

歯牙中アミノ酸のラセミ化反応による 年齢推定法並びに法医学への応用

東京女子医科大学 口腔外科 (指導: 河西一秀教授)

荻 野 経 子

東京都立大学 工業化学教室 (主任: 鈴木繁喬教授)

荻 野 博

(受付 昭和59年2月6日)

Application of Amino Acid Racemization in Tooth to Age Estimation and Forensic Medicine

Tsuneko OGINO

Department of Oral Surgery (Director: Prof. Isshu KAWANISHI)
Tokyo Women's Medical College
and

Hiroshi OGINO

Department of Industrial Chemistry (Director: Prof. Shigetaka SUZUKI)
Tokyo Metropolitan University

The racemization of aspartic acid occurring in human teeth was used as a forensic medical method to determine the age of individuals when they deceased.

First, a series of experiments was conducted with dentin separated from teeth of individuals of various ages, and extracted in vivo, in an attempt to evaluate the advantages and limitations of this method. One linear regression line was obtained from an inclusive set of 35 teeth and another from third molars only yielding $\ln(1 + D/L) = 0.0157 + 0.000575 \times t$, $r = 0.991$ and $\ln(1 + D/L) = 0.00921 + 0.000565 \times t$, $r = 0.991$, respectively.

Second, the former line was used to estimate the age of tooth extracted post mortem. Using this method, the affect of the post mortem time on age estimations appears to be negligible.

Thus, the present results indicate that the aspartic acid racemization method may give appropriate estimates of the age of individuals at the time of their death within an error range of ± 4 years.

緒 言

法医学分野において歯牙の年齢推定法は Gustafson¹⁾の方法をはじめとして数多くの研究が報告²⁾⁻⁶⁾されているが、生体内における化学反応を応用した研究は未だ報告されていない。最近 Bada⁷⁾らは地球化学分野でアミノ酸のラセミ化反応を応用して種々の年代推定をおこなっている^{7),8)}。この方法はアミノ酸の光学異性体を利用したものである。一般にアミノ酸は glycineを除

いて不斉炭素をもち L型と D型が存在する。特に生物体を構成するアミノ酸は L型であり、これが D型に変化するため、そのラセミ化量を測定することによって年代を推定し得る。ラセミ化反応は一般に緩慢に進むがその反応速度の順序⁹⁾は aspartic acid > alanine = glutamic acid > isoleucine ≅ leucine であり、Helfman⁹⁾⁻¹³⁾は比較的速度の速い aspartic acid のラセミ化反応を用いて、生体中でも骨、歯牙、水晶体、及び脳

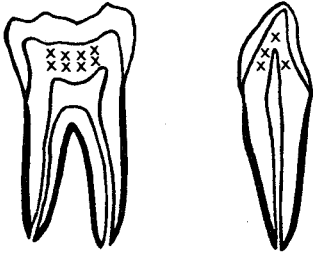


Fig. 1 Cross section of teeth showing sampling areas (x).

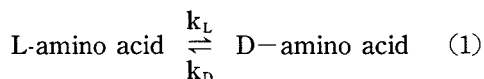
の白質部¹⁴⁾に D-aspartic acid が年齢と共に蓄積されていくことを報告している。今回著者らは歯牙における aspartic acid のラセミ化反応に着眼し、この方法を法医学分野に応用するため基礎的研究をおこなったので報告する。

実験材料および方法

材料：臨床上抜去を必要とした年齢、性別、抜去理由の明らかな生活歯で中切歯から第三大臼歯までを含む8種類の被検歯牙35本、及び抜去後1年4カ月間10%ホルマリン液で保存されていた同一人の歯牙2本、及び死亡後1年5カ月間解剖学教室でホルマリン液固定保存されていた遺体から抜去した歯牙1本を用いた。

