

化石骨のラセミ化年代測定

松浦秀治* 植田伸夫**

I, はじめに

骨は主に含水リン灰石という鉱物結晶とコラーゲンと呼ばれる繊維蛋白質の基質からできているが、堆積物中に埋没した骨は続成作用の過程で、その組成を変えていく。骨の無機成分の年代変化は古くから研究され、現在ではフッ素、ウラン、マンガンなどの微量成分の含有量は化石骨の相対年代判定に適した基準を与えることが知られている (Oakley, 1969; 田辺, 1967; 下田, 1977; 松浦, 1978; 他)。一方コラーゲンは更新世後期の化石骨からその基本的性質がほとんど変化していないものが分離される (Ho, 1965, 1966) など、耐性の強い蛋白質であるが、土中で、加水分解作用を受け、その量は漸次減少していく。蛋白質の残存量は化石骨に含まれるチッ素の量を指標として表現され、フッ素分析・ウラン分析などと併せて骨の新旧判定に利用されている (Oakley, 1969; 他)。

このような、化石の構成成分の変化とは別に、量の増減とは独立な化学反応の1種——アミノ酸のラセミ化反応——が注目され (Hare & Mitterer, 1967; Hare & Abelson, 1968), 種々の化石試料の絶対年代推定に有効であることが示された (Bada & Schroeder, 1975; Schroeder & Bada, 1976)。化石骨のラセミ化年代測定法は、ここ数年間に開発され (Bada & Helfman, 1975; Bada *et al.*, 1979b), 第四紀全般にわたる年代測定範囲を持つものとして、その有用性が期待されている。アミノ酸のなかでは、アスパラギン酸が、更新世後期・完新世の堆積物から出土した骨の年代推定に適したラセミ化速度を持つため、最も広く利用されている (Bada & Protsch, 1973; Bada *et al.*, 1974a, 1974b; Bischoff & Childers, 1979; Ike *et al.*, 1979; Matsu'ura & Ueta, 1980; 他)。このアスパラギン酸ラセミ化年代測定法は、 ^{14}C 法を適用するには古すぎるか、小さすぎるかする骨試料には特に効力を発揮する。

本報告では、まずアミノ酸ラセミ化年代測定法の原理を述べ、次に化石骨での適用例を幾つか紹介する。また、骨のラセミ化年代測定の問題点、今後の方向、信頼性の判断基準などについても言及する。

* 国立科学博物館人類研究部，東京都新宿区百人町3-23-1

** 帝京大学医学部第1生化学教室，東京都板橋区加賀2-11-1

II, ラセミ化年代測定法の原理と年代算出式

有機分子の骨格を形成する炭素には“腕”が4本あり、結合しているまわりの原子または原子団は炭素を中心とする正四面体（四面ピラミッド型）の各頂点を占める配置をとる。炭素原子に結合している4つのものがみな違ったものである場合（“不斉炭素”という）、この炭素を中心とした四面体は対称面を持たない。少なくとも1つ以上の不斉炭素を持ち、全体として非対称である分子にはその鏡像にあたるもの（対掌体：enantiomer）が必ず存在する。また部分的には鏡像の関係にあるが他の部分の立体配置は同じであるもの（ジアステレオマー：diastereomer）が存在することもある。一对の対掌体は同じ呼び名を持つが、その立体配置によりL型（左配置）とD型（右配置）に分けられている。（注1）

ほとんどの天然アミノ酸は非対称性を持つため、その対掌体があり、2つ以上の不斉炭素を内在する場合には（イソロイシン、ヒドロキシプロリンなど）、さらにジアステレオマーを持つ。ところが、生体の蛋白質を構成するアミノ酸はごく少数の例外（細菌細胞壁など）を除けば、みなL型である。（注2）骨のコラーゲンもL型アミノ酸からなっているが、化石骨に残存するアミノ酸はL型、D型の混合物になっている。これは、L型のみであったものから、その対掌体であるD型が生成・増加し、最終的には両者の当量混合物（ラセミ体）へと変化していく反応——ラセミ化反応——が、漸次地質学的条件下で進行したためである。対掌体とともにジアステレオマーを持つアミノ酸では、ラセミ化というより正しくはエピメル化という反応が起こる。例えばL-イソロイシンは特異的にそのジアステレオマーであるD-アロイソロイシンへと変化する。しかし、この反応は α 位の炭素（ $-\text{COOH}$ 基の隣の炭素）に関して見れば、ラセミ化と同じ反応であるので、ここでは“ラセミ化”と統一して表現しておく。

ラセミ化のメカニズムはまだ十分に解明されていないが、Neuberger (1948) によって提出された“carbanion mechanism”が理解しやすい（図1）。 α 位の炭素と結合した陽子（水素イオン）

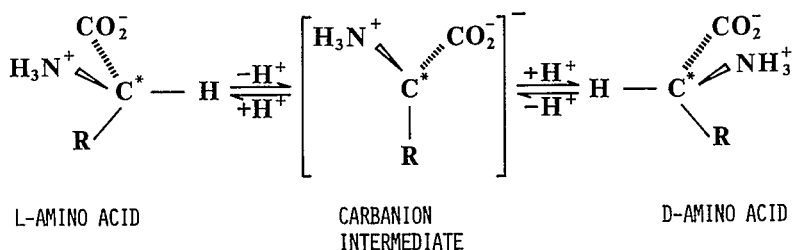


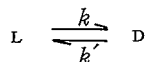
図1. アミノ酸のラセミ化の機構。
C*, α 位の不斉炭素；R, 置換基。

Fig. 1. Schematic representation of the carbanion mechanism for amino acid racemization.

C*, asymmetric carbon at the α -position.

