

第73回日本大学歯学会特別講演寄稿 骨および歯による年齢推定の実際と最近の動向

網 干 博 文

日本大学歯学部法医学講座

要旨: 遺体発見時, 検査で最も優先される事項は亡くなった方の個人識別である。身元不明遺体の場合, 個人識別作業の第一段階は生物学的な個人情報収集, すなわち, 性別, 年齢, 身長および帰属集団(人種)などの推定となる。なかでも年齢推定は, 警察の捜査対象を絞る意味からも重要であり, その推定には可能な限りの正確性が求められる。対象となる遺体が成長期(胎生期から20歳代前半)にある場合は骨や歯の成長発育状態を, 成人期以降(20歳代半ば以降)の場合は退行性的変化を用いて年齢を推定する。成長期における成長発育は, 遺伝学的なプログラムに基づいて進行することから年齢との相関が高く, 年齢推定の精度は比較的高いが, 成人期以降の退行性的変化は生活様式など環境の影響を受けやすいため, 年齢推定の精度は低下する。このように, 生物学的な年齢推定に使用される形態学的特徴は, 年齢とともに変化しながら胎生期から老齢期まで徐々に増えていくため, それに対応する様々な年齢推定法が開発されている。また近年, 生化学的な分析技術の進歩により, DNA やアミノ酸などの生物学的指標の定量分析法も開発され, 年齢推定に応用されている。

このレビューでは, 主に形態的な特徴を利用した年齢推定法の変遷をたどるなかで, 歯による年齢推定法を中心に概説するとともに, 最近の動向として研究の成果が目覚ましい生化学的な手法による年齢推定法についても紹介する。

キーワード: 歯科法医学, 年齢推定, 形態学的特徴, 退行性指標

A review of the age estimation in forensic odontology and recent trends

Hirofumi Aboshi

Department of Legal Medicine, Nihon University School of Dentistry

Abstract: When human remains are found, the priority of the investigation is to ascertain the identity of the deceased. The first step in the identification process is to build up a biological profile, which is a general description of the individual's sex, age, stature, and ancestry. Age estimation should be an important part of every identification process. The estimation should be as accurate as possible since it narrows down the pool of potential identities to be investigated by the police. The choice of the method is inherently related to whether the unidentified remains are those of a juvenile or an adult. In age estimation, while developmental morphological features in bones or teeth can be applied to a juvenile, degenerative features are applicable only to an adult. As progressive developmental changes in bone size and morphology occur from genetic programming at relatively predictable rates with a positive correlation between skeletal and chronological age, age estimation is usually most accurate in immature individuals. On the other hand, in mature individuals, the low accuracy of age estimation by degenerative morphological markers is due to the fact that they are more influenced by environmental factors. The variability in the morphological features used to assess biological age thus progressively increases from fetal life to old age. Numerous age estimation methods corresponding to developmental markers have been developed. In the last decade, because of the advances in the field of biochemical analytical technology, biochemical parameters have also been applied to age assessment such as DNA, and amino acid analysis.

This article will review the principal methods and techniques of predominantly dental age assessment practices by morphological features of the deceased and the recent trends of molecular methodologies.

Keywords: forensic odontology, age estimation, morphological features, degenerative markers

(受付: 令和3年10月18日)

責任著者連絡先: 網干博文

日本大学歯学部法医学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL: 03-3219-8119

FAX: 03-3219-9343

E-mail: aboshi.hirofumi@nihon-u.ac.jp

はじめに

白骨遺体の発見時、検査で最も優先される事項は、亡くなった方の個人識別である。身元不明死体の個人識別作業では、所持品が発見されなければ、該当者が挙げられず、生前情報がないので歯科所見や DNA 型の照合も不可能となる。そのような場合、第一のステップとして、骨硬組織の形態的特徴を指標として性別、死亡時年齢、身長および帰属集団(いわゆる人種)などを推定し、これらの個人識別の情報をもとに絞り込みを行う。このなかで死亡時の年齢は極めて重要な情報となる。性別や帰属集団は、DNA 型など他の手法でも判定あるいは推定可能であるが、年齢の推定は原型保存性が高く、死後変化も少ない骨硬組織の形態からの判断に頼らざるを得ない。またその際、警察に提供される推定結果はその後の捜査の方向性をも左右し、事件解決にも直接寄与するため、正確性と精度が要求されることになる。しかし、骨や歯からの年齢推定においては、一つの方法ですべての年代にわたり推定可能なものは存在しない。

骨および歯は、胎生期から乳児期、幼児期、少年期を経て青年期に至るまで継続的に成長発育し、20 歳代半ばで形成が完了する。成長発育は遺伝学的なプログラムに基づいて規則正しく進行することから年齢との相関が高く、年齢推定の精度は比較的高い。なかでも歯の成長発育は、骨の形成システムに比べ、周囲の環境要因の影響をほとんど受けず、原形保存性も極めて高く、胎生期から成人期初期に至るまで成長発育が継続して進行するため、この時期の年齢推定で最も信頼性の高い指標とされている¹⁾。一方、成人期以降の年齢層に属する遺体では、形成終了後の退行性変化を推定の指標とするしかなく、しかもその変化は生活様式、健康・栄養状態などの影響を受け、その様相も個人間で大きく変動する。したがって、その推定精度は若年層に比べ、おのずと低下する。以上のように生物学的な年齢推定に使用される形態学的特徴は、胎生期から高齢に至るまで徐々に増えていくため、それに対応する様々な年齢推定法が開発されている²⁾。

また、近年における生化学的な分析技術の進歩により、DNA やアミノ酸などの生物学的指標の定量分析法も開発され、年齢推定に応用されている³⁻⁶⁾。

このレビューでは、主に形態的な特徴を利用した年齢推定法の変遷をたどるなかで、歯による年齢推定法を中心に概説するとともに、最近、新たに注目されている生化学的な手法による年齢推定法についても紹介する。

1. 形態学的な特徴による年齢推定

1) 出生から成人期までの個体の年齢推定

(1) 歯の石灰化と萌出

a. 成長発育のアトラスや標準萌出時期との比較による方法

歯の発育は骨よりも暦年齢と密接に関係し、遺伝的に

制御された規則的な形成と萌出により、年齢推定に広く利用されている。成人期までの個人の暦年齢を推定する際、よく参照されるものに、生後 4 か月から 21 歳までの歯の発育状態を年代順の 20 のステージでまとめた Schour and Massler⁷⁾の発育年表がある。このデータの原型は、1933 年 Logan and Kronfeld が 25 体の解剖組織標本をもとに作成した成長発育表であったが、当初は評価もあいまいなまま少しずつ追加・訂正されながら使用されていたという。それを最終的に Schour and Massler が修正し、アメリカ歯科医師会でアトラスにして一般開業医にも広まったものと言われている。1930 年代後半に多数撮影された子供のエックス線写真をもとに作成された歯の成長ステージの分類結果が、現在でも使用されていることになる。その後、Moorrees らは歯の成熟度を咬頭形成から根尖の完全閉鎖まで 14 のステージで表し、男女別の表を作成した^{8,9)}。さらに Anderson らは、Moorrees らのシステムを発展させ、第三大臼歯を含む全歯を対象とした表を発表している¹⁰⁾。最近では Ubelaker ら¹¹⁾が Schour and Massler の業績を基盤に、北米アメリカ人集団の胎生 5 か月から 35 歳までの乳歯・永久歯の歯ごとの形成、萌出状態を図譜で表現したアトラスを発表し、暦年齢推定のための参照データの一つとして使用されている。この方法は、Schour and Massler⁷⁾の方法に比べ、より広い年齢範囲で適用可能で、さらに永久歯列の発育状態と乳歯の吸収状態がアトラスとして同時に示され、視覚的にも把握し易いことから広く歯科臨床の場でも使用されている。しかし Ubelaker ら¹¹⁾の方法は、他の帰属集団にもその基準がしばしば適用されてはいるものの、追試報告はほとんど見当たらず、その精度に関する信憑性は不明である。

