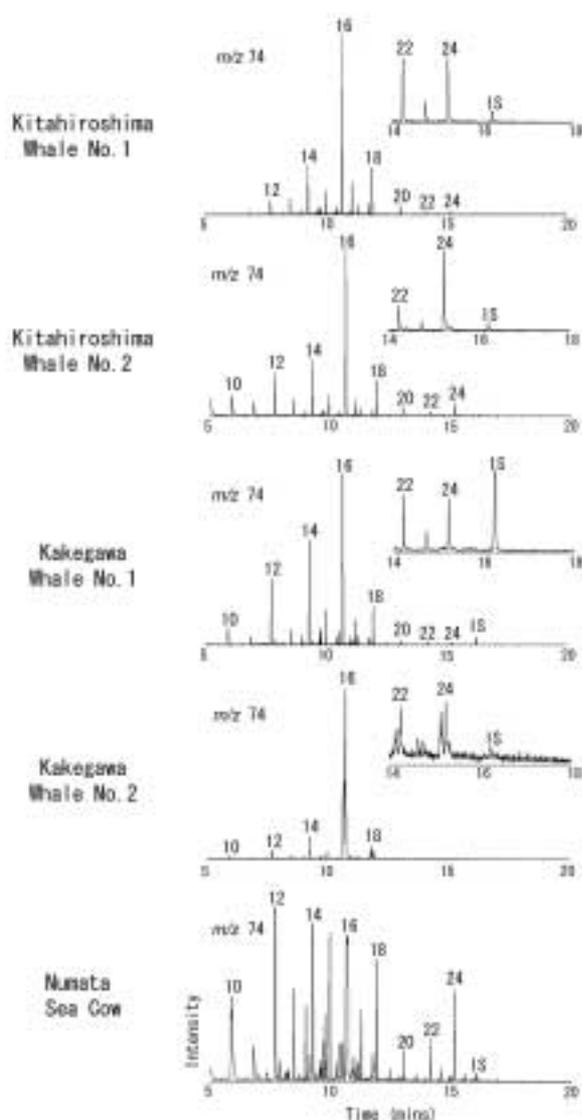


Fig. 1 Partial mass chromatogram at  $m/z$  74 of acid fractions in bone fossils of marine mammals, showing the distribution of fatty acid esters. Numbers correspond to carbon numbers of fatty acids.

ロールケトンが含まれていることがわかった。北広島クジラ No. 1以外の試料からは、コレスタノール (cholestanol) と cholest-3-one などのコレステノンが検出された。また、掛川産のクジラ化石の F 1にはコレスタン (cholestane) やコレステン (cholestene) といったステロイド炭化水素も検出された。なお、コレスト-4-エンとコレスト-5-エンは、文献 (Peakman *et al.*, 1992; Amo *et al.*, 2007) の保持時間・マススペクトルを参考に同定した (Table 3)。その他のステレン (Fig. 2のピーク1と3) については、二重結合の位置までは決定できなかった。これらはすべて  $C_{27}$  ステロイドであり、哺乳動物がもつステロイド組成と同様である。ただし、掛川クジラ No. 1試料からは  $C_{28}$ ,  $C_{29}$  のステロイドも微量に検出された。ステロイドの濃度は  $10\text{ ng}$ ~数  $\mu\text{g/g}$  オーダーであり、最大で、沼田カイギュウ試料におけるステロール  $2.35\ \mu\text{g/g}$  であった (Table 4)。

### 3.3 化石試料の脂肪酸・ステロイドの続成変化の評価への応用

本研究で得られた化石中の脂肪酸・ステロイド組成について、生物体の化石化過程や生体有機分子の続成変化という視点から考察する。

脂肪酸について、本研究で分析したすべての化石試料から飽和脂肪酸だけでなく不飽和脂肪酸が検出された。一般的に不飽和脂肪酸は分解されやすい成分で、続成作用で飽和脂肪酸に変化するか、失われてしまい、100万年より古い地層の堆積岩試料などでは不飽和脂肪酸は残存していない場合が多い。しかし、本研究において100万年前オーダーのクジラやカイギュウの骨化石から不飽和脂肪酸が有意に検出されたことは、骨に含まれる有機成分が炭酸塩の硬組織によって微生物分解などの初期続成作用から保護されているためと考えられる。ただし、掛川クジラ No. 2試料にお

Table 2 Concentrations ( $\mu\text{g/g}$ ) of fatty acids in bone fossils of marine mammals. FU is fatty acid unsaturation index.

Samples	Fatty acids ( $\mu\text{g/g}$ )																FU
	10:0	11:0	12:0	13:0	14:0	15:0	16:1	16:0	17:0	18:1	18:0	20:0	21:0	22:0	23:0	24:0	
Kitahiroshima Whale No. 1	n.d.	n.d.	0.09	0.10	0.19	0.10	0.09	0.64	0.15	0.42	0.26	0.09	n.d.	0.08	0.05	0.17	0.57
Kitahiroshima Whale No. 2	0.07	0.04	0.08	0.06	0.17	0.04	0.04	0.37	n.d.	0.10	0.08	0.03	0.01	0.03	0.02	0.19	0.31
Kakegawa Whale No. 1	n.d.	n.d.	0.04	n.d.	0.03	0.02	0.05	0.15	0.03	n.d.	0.02	0.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.29
Kakegawa Whale No. 2	n.d.	n.d.	0.35	n.d.	0.73	0.32	50.66	13.00	n.d.	5.31	0.44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.17
Nunata Sea Cow	0.38	n.d.	1.15	0.14	0.82	0.34	0.80	2.79	n.d.	0.41	0.21	0.02	0.04	0.03	0.01	0.13	0.41

n.d.: no detection

ける多量の16:1脂肪酸については、後からの他の生物由来の不飽和脂肪酸の付加、または現在の脂肪酸の汚染を疑う必要がある。なぜならば、後述するように、同試料から検出されたステロイドは明らかに熱的な後期続成作用を経て変化した化合物であるため、不飽和脂肪酸のみが、その続成作用を免れて多量に保存されているとは考えにくいからである。この掛川クジラ No. 2試料については、堆積後の他の生物の捕食の影響があるかもしれない。藤岡ほか (1993) は深海底でクジラの骨におびただしい生物が付着していることを報告しており、堆積後に他の生物に由来する有機成分が付加した可能性は十分にあり得る。また、この試料は露頭で転石として採集されており、地表に露出していた時に新鮮な脂肪酸の汚染が起こった可能性も