が陰イオン（例：OH⁻, PO₄³⁻）などの作用によって取り去られ，planar carbanion という中間体が形成される。この中間体は陽子の再付加により，ただちにアミノ酸に戻るが，このときD型になるかL型になるかの確率は等しい。“carbanion mechanism”は，遊離アミノのラセミ化だけでなく，骨コラーゲンなどの結合アミノ酸におけるラセミ化反応にも適用される（Bada, 1972a ; Bada & Schroeder, 1975）。

アミノ酸のラセミ化は可逆一次反応であって次のように表現される。



k, k' は対応する一次反応の速度定数であり，LおよびDはそれぞれL-アミノ酸，D-アミノ酸の濃度を表わす。 t （経過時間）=0 のとき， $L = L_0, D = D_0 \rightleftharpoons 0$ とすれば， t 時間後の反応（L型の減少）速度は，

$$\begin{aligned} -\frac{dL}{dt} &= kL - k'D \\ &= kL - k'(L_0 - L) \end{aligned} \quad \cdots \cdots (i)$$

となり，(i)式を積分し，積分定数を考慮して変形すると，次の式を得る。

$$\ln \left\{ \frac{1 + \frac{D/L}{(k'/k)}}{1 - \frac{D/L}{(k'/k)}} \right\} = (1 + k'/k) kt \cdots \cdots (ii)$$

しかしながら，(ii)の左辺は試料の分析過程（加水分解過程）で起こる少量のラセミ化に対して補正する必要があるので，結局，年代算出式は次のような形で与えられる。

$$\ln \left\{ \frac{1 + \frac{D/L}{(1-K)}}{1 - \frac{D/L}{(1-K)}} \right\}_t - \text{constant} = (1 + K) kt \cdots \cdots (iii)$$

Kは平衡に達したときのD/L比（ $= k/k'$ ）の逆数を表わし，不斉炭素を1つしか持たない一般のアミノ酸（アスパラギン酸，アラニンなど）では $K=1$ となるが，2つ以上不斉炭素を持つ場合は（L-イソロイシン $\rightleftharpoons$ D-アロイソロイシンの反応など）1から少しはずれた値となる。また，(iii)式左辺の補正值（constant）はイ）化石骨と同様に処理した現世試料の分析結果（Bada & Protsch, 1973），又はロ）加水分解時間を幾つか変えて化石試料を分析した結果，から求められる（Matsu'ura, 1980）。

ラセミ化は化学反応であるから，その速度は，環境（主に温度，V章参照），アミノ酸の種類・存在状態によって決まる。化石骨をラセミ化年代測定するためには，同じ遺跡又は同じ地域から出土した年代既知（¹⁴C法，伴出遺物などによる）の骨を基準試料（calibration sample）とし，あらかじめその地域（温度）における特定のアミノ酸のラセミ化速度を推定しておく必要がある（Bada & Protsch, 1973 ; 他）。速度が決定されていなくても，埋存温度についての情報が得られれば，ラフな推定値が，また少なくとも相対年代は求められる。

Ⅲ，骨のラセミ化分析法操作

(i) アミノ酸の抽出

化石骨に残存するアミノ酸は酸脱灰，酸加水分解などによって得られる。ラセミ化年代は一般に，

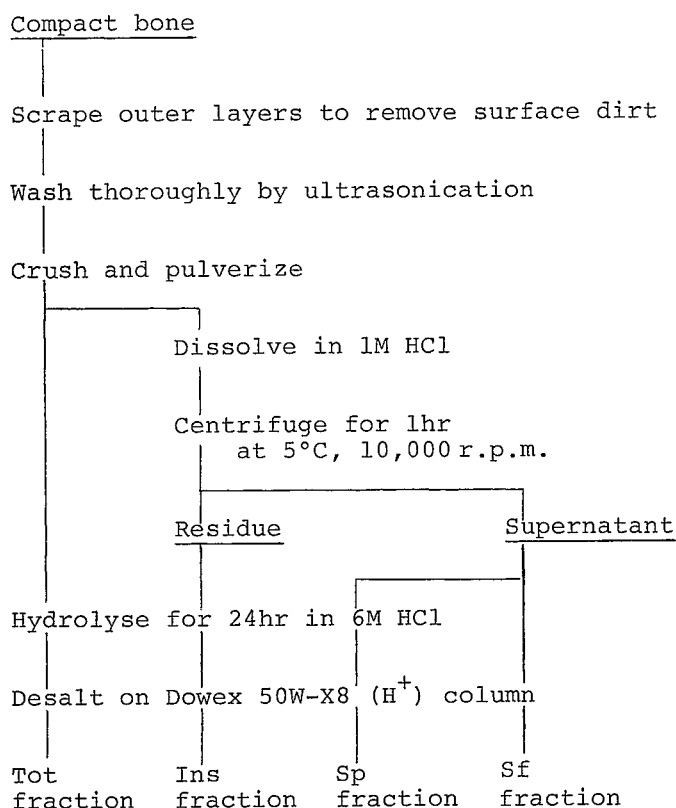


図2. 化石骨に残存するアミノ酸の分別抽出法。本文参照。

Fig. 2. Fractionation of remnant amino acids in fossil bone. Tot, total amino acid; Ins, insoluble (protein); Sp, soluble peptide-free amino acid; Sf, free amino acid.

抽出される総アミノ酸画分におけるD/L比から算出される (Schroeder & Bada, 1976; Bada *et al.*, 1979b)。つまり、脱脂・洗浄後、そのまま加水分解した骨を分析試料とするわけであるが、より信頼性の高い年代学的情報を得るためには、アミノ酸の存在様式 (蛋白質・ペプチド・遊離アミノ酸) によって分画処理をほどこし、それぞれのフラクション (画分) におけるラセミ化を評価することが望ましい (Matsu'ura & Ueta, 1980)。

図2に筆者らが行なっている分別抽出法を示す。ここでは、化石骨中のアミノ酸は、必要に応じ脱灰・遠心分離 (centrifugation)・加水分解 (hydrolysis) 過程を経て、総アミノ酸 (Tot)・不溶性コラーゲン (Ins)・可溶性ペプチド・遊離アミノ酸 (Sp)・遊離アミノ酸 (Sf) 4つのフラクションに分けられる。なお、化石骨には遊離アミノ酸は無視しうる量しか保存されていない (Schroeder & Bada, 1976; Matsu'ura & Ueta, 1980) ので、Spフラクションは、殆んどペプチドで構成される。

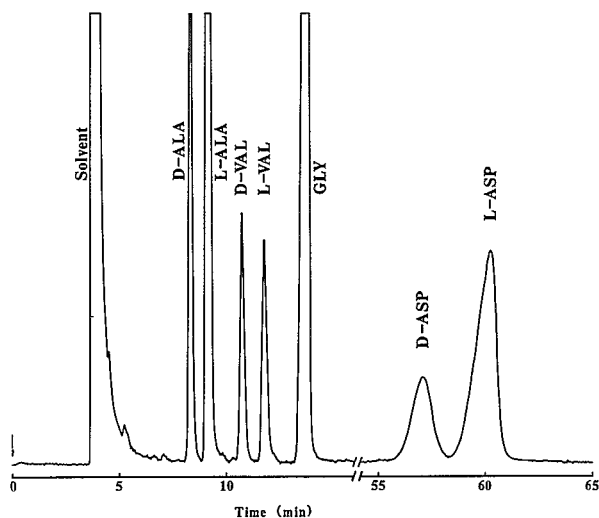


図 3. キャピラリーカラムによるアラニン (ALA), バリン (VAL), アスパラギン酸 (ASP) の D, L の分離.