一方、日本では 1988 年に日本小児歯科学会による乳歯・永久歯の萌出調査が初めて実施され、Ubelaker ら¹¹⁾のアトラスに類似した図譜も作成された¹²⁾。そして 2018 年には調査資料数 3 万人という全国規模で同じ調査が実施され、その結果は日本人乳歯と永久歯の男女別の標準萌出時期として公表されている¹³⁾。利用に際しては各歯とも萌出時期は 1 歳半前後の幅があり、各種感染や早期の喪失によっても影響を受けることなども考慮すべきであるが、発表されたデータは調査時期、調査方法、資料数などから考えても現代日本人資料として参照するには十分信頼性に足る標準データと言える。歯の萌出時期は、肉眼的に口腔内を覗いて判断した内容をもとにしているため、後継永久歯の歯冠・歯根の成長発育状態などは不明である。また変異の大きい第三大臼歯は対象として除かれている。しかし、歯科法医学の見地から考えると、大規模災害時に一度に短時間で多数の遺体の年齢推定を求められた場合、萌出時期の情報は肉眼的に迅速な判断を下すために役立つことから、信頼性のある最新版の萌出時期の対照表の存在意義は大きい。

b. スコアリングによる方法

1973年 Demirjian ら¹⁴⁾は年齢推定を簡略化するために、下顎左側の7歯を対象に、歯の発育段階を男女別にA~Hの8段階に分け、各歯に割り当てられたスコアの合計を全体の歯の成熟度として推定年齢を算出する方法を発表した。この研究には約3,000枚もの子供のエックス線写真が使用され、後に第三大臼歯が対象歯に加わり一連の形成段階が扱われているため、法医学の分野でも広く使用されている。このスコアリングによる推定は、解剖学的な特徴をエックス線写真上で読み取り発育ステージを決定するため、検査者の計測によるバイアスがなく、評価の正確性、信頼性が確保されるという利点を有する。そのため、Demirjian ら¹⁴⁾の方法は、他の帰属集団への適用が可能か否かの検証や他の年齢推定法との比較などに簡便な方法として利用されている。

(2) 第三大臼歯の成長発育

第三大臼歯は、青年期後期から成人期初期の年齢推定にしばしば利用される。なぜなら、この期間で成長発育中の歯は第三大臼歯のみで、信頼に足る生物学的な指標がそれ以外に存在しないことによる。この時期の年齢推定では、法律の適用年齢、特に成人年齢が大きな問題となる。ヨーロッパやアメリカでは不法移民対策や年金受給問題など、個人が成人に達しているか否かを明確にすることは重要な課題になっている。国ごとに多少のばらつきはあるにせよ、多くの国で法的な成人年齢は18歳であり、その年齢を推定するために、第三大臼歯の成長発育は重要な指標となっている。第三大臼歯は他の歯に比べ、多様な環境要因や遺伝的要因の影響を受けるため、個人差が出やすく正確性に欠けるという指摘もあるが、個人が成人に達しているかどうかだけを判断するには、十分な合理的な指標として使えると言われている。

1993年、Mincer ら¹⁵⁾は、A B F O (American Board of Forensic Odontology)の会員らにより収集された823名分のOPG資料をもとに、Demirjianの8段階分類法で第三大臼歯の発育ステージを評価し、男女別に平均値

を算出している。そのなかで第三大臼歯の発育は、女性より男性が有意に早く、他の歯で観察されるパターンと反対であったという。加えて、根尖が完全に閉じて歯周靭帯の幅が一定であるステージHであれば、その個人は少なくとも18歳に達している可能性が高く、その経験確率は白人男性で90.1%、白人女性で92.2%であったと報告している。その後、他の帰属集団の第三大臼歯の発育と暦年齢との関係を同様の方法、パラメータを用いて調査した研究が報告されている¹⁶⁾(Table 1)。

日本人については、Olze ら¹⁷⁾、および Arany ら¹⁸⁾によって別々に発表されたデータがある。それらによると、下顎第三大臼歯の Demirjian の各発育段階における平均出現年齢と標準偏差は、同じ日本人集団間でもステージHはほぼ同様であるが、ステージE、F、Gでは異なる。また他の帰属集団と比較すると、日本人は歯根形成開始時期も歯根完成時期も2年ほど遅い。逆にアメリカ系白人・ヒスパニックやトルコ人では、ステージHの平均年齢が20歳ほどで日本人より歯根完成期が2年ほど早い

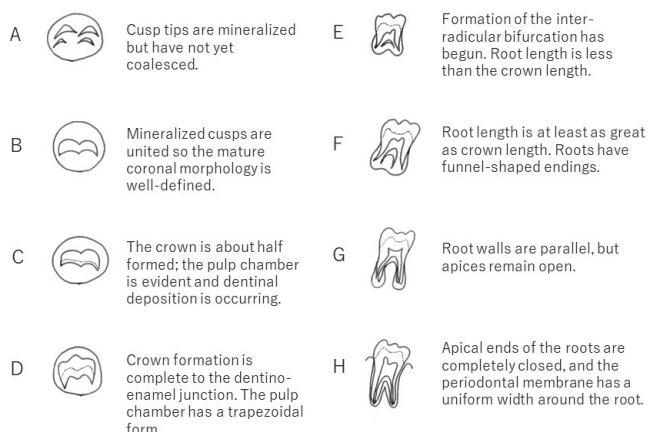


Fig. 1 第三大臼歯の発育を評価する際に使用する歯冠および歯根の8つの形成段階の模式図とその定義
模式図は Demirjian らの図を改編して作成し、定義は原文のまま。

Table1 下顎第三大臼歯における各帰属集団の Demirjian の発育段階に属する男女別平均年齢と標準偏差

Stage	Gender	American (Mincer)	Hispanics from USA (Solaris)	German (Olze)	Japanese (Olze)	Japanese (Arany)	South African (Olze)	Austrian (Meinl)	Turkish (Orhan)	Spanish (Prieto)
E	females	16.9 (1.7)	16.1 (1.4)	17.2 (2.4)	18.2 (2.3)	17.25	15.9 (2.3)	17.8 (2.5)	16.1 (2.4)	15.99 (1.42)
	males	17.3 (2.5)	15.8 (1.2)	16.7 (2.1)	18.6 (2.9)	16.35	15.2 (2.4)	15.6 (1.8)	15.6 (2.8)	15.22 (1.03)
F	females	17.7 (1.8)	17.3 (2.6)	19.0 (2.5)	20.3 (1.9)	18.2	17.4 (2.5)	18.4 (2.4)	17.0 (2.5)	16.83 (1.56)
	males	17.5 (2.1)	16.3 (1.3)	18.2 (2.1)	19.8 (2.2)	17.3	18.7 (2.3)	17.5 (2.6)	16.9 (2.7)	16.43 (1.34)
G	females	19.1 (2.1)	18.5 (2.1)	21.6 (2.1)	21.5 (1.8)	19.4	19.8 (2.3)	20.3 (2.1)	17.9 (2.3)	18.41 (1.43)
	males	18.3 (1.9)	17.1 (1.7)	21.2 (1.9)	21.8 (2.1)	18.65	20.8 (2.2)	20.1 (2.1)	17.9 (2.2)	17.92 (1.50)
H	females	20.9 (2.0)	21.7 (1.8)	22.9 (1.7)	22.1 (1.8)	21.8	22.4 (1.9)	22.9 (1.3)	20.0 (1.9)	19.66 (0.97)
	males	20.5 (1.9)	20.6 (2.3)	22.5 (1.7)	22.5 (1.8)	21.6	22.6 (1.9)	22.4 (1.8)	20.1 (2.0)	19.74 (1.08)

