

機関番号：32703

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592474

研究課題名(和文)硬組織におけるアミノ酸のラセミ化率に関する研究

研究課題名(英文) Research into amino acid racemization rates in hard tissues.

研究代表者

大谷 進 (OHTANI SUSUMU)

神奈川歯科大学・高次口腔科学研究所・教授

研究者番号：60104478

研究成果の概要(和文): アミノ酸のラセミ化反応に関する報告は少ない。アミノ酸の中のアスパラギン酸(Asp)は、ラセミ化反応速度が速く、L型から変換されたD型が加齢に伴いほぼ規則的に増加している(ラセミ化率)。我々は世界に先駆けて法医学で重要な歯(象牙質)からの年齢鑑定にこれを活用し良好な成果を上げている($r=0.99$)。そこで、この研究をさらに進展させるために、加熱された歯、外国人の歯、DNA分析とラセミ化率との関連などについて検索を試みた。

研究成果の概要(英文):

Few reports in the literature have investigated amino acid racemization. Aspartic acid (Asp) is rapidly converted from L-Asp to D-Asp, and the racemization rate increases constantly with aging. Racemization rates can be used in the field of age estimation, one of the most important aspects of forensic medicine. We are one of the world leaders in the application of racemization rates to age estimation using teeth (dentin), and our studies have yielded satisfactory results ($r=0.99$). To further advance our research, we studied the use of heated teeth and non-Japanese teeth, and investigated the relationship between DNA analysis and racemization rates.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：社会歯科学・歯科法医学

キーワード：法医学・年齢推定・硬組織・D-アスパラギン酸・ラセミ化率

1. 研究開始当初の背景

本研究は、硬組織のアミノ酸の中の Asp のラセミ化率を利用したものである。ラセミ化率は加齢に伴い、L型からD型に変換された

比率である。

(1)

本法は、環境とくに温度に強く影響される。しかし、どのような場合でも、正常な歯はも

とより焼死体からでも正確に年齢を求めることが必要である。

(2)

外国から年齢鑑定を依頼されたため、直ちに対処できる様、日本人の歯と外国人の歯との Asp のラセミ化反応速度を比較しておくことが必要である。

(3)

諸外国では DNA 分析を行う前に Asp のラセミ化率を求めてから行うことが多い。これは、ラセミ化率を求めることにより、DNA 分析の可能か否かが分かると報告されている。このため、我が国のような酸性土壌の資料からでも可能か否か検索した。

2. 研究の目的

(1)

法医学上、年齢推定は、未だ確実性の少ない鑑定項目の一つである。しかし、Asp のラセミ化法は、現段階で最も正確に年齢を求めることのできる検査法で、これをさらに精度の高いものにするために、焼死体の歯からでも正確に求めることが可能か実験的に検証した。

(2)

スウェーデン人の歯からの年齢鑑定を依頼(18 歯、カロリンスカ研究所)された。しかし、スウェーデン人の歯から年齢を求めるためには、対照歯が必要である。これは、外国人の歯から年齢を求める場合、日本人の歯を対照歯として用いても可能か否か検証した。

(3)

海外文献によると、Asp のラセミ化率と DNA 分析との関連が指摘されている。これは考古学領域の貴重な資料からの DNA 分析を予めラセミ化率を求めてから行うと資料のむやみな損失を最小限で抑えられるということである。そこで、日本の酸性土壌からの資料か

らでも可能か否か検証した。

3. 研究の方法

(1)

Asp のラセミ化率は、加熱に伴い直線的に増加する。しかし、熱が加わると象牙質が褐色を呈するとともにラセミ化率が直線性を示さなくなる。そこで、ヒーティングブロックにより加熱実験を行い直線性を示さなくなる限界のラセミ化率をガスクロマトグラフィーにより求めるとともに、その時の測色値(Lab 表色系)を分光測色計を用いて測定した。

(2)

日本人とスウェーデン人の歯の Asp ラセミ化反応速度を求めるために比較検証した。ラセミ化反応は化学反応で、環境、とくに温度によりその速度は変化する。反応温度と反応速度との間に定量的な関係があることは、Arrhenius によって確かめられ、アレニウス式として広く利用されている。この式を求めるために、日本人とスウェーデン人の歯にヒーティングブロックによりいろいろな温度・時間を加え加熱実験を行い、それぞれのラセミ化反応速度を比較し、ガスクロマトグラフィーによりラセミ化率を求め比較した。

(3)

資料を凍結粉碎し分析に用いた。ラセミ化率はアミノ酸の中で最も速い Asp を測定した。そして、同一試料より DNA を抽出し、PCR にてミトコンドリア DNA (mtDNA) D-loop 領域の複数断片 (90bp、120bp、250bp、510bp) の増幅を試みた。さらにラセミ化と熱との影響を検証するため、骨粉末試料および精製した DNA をヒートブロックで熱処理した。

4. 研究成果

(1)

Asp のラセミ化率の直線性の限界は、50 分付近の 0.0973 で、60 分過ぎると直線性の傾きが小さくなる傾向で、ラセミ化率が 0.1 以上であった。ラセミ化率と測色値との相関は、Lab 表色系のうち b* 値がもっとも高く、その時の b* 値が 17.09 で、60 分以上では 17.99 以上を示した。本法は加熱された歯でも比色計の b* 値が 17 前後以上の場合、正確にラセミ化率が得られず推定年齢を誤る可能性があり、十分注意が必要で、測色計を併用することで年齢推定に役立つことが示唆された。

(2)

