

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23018

研究課題名(和文)象牙質アミノ酸ラセミ化法による年齢推定に用いる標準試料の開発

研究課題名(英文) Development of standard samples for age estimation using the amino acid racemization method with dentin

研究代表者

峰岸 沙希 (Minegishi, Saki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00882820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸ラセミ化法による年齢推定に用いる標準試料の開発を目的として、象牙質粉末から抽出したアミノ酸試料に対して、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)を作用させ、AST量、反応時間及び基質量の違いによるラセミ化率の変動を調べた。その結果、短時間でラセミ化率が上昇および減少することを確認し、標準試料作成が可能であることが示唆された。また、抜去歯として比較的入手しやすい失活歯のラセミ化率について、生活歯と比較検討したところ、失活歯のラセミ化率は高いことが確認され、治療歯のラセミ化率は変化する可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラセミ化法による年齢推定は精度が高い方法として知られているが、手技が煩雑であることや検量線作成のために同歯種の幅広い年代の抜去歯収集が必要になることから実務に積極的に応用されていない。我々はこれまで高温加熱によって人工的にラセミ化率を変えられること明らかにしてきたが、より簡便で安全な方法の開発が必要と考えてきた。本研究では、ASTに着目し、酵素量、反応時間および基質量を変えることで、短時間で安全にラセミ化率の上昇および減少を確認できたことは学術的および社会的意義が大きいと考える。また、失活歯の応用を考える上で、生活歯とはラセミ化率が異なることを明らかにできた点も意義あるものとする。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop standard samples for age estimation using the amino acid racemization method. Amino acid samples extracted from dentin powder were treated with aspartate transaminase (AST), and changes in the racemization rate due to differences in the amount of AST, reaction time and amount of substrate were investigated. As a result, it was confirmed that the racemization rate increased and decreased in a short time, indicating that it is possible to prepare standard samples. In addition, when the racemization rate of endodontically treated teeth which are relatively easy to obtain as extracted teeth was compared with that of vital teeth, the former was found to be higher than the latter. It was clarified that the racemization rate of treated teeth possibly changed.

研究分野：法歯学分野

キーワード：年齢推定 ラセミ化 象牙質 アスパラギン酸

## 1. 研究開始当初の背景

身元不明死体における年齢推定は極めて重要な個人識別法の一つである。若年者では、歯の発育による発生学的変化に基づいた年齢推定の信頼性は高く、その誤差範囲は1~2歳と極めて精度が高い。一方、成人では、硬組織の生理学的な形態変化を中心に多数の情報を必要とし、その推定年齢幅も数十年と比較的大きいことから、より精度の高い方法の開発が求められてきた。1975年、Helfmanらはアミノ酸の鏡像異性体に着目し(図1)、特にアスパラギン酸(Asp)のL体/D体のラセミ化反応速度が大きく、年齢との相関が高いとして、±3歳の誤差範囲内で推定可能であることを報告した。その後、エナメル質、象牙質あるいはセメント質といった、それぞれ異なる歯質部位を用いた相関性の違い(Ohtani 1995, Waite 1999, Griffin 2010)、ピンク歯や齲蝕歯が与える影響についての検討(Sakuma 2015, Ritz-Timme 2018)、あるいは、地域差および生活習慣が与える影響(Chen 2016)など、様々な角度からラセミ化率に与える影響について検討されてきた。現在では、生活歯の象牙質に含有されるアスパラギン酸ラセミ化法を用いた年齢推定が精度の高い検査法の一つとして認知されている。

一方、実務応用については、一部の研究機関において実施されているに過ぎず、未だ広範囲に適用されていない。これにはいくつかの理由があると考えられる。本法は、象牙質からアミノ酸を抽出し、誘導体化後にGCにて分析する方法が最も精度が高いとされているが、手技が煩雑であり、その際の抽出条件や手技の誤差が年齢精度に影響するとされている。さらに重要な点は、検量線作成のために、対象歯と同一歯種の幅広い年代の生活歯を収集する必要がある点である。近年は、倫理的側面からも歯の収集は困難となっていることから、該当する多数の生活歯を収集することなく、それに替わる標準試料が準備できないかと考えた。我々はこれまでに、ラセミ化反応が温度に影響を受ける性質に着目し、象牙質粉末を高温加熱することで人工的にラセミ化率を増加させた標準試料の作製が可能であることを明らかにした(Minegishi 2019)。しかしながら、本法は長時間の高温加熱が必要であることや、用いた年齢のラセミ化率より常に大きいラセミ化率、すなわち高い年齢をもった標準試料のみ作製され、低い年齢の試料の作成は困難であったことから、その改善が求められていた。また、齲蝕や歯周疾患等で抜去される機会が多く、壮年期以降では残存していることも多い失活歯を検量線作成及び検査対象歯として用いることができないかと考えた。