考えられる。

本研究では、易分解性の脂肪酸の保存率を定量的に表すために‘続成変化を受けにくい飽和脂肪酸’に対する‘受けやすい不飽和脂肪酸’の割合を示す脂肪酸不飽和度 (FU: fatty acid unsaturation index) を設定した。これは以下の式で計算する。

$$FU = ([C_{16:1}FA] + [C_{18:1}FA]) / ([C_{16:0}FA][C_{18:0}FA])$$

[C<sub>xy</sub>FA]: 炭素数 x の y 不飽和脂肪酸の濃度

その結果、本研究の化石試料のFUは0.29~0.57であったが、掛川クジラ No. 2試料は他と大きく異なった高い値 (FU=4.2) を示した (Table 2)。この値から、化石の保存度を半定量的に評価できると考えられる。また、本研究の掛川クジラ No. 2試料のように、

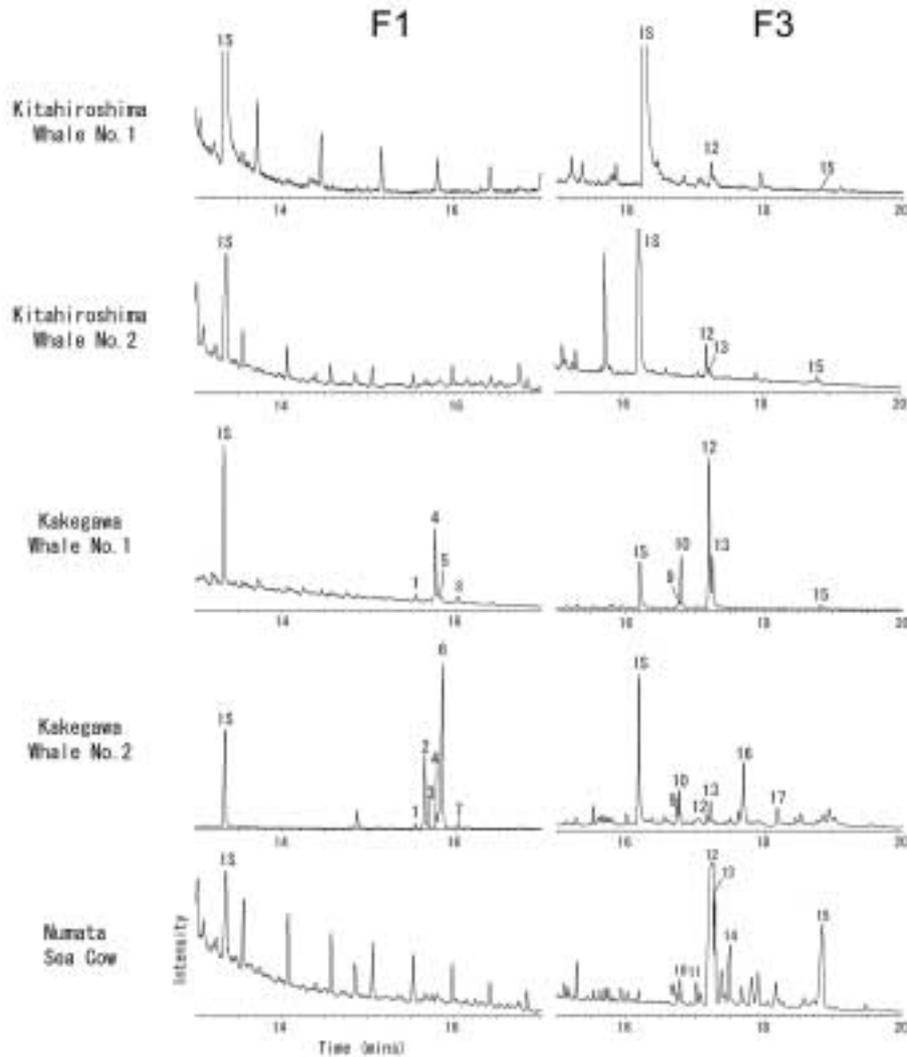


Fig. 2 Partial total ion chromatogram of F 1 and F 3 in bone fossils of marine-mammals. Peak assignments are shown in Table 3.

FUが1以上（つまり不飽和脂肪酸が飽和脂肪酸より多い）の場合は汚染の影響が大きい可能性を指摘できる。つまり、化石の形態的な保存状態や他の有機分子から得られる続成に関するデータと比較しながら、

FUから汚染のチェックを行うこともできることを提案する。

ステロイドについて、掛川クジラ No. 2試料からは C<sub>27</sub>のステロイド炭化水素と C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub>のステロ-

