

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K15878

研究課題名(和文)ホスホリンおよび遊離アミノ酸に着目したラセミ化反応による年齢推定法の改良

研究課題名(英文)Improvement of age estimation using aspartic acid racemization rate focusing on dentin phosphophoryn and free amino acids.

研究代表者

石井 名実子(Ishii, Namiko)

国際医療福祉大学・医学部・助教

研究者番号：10782386

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)：歯牙象牙質内に存在するアミノ酸の一種であるアスパラギン酸(Asp)が加齢とともにL型から鏡面对称の構造を示すD型に変化するラセミ化反応を応用した生化学的な年齢推定の手法は煩雑で再現性に問題があり、改善が求められている。そこでAsp抽出手技として固相抽出カートリッジに着目し、L型・D型-Aspをそれぞれ検出することができた。その後ラセミ化反応の分析機器や方法を変更せざるを得ず、現時点ではカートリッジをAspのラセミ化反応による年齢推定へ応用するには至らなかった。しかし従来の手技と比較しカートリッジは簡便に歯からAspを抽出する新たな手技であり、この成果を法医学の国際学会にて発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

身元不明遺体の年齢推定は、個人識別のためのスクリーニングに非常に有用であり、近年、歯牙象牙質を用いたアスパラギン酸(Asp)のラセミ化反応による年齢推定法が注目されている。本研究によって歯からAspをより簡便に抽出する新たな手技を検討した結果、従来法で問題視されていた手法の煩雑さの改善と時間短縮につなげることが可能となった。今後研究を継続し、簡便化した手技の年齢推定法への応用、並びに再現性向上のため遊離アミノ酸の象牙質に含有されるホスホリン内Aspのラセミ化反応による年齢推定への影響を検討し、将来の身元不明者の個人識別に役立てたいと考える。

研究成果の概要(英文)：The biochemical method of age estimation by aspartic acid (Asp) racemization in dentin, which using the ratio of L-Asp to D-Asp changes with aging, is complicated and has reproducibility problems and improvement is needed. Therefore, we examined the application of solid-phase extraction (SPE) cartridges as a technique for extracting Asp from teeth, and were able to detect the each peak of L-Asp and D-Asp. Unfortunately, subsequent instrumental problems forced us to change the analytical equipment and analytical method for the racemization reaction, and this Asp extracting technique has not been applied to age estimation at this time. However, the method using SPE cartridges is a new technique that can extract Asp from teeth more easily than conventional techniques, and the results were presented at the International Society of Forensic Medicine.

研究分野：法歯学、法医学

キーワード：年齢推定 歯牙象牙質

1. 研究開始当初の背景

法医学分野において身元不明遺体の年齢・性別・身長・人種等の個人情報を得ることは、身元を明らかにするために重要である。特に、年齢推定は、個人識別のためのスクリーニングに非常に有用であり、法医学分野において重要視されている。身元不明遺体の死体状況は、高度腐敗、ミイラ化、死蟻化、白骨化した状況が多く、個人情報を得ることが困難である場合がほとんどである。このような身元不明遺体の場合、個人情報を得るためには、死後変化に対し経時的な影響を受けにくく、最後まで残存する歯や骨などの硬組織を試料として利用することが最も適している。このため、これまで法人類学的な硬組織を利用した形態観察による年齢推定（歯の歯髄腔や頭蓋骨の縫合の癒合状態、上腕骨頭の骨端線の位置など）が行われてきた。しかし近年、生化学的な手法として、歯牙象牙質のアスパラギン酸（Asp）を用いたラセミ化反応による年齢推定法が注目されている。