GC 液相, N-lauroyl-L-valine *tert*-butylamide.

Fig. 3. Gas chromatographic separation of the N-TFA isopropyl esters of alanine, valine and aspartic acid on a 34m x 0.25mm i.d. column coated with N-lauroyl-L-valine *tert*-butylamide; temperature, 115°C; He pressure, 6 p.s.i.; FID detector.

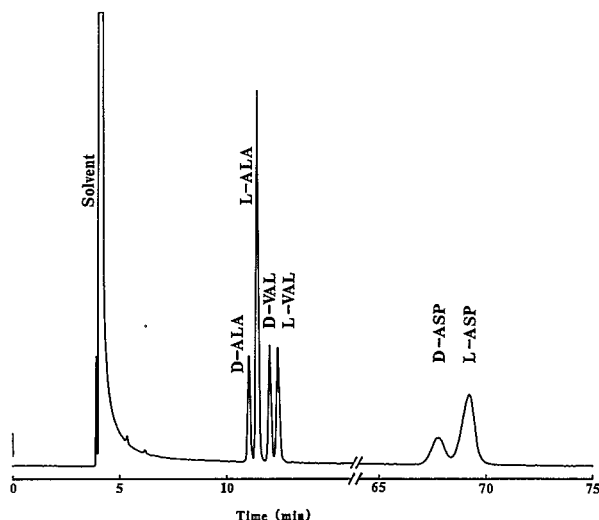


図 4. キャピラリーカラムによるアミノ酸の D, L 分離. (図 3 参照).

GC 液相, N, N'-[2, 4-(6-ethoxy-s-triazine)diyl]-bis-(L-valyl-L-valine isopropyl ester).

Fig. 4. Gas chromatographic separation of the N-TFA isopropyl esters of alanine, valine and aspartic acid on a 30m x 0.28mm i.d. column coated with N,N'-[2,4-(6-ethoxy-s-triazine)diyl]-bis-(L-valyl-L-valine isopropyl ester); temperature, 135°C; He pressure, 8.5 p.s.i.; FID detector.

(ii) アミノ酸の D/L 分析

現在行われているアミノ酸の D/L 比測定法を次にあげる。

A) 自動アミノ酸分析機 (AAAA) による方法

a) L-イソロイシン/D-アロイソロイシンの比：抽出したアミノ酸試料を特別な前処理なしでAAAAにかけ、定量する (Bada, 1972b ; 秋山, 1975 ; 他)。

b) アスパラギン酸の D/L 比：あらかじめアミノ酸試料からアスパラギン酸を分離しておく。

D および L 型はそれぞれ L-D, L-L のジペプチド (ジアステレオマーの関係) に合成され, AAAA 上で分離される (Manning & Moore, 1968 ; Bada & Protsch, 1973)。

B) ガスクロマトグラフィー (GC) による方法

幾つかのアミノ酸 (アラニン, アスパラギン酸, バリン, 他) の D/L 比を同時定量することが可能であり, GC 用液相の種類も豊富である。この方法は大きく分けて 2 つある。

a) アミノ酸を光学活性な分離試薬 (L 又は D 型のみからなる試薬) と反応させてジアステレオマーに誘導した後, 通常の光学非活性な固定液相を用いて分離する (Kvenvolden *et al.*, 1972 ; Hoopes *et al.*, 1978)。

b) アミノ酸を通常の揮発性誘導体に変え, 光学活性な固定相を用いて分離する (Gil-Av, 1975 ; 大井, 1978)。

筆者らが D/L 分析のルーティーンとしている方法 (Matsu'ura, 1980) は上述の B-b に属し, アミノ酸試料を, N-トリフルオロアセチル (TFA) -アミノ酸イソプロピルエステルに誘導した後, i) N-ラウロイル-L-バリン *t*-ブチルアミド (Feibush, 1971) 又はロ) N, N'-[2,4-(6-エトキシ-*s*-トリアジン) ジイル]-ビス-(L-バリン-L-バリンイソプロピルエステル) (大井, 1978 ; Matsu'ura & Ueta, 1980), を固定相とした 30m~50m の長さのガラスキャピラリーカラム (内径 0.25 mm 前後) で分離する。標準試料 (分析テスト用) のガスクロマトグラムを例として図 3, 4 に示す。ロの液相 (図 4) は i (図 3) に比べて, やや分離能が落ちるが, 熱安定性に優れ, カラムの寿命が長いという長所をもつ。

IV 化石骨試料への適用

ある種の化石試料をラセミ化年代測定し得るかどうかは, II 章で述べた一次反応の反応様式を実際の試料が満足しているかどうかによる。満足していない場合は相対年代しか与えない。

図 5 は骨を 148°C で加熱した時のイソロイシン (iso で表示) のラセミ化が可逆一次反応であることを示したものである (Bada, 1972b)。図 5 の中の挿入図は有孔虫試料で同様な実験を行なったものであるが, これは D/L 比が 0.35 を超えると直線からはずれる。有孔虫 (Bada & Schroeder, 1972), 貝 (秋山, 1975), 骨 (Dungworth *et al.*, 1974) などの蛋白質の加水分解によって生じ