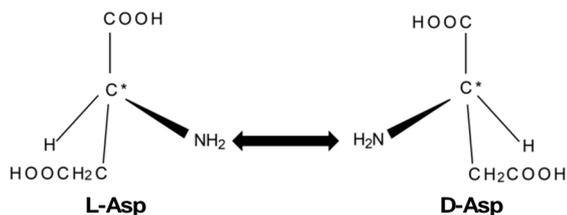


図1 アスパラギン酸のラセミ化

## 2. 研究の目的

検量線作成のために対象歯と同一種の広範囲にわたる年代の生活歯を収集せずすむよう、簡便かつ短時間で準備可能な標準試料の作製を目的とした。L-Aspに対して、その基質とされている $\alpha$ -ケトグルタル酸存在下において、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)酵素を作用させると、アミノ基が転移され、L-グルタミン酸(L-Glu)とオキサロ酢酸が産生されることが知られている(図2)。我々はこの酵素反応に着目し、象牙質から抽出されたアミノ酸に対して、各条件下で酵素反応を作用されることで、安全で簡便・迅速な標準試料作製が可能か明らかにすることを目的とする。

また、齲蝕や歯周疾患等で失活歯として抜去される機会が多く、ご遺体によっては失活歯のみ残存していることもある。この失活歯について検量線作成及び検査対象歯として有用か否かを明らかにするために、失活歯と生活歯のラセミ化率をまずは単純に比較検討し、失活歯のラセミ化法への応用が可能か明らかにすることを目的とした。

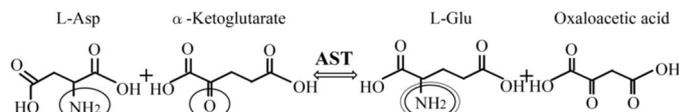


図2 L-アスパラギン酸のAST酵素下でのラセミ化反応

## 3. 研究の方法

### 【酵素を用いた標準試料作製】

#### (1) 試料、酵素および基質

試料には、上顎第三大臼歯13本(17~74歳)、酵素には、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(Wako)、基質には $\alpha$ -ケトグルタル酸(Wako)を用いた。いずれの歯牙も、年齢・性別・抜去日は明らかであり、性差および左右側は考慮せず使用した。なお、本研究は東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認を得て行っている(東京医科歯科大学倫理審査委員会承認番号:D2016-047)。

#### (2) アスパラギン酸ラセミ化分析

##### ・試料の準備

象牙質からのアミノ酸分析は大谷らの方法(Ohtani 1995)を参照・改変し、実施した。歯を過酸化水素で洗浄し、Diamond Disc Cutter(5inch, Sankei)を用いて約1mm幅に縦断し、象牙質のみを取り出した。次に、0.2M Hydrochloric Acid 5mL(Wako)と超純水を用いた超音波洗浄を3回施行。それから、Ethanol(99.5)(Wako)5mLとDiethyl Ether(Wako)5mLでそれぞれ超音波洗浄し、乾燥。MULTI-BEADS SHOCKER(MB1200, YASUI KIKAI)にて粉末化(3000rpm, 30

～60sec)。粉末化されたサンプルは4にて保存。

#### ・アミノ酸抽出およびGC分析

粉末化した各サンプル10mgについて、6M Hydrochloric Acid 5mL (Wako)を用いて100 6時間加水分解し、その後、強酸性陽イオン交換樹脂 (DOWEXTM 50Wx8 50-100 Mesh(H) Cation Exchange Resin, Wako)を用いて2N Ammonia Solution 10mL (Wako)でアミノ酸を抽出した。Acetyl Chloride (Wako)と2-Propanol (Wako)の混合液2mL用いて100 30分加熱してエステル化。次に、Dichloromethane 800  $\mu$ L (Wako)とTrifluoroacetic Anhydride 200 $\mu$ L (Wako)を加え、30分間室温にて放置し、TFA化。最後にEthyl Acetate 200 $\mu$ Lで溶解し、GCに1 $\mu$ Lを注入し、分析を行った。GCはAgilent7890B (Agilent Technologies Japan, Ltd.)を使用し、検出器にはFID (水素炎イオン化検出器)を使用。