アミノ酸には L 型と、それに対し鏡面对称を示す D 型が存在し、これらを光学異性体と呼ぶ。これまで自然界においては、アミノ酸は通常 L 型の状態であり、D 型は存在しないと考えられてきた。しかし生体内においても D 型がわずかに存在することが明らかになった。これは L 型が D 型に変化したためであり、この反応をアミノ酸のラセミ化反応と呼ぶ。この反応は熱や光などの物理的要因や酸・アルカリなどの化学的要因によって生じる、可逆一次反応である。ラセミ化反応の速度はアミノ酸の種類によって異なるが、Asp はラセミ化速度が速いと言われ注目を集めており、近年では、皮膚や大動脈といった生体組織の Asp のラセミ化反応と加齢疾患との関連が報告されている①。加齢と歯牙アスパラギン酸のラセミ化反応との関連については、1975 年、Helfman ら②が初めて発表した。彼らは、歯牙のエナメル質に含有される Asp が、加齢とともに L 型から D 型へ変化することを報告した。さらに 1976 年には、歯牙の中でも、エナメル質より Asp の含有量が多い象牙質を用いたラセミ化反応による年齢推定法を発表した③。これ以降、歯牙象牙質を用いたラセミ化反応による年齢推定法は世界中で研究されるようになった。国内においては Ohtani ら④が歯牙象牙質内の Asp におけるラセミ化反応による年齢推定法を研究しており、その推定年齢と実年齢との誤差範囲は±3 歳と報告した。これまでに利用されてきた法人類学的な年齢推定法の推定範囲は 20 歳以上と広く、Ohtani らの報告により、生化学的な年齢推定法である歯牙象牙質の Asp を用いたラセミ化反応による年齢推定法は、法人類学的な推定法より精度が高い方法として、国内の法医学分野において広く知られるようになった。申請者はこれまで Sakuma らの研究⑤を通じ、遺体の歯牙象牙質を利用したラセミ化反応による年齢推定法の手法について学んだ。しかし従来から利用されている手法④は煩雑であり、結果は検査者の手技に左右され、得られた推定年齢が実年齢と大きく異なる外れ値が存在し、再現性に問題があることが分かった。

また、2002 年に Masuda ら⑥がウシの歯牙を用いて、D 型アスパラギン酸は象牙質に含有される非コラーゲン性タンパク質であるホスホホリン内に存在すると報告した。しかし従来法においては、ホスホホリンとタンパク質として構成されていない遊離アミノ酸にそれぞれ含有される Asp を区別せず分析している。そこで申請者はこのことが、再現性に影響を及ぼしている可能性があると考えた。

2. 研究の目的

アミノ酸は、互いに鏡面对称な L 型と D 型の光学異性体を有する。Asp は加齢に伴い L 型 (L-Asp) から D 型 (D-Asp) へと変化するラセミ化反応を示すことから、歯牙象牙質内の Asp を用いたラセミ化反応による年齢推定法が法医学分野では古くから知られている。しかしその手法は煩雑で、再現性に問題があり、改善が求められている。そこで従来の手法の問題点を見直し、改善方法を検討する。また象牙質中のホスホホリン内の Asp と遊離アミノ酸中の Asp のラセミ化率の違いが、年齢推定の再現性に影響を及ぼす可能性があることに着目し、これら进行分析し、従来法と比較検討することで、身元不明遺体の年齢推定法として、法医実務に積極的に応用可能なラセミ化反応による年齢推定法の手法を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯牙象牙質内の D-Asp 及び L-Asp 抽出方法の改良に関する検討

法医解剖にてご遺体より採取した、齶蝕及び治療痕のない下顎第二小臼歯 3 本を洗浄し歯根膜等を取り除いた後、象牙質切片のみを切り出し粉末化した。粉末象牙質はそれぞれ 10 mg、20 mg、40 mg を計量し、6M 塩酸 5mL にて加水分解した。その後市販の固相抽出 (SPE, Solid Phase Extraction) カートリッジであるカートリッジ A (Strata-X-C, 島津) とカートリッジ B (Bond Elut Plexa PCX, Agilent) を用いて Asp を抽出 (図 1) 後、誘導体化し、光学異性体分析用カラム (CP - Chiracil-L-Val, Agilent) を用い、ガスクロマトグラフィー/マスクロマトグラフィー (GC/MS, HP6890 GC System/5973 Mass Selective Detector, Agilent) にて D・L-Asp を分離した。これらの結果を、粉末象牙質 10 mg を使用する従来の陽イオン交換樹脂カラム (Dowex™50W ×8, Wako) を用いた手技 (図 1) と比較し、検討した。