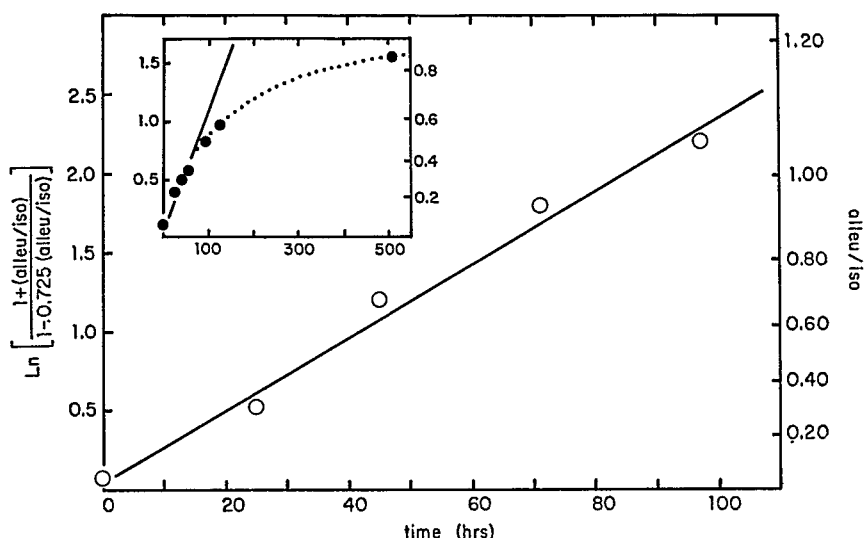


図5. 骨におけるイソロイシンのラセミ化（148°Cに加熱）。

挿入図は海底堆積物（有孔虫）の結果（148°C）を示す。Bada（1972b）より転載。

Fig. 5 The kinetics of racemization of isoleucine in bone at 148°C. The straight line is a least squares fit of the data. The insert shows the kinetics of racemization of isoleucine in a calcareous marine sediment at 148°C. In sediments, reversible first-order kinetics are approximated only up to alleu/iso $\cong$ 0.35 (indicated by the straight line in the insert).

Redrawn from Bada (1972b).

た遊離アミノ酸は結合アミノ酸より大きいラセミ化速度を持つため、遊離アミノ酸が化石中に保持され増加していくと、この影響により総アミノ酸フラクションのラセミ化は一次反応のモデルに合わなくなる。しかし貝などに較べて骨はより多孔質であるため、化石骨中の遊離アミノ酸は極く少量であり、わずかに残存していたものも超音波洗浄により殆んど取り去られてしまう（Ⅲ章の(i)参照）。このため、一般的に骨のラセミ化年代は総アミノ酸フラクションにおけるD/L比から算出される（Bada *et al.*, 1979b）。

図6は、ほぼ等しい温度条件下にある遺跡から出土した骨のラセミ化を表わしたものであるが、気温以外の埋存条件（雨量など）がかなり違っているにもかかわらず、アスパラギン酸のラセミ化はほぼ予想されたモデルに従っていることが示される（詳しいデータはBada & Shou, 1980を参照のこと）。

アスパラギン酸は地質学的環境下で安定なアミノ酸のなかで、最も早いラセミ化反応速度を持ち（Bada, 1972a; Bada *et al.*, 1973; Dungworth *et al.*, 1976）、化石骨におけるラセミ化の半減期（ $\ln 2 / (1+K) k$, Aspの場合D/L = 1/3になるまでの時間）は20°Cの場合約15,000年となるため、 ^{14}C 法などとのクロスチェックが可能である。また ^{14}C 法の年代測定範囲を超える試料にも適用できる。こうした例のいくつかを表1に示した。

表 1 アスパラギン酸ラセミ化年代値と他法による年代測定 (推定) 値との比較.

Table 1 Comparison of ages deduced by aspartic acid racemization and by other techniques.

Sample location	D/L aspartic acid	Radiocarbon, or geologically-inferred age (years)	Aspartic acid age (years)	Reference
Mulleta Cave, Mallorca, Spain	0.273* 0.293 0.455	16,850 ± 200 (UCLA 1704D) 18,890 ± 200 (UCLA 1704E) 28,600 ± 600 (UCLA 1704A)	$k=1.25 \times 10^{-5} \text{ yr}^{-1}$ 18,600 33,700	Bada <i>et al.</i> , 1974 b
Murry Springs, Arizona	0.33*	5,640 ± 60 (A-905A, B)	$k=4.84 \times 10^{-5} \text{ yr}^{-1}$	Bada <i>et al.</i> ,
	0.52	11,230 ± 340 (A-805)	10,500	1974 b
Double Adobe, Arizona	0.500	10,420 ± 100 (A-1152)	9,900	Bada & Helfman, 1975
South Africa, Coastal Sites				
Nelson Bay Cave	0.151* 0.167	16,700 ± 240 (I-6516) 18,100 ± 500 (UW-185) 18,660 ± 110 (GrN-5889)	$k=4.92 \times 10^{-6} \text{ yr}^{-1}$ 20,000	Bada & Deems, 1975
Klasies River Mouth Cave I				
Level 13	0.370	} ~80,000 to 120,000	65,000	
16	0.467		89,000	
18	0.474		90,000	
19	0.548		110,000	
Mumbwa, Zambia	0.166* 0.158	19,780 ± 130 (UCLA 1750) 18,000 ± 370 (UCLA 1750B)	$k=4.96 \times 10^{-6} \text{ yr}^{-1}$ 18,300	Bada <i>et al.</i> , 1974 b

Broken Hill, Zambia	0.55	—	~110,000	
Olduvai Gorge, Tanzania				
Middle Naisiusiu Beds	0.32*	17,550 ± 1,000 (UCLA 1695)	$k=1.48 \times 10^{-5} \text{ yr}^{-1}$	Bada & Protsch, 1973; Bada & Helfman, 1975
Upper Ndutu Beds	0.51	3,340 ± 800 (UCLA 1903)	33,000	
"	0.72	>29,000	56,000	
Sarab, Iran				
Asiab, Iran	0.155*	7,620 ± 70 (UCLA 1714A)	$k=1.14 \times 10^{-5} \text{ yr}^{-1}$	Bada <i>et al.</i> , 1974 b
	0.167	8,700 ± 100 (UCLA 1714C)	8,600	
Palagawra, Iraq				
	0.370*	13,600 ± 460 (UCLA 1714D)	$k=2.34 \times 10^{-5} \text{ yr}^{-1}$	Bada <i>et al.</i> , 1974 b
	0.402	14,350 ± 280 (UCLA 1703A)	15,200	
Southern California, Coastal Sites				
W-9, SDi 4660	0.154	6,700 ± 150 (LJ-79)	5,700**	Ike <i>et al.</i> , 1979
	0.156		5,800**	
W-12, SDi 4669	0.189	8,360 ± 75 (Pta 1725)	8,100**	
Ora 64, 50-60cm	0.170	6,960 ± 140 (GAK 4136)	6,800**	
Taishaku Kannondo Cave Site, Japan				
Layer 20	0.115*	10,085 ± 320 (I-943)	} $k=4.30 \times 10^{-6} \text{ yr}^{-1}$	Matsu'ura & Ueta, 1980
23B	0.140*	ca. 16,000		
24A	—	20,150 ± 300		
25B	0.169	—		
			22,900	

.* Sample used to calculate k values (calibration sample).