Cameriere et al. (2008) The comparison between measurement of open apices of third molars and Demirjian stages to test chronological age of over 18 year olds in living subjects, Int. J. Legal Med.122, P494 より改編引用。

日本人集団については2名の研究者が、いずれも歯根形成開始時期(ステージE)が他の集団に較べ少し遅いと報告している。また日本人の根尖閉鎖時期(ステージH)の平均年齢は、22歳前後で白系ヒスパニック系アメリカ人、トルコ人より2年ほど遅いことが読み取れる。

ことが分る。他に特徴的な所見としては、南アフリカ黒人がステージEからGにおいて、ほかの集団より1~4歳も若いことが挙げられる。これらの結果から、18歳の個体における第三大白歯の歯根形成ステージは帰属集団間で異なるため、ステージHの評価を18歳の閾値とするのは難しいと言える。このように、第三大白歯の成長発育の情報だけで成人に達しているかどうかを判断するのは非常に危険であり、推定精度の向上のためには歯と骨の成長所見を併用すべきという意見もある。

そこで、第三大白歯の形態学的特徴による年齢推定法のトレンドの一つを紹介する。2008年、Cameriereら¹⁶⁾は、第三大白歯の成熟度指数 I_{3M} (Index 3M)を提唱した(Fig. 2)。これはエックス線画像上で、歯の全長に対する、根尖孔の内径の合計の割合、すなわち根尖の開存程度を指数として表現したもので、0.08以下であれば18歳以上、0.08以上であれば18歳未満と判断できるという。またこの分析の感度は70%、特異度は98%であり、正解と分類された割合は83%であったとも報告されている。この方法は、比較的短期間で世界各地の歯科法医学者により検証作業が行われ¹⁹⁻²⁴⁾、日本人資料についても成熟度指数0.08が18歳の閾値として有効であることが報告されている²⁵⁾。

2) 成人期以降の個体の年齢推定

成人期以降の個体については、恥骨結合面の形態、頭蓋縫合の閉塞程度、骨海綿質における骨梁構築像、腰椎椎体部の骨棘形成および歯の咬耗・歯髓腔の退縮程度な

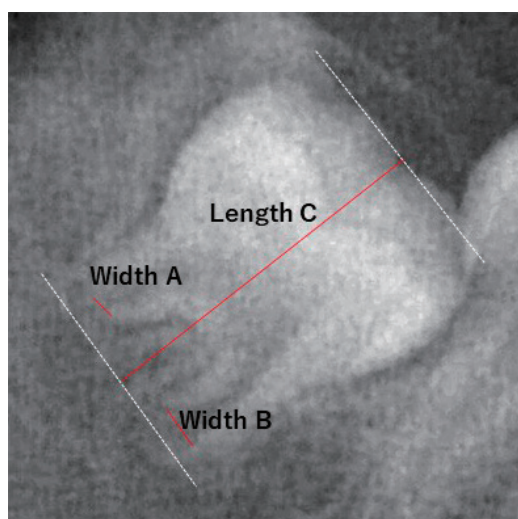


Fig. 2 第三大白歯の成熟度指数 I_{3M} のための計測

I_{3M} は、開存する根尖孔の内側の幅の合計(Width A + Width B)を歯の全長(Tooth Length C)で割ることで求められる。Cameriereらによれば、18歳以上か未満かの閾値は $I_{3M} = 0.08$ であり、0.08未満であれば18歳以上、0.08以上であれば18歳未満と推定可能という。

どを指標とするのが一般的である。ここでは歯の生理学的加齢変化を指標とする代表的な年齢推定法のみ概説する。

(1) Gustafson Method

歴史的に有名で歯による成人の年齢推定法でよく参照されるのが、1950年に発表されたGustafson法²⁶⁾である。この方法は歯の研磨標本による組織学的な観察法で、熟練した手技を必要とする。具体的には、形成完了後から現れる6種類の退行性変化の進行程度に応じて0~3の4段階のスコアを与え、その数値の合計と回帰直線により、推定年齢を算出する方法である。指標として使用された6項目は、以下のとおりである。

- A : Attrition (咬耗)
- P : Periodontosis (歯周組織の退縮)
- S : Secondary dentine (第二象牙質の添加)
- C : Apposition of cementum (セメント質の添加)
- R : Resorption (歯根吸収)
- T : Transparency (歯根透明象牙質)

Gustafsonの直線回帰式による精度は、集団の95%で推定年齢と実年齢との差が7~8年程度と報告されていた。しかしその後の追跡研究により、各変数の独立性や年齢推定に対する効果の程度に差があるのでは、との議論になり、結局、1971年にGustafsonの後継者であるJohansonにより改良法が発表されている²⁷⁾。その方法は、歯髓の最も広い部分を含む厚さ0.25mmで唇舌方向にスライスした研磨標本作製し、Gustafsonと同様の6種類の退行性変化に、0~3の0.5刻みで計7段階のスコアを与え、変数ごとに重み付けられた重回帰式に代入して推定年齢を求めるものである。性別や歯種については考慮されていないが、グスタフソン改良法と呼ばれ、以降しばらくの間、標準的な歯の組織学的な年齢推定法として使用されていた。さらに1978年、Maplesら²⁸⁾はJohansonの方法を検証した際、年齢と相関の高い変数は、①歯根透明象牙質、②第二象牙質の添加、③咬耗の順であり、①、②のみを使用した回帰式の推定精度が最も良かったと報告している。

そこで、その2つを指標とする代表的な年齢推定法についてそれぞれ説明する。

(2) 歯根透明象牙質

透明象牙質は、象牙細管にハイドロキシアパタイト結晶が沈着し光が透見できる現象で、20歳以前には現れないと言われる。また歯根の透明性は、根尖部から始まり歯冠方向へと進行する。この変化に性差はなく、死体、生体いずれの歯においても透明性に違いはなく、外的な影響も受けにくいと言われている。

a. Bang and Ramm²⁹⁾による(1970年)

この方法では歯をそのまま、あるいは切片標本の場合には、歯根部歯髓中央部を含む唇舌方向に切断した切片を用い、根尖から透明層上部までの長さを計測する。計測

に際して、透明層の歯冠側方向の位置が異なる場合は、最大透明層長と最小透層長の計測値の平均値が年齢推定に利用される。ただし、透明層の進行は根尖部から始まるが、70歳を過ぎたころからその進行速度は遅くなると言われ、年齢推定には2種類の回帰式が導出されている。すなわち計測値が9mm以内の場合と、9mm以上の場合で別々に用意された回帰式を使用する。この方法は、資料骨がわずかしか残っておらず、性別なども不明な場合に広く適用される。

b. Lamendin ら³⁰⁾による(1992年)

これは Gustafson の方法で使用された変数を減らすと同時に、歯を破壊しないで計測することを念頭に開発された方法である。すなわち、抜去歯の唇側面で、①歯根透明象牙質、②歯周組織の退縮、③歯根長の3項目を計測し、それらの値を重回帰式に代入し年齢を推定するものである。変数のなかで②歯周組織の退縮は、唇側面における CE-Junction と軟組織付着部の最大長であるが、この部位は年齢に関与しない叢生、清掃不良、咬合性外傷など種々の要因で容易に変化することが予想され、死後時間の経過した遺体などでは、正確な計測に困難を来す可能性もある。Lamendin ら³⁰⁾によれば、資料数は少ないが、推定誤差の平均値はおよそ10年で、40～70歳の上顎中切歯には利用可能であったという。法医学的には、証拠保全の立場から歯1本からでも非破壊的に、ある程度の精度を持って推定が可能であるという点では実施に値する方法と思われる。