#### (3) D-AspおよびL-Aspに対するASTとケトグルタル酸の影響

##### ・D-AspおよびL-Aspの標準試料に対する、ASTおよびケトグルタル酸の影響

pH標準液 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5mL, pH7.8調整済)にD-AspおよびL-Aspを各3mg融解させ、AST (0.1U)および/又はケトグルタル酸 (0.62M, 300  $\mu$ L)を添加させたものを至適条件とされる37で15分間インキュベートした (n=3)。インキュベート後は通常法に従い、エステル化、並びにTFA化し、Trifluoroacetic Anhydride 200 $\mu$ L (Wako)にて溶解後に遠心分離 (6000rpm, 5分間)させ、上清部分を抽出しGC分析を行った。

##### ・酵素反応におけるpHおよび温度

次に、上顎第三大臼歯2本 (22歳, 男女)の象牙質粉末を作製後、混合粉末として用いた。粉末10mgを試料として、前述の方法にて抽出したアミノ酸試料内に含まれるAspの推定量に対して、エステル化反応前に、AST試薬の注意書きに記載の使用濃度を参考にAST (0.1U)を加え、pH7.0またはpH7.8、並びに室温 (22~25)または37の条件下 (n=5~6)で15分間、恒温槽 (DTU-1BN, TAITEC)にてインキュベート。通常法に従い、エステル化を30分間反応させ、30分後にマイクロチューブに移し、遠心分離をさせ、上清のみ試験管に戻し、窒素ガスにて乾燥。次いで、通常法に従いTFA化を実施。Ethyl Acetateにて夾雑物を除去し、上清のみをGCにて分析した。

#### (4) 酵素量、反応時間および基質有無の違いによるラセミ化率並びに相対年齢

至適条件下で、AST量 (1, 2倍量)、インキュベート時間 (5, 15, 30分)の違いによるラセミ化率の変化を調べた (n=5~6)。また、基質であるケトグルタル酸 (0.62M, 300  $\mu$ L)を加えた場合と加えない場合のラセミ化率の変化について調べた (n=5~6)。さらに、上顎第三大臼歯13本 (17~74歳)を用いて作成した検量線を用いて、各条件下で得られたラセミ化率から相対年齢を算出した。

各データの有意差を確認するために、Post-hoc test with Turkey-Kramer testが行われ、有意差1%で統計解析が行われた。

### 【失活歯のラセミ化法における有用性】

#### (1) 試料

試料には、上顎第一小臼歯において生活歯17本 (19~84歳)、失活歯5本 (53~80歳)、下顎第二小臼歯において生活歯11本 (19~80歳)、失活歯6本 (31~80歳)、上顎第二大臼歯において生活歯8本 (16~85歳)、失活歯7本 (23~75歳)を用いた。いずれの歯牙も、年齢・性別・抜去日は明らかであり、性差および左右側は考慮せずに使用した。また、失活歯についてはガッタパーチャーによる根充処置がなされている以外、修復等の種類を考慮せず用いた。

#### (2) 各歯種における生活歯および失活歯のラセミ化率

上述のラセミ化分析法に基づいて実施した。下顎第二小臼歯および上顎第二大臼歯において、生活歯と失活歯、さらに、生活歯と失活歯を混合させたものについて、それぞれの年齢とラセミ化率の検量線を作成し、相関係数を比較した。また、上顎第一小臼歯において、生活歯で作成した検量線を用いて、年齢の異なった失活歯5本についてラセミ化率を求め、年齢推定を試みた。各歯種における検量線の相関係数については、単回帰分析による判定を行った ( $p=0.01$ )。

## 4. 研究成果

### 【酵素を用いた標準試料作製】

#### (1) D-AspおよびL-Aspに対するASTとケトグルタル酸の影響

至適条件下におけるD-AspおよびL-Aspに対し、ASTおよびケトグルタル酸の影響を確認した。図3に示すように、ASTのみ、ケトグルタル酸のみ、並びにASTおよびケトグルタル酸を混合させたものはいずれも本来のD/L-Aspのラセミ化率より低い値を認めた。この結果から、ASTが基質の有無に関係なく、また、基質であるケトグルタル酸のみでも、あるいはD-Aspに対して反応している可能性が示唆された。