* * Dated using $k=1.5 \times 10^{-5} \text{ yr}^{-1}$; see Ike *et al.* (1979).

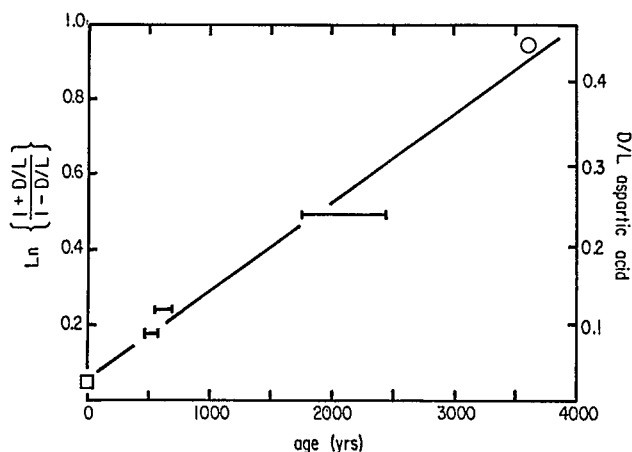


図 6. 化石骨中のアスパラギン酸のラセミ化と考古学的（歴史的）推定年代との関係，周辺の気温がほぼ同一である遺跡から出土したもの。Bada & Shou(1980)より転載。

Fig. 6. Racemization kinetics of aspartic acid in fossil bones from sites with nearly identical temperatures. A least-squares fit of the data ($R = 0.993$) yields the indicated straight line which has a slope ($2k_{asp}$) of $2.37 \times 10^{-4} \text{yr}^{-1}$. Redrawn from Bada & Shou (1980).

表 1 から，アスパラギン酸ラセミ化法は更新世後期・完新世に属する化石骨の年代測定に有効であることが示唆される。唯一つ Olduvai の Upper Ndutu Beds での結果は調和的でないが，これは他の地質・年代学的情報から，むしろ ^{14}C 年代が誤ったものであると考えられている（試料の汚染などについての議論は，Bada & Helfman, 1975 にやや詳しく書かれている）。

最近では中国でもラセミ化年代測定が行われている。表 2 に周口店第 1 地点（北京原人洞）の年代測定結果を載せたが年代値はいずれも予察的なものと考えられる。なお，表 2 中の測定値のいくつかは，「科学通報」（24 巻 18 期，25 巻 4 期）に短報されているが，データの細かい数字には若干の違いがみられる。

日本での適用例（表 1 下段）は少ないが，沖縄など温暖な地方での成果が期待される。（松浦，未発表）。また関東の縄文時代の貝塚から出土した骨遺残については，図 2 の Sp フラクシオンのラセミ化年代測定に対する有用性が検討された（Matsu'ura, 1980）。表 3 に荒屋敷貝塚出土獣骨の分析結果を示す（図 7 参照）。この表から，比較的若い年代試料の新旧判定には，可溶性ペプチド画分における D/L 比が有効であろうと判断される。木戸作貝塚の獣骨を calibration sample とし（図 8），Sp フラクシオンの D/L 比を用いて年代測定した結果は考古学的推定およびウラン分析の結果と矛盾しなかった（Matsu'ura, 1980）。しかし，化石骨から抽出される Sp フラクシオンで観察されるアミノ酸のラセミ化が，可逆一次反応で表現され得るかどうかについては，検討の余地が残されている。

アスパラギン酸以外のアミノ酸では，アラニン，グルタミン酸，バリン，ロイシン，イソロイシンなどが有望であろうが，今のところアラニン，グルタミン酸などはアスパラギン酸に比べ，研究室（分析法）による分析結果の違いがやや大きいという問題がある（Bada *et al.*, 1979a）。しかし

表 2 北京原人遺跡（周口店第 1 地点）の年代

周口店「北京猿人展覧館」展示資料（1979年11月作製 による）。

Table 2. Ages for Locality 1 of Zhoukoudian. Data displayed in The Exhibition Hall of Peking Man Site at Zhoukoudian (Nov. 1979).

Layer no.	Age (10^4 years)	Dating method
1 - 3	$23^{+3}_{-2.3}$	uranium series
	37	amino acid
4	29	thermoluminescence
7	37 - 40	palaeomagnetic
8 - 9	$42^{+>10}_{-10}$	uranium series
	39	amino acid
10	46.2 ± 4.5	fission track
	61	thermoluminescence
11	46	amino acid
below 13	> 69	palaeomagnetic

表 3 荒屋敷貝塚出土獣骨におけるアスパラギン酸のラセミ化

(Matsu'ura, 1980 による)。

Table 3. Aspartic acid racemization in bone samples from the Arayashiki shellmound. Data from Matsu'ura (1980).

Sample	D/L Asp	
	Ins fraction	Sp fraction
AR - 11 (horse)	0.094	0.198
AR - 12 (horse ?)	0.074	0.164
AR - 16 (deer)	0.093	0.219

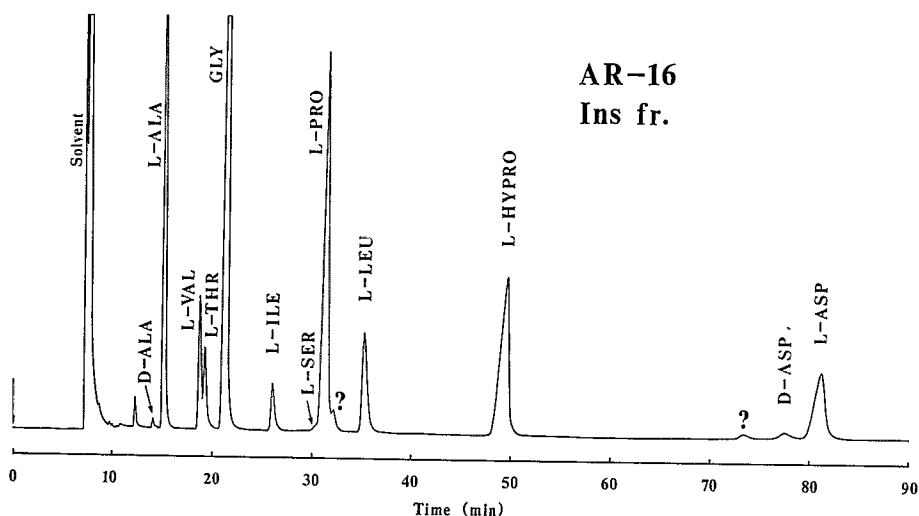


図 7. 荒屋敷貝塚出土獣骨中の不溶性コラーゲン画分のクロマトグラム (Matsu'ura, 1980).