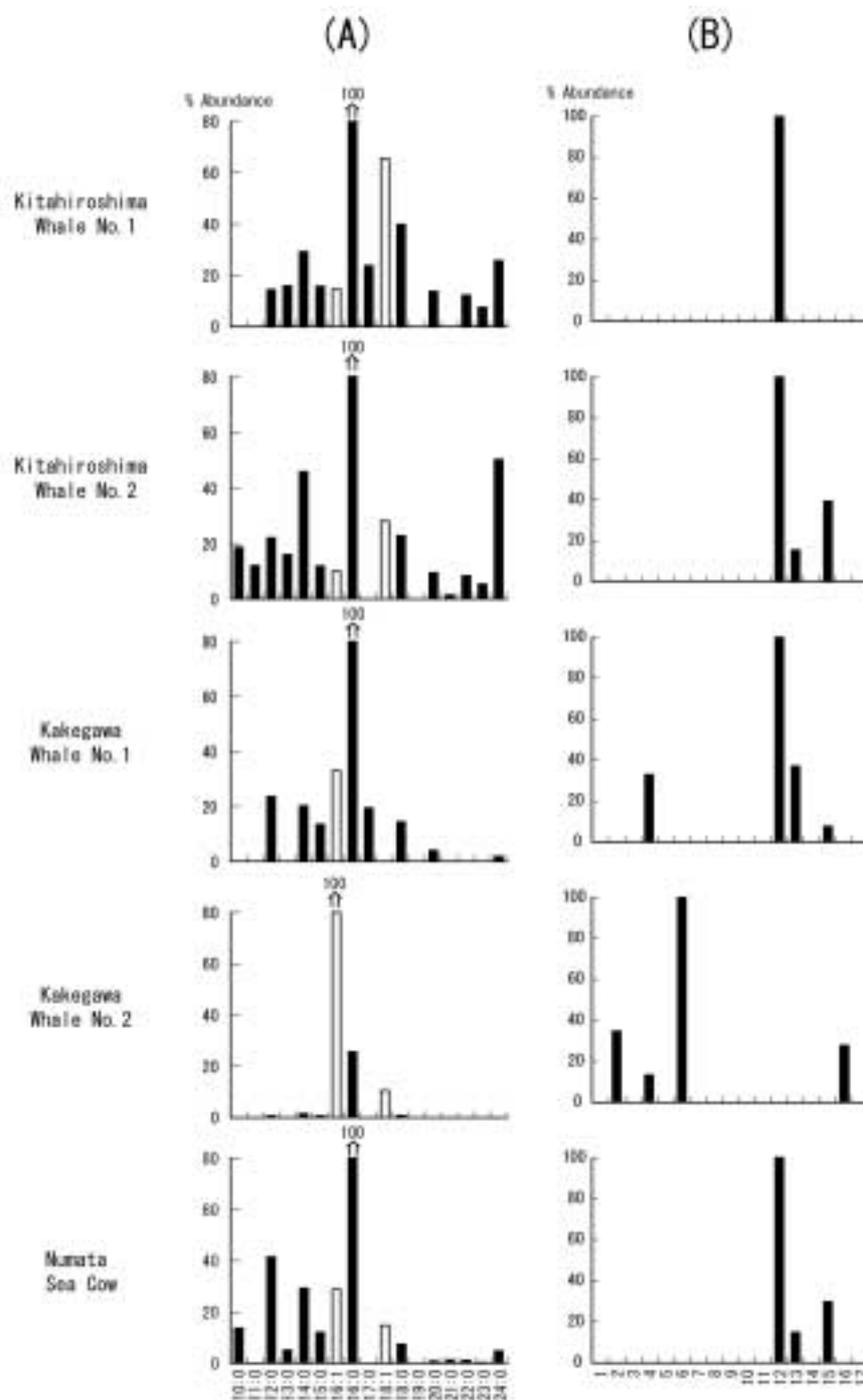


Fig. 3 Molecular distributions of fatty acids (A) and steroids (B). x: y in (A): x and y are carbon number and numbers of double bonds in fatty acids. Numbers in (B) correspond to those in Fig. 2.

ルが検出された。哺乳類の骨にはコレステロールが大量に含まれているため、 $C_{27}$ のステロイドとして保存されると考えられる。一方、 $C_{28}$ 、 $C_{29}$ のステロイドは動物が普通、合成しないステロイドである。したがって、掛川クジラ No. 2試料においては、クジラが持っていたステロイドに他の生物のステロイドが供給されたと考える必要がある。また、 $C_{27}$ のステロイドとそれ以外のステロイドは、化合物の種類から推定される続成段階が大きく異なる。 $C_{27}$ のステロイドはおもにコレスタンなどのステロイド炭化水素として同定されるため、熱的な続成作用を受けていると推定される (Fig. 3 b)。一方、 $C_{28}$ 、 $C_{29}$ のステロイドはスタロールとしてのみ同定された (Fig. 3 b)。これは、低い続

成作用しか受けていないことを意味する。さらに、この試料は前述したように脂肪酸の汚染が考えられることから、転石として地表に露出していた時に脂肪酸と同様にステロールの汚染があったものと推察した。

掛川クジラ No. 1試料からは鮮新世の試料でありながら、コレステロールがおもに検出された (Fig. 3 b)。この試料は泥岩に挟在する細粒砂岩層から産出したが、形態的によく保存されており、多量の脂質がよく保存されたと考えられる。さらにチャネルを埋積した砂岩層から産出したことから考えられる比較的急速な埋積が、微生物による活発な分解を抑えたと考えられる。第四紀の試料である北広島の試料からは、コレステロールやコレスタノール、コレスタノールケトンのみ検出され (Fig. 3), 低い続成作用しか受けていないことを示している。また、これらの試料は海浜域に堆積した礫層より産出し (篠原ほか, 1980; 木村ほか, 1983), 透水性の岩相で、リワークを繰り返す堆積環境であることから考えて、微生物による活発な分解は起こりつつも、骨の中で脂質成分がよく保存されたと考えられる。沼田カイギュウ試料は中新世の試料であるにも関わらず、コレステロールやコレスタノール、コレスタノールケトンのみ検出された (Fig. 3 b)。この試料は関節した状態で硬質細粒砂岩より産出した極めて保存のよい試料であり (古沢, 1996), 泥岩による隔離に加え、保存状態の良さやカイギュウ類の厚い緻密質により分解作用を抑えることができたと考えられる。