方法：冠部象牙質の一部 (Fig. 1) を冷却下で歯科用エンジンを使って約10mg 取り出し、粉末にして洗浄後、加水分解する (6N HCl, 100°C, 6hr)。次に陽イオン交換樹脂 (Bio-Rad AG 50-X8, 50~100mesh) カラムに通して脱塩をおこなうと共に捕集されたアミノ酸を TFA-イソプロピルエステルの誘導体にかえ、ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 5880A, Chirasil-Val-fused silica capillary column, FID) で分離定量¹⁵⁾した (Fig. 2)。

一般にアミノ酸のラセミ化反応は一次可逆反応で表わされる¹⁰⁾。



(1) の速度式は次のように与えられる。

$$-\frac{d[L]}{dt} = k_L[L] - k_D[D] \quad (2)$$

[L] は L-amino acid, [D] は D-amino acid,

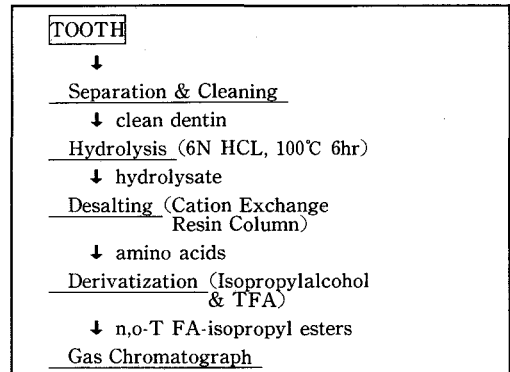


Fig. 2 Sample preparation flow chart.

k_L, k_D は速度定数、さらに(2)を積分し、 $D/L \ll 1$ と仮定すると次の一般式が得られる。

$$\ln[1+(D/L)]_t = \ln[1+(D/L)]_{t=0} + 2k_L \times t$$

この式より速度定数 k_L と定数 $\ln[1+(D/L)]_{t=0}$ を知ることができれば未知なる歯牙の年齢 (t) を推定できる。

結 果

Fig. 3 は、冠部象牙質から得たガスクロマトグラムの1例であり、aspartic acid の D-と L-の分離が認められる。Fig. 4 は年齢の異なる歯牙より得たガスクロマトグラムで分析された aspartic acid の部分を取り出し比較したものである。これより明らかなように D-aspartic acid は加齢と共に増加していることを示している。被検歯牙総計35本を用いて既述した方法により分析し、その D/L 値から $\ln[1+(D/L)]$ 値をもとめて縦軸にとり、歯牙の年齢 (Age of tooth) を横軸にとって表わしたのが Fig. 5 である。歯牙の年齢 (Age of tooth) 値は、個人の年齢から中切歯、側切歯で4歳、犬歯、第一小臼歯、第二小臼歯で6歳、第一大臼歯で3歳、第二大臼歯で7歳、第三大臼歯で12歳を差引いた値である。すなわち歯牙の標準萌出時期は、歯種及び上下顎によって異なるので当然冠部象牙質の完成期も異なってくる。この歯の発育状況に関しては、Schour ら¹⁶⁾により詳細に報告されている。このように補正することによって異なった歯種においても同一にプロットできるのである。Fig. 5 で示したごとく、歯牙の年齢と $\ln[1+(D/L)]$ との回帰直線式は最小二乗法で算出