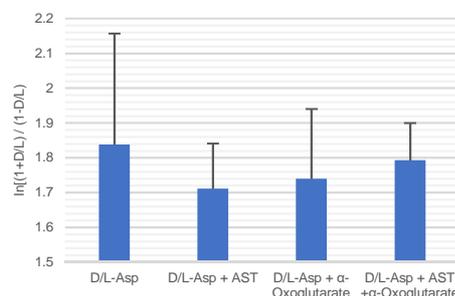


図3 ASTとケトグルタル酸によるラセミ化率への影響

(2) 酵素反応における pH および温度

象牙質粉末から抽出したアミノ酸試料に AST を添加し、pH7 または pH7.8、並びに室温 (22~25 ) または 37 の条件下で 15 分間インキュベートさせた時のラセミ化率の変化を調べた。図 4 に示すように、 $\alpha$ -ケトグルタル酸試薬の非存在下でもラセミ化率は変化し、pH7・室温および pH7.8・37 の条件において、NC に対し有意な上昇を示した ( $p < 0.01$ )。また、室温では 37 に比べややばらつきが大きいことから、pH7.8・37 を AST の至適条件として次の実験に用いることとした。

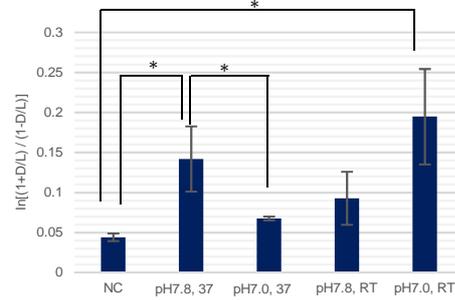


図4 至適 pH および温度の比較

(3) ラセミ化率に対する酵素量、反応時間および基質試薬の影響

pH7.8・37 の条件下で、象牙質粉末から抽出したアミノ酸試料に対し、AST 量およびインキュベート時間を変化させ、ラセミ化率を比較した結果を図 5 に示す。1 倍量の AST を用いた場合、15 分まで経時的に上昇するよう見え、30 分では 15 分に対し減少するよう見えたと、いずれも経時的な有意差は示さなかった。一方、2 倍量の AST を用いた場合、30 分まで経時的に上昇するよう見え、15 分と 30 分は NC に対して有意な上昇を示した ( $p < 0.01$ )。また、30 分インキュベートにおいて、2 倍量の AST は 1 倍量の AST に比べ有意に大きかった ( $p < 0.01$ )。

一方、基質の  $\alpha$ -ケトグルタル酸試薬を加えた時の、酵素量および反応時間に対するラセミ化率の変化を図 6 に示す。基質を加えると全体的にラセミ化率の上昇は抑えられるよう見え、特に 1 倍量の AST で 15 分、2 倍量の AST で 30 分インキュベートした際には基質を加えない場合に対し有意な減少を示した ( $p < 0.01$ )。