分析したすべての試料からはその動物に由来すると考えられる  $C_{27}$ のステロイドが検出された。骨試料中

Table 3 Peak assignments for steroids labeled in Fig. 2

Peak	Compound name
1	$C_{27}$ sterene isomer
2	5 $\beta$ (H)-cholestane (coprostanane)
3	$C_{27}$ sterene isomer
4	cholest-4-ene
5	cholest-5-ene
6	5 $\alpha$ (H)-cholestane
7	$C_{24}$ sterene isomer
8	24-methylcholest-3,5-diene
9	$C_{27}$ sterol isomer
10	5 $\beta$ (H)-cholestanol (coprostanol)
11	5 $\beta$ (H)-cholestan-3-one
12	cholesterol
13	5 $\alpha$ (H)-cholestanol
14	cholest-3,5-diene-7-one
15	cholest-5-ene-3 $\beta$ -ol-7-one
16(ST28)	$C_{24}$ 24-methylcholestanol
17(ST29)	$C_{29}$ 24-ethylcholestanol

Table 4 Concentrations ( $\mu\text{g/g}$ ) of steroids in bone fossils of marine mammals. Bold numbers correspond to the peak numbers in Fig. 2 (see Table 3).

Samples	Steroid hydrocarbon (F1)					Steroidal ketone and sterol (F3)					
	$C_{27}$ sterene isomer	coprostanane	$C_{27}$ sterene isomer	cholest-4-ene	cholestane	$C_{27}$ sterol isomer	coprostanol	cholestan-3-one	cholesterol	cholestanol	cholest-5-ene-3 $\beta$ -ol-7-one
	1	2	3	4	6	9	10	11	12	13	15
Kitahiroshima Whale No. 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.02	n.d.	n.d.
Kitahiroshima Whale No. 2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.00	n.d.	0.04	0.01	0.01
Kakogawa Whale No. 1	n.d.	n.d.	n.d.	0.29	n.d.	0.32	0.29	0.09	0.74	0.25	0.08
Kakogawa Whale No. 2	0.02	0.21	0.02	0.08	0.61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Naruta Sea Cow	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.26	n.d.	2.35	0.35	0.70

n.d.: no detection

のコレステロールの起源には、1) 血液中の脂質、2) 骨髄中の脂質、3) 細胞中の脂質の3通りが考えられている (Stott *et al.*, 1999)。Evershed *et al.* (1995) は考古学的なヒトや動物の骨試料からコレステロールやその続成産物を抽出し、それぞれの試料でステロイド組成には多様性があったが、 $C_{27}$ ステロイドのみであったことを報告した。この研究では骨試料中でコレステロールからコレスタン-3-オンを仲介しコレスタノールへいたる経路があることを指摘している。本研究で用いた同一堆積盆から産出した二つの試料 (掛川クジラ No. 1試料, 掛川クジラ No. 2試料) からはステロールとステロイド炭化水素 (掛川クジラ No. 1試料はコレステロールやコレスタノール, コレステンを含み, 掛川クジラ No. 2試料はコレステンとコレスタ

ンを含む) が検出された。このことから骨中のコレステロールは、動物の死後に続成変化し、還元・脱水の反応を経てコレスタノール, コレステンへ変化し、さらに水素付加によってコレスタンへ変化する経路が考えられる (Fig. 4)。なお、ステロールのスタノール化はスタノンを経しても起こるが、沼田カイギュウ試料以外からはコレスタン-3-オンは検出されていない。このことから、本研究で用いた試料の初期続成変化におけるコレステロールのコレスタノール化のほとんどはバクテリアによる直接の還元反応であると考えられる。また、ステロイドケトン (cholest-5-ene-3 $\beta$ -ol-7-one) は多くの試料から検出されており、酸化反応によってステロイドケトンへと変化した後に、コレステンを経てコレスタンへ変化したものと考えられる