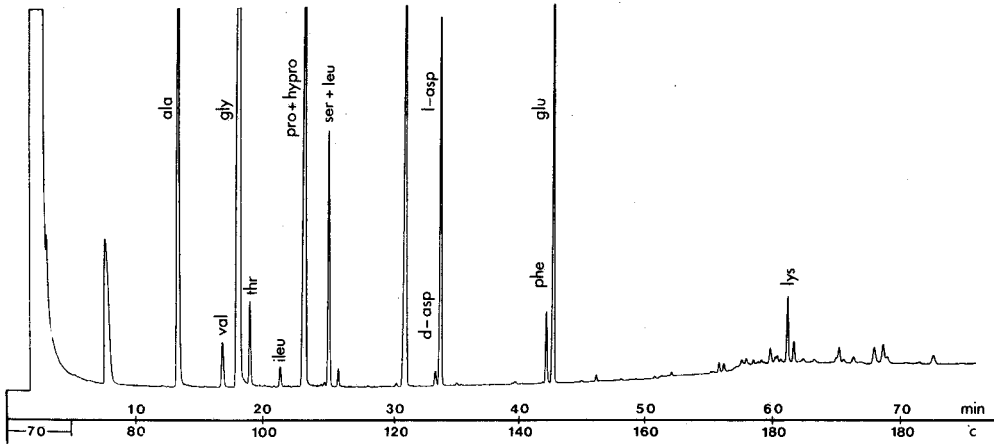


Fig. 3 Gas chromatogram of amino acids (N, O-trifluoroacetyl isopropyl esters) recovered from the hydrolysate of dentin.

ala : L-alanine, val : L-valine, gly : glycine, thr : L-threonine, ile : L-isoleucine, pro : L-proline, hypro : L-hydroxyproline, ser : L-serine, leu : L-leucine, d-asp : D-aspartic acid, l-asp : L-aspartic acid, phe : L-phenylalanine, glu : L-glutamic acid, lys : L-lysine.

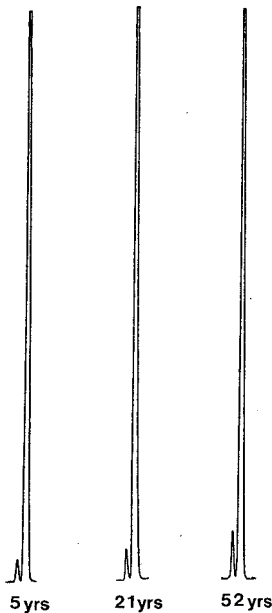


Fig. 4 Gas chromatograms of aspartic acids from dentin with various ages of teeth.

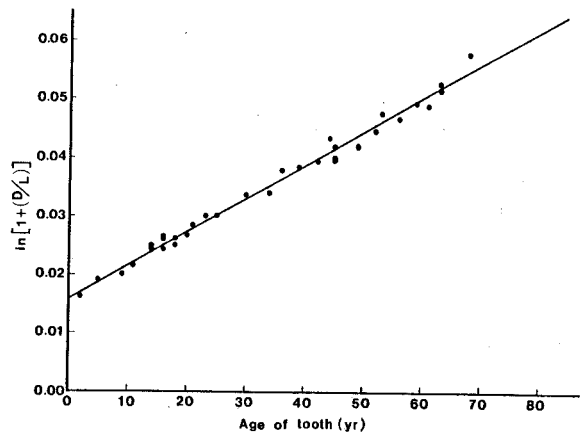


Fig. 5 The linear regression line for all types of teeth.

も多かった第三大白歯14本を $\ln[1+(D/L)]$ と個人の年齢で表わしたものである。この場合においては同歯種のため冠部象牙質の完成期のちがいはなく、従って前述のような補正を必要とせず直接個人の年齢で表わすことができる。第三大白歯における年齢と $\ln[1+(D/L)]$ の回帰直線式は、