(3) 第二象牙質の添加

象牙質の添加には二つの形式がある。一つは生理的な二次象牙質の添加で、歯根形成完了後から健全な歯髓組織で生涯にわたり、ゆっくり着実に形成される加齢変化である。他は、修復二次象牙質(第三象牙質)として知られ、歯に対する外的な刺激により形成される。いずれも歯髓腔の形態からみると、歯髓腔の狭窄という形で現れる。狭窄状態は歯の切片上で顕微鏡的に直接観察、計測できるが、その切片標本の作製は特殊技術であり、歯も破壊される。また、生体では歯を抜去できない状況もある。そこで最近では、エックス線撮影やCT撮影などによる非侵襲的な歯髓腔の計測が主流となっている³¹⁾。

a. Kvaal ら³²⁾による(1995年)

Kvaal ら³²⁾はデンタルエックス線写真上で歯髓腔の大きさを詳細に計測し、成人の暦年齢を推定する方法を開発した。対象歯は、上顎の中・側切歯、第二小臼歯、下顎の側切歯、犬歯、第一小臼歯の6種類、計12歯である。歯種を選択に当たっては、第三象牙質の添加の影響などを可及的に減少させるべく、以下の前提が必要となる。

- ① 通常の機能的咬合を有する
- ② 修復処置、齲蝕、摩耗、異常な咬耗等、外的な刺激による徴候のない歯である

- ③ 計測誤差を避けるため、単根歯で回転していない歯である

資料となるエックス線画像間での拡大率や撮影角度によるズレの補正を行うため、歯のエックス線画像上で設定した計測部位における歯に対する歯髓腔の割合を比として表し(Fig. 3)、それらを変数とした回帰分析が詳細に実施されている。

歯の歯髓腔のサイズの変化を評価するため、すべての歯種を用いた場合、上顎歯あるいは下顎歯のみを用いた場合、そして歯種ごとに推定を行う場合と、それぞれ設定した条件別に算出した回帰式を Table 2 に示した。回帰による推定精度が最も高かったのは6歯種すべてを用いた場合で、逆に下顎側切歯あるいは犬歯を用いた場合は精度が低い。なお、実際この手法を利用して多項目の計測を行う際は、効率良く計測誤差を抑えるため、デジタル画像計測が推奨される。また画像計測ソフト上を用いたデジタル計測とデータ管理を同時に行うことで、より簡便な推定も可能となる。

b. 歯髓腔の加齢変化による年齢推定法の研究(日本大学歯学部法医学講座1974年～)

当講座では、1974年に歯髓腔の狭窄化を簡便かつ非破壊的に捉える年齢推定法の開発に着手し、最初はエックス線フィルム上で設定した抜去歯に対する歯髓腔の幅の比(水平示数)³³⁾や歯の全長に対する歯髓腔の高さの比(垂直示数)³⁴⁾、ならびに歯全体に対する歯髓腔の面積の比(面積示数)³⁵⁾をそれぞれ変数とした年齢推定のための回帰分析を行い、0.6前後の年齢との相関が得られている。その後、上下顎中・側切歯と犬歯を資料に、それまで検討した3種類の示数を用いた重回帰分析を行った結

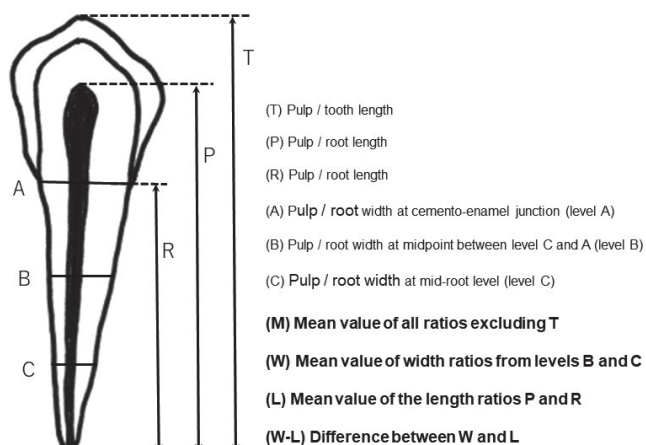


Fig. 3 計測部位と計測項目(Kvaal ら)

上顎1, 2, 5と下顎2, 3, 4のデンタルX線写真上に設定された計測項目は元の歯の拡大率、撮影角度による誤差を補正するため、長さとの比率が変数として用いられる。年齢を独立変数とした回帰分析の結果、(M)と(W-L)が有意な予測因子として抽出された。(参照: Table 2)

果, 0.77 と高い重相関係数が得られた³⁶⁾。また 1998 年以降は, 歯髓腔の計測部位をより鑑定実務で応用可能な上下顎犬歯や下顎小白歯部の主として歯根部に絞り, デジタルエックス線画像を用いた年齢推定法の研究が新たに開始された³⁷⁾。さらに 2000 年には歯科領域の診断に特化した小型エックス線 CT 撮影装置 (3DX Multi-Image Micro-CT, 以下 Orhto-CT) が世界で初めて開発されたのを機に, 根部歯髓腔の横断面形態を画像計測し, 歯根部歯質および歯髓腔の断面形態を根管面積比として算出し, 年齢推定に応用した³⁸⁾。しかし, 本来, 複雑な形態を有する歯および歯髓腔の形態的特徴を表現するには立体計測による体積値を利用することが望ましい。当時, Orhto-CT には体積値を求める専用プログラムが搭載されておらず, 多数の断層画像をスライス幅で補完しても, 煩雑で誤差も大きくなることが予想されていた。そして, その 10 年後の 2010 年, 焦点サイズが Orhto-CT より小さく (20 ~ 50 μm), 微細形態を高解像度で撮影可能なマイクロ CT 撮影装置を使用する機会に恵まれた。当時, その装置を年齢推定に応用しようとした試みは, 世界でも Vandevooort ら³⁹⁾の研究しかなかったが, 彼らが算出した回帰式の決定係数は残念ながら 0.31 と実用可能なレベルには至っていなかった。そこで著者は, 下顎小白歯の三次元計測値をもとに, 歯冠部と根部歯髓腔の部位別体積比を変数とした年齢推定のための回帰モデルを発表した⁴⁰⁾。この一連の研究では, 特に下顎第二小白歯の 4 か所の歯髓腔体積比を変数とした重回帰式により, 暦年齢との相関が決定係数で 0.70 と高い精度が得られている (Fig. 4)。

以上の研究では, 歯の退行性の加齢変化を歯髓腔の狭窄程度として非破壊的に捉えることが目標であり, 対象資料はほとんどが抜去歯のエックス線画像であった。し

かし, 実務において抜去歯が実験室に持ち込まれ, その年齢推定を依頼される機会は少ない。推定精度を追求する重要性もさることながら, 一方でより広く簡便に実務に応用できる手法を開発することも, 非常に重要となる。

