

日本財団補助金による

1999年度日中医学協力事業報告書

—調査・共同研究に対する助成—

2000年3月15日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究代表者氏名 王 秀玲



所属機関名 東京女子医科大学医学部法医学教室

職名 助手 年齢 42 才

所在地 〒162-8666 新宿区河田町8-1

電話 03-3353-8111 内線 22242

1. 研究課題

日本人および中国人における6種類STR多型の解析

2. 研究期間 自 1999 年 4 月 1 日 ~ 至 2000 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 王 秀玲 (42 才)

所属機関 東京女子医科大学 職名 助手

中国側研究者氏名 張 曉東 (46 才)

所属機関 中国人民刑事警察学院 職名 教授

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

日本人及び中国人における6種類STR多型の解析

王 秀 玲

東京女子医科大学医学部法医学教室

助手

要 旨

STR (Short Tandem repeat) は、個人識別や親子鑑定などの法医実務において有効な遺伝子マーカーとし、広く応用されている。最近、多色蛍光色素標識技術の開発により、多数のSTR多型は同時に解析する方法が検討されている。今回は、血縁関係のない日本人と中国人の健康者（各300名）における ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer及びGeneScan™ Analysis Software Ver 2.1を用い、D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820の6種類のSTR遺伝子頻度を調べ、データベースを作成した。日本人および中国人各300名においては、6ローカスの対立遺伝子頻度の分布はHardy-Weinbergの法則に適合していた。更に、STR多型の法科学的応用の有用性を評価するため、遺伝形質の多型性の指標とされる遺伝子型の異型接合率 (Heterozygosity H), 多型情報量 (Polymorphism information content PIC) および個人識別確率 (Distinguishing Probability DP) について検討した。日本人集団においては、D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820のH値は0.8434, 0.8132, 0.8505, 0.7875, 0.8086, 0.7851, CIP値は0.8366, 0.8033, 0.8484, 0.7682, 0.8003, 0.7653, DP値0.9602, 0.9375, 0.9616, 0.9219, 0.9363, 0.9217で算出された。中国人集団においては、D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820のH値は0.8245, 0.8495, 0.8490, 0.7851, 0.7949, 0.7690, CIP値は0.8151, 0.8492, 0.8402, 0.7519, 0.7646, 0.7354, DP値は0.9486, 0.9604, 0.9602, 0.9194, 0.9281, 0.9121で算出された。日本人集団および中国人集団において6ローカスは多型性の高いSTR部位であり、法科学的証拠資料の個人識別にとって極めて有用な遺伝子型であることが認められた。

KEY WORDS

STR (Short Tandem Repeat), H (Heterozygosity), PIC (Polymorphism information content), DP (Distinguishing Probability), Allele Frequencies, Japanese, Chinese.

研 究 報 告

目 的

STR多型は2-5塩基を基本単位とする繰り返し配列であり、ゲノム中に多数散在している。他の多型マーカーよりも染色体上の出現頻度が高く、多型性も高いことから近年注目を集めている¹⁻³⁾。しかしながら日本人集団および中国人集団におけるデータが整っていない形質は多いので、法医実務に応用する際にSTR多型のデータベースが必要である。今回は、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer 及び Gene Scan™ Analysis Software Ver 2.1 を用いた D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820の6種類STR多型マーカーが開発され、その検査システムが確立される一方、日本人及び中国人のデータベースが得られることを望む次第であった。

D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820のSTR多型性は、現在までに開発されているSTR多型で最も多くの対立遺伝子を有し、6種STR多型を合わせて80以上の対立遺伝子があり、これらの対立遺伝子に基づいて出現される可能な遺伝子型の数は3240通りである⁴⁻⁶⁾。これらの高度な遺伝的多型性は人類遺伝学的な研究に利用されるのみならず、個人識別、親子鑑定、犯罪捜査などの法医実務にも応用されている。犯罪の国際化に伴う、個人識別、集団識別、地域識別等は各人種のデータベースが必要となっている。本共同研究は、中国漢族及び日本民族の6種STR多型の分布を調べ、両国民族の遺伝的類縁関係を明らかにし、データベースを作成することを目的とした。

方 法

1. DNA抽出

Johnらの方法に基づき、血縁関係のない日本人と中国人（各300名）の血液から迅速なDNA抽出を行った⁷⁾。200 μ l 血液にSolution I液（10 mM Tris HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂）1 mlとNonidet P-40 10 μ lを加え、7,000 rpmで2分間遠心し、白血球の核を分離した。分離した白血球の核の中にSolution II液（10 mM Tris HCl pH 7.6, 10mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 M NaCl, 0.5 % SDS, 2 mM EDTA）を0.5 ml加え、混和した後、Phenolを0.5 ml加え、よく混和した。12,000 rpmで1分間遠心後、溶液の上層に対し、Phenol : Chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)液を0.5 ml加え、よく混和。12,000 rpmで1分間遠心後、溶液の上層を採取した。更に、Ethanol沈殿によりDNAを抽出した。