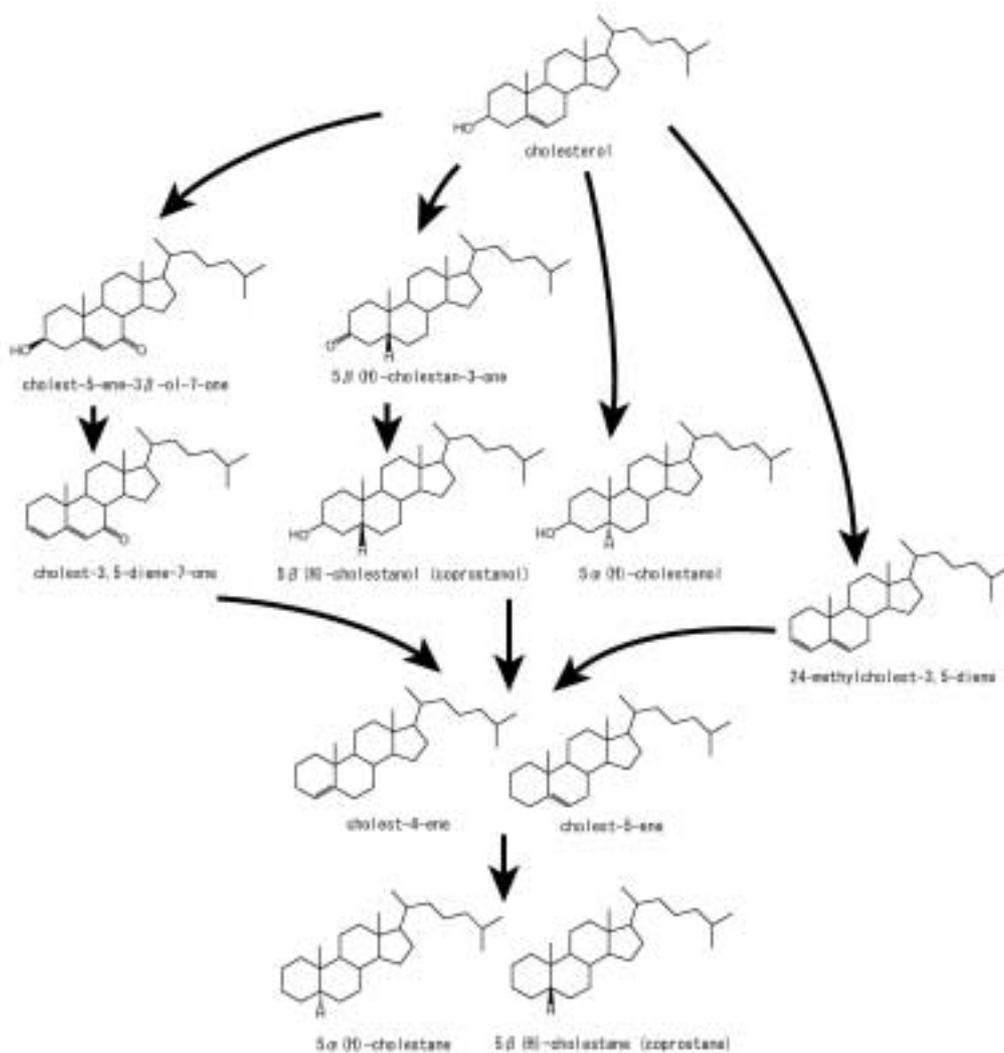


Fig. 4 Proposed diagenesis of cholesterol in fossil bone samples (after Meyers and Ishiwatari, 1993; Killops and Killops, 2005).

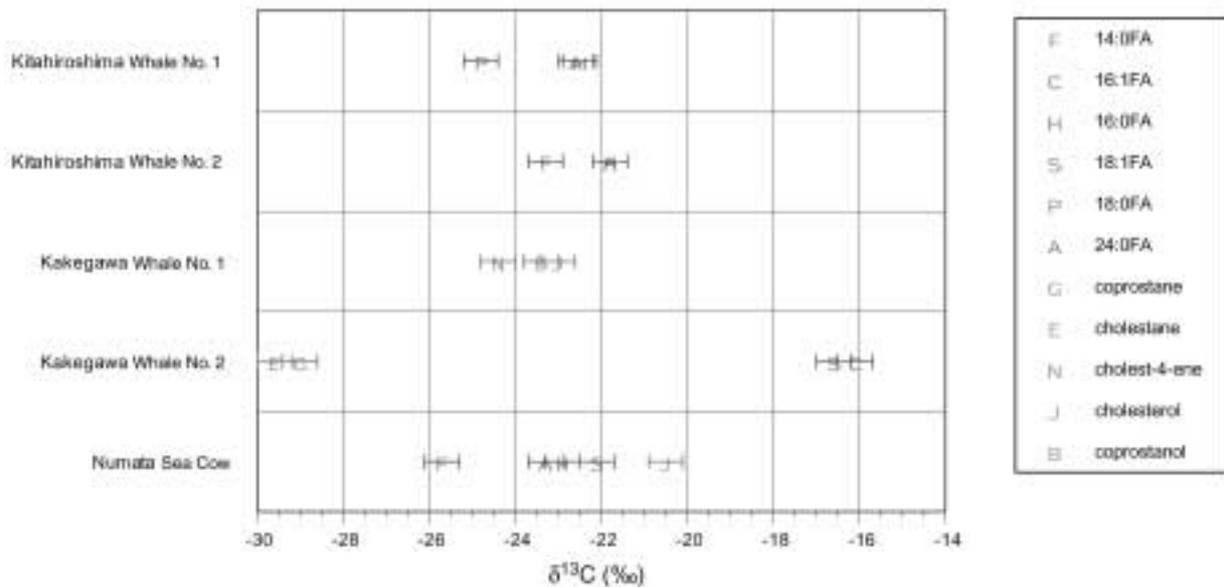


Fig. 5  $\delta^{13}\text{C}$  values of steroids and fatty acids measured for bone fossils of marine mammals. Error bars are  $\pm 0.4\%$ .

(Fig. 4). Evershed *et al.* (1995) により75000年前の骨試料からコレステロールが抽出されたのは、永久凍土層という特殊な環境に埋積されたため保存されたと考えられているが (Jim *et al.*, 2004), 本研究で用いた中新世の試料からでもコレステロールが大量に検出されたことは、今後さらに古い時代の骨試料についてステロイドが検出される可能性を示唆する。

### 3.4 化石試料のステロイド、脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値から古食性解析

北広島の試料 (北広島クジラ No. 1試料, 北広島クジラ No. 2試料) の脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-24.8\sim-21.8\%$ であり, ステロイドは微量であったため $\delta^{13}\text{C}$ 値を得られなかった。C<sub>14</sub>脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値が小さい傾向が見られた。掛川クジラ No.1試料のステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-24.4\sim-23.0\%$ であり, 脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値は微量であったため測定できなかった。掛川クジラ No. 2試料のコレステランとコプロスタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-29.6\sim-29.0\%$ , 脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-16.6\sim-16.1\%$ と大きく異なった。沼田カイギュウ試料のステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-20.5\%$ , 脂肪酸の $-25.7\sim-22.1\%$ と両者は最大5%の違いがあった。また, 脂肪酸の化合物間でも3.5%ほどの差が見られ, 北広島試料と同様にC<sub>14</sub>脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値が小さい。

本研究では, 掛川クジラ No. 1試料のステロールとステランの $\delta^{13}\text{C}$ 値がやや異なるが, それ以外のステ

ロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は測定誤差の範囲内であり, 同じ値であったとよい。つまり, 化石中のステロイドの炭素同位体比は, 続成作用による同位体分別が起こっていないと考えられる。Stott *et al.* (1997 a) の研究では, コレステロールとステロイドケトン (cholest-5-ene-3 $\beta$ -ol-7-one) の $\delta^{13}\text{C}$ 値が同じであることを示し, 両者の間での同位体分別はないとしている。一方, 脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値は化合物間で約2~4%の違いが見られた。この脂肪酸の化合物間における $\delta^{13}\text{C}$ 値の多様性については, 化石中の脂肪酸の起源の多様性が大きな原因の1つであると考えている。FUの評価から言及したように, 掛川クジラ No. 2試料の脂肪酸は汚染の可能性が高く, クジラの食性を反映したものではないと考えられる。これらの結果から, 化石中の脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値の古食性解析への適用性は低いと考えざるを得ない。しかし, 化石ステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は, より適用性の高い古食性指標になりうる。