2012 年, イタリアの Cameriere ら⁴¹⁾は, オルソパントモグラム (以下, OPG) を用いた下顎小白歯の歯髓腔面積比による簡便な年齢推定法を発表した。この方法はヨーロッパ, アジア諸国を中心に短期間で追試が進み, 一定の成果も報告され始めている。その研究は, 606 名分のスペイン系白人の OPG 資料を用い, 簡便なデジタル画像計測により算出した下顎小白歯の歯髓腔面積比を変数とした年齢推定法である。すなわち下顎小白歯の歯と歯髓腔を, フリーの画像計測ソフト (Image J: National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) で指定するポイント数で外形を選択し, 囲まれたそれぞれの面積の比を歯髓腔面積比として変数に使用するだけである。身元確認作業の現場で遺体の OPG 画像を撮影し入手することは現実的には難しいが, AI (Autopsy Imaging) が法医解剖の現場で実施される場面も年々増加し, CT による三次元立体構築画像から OPG に類似した断面画像を作成することは比較的容易であることから, 現場で撮影されるデンタルエックス線写真の活用法も含め, 今後, 日本でも利用される機会が増える可能性がある。

2. 生化学的な手法による年齢推定

広く生命に関する情報を扱う生化学的な分析は, 法科学の分野で有用なツールであることは言うまでもない。以下, 年齢推定における最近の生化学的なアプローチのなかで有効なものを取り上げる。一般にこの類の推定法の精度は非常に高く, これまで述べた形態的特徴を指標とする方法に較べ扱うデータも定量的で客観性があると言える。しかし実施には, 高額で特殊な分析装置や高い

Table2 X線写真を用いた年齢推定のための回帰式 (Kvaal ら, 1995 を改編し引用)

	Regression Formula	SEE (Years)
Six (6) teeth from both maxillary and mandibular arches	Age = 129.8 - 316.4(M) - 66.8(W-L)	8.6
Three (3) maxillary teeth	Age = 120.0 - 256.6(M) - 45.3(W-L)	8.9
Three (3) mandibular teeth	Age = 135.3 - 356.8(M) - 82.5(W-L)	9.4
Individual tooth		
11 or 21	Age = 110.2 - 201.4(M) - 31.3(W-L)	9.5
12 or 22	Age = 103.5 - 216.6(M) - 46.6(W-L)	10.0
15 or 25	Age = 125.3 - 288.5(M) - 46.3(W-L)	11.0
34 or 44	Age = 133.0 - 318.3(M) - 65.0(W-L)	10.5
33 or 43	Age = 158.8 - 255.7(M)	11.5
32 or 42	Age = 106.6 - 251.7(M) - 61.2(W-L) - 6.0(G)	11.5

Data from Kvaal, S.I. et al. (1995), *Forensic Sci. Int.*, 74, 175.

G, gender: Male = 1; Female = 0.

回帰式の精度は上下顎 6 種類の歯のすべての比を使用した場合に最も高く, 片顎の歯を使用した場合は低くなり, なかでも下顎犬歯の場合で最小である。

専門性に裏付けられた分析技術などがあって初めてその精度が得られるという制限もある。

1) 象牙質アスパラギン酸のラセミ化反応

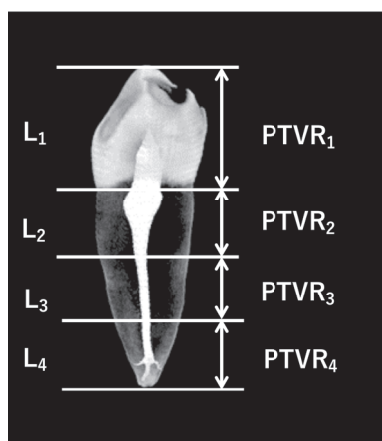
アミノ酸はグリシンを除き、分子中に光学活性な不斉炭素を持つ。それが一つの場合、そのアミノ酸は二つの光学異性体(L体とD体)に分けられる。ラセミ化反応は、一方のアミノ酸の光学異性体が他方に転換し、平衡状態に向け変化が緩徐に進行し、最終的にこれらの等量混合物(ラセミ体)となる反応をいう。出生時、生体を構成するアミノ酸はすべてがL体であり、その後、すぐにラセミ化が開始される。代謝が活発な骨組織などでは、生涯にわたりL体が補充されるが、代謝が低い歯や水晶体、脳の一部などではD体が排出されず、年齢とともに蓄積されていく。アミノ酸の反応速度は一般的に緩慢であるが、アミノ酸の種類や反応条件により異なり、アスパラギン酸の反応速度が最も早く、アラニンとグルタミン酸がそれに次ぐ。1975年、Helfmanら⁴²⁾は、歯においてアスパラギン酸が加齢とともに蓄積され、そのD/L比から年齢推定が可能であることを発表した。特にラセミ化反応速度が最も早いアスパラギン酸は、年齢推定に使用するアミノ酸としては理想的であると言われる⁴³⁾。日本でもOginoら⁴⁴⁾、Ohtaniら⁴⁵⁾が、象牙質中のアスパラギン酸のラセミ化反応を用いた年齢推定法を発表している。報告者により多少成績は異なるが、そのなかでOhtaniら⁴⁶⁾は、かなり精度の高い推定結果(実年齢±3歳)を報告している。

試料として歯の象牙質が用いられる理由としては、ア

ミノ酸の含有量が多く、ハイドロキシアパタイトによりpH値や水分量が一定に保たれ、またエナメル質やセメント質の内部に存在することで外部の環境要因から防御され安定性があること、さらには生体が活動している限り温度(体温)が保たれ、アミノ酸が一定の速度でラセミ化するのに適した条件を作り出していることなどが挙げられる⁴⁷⁾。

アミノ酸のラセミ化反応(速度)は環境要因、なかでも温度の影響を強く受けるとされている。そのため、死亡あるいは歯が抜去された場合は急激に温度が下がり、ラセミ化反応の速度は遅くなる。これにより、死後経過時間は年齢推定に影響せず、死亡時あるいは抜去された時点での年齢が推定可能となる。一方、高温にさらされた焼死体⁴⁸⁾や水中死体、さらには湿度やバクテリアなどの汚染⁴⁹⁾により、ラセミ化の生じる速度に変化するため、年齢推定の信頼性は低くなる。

象牙質のアミノ酸分析では、D/L比はガスクロマトグラフィー(GC)により、アスパラギン酸のL体とD体を分離し、チャート上のピーク面積比から求められる。実際の推定に当たっては、年齢既知の数歯の対照歯からD/L比を求め、事前に年齢算出式を作成するのが理想である。しかしアミノ酸分析に使用するGCの分析条件は、毎回微妙に違うことから同様の直線を求めることは困難となる。したがって精度を求めるには、その都度同じ条件で対照歯のD/L比を求め、年齢推定算出式を作成することが必要であり、そのために形成時期の同じ資料歯と同一の歯種を用意しなければならない、という制限も出



PTVR₁₋₄ : Pulp-Tooth Volume Ratios

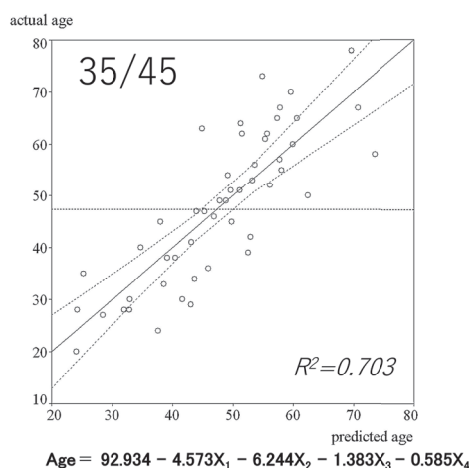


Fig. 4 計測部位と年齢推定のための重回帰式(下顎小白歯による)