2. STR多型の検出

STR多型の検出はABI PRISM™ 310 Genetic AnalyzerとPCR法を用いて、多色蛍光色素標識により、異なる染色体とサイズの6種のSTR多型が同時に検出した。PCR増幅は1検体につき25 μlとし、DNA試料10 μl(0.05 ng / μl)、PCR Reaction Mix 10 μl、AmpliTaq Gold DNA Polymerase 0.5 μl及び蛍光色素標識したPrimer Set 4.5 μlを0.2 mlポリプロピレンチューブに入れ、94℃ 1分間、59℃ 1分間、72℃ 1分間を30回繰り返す条件で、PCR増幅を行った。キャピラリー電気泳動はABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer)とInternal Lane Size Standard (Perkin-Elmer)を用いて、15 KV、60℃、30分間で泳動した。

3. 遺伝子の解析

遺伝子の解析は、GeneScan™ Analysis Software Ver 2.1を用いて、Internal Lane Size Standardによる型判定を行った。

4. データベースの作成

遺伝子頻度は、複数対立遺伝子の任意交配集団における遺伝子頻度の式に従って算出し、遺伝子頻度から、遺伝子型の期待値をHardy-Weinbergの法則に従って推定した。遺伝形質の異型接合率(H)、多型情報量(PIC)および個人識別確率(DP)は以下の式に従って算出した。

$$H^{(8)} = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (P_i = \text{対立遺伝子の頻度}, n = \text{対立遺伝子の数})$$

$$CIP^{(9)} = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 \quad (P_i = \text{対立遺伝子の頻度}, n = \text{対立遺伝子の数})$$

$$DP^{(10)} = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (P_i = \text{各遺伝子型の頻度}, n = \text{遺伝子型の数})$$

結 果

日本人と中国人の健康者各300名におけるABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer及びGeneScan™ Analysis Software Ver 2.1を用い、D8S1179、D21S11、D18S51、D5S818、D13S317、D5S818、D7S820の6種類STR遺伝子頻度の分布をTable 1に示した。算出された6ローカスの遺伝子型の分布はHardy-Weinbergの法則に適合していた。遺伝形質の異型接合率、多型情報量および個人識別確率については計算した結果をTable 1に示し、いずれの数値も極めて高い値を確認した。

考 察

日本人集団におけるD8S1179、D5S818、D7S820対立遺伝子の出現頻度は中国人集団のものと大きな違いは見られず、ほぼ同様の傾向が確認された。D21S11、D18S51、D13S317には日本人集団の対立遺伝子の出現頻度と中国人集団の対立遺伝子の出現頻度を比較するとやや異なる傾向が観察され、いずれも高多型性であることが確認された。

本STR解析方法は、正確な遺伝子型判定を効率よく行うことができるうえ、微量のDNA(0.05 ng / μl)から多数のローカスを同時に解析できた。また、多型性の高い6種類のSTRローカスの組み合わせを選択し、従来の尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法より操作が簡単かつ有効であり、DNA多型分析の信頼性も高くなった。日本人集団および中国人集団における6ローカスのSTRは、個人識別や親子鑑定などの法医実務において有効な遺伝子マーカーであることが認められた。

参 考 文 献

- 1) Hammond, H.A., Jin, L., Zhong, Y., et al.: Evaluation of thirteen STR loci for use in personal identification application. *Am J Hum Genet*, 55: 175-189, 1994.
- 2) Anderson, J.F., Greenhalgh, M.J., Bulter, S.R., et al.: Further validation of multiplex STR system for use in routine forensic identity testing. *Forens Sci Int*, 78: 47-64, 1996.
- 3) Lins, A.M., Sprecher, C.J., Puers, C., et al.: Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci-silver stain and fluorescence detection. *Bio Techniques*, 20: 882-889, 1998
- 4) Barber, M.D., Parkin, B.H.: Sequence analysis and allelic designation of the two short tandem repeat loci D18S51 and D8S1179. *Intl J Legal Med*. 109: 62-65, 1996.
- 5) Barber, M.D., Mckeown, B.J., Parkin, B.H.: Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus. *Intl J Legal Med*. 108: 180-185, 1996.
- 6) Sharma, V., Litt, M.: Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Hum Mol Genet*, 1: 67, 1992.
- 7) John, S.W.m., Weitznerr, G., Rozen, R., Scriver, C.R.: A rapid procedure for extracting genomic DNA from Leukocytes. *Nudeic Acids Res*, 19: 408, 1991.
- 8) Nei, M., Roychoudhury, A.K.: Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379-390, 1974.
- 9) Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R. W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Gonet*, 32: 314-331, 1980.
- 10) Grunbaum, B.W., Selvin, S., Pace, N., Black, D.M.: Frequency distribution and discrimination probability of twelve protein genetic variants in human blood as functions of race sex, and age. *J Forens Sci*, 23: 577-587, 1978.