動物体のコレステロールは食物の同位体比に調和的であり (Stott and Evershed 1996; Jim *et al.*, 2003), すでにヒトやクジラ類の骨試料からステロイドを抽出し, その $\delta^{13}\text{C}$ 値を用いた古食性解析について議論されている (Stott *et al.*, 1996; Stott *et al.*, 1997 a)。Stott *et al.* (1999) は, コレステロールやその続成産物が古食性解析に使われる利点について, 以下のよう

Table 5  $\delta^{13}\text{C}$  values of steroids and fatty acids measured for bone fossils of marine mammals.

Sample	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$										
	Fatty acid						Steroid				
	$\text{C}_{14:0}$	$\text{C}_{16:1}$ (+ $\text{C}_{16:0}$ )	$\text{C}_{18:0}$	$\text{C}_{20:1}$ (+ $\text{C}_{20:0}$ )	$\text{C}_{22:1}$	$\text{C}_{24:1}$	copro-ster	chole-ster	cholest- -4-ene	cholesterol	coprostanol
Kitahiroshima Whale No.1	-	-	-22.5	-	-24.8	-22.6	-	-	-	-	-
Kitahiroshima Whale No.2	-23.3	-	-21.8	-	-	-21.8	-	-	-	-	-
Kakegawa Whale No.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-24.4	-23.0	-23.4
Kakegawa Whale No.2	-	-16.1	-	-16.6	-	-	-29.0	-29.6	-	-	-
Numata Sea Cow	-25.7	-	-22.9	-22.1	-	-23.3	-	-	-	-20.5	-

を用いて、コレステロールを同定しやすいこと。(2) 骨中のコレステロールはその動物に由来すると言えること。(3) 骨試料からは数種類のコレステロールの続成産物が検出されるが、ステロイド環は維持され、続成作用による同位体効果がないと考えられていること。(4) コレステロールの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、食物の糖や脂質の元来持つ同位体比に基づいていること。これらステロイドを含め脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値は食物より数%軽くなるのが餌を管理したブタやネズミで知られている (Stott *et al.*, 1997 b; Stott *et al.*, 1999; Jim *et al.*, 2004)。Jim *et al.* (2004) では、コレステロールと全体的な食物の同位体比の間で、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{cholesterol}} = 0.81 \delta^{13}\text{C}_{\text{whole diet}} - 6.96$ という関係式を得ている。なお、同個体において考古学的な試料に残存するステロイドには部位ごとで濃度の違いはあるものの、 $\delta^{13}\text{C}$ 値はほぼ一定であることが、ヒトの骨や歯によって示され (Stott and Evershed, 1996; Stott *et al.*, 1999), 別個体における別部位同士の $\delta^{13}\text{C}$ 値の比較も有効であることも示されている。また、ステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、コラーゲンやアパタイトに比べて短期間の食性を示すため、長期間の食性を平均化したコラーゲンなどとあわせて解析することにより、より詳細な食性解析が可能であるとも考えられている (Stott *et al.*, 1999; Jim *et al.*, 2001)。

本研究で分析した掛川クジラ No. 1試料のステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-24.4\text{‰}$ であったが、掛川クジラ No. 2試料のステロイドは $-29.6\text{‰} \sim -29.0\text{‰}$ であった。また、掛川クジラ No. 1試料のステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、北広島試料 (クジラ類) の脂肪酸のそれとほぼ同じである。この掛川クジラ試料のステロイドの目だつて小さい $\delta^{13}\text{C}$ 値について、その理由を現時点では明確に説明することはできない。しかし、クジラは大規模な

回遊を行うので、クジラが経験してきた多様な海域の環境や食物の多様性を受けて、 $\delta^{13}\text{C}$ 値が個体間で大きな幅を持っている可能性は十分あり得る。Stott *et al.* (1997 a) によって測定されたクジラ類の現生と化石試料のステロイドの値は $-25.7\text{‰} \sim -21.5\text{‰}$ であり、掛川クジラ No. 1試料とほぼ同じであるが、掛川クジラ No. 2試料とは大きく異なる。クジラ類、特に大規模な回遊を行う現生ヒゲクジラ類 (ミナミセミクジラ) の鯨髭は根元から先端にかけて $\delta^{13}\text{C}$ 値は回遊にあわせて最大8%も変動することが知られ (Best and Schell, 1996), ステロイドの置換速度は速いことから考えて、同一個体においてもステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値が回遊に合わせて変動することも考えられる。本研究のクジラ類試料の大幅な $\delta^{13}\text{C}$ 値の違いは、摂餌場の食物となる動物プランクトンの $\delta^{13}\text{C}$ 値を反映していると推察する。掛川クジラ No. 2試料は他の試料とは異なる $\delta^{13}\text{C}$ 値の摂餌場を利用して来たばかりであったことを示している可能性がある。

一方、カイギュウ類 (*Dusisiren* sp.) のステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-20.5\text{‰}$ であり、その値から推定される食物の $\delta^{13}\text{C}$ 値は、食物と考えられるケルプのような海藻類 (大部分は $-10\text{‰} \sim -30\text{‰}$ ) のほぼ中央の値であることから (Raven *et al.*, 2002), これまでに考えられている食性と矛盾しない。さらにクジラ類のように大規模な摂餌場の回遊を行わないために個体間の $\delta^{13}\text{C}$ 値の変動がほとんどないと考えられる。したがって、短期の食性を反映する脂質の $\delta^{13}\text{C}$ 値はカイギュウ類の食性解析に有効であると思われる。