Micro-CTを用いて保存されたRaw Dataは、スライス画像として再構成後、必要な部分をバイナリー画像としてされる。この画像をもとに三次元画像構築ソフトを用いてVoxelデータとした。三次元画像上で年齢推定のためのパラメータを設定し(上図左)、歯および歯髄腔の体積値を測定した。歯の歯髄腔体積比(PTVR)を指標とした重回帰分析を行なった。その結果、実年齢と推定年齢との係数は、第一小白歯で0.66、第二小白歯で0.70の精度であった。

てくる。

この方法は、他の形態学的変化を指標とした年齢推定法に比べ、化学的变化に注目し、客観的で安定した結果が得られ、しかも推定誤差は小さく優れた推定法ではあるが、それを実現するには、普段から継続的に資料収集・保管する手間と高度の分析技術が必要となる。

2) 放射性炭素 ^{14}C

2005 年、Spalding ら⁵⁰⁾は歯のエナメル質中の ^{14}C 濃度を利用した年齢推定法を発表した。

大気中の ^{14}C 濃度は、1955 年までは比較的一定で安定していたが、1963 年にかけて世界中で行われた大気圏内核実験により生成された中性子が大気中に放出され、核反応により ^{14}C が急増した。この ^{14}C 濃度は、部分的核実験停止条約が発効した 1963 年にはピークに達し、それ以降は急激に減少してきている。産生された核実験由来の ^{14}C は大気中で酸素と反応し、放射性を有する CO_2 を産生する。その放射性 CO_2 は世界規模で光合成により植物に取り込まれ、その植物を動物が食べ、食物連鎖を通じて人体へ取り込まれる。この ^{14}C の体内濃度は個体が生存している間、大気中の ^{14}C 濃度を反映する。

エナメル質は、形成完了後は改造されないため、エナメル質中の ^{14}C 濃度は形成中に取り込まれた時期の大気中の ^{14}C 濃度をそのまま反映する。そこで、エナメル質中の ^{14}C 濃度と、歯種ごとのエナメル質形成時期の情報をもとに、既に発表されている過去の大気中 ^{14}C 濃度のデータを比較することで、資料の誕生年が推定可能となる。この手法は、エナメル質の形成完了時期が最も遅い第三大臼歯を資料とした場合(およそ 12 歳)、1955 年時点で 12 歳以降、すなわち 1943 年以降に生まれた個人に対してのみ適用可能となる。もっとも第三大臼歯のエナメル質の ^{14}C 濃度が 0 であれば、その個人は 1944 年以前に誕生していた、という事実もまた明らかとなり、これだけでも法医学的には有用な情報となり得る。Spalding ら⁵⁰⁾の研究においては、歯のサンプルはスウェーデンのカロリンスカ研究所で収集され、 ^{14}C 濃度は米国カリフォルニア、ローレンス・リバモアー国立研究所の加速器質量分析装置(AMS)を用いて ^{14}C の原子の数として直接計測されている。この AMS は日本でも考古学、地質学、生物医学などの分野で利用されているが、非常に高価な大型分析機器で高精度に微量の同位体元素試料の測定が可能である。しかし機器が設置されている研究施設は少なく、AMS 分析を専門に請け負う会社も存在するものの、分析費用、分析期間を考えると残念ながら頻りに利用できる分析法とは言えない現状にある。法医学の分野では、Spalding が 2004 年 12 月に発生したインド洋津波によるスウェーデン人被害者 6 名の歯の分析を依頼され、1.6 年以下の誤差で年齢を推定できたという。また 2009 年には Spalding らと同じ研究グループの Alkass ら⁵¹⁾

が、ある殺人事件における個人識別事例において ^{14}C 分析とアスパラギン酸のラセミ化反応による分析を同時に行い、前者からは誕生年を、また後者からは死亡時年齢を推定して死亡時期を特定し、身元につながる重要な捜査情報を提供できたという。

骨や歯の形態学的評価では、たとえ死亡時の年齢が絞れたとしても、具体的な死亡時期は不明である。 ^{14}C 分析による年齢推定については、大気中の ^{14}C レベルがバックグラウンドまで低下すると、死亡時期を特定するのは困難になってくるのではという指摘もあるが、いまのところ他の年齢推定法との併用により、推定誤差が ± 2 年以内まで誕生年を絞れるという結果は特筆に値する。

3) エピジェネティックス

エピジェネティックスとは、ゲノム上の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御することで細胞個性を決定する仕組みである。代表的なものとして、DNA のメチル化、ヒストン修飾、microRNA などが挙げられる。

DNA のメチル化は、脊椎動物のゲノムにおける唯一の生理的な修飾である。特に、転写開始点上流のプロモーター領域に存在する CpG アイランド(シトシンとグアニンが隣り合って並んでいる CpG 配列の出現頻度が高い領域)で、加齢に伴いそのメチル化の程度が亢進することが知られている。メチル化反応は DNA メチル化酵素によって、CpG 配列のシトシン(C)にメチル基(- CH_3)が付加されると、下流の遺伝子発現が抑制される。DNA のメチル化は遺伝子および細胞の種類により出現頻度や時期が異なり、加齢に伴う老化促進や病的老化の指標として注目され、CpG アイランドのメチル化の程度が主な分析のターゲットとなっている⁵²⁾。例えば、2013 年 Hannum ら⁵³⁾は、イルミナ社の BeadChip を用いて 45 万か所以上の CpG マーカーの中から選択した 71 か所のシトシンのメチル化状態を血液試料で解析し、年齢の予測モデルを構築している。また 2015 年には Zbieć-Piekarska ら⁵⁴⁾は、パイロシーケンス法により、ELOVL2 や FHL2 のプロモーター領域に位置するメチル化レベルが、法医学的な年齢推定に有効であることを報告している。日本では 2016 年から 2017 年にかけて Hamano ら⁵⁵⁾が、パイロシーケンス法に比べ、より簡単に迅速かつコストパフォーマンスに優れたメチル化感受性高精度融解分析(MS-HRM)を用い、生体および死体の血液、ならびに唾液由来の DNA におけるプロモーター領域(ELOVL2, FHL2)のメチルレベルが年齢推定に有効であることを発表した。その年齢予測モデルの誤差平均は 7.7 歳であった。

そこで当講座でも 2 年前から、法医鑑定資料として原型保存性に優れている歯から DNA を抽出し、リアルタイムメチル化特異的 PCR 法(MSP)を用いて、暦年齢と DNA のメチル化率との関連性について検討している

(Fig. 5)。

ゲノムDNAのメチル化状態(メチル化している[mC], またはメチル化していない[C])は, 単にDNAを抽出しただけでは判断することができない。DNAをバイサルファイト処理すると, 非メチル化シトシン(C)をウラシル(U)に変換される。これにより, メチル化状態(mC または C)を塩基の違い(C または U)に置換することで, メチル化状態の解析が可能になる。MSPは, このバイサルファイト処理後のDNA(メチル化DNA および非メチル化DNA)を鋳型として, 各々の配列に特異的なプライマーを作製してPCRを行い, その増幅の起こる状態からDNAのメチル化状態を判定(定量)する手法である。

これまでELOVL2のプロモーター領域に対してMSP用プライマーを設計し, 抜去歯29例の歯由来のDNAに対してMSPを行い, そのメチル化率を算出した結果, 暦年齢とDNAメチル化率の正の相関が観察され, 単回帰式による年齢推定の精度は8.9歳であった⁵⁶⁾。この結果は先行研究の精度にはわずかに及ばないが, ELOVL2以外で暦年齢と相関が高い遺伝子内の別のCpG部位を検索し改良を加えることで, 更なる推定精度の向上が期待できる。

また今後, DNAメチル化を中心とするエピジェネティクスは, エイジングに限らず, ストレスによる様々な生命現象を客観的に証明できるツールとして, 将来, 法医実務にも応用される可能性を秘めている。