Fig. 7. Gas chromatogram of N-TFA isopropyl esters of amino acids in the Ins fraction isolated from the sample AR-16 from the Arayashiki shellmound. Chromatography: 50m x 0.25mm i.d. column coated with N-lauroyl-L-valine *tert*-butylamide; temperature, 125°C isothermal; He pressure, 13 p.s.i.; FID detector. Taken from Matsu'ura (1980).

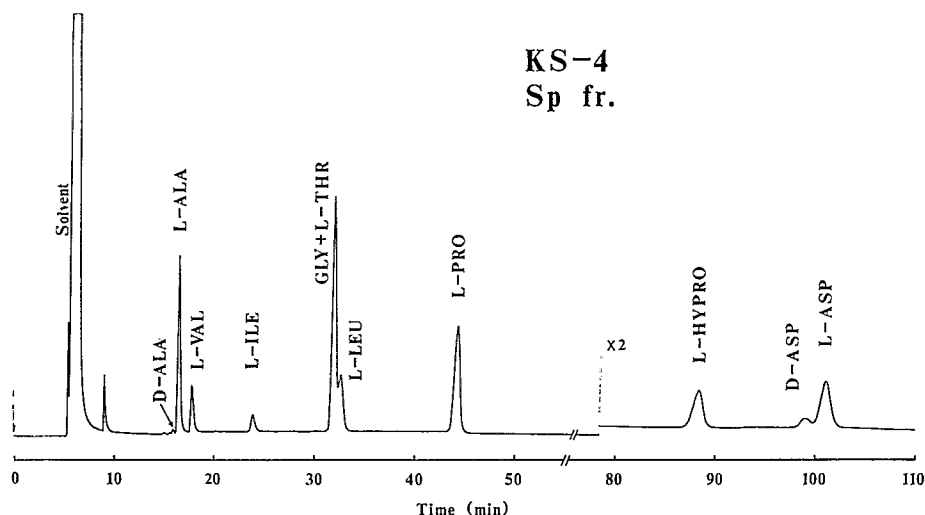


図 8. 木戸作貝塚出土獣骨から抽出された可溶性ペプチド画分のクロマトグラム (Matsu'ura, 1980).

Fig. 8. Gas chromatogram of N-TFA isopropyl esters of amino acids in the Sp fraction recovered from the KS-4 sample from the Kidosaku shellmounds. Chromatography: 30m x 0.28mm i.d. column coated with N,N'-[2,4-(6-ethoxy-s-triazine)diyl]-bis-(L-valyl-L-valine isopropyl ester); temperature, 130°C isothermal; He pressure, 7 p.s.i.; FID detector. Taken from Matsu'ura (1980).

ながら、アスパラギン酸のラセミ化年代値を他のアミノ酸による推定値と比較することは、信頼性をチェックする上で意味の大きいことである。また各種アミノ酸のD/L比の大小のパターンから試料の汚染状態を推察することができる (Bada *et al.*, 1973; Dungworth *et al.*, 1976)。

化石骨に残存するアミノ酸をその残存様式によって分画することは、ラセミ化年代測定法の信頼性を高める上でやはり重要な意味を持つ。Matsu'ura & Ueta (1980) は図2に示す各フラクションのラセミ化を評価することによって、より良質の年代学的情報が得られることを示唆し、また測定年代範囲が広がる可能性を示した。

V. ラセミ化反応速度に関与する環境要因

化石骨のラセミ化年代測定法は“骨中アミノ酸のラセミ化反応速度は埋存温度によって決まる”という前提の上に立っているが、この前提条件はほぼ成立していると思われる (表1, 図6)。ラセミ化は化学反応の1種であるから、pH, 湿気 (humidity) などの環境因子や、地下水が骨の有機質を濾し取る (“leaching”) 効果がその速度に影響を及ぼすであろうことは当然指摘された (Hare, 1974 a, 1974 b) が、これらは小さい要因であると考えられている (Bada & Helfman, 1975; Bada *et al.*, 1979 b)。

図9はBada *et al.* (1979 b) が、年代既知試料から算出されたラセミ化一次反応速度定数 (アスパラギン酸) の温度依存性が大きいことを示したものである。試料の埋存環境が多様であることを考慮すると、ここに認められる相関は極めて高いといえよう。

pHの影響も調べられた (図10) が、骨ではpH (4~9) と k は無関係であった。これは骨自体が、pHの変動に対してバッファ (緩衝剤) として働いたためであろうと考察された (Bada & Shou, 1980)。いずれにせよ、骨が残るような環境下では、pHはラセミ化速度の変動要因とはならないであろう。

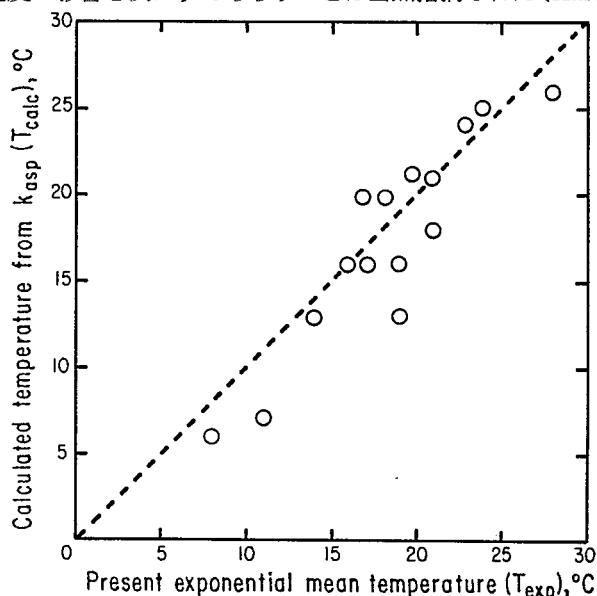


図9. 完新世の骨のアスパラギン酸ラセミ化速度から計算された温度と気象学的資料から計算された温度との関係。(Bada *et al.*, 1979bより転載)。破線は45°の直線を示す。

Fig. 9. A plot of T_{calc} vs. T_{exp} for Holocene bones. An exact agreement between the two temperatures is represented by the broken line. Redrawn from Bada *et al.* (1979b).