日本人とスウェーデン人の Asp のラセミ化反応速度を比較したところ、加熱実験の結果、ほぼ同様な速度であることが示唆された。そこで、日本人の歯を対照歯として年齢算出式を求め鑑定した。後日、実年齢が判明したが、推定年齢は日本人のデータほど良い成績でなかった。その理由は、民族による口腔内温度の影響も考えられたが、スウェーデン人の鑑定した歯が上顎臼歯が多く複根(14 歯)であったため、その象牙質の年齢に即した正確なラセミ化率が得られなかったことに起因していることが示唆された。また、カロリンスカ研究所の研究者が 2005 年に Nature に報告した放射性炭素からの生年推定とラセミ化法との比較に関する共同研究を行い、2010 年 5 月の Molecular & Cellular Proteomics に論文が掲載された。

(3)

骨における Asp のラセミ化率は、0.02 ~ 0.04 を示した。同一個体から DNA 分析したところ、異なる増幅長のプライマーで PCR した結果、1 検体を除いてすべて 250bp 断片の幅が確認された。新しい骨より古い骨のラセミ化率が高く、古い骨では PCR 増幅が確認できない資料もみられた。骨を熱処理したところ、ラセミ化率は上昇し、0.083 を超えると短い

断片 (90bp) でも PCR による増幅が確認できなかった。これらのことから、古い資料では、ラセミ化率が高く、DNA 分析できなくなる資料がみられ、DNA 分析する前にラセミ化率を求めることは、意義あることと思われた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Ohtani S, Yamamoto T.
Comparison of age estimation in Japanese and scandinavian teeth using amino acid racemization.
Journal of Forensic Sciences. 2011
Jan;56(1):244-7. 査読 有
2. Ohtani S, Yamamoto T.
Age estimation by amino acid racemization in human teeth.
Journal of Forensic Sciences. 2010
Nov;55(6):1630-3. 査読 有
3. Arany S, Ohtani S.
Age estimation by racemization method in teeth: application of aspartic acid, glutamate, and alanine.
Journal of Forensic Sciences. 2010
May;55(3):701-5. 査読 有
4. Alkass K, Buchholz BA, Ohtani S, Yamamoto T, Druid H, Spalding KL.
Age estimation in forensic sciences: application of combined aspartic acid racemization and radiocarbon analysis.
Molecular Cellular & Proteomics. 2010
May;9(5):1022-30. 査読 有

5. Ohtani S, Yamamoto T, Iimura A, Takahashi T, Kinoshita Y. Regional differences in D/L aspartic acid ratios in the human mandible as a possible indicator of the bone remodeling rate. Growth Development, & Aging. 2008 Summer;71(1):17-22. 査読 有

6. 大谷 進:

アミノ酸のラセミ化反応を用いたヒトの歯からの年齢推定
生物の科学 遺伝 2008 62 巻 6 号 106-14.
依頼原稿

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 大谷 進、覚張隆史、咲間彩香、茂谷久子: アスパラギン酸のラセミ化率を指標とした歯からの年齢推定 第 64 回日本人類学会大会 平成 22 年 11 月 伊達市
2. 大谷 進、小笠原章夫、丸茂忠英、茂谷久子、咲間彩香: エナメル質および象牙質中の D-アスパラギン酸 第 52 歯科基礎医学会総会 平成 22 年 9 月 東京
3. 大谷 進、小笠原章夫、丸茂忠英、菅野均、杉本治雄、山岸光男: アスパラギン酸のラセミ化率を指標とした象牙質からの年齢推定 日本アミノ酸学会第 4 回大会 平成 22 年 9 月 鬼怒川
4. 大谷 進、Kirsty Spilding: アミノ酸ラセミ化法によるスウェーデン人の歯からの年齢鑑定例 第 94 次日本法医学会総会 平成 22 年 6 月 東京
5. 大谷 進、菅野 均: 象牙質中の D-アスパラギン酸の加齢変化 第 10 回抗加齢医学会総会 平成 22 年 6 月 京都
6. 大谷 進、山田良広、菅野 均、角田健

司、覚張隆史: アミノ酸のラセミ化率を指標とした歯からの年齢推定 日本歯科医学会第 26 回「歯科医学を中心とした総合的な研究をする集い」平成 22 年 1 月 東京

7. 大谷 進、小笠原章夫、丸茂忠英、宇都野創: アミノ酸ラセミ化法による焼死体の歯からの年齢推定、象牙質の測色値とアスパラギン酸のラセミ化率について (2) 第 51 科基礎医学会総会 平成 21 年 9 月 東京
8. 大谷 進、小笠原章夫、丸茂忠英、菅野均、杉本治雄: アミノ酸ラセミ化法による歯からの年齢鑑定事例 第 93 次日本法医学会総会 平成 21 年 5 月 大阪
9. 大谷 進、小笠原章夫、丸茂忠英、宇都野創: アミノ酸ラセミ化法による焼死体の歯からの年齢推定、象牙質の測色値とアスパラギン酸ノラセミ化率について (1) 第 50 回歯科基礎医学会総会 平成 20 年 9 月 東京
10. 大谷 進、小笠原章夫、丸茂忠英、杉本治雄: アミノ酸ラセミ化法による象牙質からの年齢推定、TA および SP 中の Asp, Ala, Glu の比較 第 92 次日本法医学会総会 平成 20 年 4 月 長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 進 (OHTANI SUSUMU)

神奈川歯科大学・高次口腔科学研究所・教授
研究者番号: 60104478