#### 4. ま と め

本研究では、鮮新世～更新世のクジラ化石と中新世のカイギュウ化石 (*Dusisiren* sp.) に含まれる脂肪

酸とステロイドの分析を行った。それらの濃度と化合物分布から続成作用の影響を評価し、またそれらの炭素同位体比から古食性解析について検討し、以下のような結果を得た。

1. クジラ化石およびカイギュウ化石すべてから、脂肪酸とステロイドが検出された。更新世のクジラ化石試料ではステロールのような生体成分と同じ化合物が同定された。一方、鮮新世のクジラ化石試料からはステロイド炭化水素のような続成生成物として検出された。しかし、カイギュウ化石は、中新世試料でありながらステロールが比較的多量に検出された。このことから、カイギュウ化石中のステロイドが古生物化学・有機地球化学の研究を行う上で、非常に有用であることを確認した。

2. クジラ化石およびカイギュウ化石すべてから、生体がつまみ分解成分と考えられる不飽和脂肪酸が検出された。とくに掛川層群の転石として得られたクジラ化石からもっとも多量の成分として不飽和脂肪酸が得られた。この化合物は化石となった生物に由来するものではなく、他の生物由来か、現代の汚染であると推察した。また、化石中の有機物の続成変化の定量的な評価、または汚染をチェックする指標として、不飽和脂肪酸の相対比を使うことを提案した。

3. クジラ化石およびカイギュウ化石の脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値は、 $-25.7\sim-16\%$ と広い値を示し、同一化石から得られた脂肪酸の各化合物間でも $1\sim4\%$ の違いが見られた。このことから、脂肪酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値の古食性解析への応用は検討が必要であると考えられる。

4. クジラ化石におけるステロイドの各化合物の $\delta^{13}\text{C}$ 値は、同一試料ではほとんど同じ値であることがわかった。ただし、試料の間で $-29.6\sim-24.4\%$ という広い値をとり、それぞれの個体が経験した摂餌場の環境や動物プランクトンの $\delta^{13}\text{C}$ 値を反映している可能性がある。

5. カイギュウ化石のステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-20.5\%$ であり、従来考えられているカイギュウ類の食物の $\delta^{13}\text{C}$ 値と調和的である。保存状態やカイギュウ類の生態的特徴を考えると、カイギュウ化石中のステロイド $\delta^{13}\text{C}$ 値は古食性解析においてより有効な指標になり得ると提案できる。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、北海道大学大学院理学研究科の鈴木徳行教授には終始有意義なご助言を頂いた。また、本研究で使

用した試料は東海大学自然史博物館の柴正博博士、藤田和美氏、北海道開拓記念館の山田悟郎学芸員、北海道教育大学名誉教授の木村方一氏、沼田町化石館の山下茂氏（故人）のお世話になった。海洋研究開発機構の高野淑識博士には本稿の査読を通して、東京大学海洋研究所の川幡穂高教授には本稿の査読・編集を通して、有益なコメントをいただいた。以上の方々と機関に厚くお礼申し上げる。本研究を進めるにあたり、文部科学省科学研究費（課題番号: 16740291, 18684028）の一部を使用した。また、本研究の一部は文部科学省21世紀COEプログラム（北大 新・自然史科学創成: 自然界における多様性の起源と進化、プログラムリーダー 岡田尚武）の助成による。

## 文 献

- Ackman, R. G. and Lamothe, F. (1989) Marine mammals. In: *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils, Vol. 2* (ed. Ackman, R. G.), CRC Press, Florida, 179-381.
- Amo, M., Suzuki, N., Shinoda, T., Ratnayake, N. P. and Takahashi, K. (2007) Diagenesis and distribution of sterenes in Late Miocene to Pliocene marine siliceous rocks from Horonobe (Hokkaido, Japan). *Organic Geochemistry*, **38**, 1132-1145.
- Barrick, R. E. and Showers, W. J. (1994) Thermophysiology of *Tyrannosaurus rex*: evidence from oxygen isotopes. *Science*, **265**, 222-224.
- Best, P. B. and Schell, D. M. (1996) Stable isotopes in southern right whale (*Eubalaena australis*) baleen as indicators of seasonal movements, feeding and growth. *Marine Biology*, **124**, 483-494.
- Bocherens, H., Drucker, D. G., Billiou, D., Geneste, J.-M. and van der Plicht, J. (2006) Bears and humans in Chauvet Cave (Vallon-Pont-d'Arc, Ardèche, France): insights from stable isotopes and radiocarbon dating of bone collagen. *Journal of Human Evolution*, **50**, 370-376.
- Clementz, M. T. and Koch, P. L. (2001) Differentiating aquatic mammal habitat and foraging ecology with stable isotopes in tooth enamel. *Oecologia*, **129**, 461-472.
- Clementz, M. T., Hoppe, K. A. and Koch, P. L. (2003) A paleoecological paradox: the habitat and dietary preferences of the extinct tethythere *Desmostylus*, inferred from stable isotope analysis. *Paleobiology*, **29**, 506-519.
- DeNiro, M. J. (1985) Postmortem preservation and alteration of *in vivo* bonecollagen isotope ratios in relation to palaeodietary reconstruction. *Nature*, **317**, 806-809.
- Evershed, R. P., Turner-Walker, G., Hedges, R. E. M., Tuross, N. and Leyden, A. (1995) Preliminary results for the Analysis of Lipids in Ancient Bone. *Journal of Archaeological Science*, **22**, 277-290.
- 藤岡換太郎・和田秀樹・岡野肇 (1993) 鳥島海山の鯨骨に群がる深海生物群集—しんかい6500による新しい発見—。地学雑誌, **102**, 507-571.
- 古沢仁 (1996) 北海道・沼田町の上中新統から発見された新たな海牛類化石。化石, **60**, 1-11.
- Jim, S., Stott, A. W., Evershed, R. P., Rogers, J. M. and Ambrose, S. H. (2001) Animal feeding experiments in the de-