$\ln[1+(D/L)] = 0.00921 + 0.00565 \times t$ であり、その相関係数は $r = 0.991$ となった。

以上のことから、それぞれ異なった歯種を用い

すると、

$\ln[1+(D/L)] = 0.0157 + 0.000575 \times t$ であり、その相関係数は $r = 0.991$ であった。

Fig. 6 は被検歯牙35本のうち歯種別にみて最

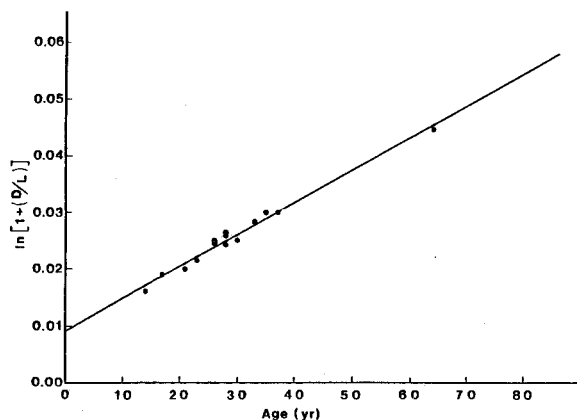


Fig. 6 The linear regression line for the third molar only.

て補正することによって、得られた歯牙の年齢を同一にプロットした場合も、一種の歯牙のみをもちいて補正せずに直接個人の年齢をプロットした場合も、同じく高い相関係数を示した。次に本法の年齢推定に対して、(1) 抜去後の放置時間、(2) 死亡後の経過時間について、その影響を検索するために以下の実験をおこなってみた。すなわち(1) にたいしては、1年4カ月前に同一人から抜去し10%ホルマリン液で室温保存されていた歯牙2本(5と6)を既述した処理方法で分析し、その値をFig. 5でもとめた回帰直線式に代入して歯牙の年齢をもとめ、それを上記のごとく補正し、年齢推定を行なったところ、5]では51歳、6]では50歳と得られた。これらの歯牙は同一人より抜去されたので、得られた推定年齢を平均すると51歳となり、実際の年齢は52歳で-1歳の誤差であった。(2) にたいしては、死亡後1年5カ月間解剖学教室でホルマリン液固定保存されていた遺体から抜去した歯牙1本(2)を用いて、同様の方法で分析、算出した結果、得られた推定年齢は70歳となり、この人の実際の死亡時の年齢は74歳で-4歳の誤差があった。

考 察

歯牙からの年齢推定の研究は数多くおこなわれている⁵⁾が、アミノ酸のラセミ化を用いた研究は法医学分野において報告がないため、著者らは各歯種を用いて基礎的検索をおこない、また抜去

後1年4カ月経過した歯牙を死後1年5カ月経過した遺体から得た歯牙を用いてこのラセミ化法に適用してみたところ、それぞれ-1歳、-4歳の誤差で抜去時年齢、死亡時年齢を推定することができ、満足する結果を得た。本法はあらゆる種類の歯牙においても、あるいは一種類の歯牙においても、いずれも高い相関係数が得られたので、同様に他の歯種でも得られるものと予想され、現在検索中であり、法医学における個人の年齢推定に十分期待できると思われる。又、転位歯、埋伏歯、あるいは対合歯の喪失で咬磨耗が起きていない歯牙においても適用できる。更にう蝕で実質欠損があっても、約10mgの健全象牙質を採取できるなら分析可能である。しかし下顎切歯のごとく小さな歯牙では冠部象牙質を採取する難しさがある。なお第4度う蝕等の歯根部のみの場合については現在検索中である。法医学の個人鑑定で年齢推定がかなり困難な場合、従来の方法とラセミ化法を組み合わせて推定するのも解決法の一つではないかと思われる。

総括および結論

著者らは年齢推定の目的のためにアミノ酸の光学異性体比(D/L)を測定する方法を用いて年齢既知の被検歯牙35本の基礎的検索及びその応用を試み、つぎの結果を得た。

1) すべての歯種を含む歯牙35本における回帰直線式は、

$$\ln[1+(D/L)]=0.0157+0.000575 \times t \quad (t; \text{歯牙の年齢})$$

となり、補正することによって個人の年齢を推定できる。

2) 35本の内、同歯種である第三大臼歯14本のみに着目した場合の回帰直線式は、

$$\ln[1+(D/L)]=0.00921+0.000565 \times t \quad (t; \text{個人の年齢})$$

となり、直接個人の年齢を推定できる。

3) 更に本法の応用として、抜去後1年4カ月経過した歯牙と死後1年5カ月経過した遺体からの歯牙を用いて検索したところ、それぞれ-1歳、-4歳の誤差で年齢が推定された。