本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会承認済 (D2016-047-01) である。

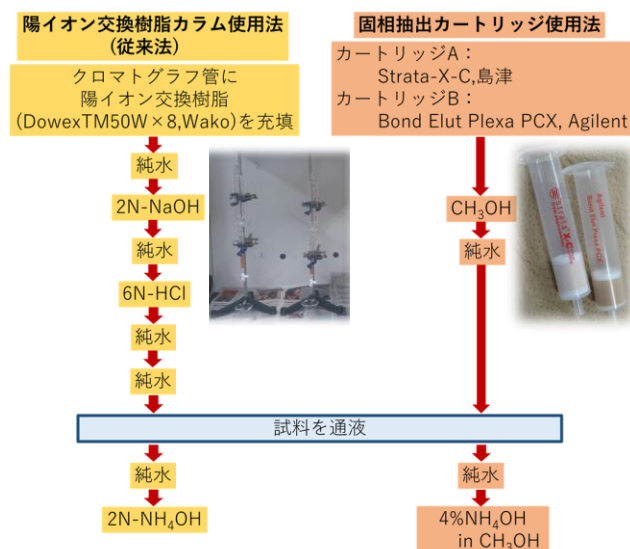


図1：従来法及び固相抽出カートリッジによる Asp 抽出手技の比較

(2) SPE カートリッジを応用した歯牙象牙質内の Asp のラセミ化反応による年齢推定法の再現性の検討

(1) の結果を基に SPE カートリッジ (Bond Elut Plexa PCX, Agilent) を使用し、歯牙象牙質内の Asp のラセミ化率 (D/L 化率) と年齢との相関関係を調査した。使用する歯牙は千葉大学附属法医学教育研究センター及び国際医療福祉大学医学部法医学にて法医解剖の際に採取した、明らかな齲蝕や治療痕のない、年齢及び死体状況が判明している下顎第二小臼歯計 43 本 (平均年齢 44 ± 17.9 歳) である。歯牙は歯根膜等を除去した後に象牙質切片を切り出し 0.2M 塩酸にて洗浄後、粉末化し 20 mg を使用する。粉末化した象牙質を 6M 塩酸 2.5 mL にて 100°C で 6 時間加水分解後乾燥させ、SPE カートリッジを用いて Asp を抽出 (図 1) する。Asp 抽出後エバポレーターにて乾固させ、イソプロピルアルコールと塩化アセチルを加え 100°C 30 分、無水トリフルオロ酢酸と塩化メチレンを加え室温 30 分にてそれぞれ誘導体化した後、酢酸エチルを溶媒として光学異性体分析用カラム (Chirasil-Val, 15m long, 0.3mm in diameter) を用いて、ガスクロマトグラフィー (GC, 7890B GC System, Agilent, FID 付き) にて D-Asp 及び L-Asp を分析し、計算式: $\ln [(1+D/L_{\text{Asp}}) / (1-D/L_{\text{Asp}})]$ に則り、D/L 化率を算出した。算出した Asp の D/L 化率と実年齢との間の相関関係並びに単回帰分析に関しては、エクセルの分析ツールを用いて求めた。本研究は国際医療福祉大学医学部倫理審査委員会承認済 (20-Im-022) である。

4. 研究成果

(1) 歯牙象牙質内の D-Asp 及び L-Asp 抽出方法の改良に関する検討

カートリッジ A (Strata-X-C, 島津)・カートリッジ B (Bond Elut Plexa PCX, Agilent) とともに象牙質粉末 20 mg を用いた場合に、D-・L-Asp とともに陽イオン交換樹脂カラムを使用した場合と同様に分離、測定が可能であった (図 2)。