- velopment of cholesterol as a palaeodietary indicator. In: *Archaeological Science 1997* (ed. A. Millard), BAR International Series, **939**, Oxford, 68–77.
- Jim, S., Ambrose, S. H. and Evershed, R. P. (2003) Natural abundance stable carbon isotope evidence for the routing and *de novo* synthesis of bone FA and cholesterol. *Lipids*, **38**, 179–186.
- Jim, S., Ambrose, S. H. and Evershed, R. P. (2004) Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite: Implications for their use in palaeodietary reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **68**, 61–72.
- Killops, S. and Killops, V. (2005) Chemical stratigraphic concepts and tools. In: *Introduction to Organic Geochemistry 2nd edition* (eds. Killops, S. and Killops, V.), Blackwell Publishing, Oxford, UK, 166–245.
- 木村方一・外崎徳二・赤松守雄・北川芳男・吉田充夫・亀井節夫 (1983) 北海道石狩平野・野幌丘陵からの前期—中期更新世哺乳動物化石群の発見. 地球科学, **37**, 162–177.
- Meyers, P. A. and Ishiwatari, R. (1993) The early diagenesis of organic matter in lacustrine sediments. In: *Organic Geochemistry* (eds. Engel, M. H. and Macko, S. A.), Plenum Press, New York, 185–209.
- 中村俊夫・大塚裕之・奥野充・太田友子 (1996) 東シナ海の大陵棚および琉球弧の海底から採取された, 哺乳類化石の加速器質量分析法による<sup>14</sup>C年代測定. 地学雑誌, **105**, 306–316.
- 奈良岡浩・山田桂太・松岡公平・石渡良志 (1997) ガスクロマトグラフ燃焼同位体比質量分析計を用いた有機分子レベルの軽元素同位体比測定と地球化学への応用. 地球化学, **31**, 193–210.
- Peakman, T. M., De Leeuw, J. W. and Rijpstra, C. I. W. (1992) Identification and origin of  $\Delta^{8(14)}$  5 $\alpha$ - and  $\Delta^{14}$  5 $\alpha$ -sterenes and related hydrocarbons in an immature bitumen from the Monterey Formation, California. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **56**, 1223–1230.
- Raven, J. A., Johnston, A. M., Kubler, J. E., Korb, R., McNroy, S. G., Handley, L. L., Scrimgeour, C. M., Walker, D. I., Beardall, J., Vanderklift, S. and Dunton K. H. (2002) Mechanistic interpretation of carbon isotope discrimination by marine macroalgae and seagrass. *Function Plant Biology*, **29**, 355–378.
- 沢田健・有田陽子・中村俊夫・秋山雅彦・亀井節夫・中井信之 (1992) 加速器質量分析計を用いた<sup>14</sup>C年代測定による野尻湖層の編年. 地球科学, **46**, 133–142.
- Sawada, K. and Shiraiwa, Y. (2004) Alkenone and alkenoic acid compositions of the membrane fractions of *Emiliania huxleyi*. *Phytochemistry*, **65**, 1299–1307.
- 新村龍也・柴正博・横山謙二・北村孔志 (2001) 掛川市上西郷における掛川層群産鯨目化石発掘調査の成果—海生哺乳類化石—. 東海大学博物館研究報告「海・人・自然」, **3**, 91–99.
- 篠原暁・木村方一・古沢仁 (1980) 北海道石狩平野の野幌丘陵から発見されたステラー海牛について. 地団研専報, **30**, 97–117.
- Schoeninger, M. J. and DeNiro, M. J. (1982) Carbon isotope ratio of apatite from fossil bone cannot be used to reconstruct diets of animals. *Nature*, **297**, 577–578.
- Schoeninger, M. J. and DeNiro, M. J. (1984) Nitrogen and carbon isotopic composition of bone collagen from marine and terrestrial animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **48**, 625–639.
- Sillen, A. (1992) Strontium-calcium ratios (Sr/Ca) of Australopithecus robustus and associated fauna from Swartkrans. *Journal of Human Evolution*, **23**, 495–516.
- Stott, A. W. and Evershed, R. P. (1996)  $\delta^{13}\text{C}$  Analysis of cholesterol preserved in archaeological bones and teeth. *Analytical Chemistry*, **68**, 4402–4408.
- Stott, A. W., Davies, E., Evershed, R. P. and Tuross, N. (1997 a) Compound-specific approach to the  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of cholesterol in fossil bones. *Organic Geochemistry*, **26**, 99–103.
- Stott, A. W., Davies, E., Evershed, R. P. and Tuross, N. (1997 b) Monitoring the routing of dietary and Biosynthesised lipids through compound-specific stable isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ) measurements at natural abundance. *Naturwissenschaften*, **86**, 82–86.
- Stott, A. W., Evershed, R. P., Jim, S., Jones, V., Rogers, J. M., Tuross, N. and Ambrose, S. H. (1999) Cholesterol as a new source of palaeodietary information: experimental approaches and archaeological applications. *Journal of Archaeological Science*, **26**, 705–716.
- Sullivan, C. H. and Krueger, H. W. (1981) Carbon isotope analysis of separate chemical phases in modern and fossil bone. *Nature*, **292**, 333–335.
- Tuross, N., Marilyn, L. F., and Hare, P. E. (1988) Variability in the preservation of the isotopic composition of collagen from fossil bone. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **52**, 929–935.
- van der Merwe, N. J. and Vogel, J. C. (1978) <sup>13</sup>C Content of human collagen as a measure of prehistoric diet in woodland North America. *Nature*, **276**, 815–816.

追記: 2009年6月に IUGS (国際地質科学連合) によって, 第四系の基底が1.806 Ma から2.558 Ma と改訂されたため, 本論文の掛川クジラ No. 1試料 (大日層) の地質時代は前期更新世となった。