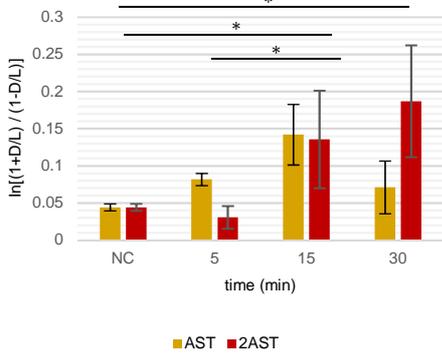


図5 AST のラセミ化率への影響

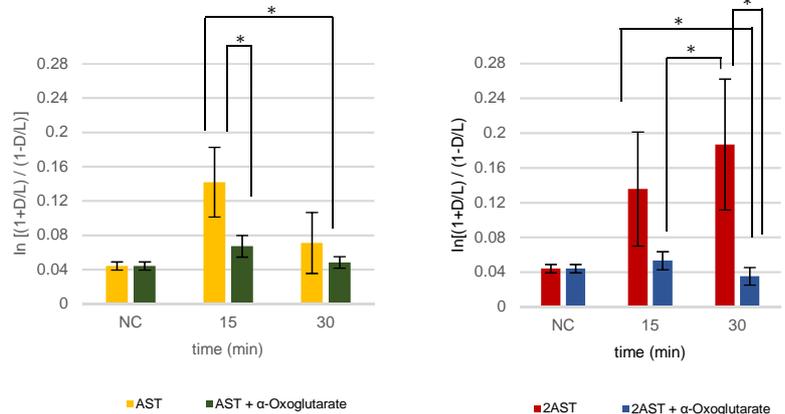


図6 AST と  $\alpha$ -ケトグルタル酸それぞれのラセミ化率への影響

(4) 検量線を用いて得られたラセミ化率の平均値からの相対的年齢の推定

上顎第三大臼歯 13 本 (17~74 歳) を用いた検量線を図 7 に示す。図 6 に示した各条件下で得られたラセミ化率の平均値について、検量線を用いて算出した相対年齢を表 1 に示した。12 歳から 139 歳に相当するラセミ化率の試料が得られたことを示す。

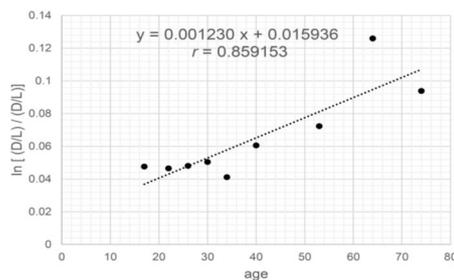


図7 上顎第三大臼歯の検量線

表1 得られたラセミ化率を検量線に代入して求めた推定年齢

AST	$\alpha$ -Oxoglutarate	Reaction time (min)	ln[(+D/L)/(-D/L)] ave.	SD	Relative age (years)	P value
-	-	-	0.046481	0.002791	22.8	
++	-	5	0.030595	0.015269	11.9	
++	+	30	0.036567	0.013080	16.7	
+	+	30	0.048232	0.006729	26.2	
++	+	15	0.053138	0.010441	30.2	
+	+	15	0.066967	0.012533	41.4	< 0.01
+	-	30	0.070916	0.035499	44.6	
+	-	5	0.081702	0.008166	53.4	
++	-	15	0.135624	0.065586	97.3	
+	-	15	0.141841	0.0407127	102.3	
++	-	30	0.186836	0.075279	138.9	

(5) 今後の展望

本実験結果は、酵素を用いた方法が短時間で安全にラセミ化率の上昇および減少させることが可能であることを明らかにした。今後、酵素反応による試料中のラセミ化率変化の機序、ラセミ化率の安定性や保存方法を含め、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。これは、酵素量、反応時間、基質の有無等の諸条件を変えることで、様々なラセミ化率の試料を準備できる可能性を示唆している。

【失活歯のラセミ化法における有用性】

(1) 結果及び今後の展望

下顎第二小臼歯の生活歯，失活歯及び生活歯と失活歯を一緒にした混合歯における年齢とラセミ化率との関係を図8に示した。失活歯のみで作成した検量線は，生活歯のみの検量線に対し上方に位置し，ラセミ化率の高いことが示された。生活歯の相関係数は  $r = 0.982836$  ( $p < 0.01$ )，失活歯の相関係数は  $r = 0.896082$  ( $p > 0.01$ ) であった。また，上顎第二大臼歯の生活歯，失活歯及び生活歯と失活歯を一緒にした混合歯における年齢とラセミ化率との関係を図9に示した。下顎第二小臼歯の結果と同様に，失活歯のみで作成した検量線は，生活歯のみの検量線に対し上方に位置し，ラセミ化率の高いことが示された。生活歯の相関係数は  $r = 0.920114$  ( $p < 0.01$ )，失活歯の相関係数は  $r = 0.744991$  ( $p > 0.01$ ) であった。