おわりに

歯の生物学的な年齢には個人差がある。しかし若年期における成長発育は遺伝学的なプログラムに沿って進行するため, その指標により推定された生物学的年齢は暦年齢との相関性が高い。しかし, 成人期以降は外的な様々な要因により, 個体の生物学的な年齢と暦年齢は解離し, その程度には個人差が生じる。すなわちその時期の個体の推定には, 性別, 生活環境, 経済状態, 時代背景など, 様々な要因が関わってくる。したがって, 成人期以降の時期における形態的な特徴を指標とする推定法の精度は, せいぜい±10歳程度である。実際の鑑定においては出来る限り多くの検査を実施し, 推定された年齢域が多く重なる部分をその年齢とするしかない。その際に重要となるのが, 検査法の選択である。当然, 使用する推定法の作成時の条件や背景, すなわち対象資料の帰属集団, 資料数や年齢構成, 推定精度などは, 事前に把握しておく必要がある。

世界的にみると, 法医学的な年齢推定に特化したワークショップも毎年開催されている。そうした機会を利用し訓練を継続することも大切ではあるが, 歯科臨床などで年齢既知の歯を肉眼的に観察できる機会を利用し, 普段から意識して観察力を涵養することも大事であろう。

本総説に関して, 開示すべき利益相反はない。

稿を終えるに際し, これまでご支援, ご協力をいただいた日本大学歯学部法医学講座医局員, 法医学講座法会会員の先生方ならびに研究へのご助言, ご協力をいただいたすべての方々に深く感謝申し上げます。

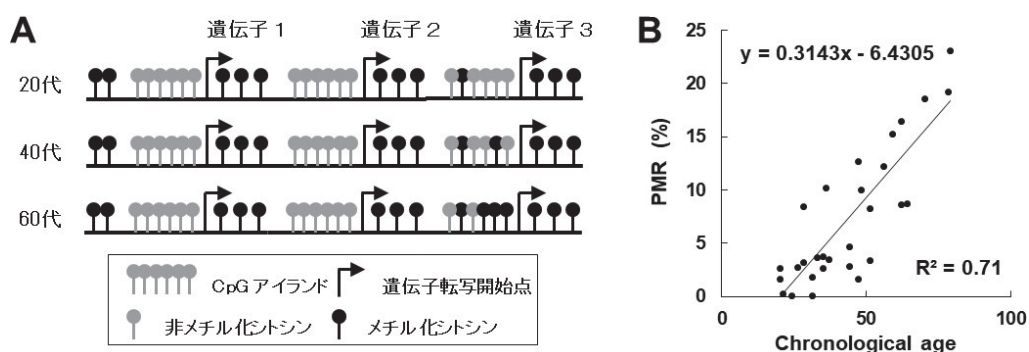


Fig. 5 CpG アイランド内でのシトシンのメチル化率(PMR)と暦年齢との相関

A 遺伝子転写開始点の上流に存在するCpGアイランドのメチル化は, 一般的に低い状態に抑えられている。加齢に伴い, 一部の遺伝子(ここでは遺伝子3)の上流のCpGアイランドでシトシン残基のメチル化が徐々に上昇していく。

B ELOVL2の上流のCpGアイランド内におけるPMRと暦年齢との間には, 強い正の相関が認められる($R^2 = 0.71$, Kondoら⁵⁶⁾, 2020)。

文 献

- 1) Caldas MI, Julio P, Simoes JR, Matos E, Afonso A, Magalhães T (2011) Chronological age estimation based on third molar development in a Portuguese population. *Int J Legal Med* 125, 235-243.
- 2) Zapico SC, Ubelaker DH (2013) Applications of physiological bases of ageing for forensic sciences. Estimation of age-at-death. *Ageing Res Rev* 12, 605-617.
- 3) Zapico SC, Ubelaker DH (2016) Relationship between mitochondrial DNA mutations and aging. Estimation of age-at-death. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 71, 445-450.
- 4) Tsuji A, Ishiko A, Takasaki T, Ikeda N (2002) Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Sci Int* 126, 197-199.
- 5) Yekkala R, Meers C, Van Schepdael A, Hoogmartens J, Lambrichts I, Willems G (2006) Racemization of aspartic acid from human dentin in the estimation of chronological age. *Forensic Sci Int* 159, 89-94.
- 6) Griffin RC, Moody H, Penkman KEH, Collins MJ (2008) The application of amino acid racemization in the acid soluble fraction of enamel to the estimation of the age of human teeth. *Forensic Sci Int* 175, 11-16.
- 7) Schour I, Masser M (1941) The development of the human dentition. *J Am Dent Assoc* 28, 1153-1160.
- 8) Moorrees CF, Fanning EA, Hunt EE Jr (1963) Age variation of formation stages for ten permanent teeth. *J Dent Res* 42, 1490-1502.
- 9) Moorrees CF, Fanning EA, Hunt EE Jr (1963) Formation and resorption of three deciduous teeth in children. *Am J Phys Anthropol* 21, 205-213.
- 10) Anderson DL, Thompson GW, Popovich F (1976) Age of attainment of mineralization stages of the permanent dentition. *J Forensic Sci* 21, 191-200.
- 11) Ubelaker DH (1989) *Human Skeletal Remains: Excavation, Analysis, Interpretation* Taraxacum, Washington D. C..
- 12) 日本小児歯科学会 (1988) 日本人小児における乳歯・永久歯の萌出時期に関する調査研究. *小児歯誌* 26, 1-18.
- 13) 日本小児歯科学会, 有田憲司, 阿部洋子, 仲野和彦, 齊藤正人, 島村和宏, 大須賀直人, 清水武彦, 石通宏行, 松村誠士, 尾崎正雄, 石谷徳人, 濱田義彦, 渥美信子, 小平裕恵, 高風亜由美, 長谷川大子, 林 文子, 藤岡万里, 茂木瑞穂, 八若保孝, 田中光郎, 福本 敏, 早崎治明, 関本恒夫, 渡部 茂, 新谷誠康, 井上美津子, 白川哲夫, 宮新美智世, 荻部洋行, 朝田芳信, 木本茂成, 福田 理, 飯沼光生, 仲野道代, 香西克之, 岩本 勉, 野中和明, 牧 憲司, 藤原 卓, 山崎 要 (2019) 日本人小児における乳歯・永久歯の萌出時期に関する調査研究 II その 1. 乳歯について. *小児歯誌* 57, 45-53.
- 14) Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM (1973) A new system of dental age assessment. *Hum Biol* 45, 211-227.
- 15) Mincer HH, Harris EF, Berryman HE (1993) The A.B.F.O. study of third molar development and its use as an estimator of chronological age. *J Forensic Sci* 38, 379-390.
- 16) Cameriere R, Ferrante L, De Angelis D, Scarpino F, Galli F (2008) The comparison between measurement of open apices of third molars and Demirjian stages to test chronological age of over 18 year olds in living subjects. *Int J Legal Med* 122, 493-497.
- 17) Olze A, Schmeling A, Taniguchi M, Maeda H, Niekerk Pv, Wernecke KD, Geserick G (2004) Forensic age estimation in living subjects: the ethnic factor in wisdom tooth mineralization. *Int J Legal Med* 118, 170-173.
- 18) Arany S, Iino M, Yoshioka N (2014) Radiographic survey of third molar development in relation to chronological age among Japanese juveniles. *J Forensic Sci* 49, 534-538.
- 19) Dardouri AAK, Cameriere R, Luca SD, Vanin S (2016) Third molar maturity index by measurements of open apices in a Libyan sample of living subjects. *Forensic Sci Int* 267, 230.e1-230.e6.
- 20) Luca SD, Aguilar L, Rivera M, Palacio LA, Ricconi G, Bestetti F, Cameriere R (2016) Accuracy of cut-off value by measurement of third molar index: study of a Colombian sample. *Forensic Sci Int* 261, 160.e1-160.e5.
- 21) Gulsahi A, Luca SD, Cehreli SB, Triali RE, Cameriere R (2016) Accuracy of the third molar index for assessing the legal majority of 18 years in Turkish population. *Forensic Sci Int* 266, 584.e1-584.e6.
- 22) Zelic K, Galic I, Nedeljkovic N, Jakovljevic A, Milosevic O, Djuric M, Cameriere R (2016) Accuracy of Cameriere's third molar maturity index in assessing legal adulthood on Serbian population. *Forensic Sci Int* 259, 127-132.
- 23) Angelakopoulos N, Luca SD, Palacio LAV, Coccia E, Ferrante L, Cameriere R (2018) Third molar maturity index (I3M) for assessing age of majority: study of a black South African sample. *Int J Legal Med* 132, 1457-1464.
- 24) Kelmendi J, Cameriere R, Koçani F, Galic I, Mehmeti B, Vodanović M (2018) The third molar maturity index in indicating the legal adult age in Kosovar population. *Int J Legal Med* 132, 1151-1159.
- 25) Kumagai A, Takahashi N, Palacio LAV, Giampieri A, Ferrante L, Cameriere R (2019) Accuracy of the third molar index cut-off value for estimating 18 years of age: Validation in a Japanese samples. *Leg Med* 38, 5-9.
- 26) Gustafson G (1950) Age determination on teeth. *J Am Dent Assoc* 41, 45-54.
- 27) Johanson G (1971) Age determination from human teeth. *Odontol Revy* 22, 1-126.
- 28) Maples WR (1978) An improved technique using dental histology for estimation of adult age. *J Forensic Sci* 23, 764-770.
- 29) Bang G, Ramm E (1970) Determination of Age in Humans from Root Dentin Transparency. *Acta Odontol Scand* 28, 3-35.
- 30) Lamendin H, Baccino E, Humbert JF, Tavernier JC, Nossintchouk RM, Zerilli A (1992) A Simple technique for age estimation in adult corpses: The two criteria dental method. *J Forensic Sci* 37, 1373-1379.
- 31) Asami R, Aboshi H, Iwawaki A, Ohtaka Y, Odaka K, Abe S, Saka H. (2019) Age estimation based on the volume change in the maxillary premolar crown using micro CT. *Leg Med* 37, 18-24.