4) 本法による年齢推定の精度は次のごとくで

あった。すべての歯種35本における相関係数 $r=0.991$ であり、同歯種14本における相関係数 $r=0.991$ となり、いずれの算出法でも精度が高く、また遺体から抜去された歯牙においても満足する結果を得たので、法医学上、個人識別の年齢推定に有効性が高い。

5) 本法において性差は認められなかった。

以上述べたごとく、本法の原理は生体中でのアミノ酸のラセミ化反応に基づくもので、従来の方法と全く異なる。このため本法は法医学における年齢推定に関し、有効かつ新しい手段を提供するものと期待される。

稿を終るにあたり、2年間本研究の機会を与えて下さった東京女子医科大学口腔外科河西一秀教授に深甚の謝意を捧げるとともに、本研究に終始ご懇篤なる御指導と本誌発表の機会を与えて下さったアリゾナ大学地球化学教室 Bartholomew Nagy 教授に心から感謝の意を表します。また数多くの材料を提供して下さいました鶴見大学第2口腔外科の橋爪敦子先生、並びに貴重な材料を提供して下さいました鶴見大学解剖学教室橋本 巖教授及び田中 倫先生に深く感謝いたします。

本研究の一部はアリゾナ大学 (University of Arizona) で NASA の Grant (NGR-03-002-171) によっておこなわれた。

文 献

- 1) Gustafson, G.: Age determination on teeth. *J Am Dent Assoc* 41 45~54 (1950)
- 2) 向井 敏・ほか: 歯科学的にみた年齢推定の一新法. *日法医誌* 20(2) 223~229 (1966)
- 3) 伊東志朗: 歯牙の年齢に関する研究. *日法医誌* 26(1) 31~41 (1972)
- 4) 山本勝一・ほか: Attrition, Periodontosis, Transparency による年齢鑑定に関する研究. *神奈川歯学* 8(4) 199~211 (1974)
- 5) 鈴木和男: 法歯学. 第2版 永末書店 京都(昭52) 86~112
- 6) Solheim, T. and P.K. Sundnes: Dental age estimation of norwegian adults-A comparison of different methods. *Forensic Sci Int* 16 7-17 (1980)
- 7) Bada, J.L.: Racemization of amino acid in nature. *Interdisciplinary Science Reviews* 7 30~46 (1982)
- 8) 安部 巖・ほか: アミノ酸ラセミ化法による屋久杉年輪の年代測定. *分化* 31427~431 (1982)
- 9) Bada, J.L., et al.: Racemization of amino acid in bones. *Nature* 245 308~310 (1973)
- 10) Helfman, P.M. and J.L. Bada: Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proc Nat Acad Sci USA* 72 2891~2894 (1975)
- 11) Helfman, P.M. and J.L. Bada: Aspartic acid racemization in dentine as a measure of aging. *Nature* 262 279-281 (1976)
- 12) 下山 晃・ほか: ヒトの歯と年齢とアスパラギン酸の D/L 比(2). *日本化学会第47年会講演予稿集 II* 130頁 (1983)
- 13) Masters, P.M., et al.: Aspartic acid racemization in the human lens during aging and in cataract formation. *Nature* 268 71~73 (1977)
- 14) Man, E.H., et al.: Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain. *Science* 220 1407~1408 (1983)
- 15) Nagy, B., et al.: Amino acid and hydrocarbons 3,800-Myr old in the Isua Rocks, Southwestern Greenland. *Nature* 289 53~56 (1981)
- 16) Schour, I. and M. Massler: Studies on tooth development; the growth pattern of human teeth (part II). *J Am Dent Assoc* 27 1918~1931 (1940)