さらに，上顎第一小臼歯において，生活歯における年齢とラセミ化率との関係を図10に示す ( $r = 0.945163$ ,  $p < 0.01$ )。この検量線を用いて，53~80歳までの失活歯5本のそれぞれのラセミ化率から年齢を算出した結果を表2に示した。いずれも実年齢に対して，+10歳以上の誤差が認められ，下顎第二小臼歯及び上顎第二大臼歯と同様に，失活歯のラセミ化率は同年代の生活歯よりも高い値になることが確認された。齲蝕のある歯のラセミ化については，齲蝕によるタンパク質劣化がD-Aspの蓄積を促進させ，ラセミ化率を高くする傾向があるとの報告がある。一般に失活歯は象牙質の齲蝕を経て抜髄されることがほとんどであり，その後の象牙質構造の変化が影響している可能性があるが，象牙質の構造は極めて複雑であり，現在でも生活歯と失活歯の象牙質構造の明確な違いについて言及している報告はほとんど見当たらない。また，これを明らかにするためには，失活後の修復処置などの各種因子の影響など，齲蝕から抜髄，修復処置から抜歯に至る過程を追跡しながら，比較検討する必要があるものと考えられる。本実験では，失活歯の詳細な分類はせずに，まずはラセミ化率がどの程度生活歯と異なるか3種類の歯を用いて確認してみた。

本研究では，歯を用いたラセミ化法への失活歯の応用の可能性を探るための予備的検討として，3種類の歯を用いて生活歯と失活歯のラセミ化率の違いを確認した。その結果，全ての歯種で失活歯は生活歯に対してラセミ化率が高くなることが明らかとなった。失活歯を用いた検量線の相関係数は生活歯に比べ有意に低く，現時点では失活歯の実務への応用の可能性は低いものと考えられた。失活歯のラセミ化率が高くなる原因については未だ不明であり，今後失活歯の履歴情報を細かく追跡しながら，抜髄後の象牙質の組織構造の変化との関連も含め，明らかにしていく予定である。

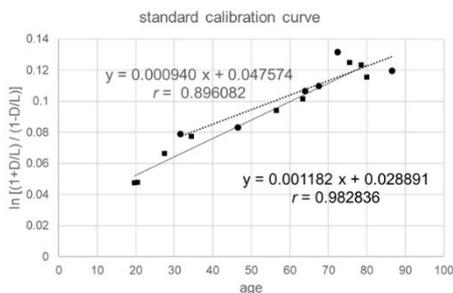


図8 下顎第二小臼歯の生活歯および失活歯の検量線

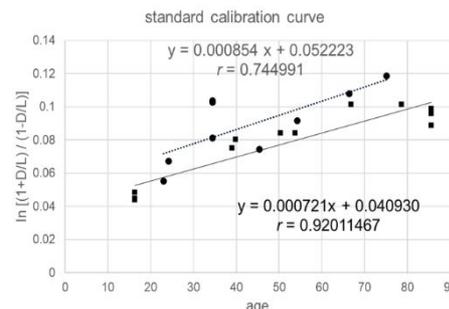


図9 上顎第二大臼歯の生活歯および失活歯の検量線

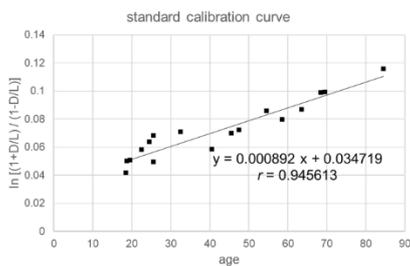


図10 上顎第一小臼歯の生活歯の検量線

表2 失活歯のラセミ化率を生歯の検量線に代入して求めた推定年齢

Actual age (years)	53.8	58.3	63	78.5	80.8
Racemization data	0.105553	0.101876	0.101008	0.113703	0.128195
Estimated age (years)	79.4	75.3	74.3	88.5	104.8
Error (years) *	+25.6	+17.0	+11.3	+10.0	+24.0

\*Error: Actual age – estimated age

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minegishi Saki, Utsuno Hajime, Ohta Jun, Namiki Shuuji, Toya Maiko, Sumi Nozomi, Saitoh Hisako, Sakurada Koichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Comparison of racemization rates between vital and endodontically treated teeth for age estimation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102189 ~ 102189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2022.102189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 峰岸 沙希、並木 修司、大田 隼、戸谷 麻衣子、壽美 望、宇都野 創、斉藤 久子、櫻田 宏一
2. 発表標題 年齢推定に用いる生活歯および失活歯のラセミ化率の比較検討
3. 学会等名 日本法歯科医学会 第15回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 峰岸 沙希、大田 隼、並木 修司、戸谷 麻衣子、宇都野 創、船越 丈司、斉藤 久子、岩瀬 博太郎、上村 公一、櫻田 宏一
2. 発表標題 象牙質ラセミ化法による年齢推定における失活歯の影響について
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------