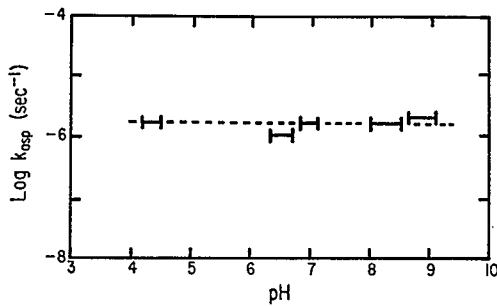


図10. 骨のアスパラギン酸のラセミ化一次反応速度定数と pH との関係。(96°C に加熱)。Bada & Shou (1980) より転載.

Fig. 10. A plot of $\log k_{asp}$ vs. pH for bones at 96°C. Redrawn from Bada & Shou (1980).

“Leaching Effect”は加熱実験の結果をもとに、Hare (1974 a, 1974 b) によって提起されたが、実際のケースには当てはまらないものであるとの反論 (Bada, & Helfman, 1975), また k 算出のための基準試料を選定することによりこの leaching 効果をも calibrate できるとの主張 (King & Bada, 1979)がある。筆者らは、アミノ酸の分別抽出(図2)がleachingやhumidityの影響(当然、骨に残存するアミノ酸の存在状態に現われるはずである)を補正するのに効果的であると考えている。温度がラセミ化速度を律する主要因であることから、逆に k より化石試料の温度履歴が求められる (Shroeder & Bada, 1976)。

VI. ラセミ化年代の信頼性の判定基準

報告されたラセミ化年代値の信頼性を判断するためのチェック・リストを以下に記す。これらは筆者らの考えで重みを付けて配列してある。

- i) 年代算出に使われたアミノ酸の D/L 比と分析法、および加水分解過程で起こるラセミ化に対する補正值(そのラボの値)、が明記されているか?
- ii) ラセミ化反応速度とそれを算出した基準試料に関するデータが記されているか?
- iii) 使用されたフラクションはコラーゲンのアミノ酸組成を示すか(又はコラーゲン起源とみなしてよい)か?
- iv) 各種アミノ酸の D/L 比の大小はパターン(Asp>Ala≒Glu>Ile>Val など)と一致するか?
- v) ラセミ化反応速度定数から推定された保存温度が気象学的・地質学的温度と矛盾しないか?
(今のところ総アミノ酸フラクションを使用した場合しかチェックできない)
- vi) アミノ酸を分別抽出し、各フラクションのラセミ化を評価したか?
- vii) 異種のアミノ酸の D/L 比から算出された年代値は調和的か?

ここで i), ii) は年代算出に最少限必要な条件であり、これを満たしていない場合は、予察的なものと解釈される。iii) 以下は満足するものが増えるほど、年代値の信頼度は高くなる。なおこのリスト作製に当って、Bada *et al.* (1979b) および Kessels & Dungworth (1980) を参考にしたことを註記しておく。

謝辞

北京原人遺跡の年代測定結果について御教示下さった国立科学博物館人類研究部の佐倉 朔博士、図のトレースをして下さった同 中塚彰子嬢に対し謹んで感謝の意を表する。

注1 1対の対掌体の性質はほとんど同じであるが、生物に対する作用（注1以下の本文の記述を参照）や旋光性は異なる。ある物質（溶液または液体状態）が、それを通過する偏光の偏光面を回転させる性質があるとき、このような物質のことを旋光性がある、あるいは光学活性であるという。対応するD型とL型はちょうど正反対の方向に偏光面を回す。この回転方向が時計回り（光の進行方向とむきあったとき）であるとき、これを右旋性といい、（+）または*d*（*dexter* = 右）で表わす。逆の左旋性は（-）又は*l*（*laevus* = 左）で表わす。立体配置を表わすDとLも語源は同じであるが、旋光の方向とは無関係である（例えばL-アラニン（+）である）。

注2 グリシン（図1のRがHであるもの）も蛋白質を構成するアミノ酸の1種であるが、これにはD型、L型の別はない。

文献

- 秋山雅彦（1975）イソロイシンのラセミ化と地質学への応用。地球科学，29：161－165。
- Bada, J. L. (1972a) Kinetics of racemization of amino acids as a function of pH. J. Am. Chem. Soc., 95: 1371-1373.
- Bada, J. L. (1972b) The dating of fossil bones using the racemization of isoleucine. Earth Planet. Sci. Lett., 15: 223-231.
- Bada, J. L. & L. Deems (1975) Accuracy of dates beyond the ¹⁴C dating limit using the aspartic acid racemization reaction. Nature, 255: 218-219.
- Bada, J. L. & P. M. Helfman (1975) Amino acid racemization dating of fossil bones. World Archaeol., 7: 160-173.
- Bada, J. L., E. Hoopes, D. Darling, G. Dungworth, H. J. Kessels, K. A. Kvenvolden, & D. J. Blunt (1979a) Amino acid racemization dating of fossil bones, I. inter-laboratory comparison of racemization measurements. Earth Planet. Sci. Lett., 43: 265-268.
- Bda, J. L., K. A. Kvenvolden, & E. Peterson (1973) Racemization of amino acids in bones. Nature, 245: 308-310.
- Bada, J. L., P. M. Masters, E. Hoopes, & D. Darling (1979b) The dating of fossil bones using amino acid racemization. In Berger R. (ed.) "Radiocarbon Dating (Proc. IX International