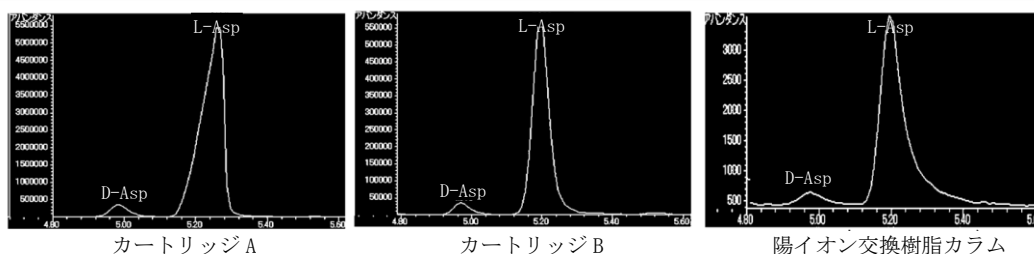


図2：SPE カートリッジ (象牙質粉末 20 mg 使用) 及び陽イオン交換樹脂カラム (象牙質粉末 10 mg 使用) におけるクロマトグラフ

さらに従来の陽イオン交換樹脂カラムを使用した手技の場合、樹脂のクロマトグラフ管への充填から Asp 抽出までの工程が多く、さらに試薬量も多いため時間がかかる (図 1)。一方、SPE カートリッジは従来と比較するとコンパクトで工程が少なく操作性もよい (図 1)。さらに使い捨てのため使用後の器具の洗浄も必要ない。これらのことから SPE カートリッジを使用することで、時間の削減・作業の効率化が可能になると考えられる。

(2) SPE カートリッジを応用した歯牙象牙質内の Asp のラセミ化反応による年齢推定法による再現性の検討

43 本の下顎第二小臼歯計 43 本 (平均年齢 44 ± 17.9 歳) に対し、SPE カートリッジを用いて Asp

を抽出、GCにてD・L-Aspを検出し、計算式に則りD/L化率を計算し、算出したAspのD/L化率をY軸、年齢をX軸とし、散布図を作成し回帰式を作成した(図3)。その後エクセルの分析ツールを用いてピアソンの積率相関係数(r)及び単回帰分析にて単回帰式及び決定係数(R²)を算出し、以下の結果となった。