- 32) Kvaal SI, Kollveit KM, Thomsen IO, Solheim T (1995) Age estimation of adults from dental radiographs. *Forensic Sci Int* 74, 175-185.
- 33) 相原俊一 (1974) 歯髄腔の加齢的变化からみた年齢の推定, - 根管示数 -. 日大歯学 48, 663-674.
- 34) 板垣道夫 (1974) 歯髄腔の加齢的变化からみた年齢の推定, - 歯の長さ と 歯髄腔の長さとの比による -. 日大歯学 48, 700-706.
- 35) 篠崎寿一 (1975) 歯髄腔の加齢的变化からみた年齢の推定, - 面積示数による -. 日大歯学 49, 666-678.
- 36) 根橋舜三 (1982) 前歯歯髄腔の経年的変化からみた年齢推定, - ステップワイズ法による推定要因の検索 -. 日大歯学 56, 40-48.
- 37) Aboshi H, Mukoyama R, Kawano S, Takahashi T, Komuro T, Arai Y, Shinoda K (1999) A Method of Age Estimation Based on the Morphometric Analysis of Dental Pulp Using a Digital X-Ray System. 6th Indo Pacific Congress on Legal Medicine and Forensic Sciences, Tatsuno Y, Organizing Committee of the 6th Indo Pacific Congress on Legal Medicine and Forensic Sciences, Kobe, 894-897.
- 38) Aboshi H, Takahashi T, Tamura M, Komuro T (2000) Age estimation based on the morphometric analysis of dental root pulp using ortho cubic super high resolution CT (Ortho-CT). *Forensic Odontology*. Willems G, Leuven University Press, 199.
- 39) Vandevoort F, Bergmans L, Cleynenbreugel JV, Bielen DJ, Lambrechts P, Wevers M, Peris A, Willems G. (2004) Age calculation using X-ray microfocus computed tomographical scanning of teeth: A pilot study. *J Forensic Sci* 49, 787-790.
- 40) Aboshi H, Takahashi T, Komuro T (2010) Age estimation using microfocus X-ray computed tomography of lower premolars. *Forensic Sci Int* 200, 35-40.
- 41) Cameriere R, Luca SD, Alemán I, Ferrante L, Cingolani M (2012) Age estimation by pulp/tooth ratio in lower premolars by orthopantomography. *Forensic Sci Int* 214, 105-112.
- 42) Helfman PM, Bada JL (1975) Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2891-2894.
- 43) Cloos PA, Fledelius C (2000) Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized: a biological clock of protein aging with clinical potential. *Biochem J* 345, 473-480.
- 44) Ogino T, Ogino H, Nagy B (1985) Application of aspartic acid racemization to forensic odontology: post mortem designation of age at death. *Forensic Sci Int* 29, 259-267.
- 45) Ohtani S, Yamamoto K (1991) A estimation using the racemization of amino acid in human dentin. *Forensic Sci Int* 36, 792-800.
- 46) Ohtani S, Yamamoto K (1992) Estimation of age from a tooth by means of racemization of an amino acid, especially aspartic acid-comparison of enamel and dentin. *J Forensic Sci* 37, 1061-1067.
- 47) Arany S, Ohtani S (2010) Age estimation by racemization method in teeth: application of aspartic acid, glutamate, and alanine. *J Forensic Sci* 55, 701-705.
- 48) Ritz S, Schutz HW, Peper C (1993) Postmortem estimation of age at death based on aspartic acid racemization in dentin: Its applicability for root dentin. *Int J Legal Med* 105, 289-293.
- 49) Robinsons J, Jones M, Matisoo-Smith E (2001) *Amino Acid Racemization Dating in New Zealand: An overview and Bibliography*. Auckland University, Private Bag 92019, 1-33.
- 50) Spalding KL, Buchholz BA, Bergman LE, Druid H, Frisen J (2005) Forensics: Age written in teeth by nuclear tests. *Nature* 437, 333-334.
- 51) Alkass K, Buchholz BA, Ohtani S, Yamamoto T, Druid H, Spalding KL (2009) Age estimation in forensic sciences: application of combined aspartic acid racemization and radiocarbon analysis. *Mol. Cell Proteomics* 9, 1022-1030.
- 52) Vidaki A, Kayser M (2018) Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. *Forensic Sci Int Genet* 37, 180-195.
- 53) Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell* 49, 359-367.
- 54) Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Makowska Ż, Spas A, Parys-Proszek A, Kucharczyk K, Ploski R, Branicki W (2015) Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 14, 161-167.
- 55) Hamano Y, Manabe S, Morimoto C, Fujimoto S, Tamaki K (2017) Forensic age prediction for saliva samples using methylation-sensitive high resolution melting: exploratory application for cigarette butts. *Sci Rep* 7, 10444.
- 56) Kondo M, Aboshi H, Yoshikawa M, Ogata A, Murayama R, Takei M, Aizawa S (2020) A newly developed age estimation method based on CpG methylation of teeth-derived DNA using real-time methylation-specific PCR. *J Oral Sci* 63, 54-58.