- Radiocarbon Conference)", Univ. of California Press, 740-756.
- Bada, J. L. & R. Protsch (1973) Racemization reaction of aspartic acid and its use in dating fossil bones. *Proc. Natn. Acad. Sci., U.S.A.*, **70**: 1331-1334.
- Bada, J. L. & R. A. Schroeder (1972) Racemization of isoleucine in calcareous marine sediments. kinetics and mechanism. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **15**: 1-11.
- Bada, J. L. & R. A. Schroeder (1975) Amino acid racemization reactions and their geochemical implications. *Naturwissenschaften*, **62**: 71-79.
- Bada, J. L., R. A. Schroeder & G. F. Carter (1974a) New evidence for the antiquity of man in North America deduced from aspartic acid racemization. *Science*, **184**: 791-793.
- Bada, J. L., R. A. Schroeder, R. Protsch & R. Berger (1974b) Concordance of collagen-based radiocarbon and aspartic-acid racemization ages. *Proc. Natn. Acad. Sci., U.S.A.*, **71**: 914-917.
- Bada, J. L. & M.-Y. Shou (1980) Kinetics and mechanisms of amino acid racemization in aqueous solution and in bones. In Hare, P. E., T. C. Hoering & K. King, Jr. (ed.) "Biogeochemistry of Amino Acids", John Wiley & Sons, 235-255.
- Bischoff, J. L. & W. M. Childers (1979) Temperature calibration of amino acid racemization: age implications for the Yuha skeleton. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **45**: 172-180.
- Dungworth, G., N. J. Vincken & A. W. Schwartz (1974) Compositions of fossil collagens: analysis by gas-liquid chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.*, **47B**: 391-399.
- Dungworth, G., A. W. Schwartz, & L. Van de Leemput (1976) Composition and racemization of amino acids in mammoth collagen determined by gas and liquid chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.*, **53B**: 473-480.
- Feibush, B. (1971) Interaction between asymmetric solutes and solvents. N-Lauroyl-L-valyl-*t*-butylamide as stationary phase in gas liquid partition chromatography. *Chem. Commun.*, **1971**, 544-545.
- Gil-Av, E. (1975) Present status of enantiomeric analysis by gas chromatography. *J. Mol. Evol.*, **6**: 131-144.
- Hare, P. E. (1974a) Amino acid dating — a history and an evaluation. *MASKA Newsletter*, **10**: 4-7.
- Hare, P. E. (1974b) Amino acid dating of bone — the influence of water. *Carnegie Inst. Washington, Yearb.*, **73**: 576-581.
- Hare, P. E. & P. H. Abelson (1968) Racemization of amino acids in fossil shells. *Carnegie Inst. Washington, Yearb.*, **66**: 526-528.

- Hare, P. E. & R. M. Mitterer (1967) Nonprotein amino acids in fossil shells. *ibid*, **65**: 362-364.
- Ho, T.-Y. (1965) The amino acid composition of bone and tooth proteins in late Pleistocene mammals. *Proc. Natn. Acad. Sci., U.S.A.*, **54**: 26-31.
- Ho, T.-Y. (1966) The isolation and amino acid composition of the bone collagen in Pleistocene mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, **18**: 353-358.
- Hoopes, E. A., E. T. Peltzer, & J. L. Bada (1978) Determination of amino acid enantiomeric ratios by gas chromatography of the N-trifluoroacetyl-L-prolylpeptide methyl esters. *J. Chromat. Sci.*, **16**: 556-560.
- Ike, D., J. L. Bada, P. M. Masters, G. Kennedy & J. C. Vogel (1979) Aspartic acid racemization and radiocarbon dating of an early milling stone horizon burial in California. *Am. Antiq.*, **44**: 524-530.
- Kessels, H. J. & G. Dungworth (1980) Necessity of reporting amino acid compositions of fossil bones where racemization analyses are used for geochronological applications: Inhomogeneities of D/L amino acids in fossil bones. In Hare, P. E., T. C. Hoering & K. King, Jr. (ed.) "Biogeochemistry of Amino Acids", John Wiley & Sons, 527-541.
- King, Jr., K. & J. L. Bada (1979) Effect of *in situ* leaching on amino acid racemization rates in fossil bone. *Nature*, **281**: 135-137.
- Kvenvolden, K. A., E. Peterson, & G. E. Pollock (1972) Geochemistry of amino acid enantiomers; Gas chromatography of their diastereomeric derivatives. In Gaertner, H. von & H. Whener (ed.) "Advances in Organic Geochemistry 1971", Pergamon Press, 387-401.
- Manning, J. M. & S. Moore (1968) Determination of D- and L-amino acids by ion exchange chromatography as L-D and L-L dipeptides. *J. Biol. Chem.*, **243**: 5591-5597.
- 松浦秀治 (1978) フ ィ ッ シ ョ ン ・ ト ラ ッ ク 法 に よ る 骨 の ウ ラ ン 分 析 と そ の 考 古 学 的 応 用 . 第 四 紀 研 究 , **17**: 95—104.
- Matsu'ura, S. (1980) Feasibility of dating archaeological bones from Japan using the aspartic acid racemization in peptides. *Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. D*, **6**: 9-19.
- Matsu'ura, S. & N. Ueta. (1980) Fraction dependent variation of aspartic acid racemization age of fossil bone. *Nature*, **286**: 883-884.
- Neuberger, A. (1948) Stereochemistry of amino acids. *Advan. Protein Chem.*, **4**: 298-383.
- Oakley, K. P. (1969) Analytical method of dating bones. In Brothwell, D. & E. Higgs (ed.) "Science in Archaeology 2nd ed", Thames and Hudson, 35-45.
- 大井尚文 (1978) 光学活性固定相, 化学の領域, 増刊, 120 号: 39-46.

Schroeder, R. A. & J. L. Bada (1976) A review of the geochemical applications of the amino acid racemization reaction. *Earth Sci. Rev.*, 12: 347-391.

下田信男 (1967) 骨の相対年代決定法における骨の年代とそれらのフッ素およびマンガン含量との関係曲線の形について, *北海道考古学*, 13: 1-12.

田辺義一 (1967) 弗素含量による古人骨の編年, *第四紀研究*, 6: 164-167.

Amino Acid Racemization Dating of Fossil Bones

Shuji Matsu'ura* & Nobuo Ueta**

*Department of Anthropology, National Science Museum

(Natural History Institute), Tokyo

**Department of Biochemistry, Teikyo University School of Medicine

Abstract

During the last several years, amino acid racemization reaction has proved to be a promising chronological tool for estimating the absolute ages of fossil bones. The racemization method has the advantage of being feasible to date bones which are either too small or too old for radiocarbon dating.

In this paper the principals and the procedures for racemization dating are briefly mentioned to begin with. Then several examples of the applications of this dating techniques in palaeo-anthropology and archaeology are presented, together with some remarks and a few suggestions for future research. Lastly, the effects of environmental factors on racemization rates are discussed and a list of criteria for checking the reliability of a racemization-deduced age is proposed.