$$r = 0.42 \quad (p < 0.05)$$

$$y = 0.0172x + 0.2765, \quad R^2 = 0.1751 \quad (p < 0.05)$$

以上より年齢とAspのD/L化率との間に相関はあるが、単回帰式を年齢推定に応用することは困難であった。

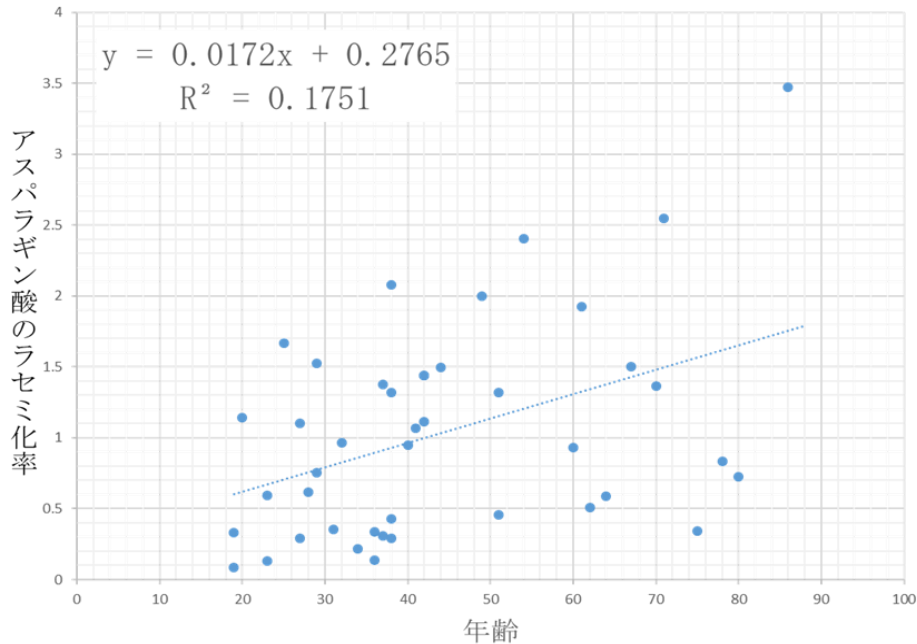


図3：年齢とアスパラギン酸のラセミ化率の散布図

(1)の検討によりSPEカートリッジによってAspの抽出が可能であると判断したが、(2)においては歯牙によってはL-Aspのピークが小さくなる事例が多く、これにより年齢推定の精度が悪くなったと考えられる。(1)と(2)の大きな違いとして、(1)では市販の光学異性体キャピラリーカラムを使用しGC/MS分析を実施していたが、その後の研究においてGC/MSの故障等が相次ぎ実験に支障が生じたため(2)ではGCを使用し、Chirasil-Valでコーティングされた特殊キャピラリーカラムを使用して分析した。今後、(1)で使用したものと同様の市販の光学異性体キャピラリーカラムを使用したGC分析方法を検討し、(2)の試料を再分析し検討する必要がある。さらに、試料の多くは抜歯後5年~10年程度冷凍保管した歯牙を使用したことが結果に影響した可能性もあり、従来法で(2)の歯牙試料を用いて年齢推定式が作成可能かを検討するとともに、抜歯後1年以内の歯牙試料を改めて収集し、SPEカートリッジを使用した手技を検討する予定である。

(3) (1)及び(2)の結果を受けた今後の展望

本研究ではSPEカートリッジを使用し、従来法と比較し作業時間の短縮ならびに手技の簡略化することを中心に検討してきた。本来であれば、象牙質内のホスホホリンと遊離アミノ酸内のAspを分離し、再現性のさらなる検討を実施する予定であったが、新型コロナウイルス感染症の影響などの要因に加え、多々の機器のトラブルの影響もあり研究に遅れが生じた。またGC/MS故障によるGC分析への切り替えなどにより結果に影響が出た可能性も否定できず、分析方法のさらなる検討が必要となるが、今後の課題として研究を継続していく予定である。

〈引用文献〉

- ① 藤井紀子、加治優一、加齢性疾患におけるタンパク質中のアスパラギン酸残基のラセミ化、生化学 第80巻 第4号, pp.287-293, 2008.
- ② Helfman PM et.al. Aspartic acid racemisation in tooth enamel from living humans. Proc Nat Acad Sci. 1975;72:2891-4.
- ③ Helfman PM et.al. Aspartic acid racemisation in dentine as a measure of ageing. Nature 1976;262:279-81.
- ④ Ohtani S et.al. Age estimation by amino acid racemization in human teeth. J Forensic Sci. 2010;55:1630-3.

- ⑤ Sakuma A et. al. The effects of racemization rate for age estimation of pink teeth. *J Forensic Sci.* 2015;602:450-2.
- ⑥ Masuda W et. al. D-Aspartic acid in bovine dentine non-collagenous phosphoprotein. *Arch Oral Biol.* 2002;47:757-62.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ishii Namiko, Saitoh Hisako, Utsuno Hajime, Minegishi Saki, Sakurada Koichi.
2. 発表標題 Improvement of the age estimation method using dentin aspartic acid racemization Study of aspartic acid extraction technique.
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井名実子、斉藤久子、宇都野創、峰岸沙希、櫻田宏一
2. 発表標題 象牙質のアスパラギン酸におけるラセミ化反応を用いた年齢推定法の改良～アミノ酸の抽出法の検討～
3. 学会等名 日本法歯科医学会第11回学術大会
4. 発表年 2017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
---------	---------