Table 1 The distribution of six STR allele frequencies in Japanese and Chinese

Allele	Japanese						Chinese					
	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
6				0.0033								0.0017
7				0.0017	0.0050	0.0050				0.0167	0.0017	0.0033
8				0.0100	0.2583	0.1150	0.0033			0.0050	0.2917	0.1183
9	0.0083			0.0750	0.1250	0.0684	0.0100			0.0717	0.1283	0.0633
10	0.1600			0.1933	0.1150	0.2300	0.0867		0.0033	0.1867	0.1617	0.2000
11	0.1000		0.0067	0.2883	0.2200	0.3067	0.0983		0.0067	0.2966	0.2400	0.3467
12	0.0900		0.0433	0.2367	0.2100	0.2183	0.1100		0.0283	0.2366	0.1367	0.2267
13	0.2283		0.2067	0.1733	0.0567	0.0483	0.3050		0.2067	0.1750	0.0333	0.0367
13.2				0.0050								
14	0.1850		0.1983	0.0117	0.0083	0.0083	0.1717		0.2183	0.0067	0.0066	0.0050
14.2				0.0033								
15	0.1417		0.1633	0.0067	0.0017		0.1400		0.1983	0.0033		
16	0.0800		0.1717				0.0617		0.1000			
17	0.0067		0.0783				0.0133		0.0717			
18			0.0367						0.0367			
19			0.0250						0.0483			
20			0.0217						0.0300			
21			0.0267						0.0217			
22			0.0033						0.0117			
23			0.0050						0.0117			
24		0.0017	0.0033						0.0033			
25			0.0017					0.0067				
26		0.0017							0.0033			
27												
28		0.0600						0.0584				
28.2		0.0033						0.0083				
29		0.2100						0.2050				
29.2								0.0017				
30		0.3317						0.2283				
30.2		0.0133						0.0133				
31		0.0900						0.1683				
31.2		0.0717						0.0567				
32		0.0300						0.0500				
32.2		0.1100						0.1183				
33		0.0167						0.0033				
33.2		0.0483						0.0667				
34		0.0033						0.0067				
34.2		0.0083						0.0083				

Table 2 The statistical data of six STR loci
in Japanese and Chinese

	Japanese			Chinese		
	H	PIC	DP	H	PIC	DP
D8S1179	0.8434	0.8366	0.9602	0.8245	0.8151	0.9486
D21S11	0.8132	0.8033	0.9375	0.8495	0.8492	0.9604
D18S51	0.8505	0.8484	0.9616	0.8490	0.8402	0.9602
D5S818	0.7875	0.7682	0.9219	0.7851	0.7519	0.9192
D13S317	0.8086	0.8003	0.9363	0.7949	0.7646	0.9281
D7S820	0.7851	0.7653	0.9217	0.7690	0.7354	0.9121

* H: Heterozygosity

PIC: Polymorphism information content

DP: Distinguishing Probability

Xiuling Wang
Toshiko Sawaguchi
Akiko Sawaguchi

Department of Legal
Medicine, Tokyo Women's
medical University, School
of Medicine, Shinjuku-ku,
Tokyo, Japan

Application of electrophoresis technology to DNA analysis

We used the variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism and the ten short tandem repeat (STR) polymorphisms to study a number of disputed paternity cases in the Japanese population. For the determination of VNTR locus (D1S80) and the ten STR loci (vWA, F13B, TH01, TPOX, CSF1PO, F13A01, LPL, D3S1744, D12S1090, D18S849) we used polymerase chain reaction (PCR) amplification and the vertical polyacrylamide gel electrophoresis technique followed by SYBR green I staining. The irregular repeats were analyzed by sequencing from bands of vertical polyacrylamide gel electrophoresis using the latest gene analyzing equipment, the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. The probable genotypes of the deceased putative father were deduced by Komatu's method from the genotypes of the widow and the genotypes of their children. The calculation of paternity probability used the Essen-Moller formula and Bayes's theorem. Calculated in eleven loci, the distinguishing probabilities (DP) and the mean exclusion chance (MEC) were 0.9999 and 0.9989, respectively. Therefore, information obtained from eleven DNA polymorphisms is enough to determine paternity plausibility.

Keywords: Vertical polyacrylamide gel electrophoresis / Polymer capillary electrophoresis / DNA polymorphism / Paternity testing
EL 3668

1 Introduction

In recent years, electrophoretic technology showed a truly dramatic development in the area of biological research. The polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique is available for the analysis of DNA polymorphism and the study of genome organization [1]. Especially the allele size and repeats can be determined precisely by high-resolution PAGE technique [2]. DNA polymorphism is widely used in areas such as criminal investigation, human identification, and paternity testing [3]. In particular, the highly distinguishable polymer capillary electrophoresis is an important complement to the analysis of DNA sequence using the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer [4]. The allele frequency distribution of D1S80 vWA, F13B, TH01, TPOX, CSF1PO, F13A01, LPL, D3S1744, D12S1090, and D18S849 has been reported in the Japanese population [5–8]. The D1S80 locus has 26 alleles, and the ten STR loci have 108 alleles, which were observed in the Japanese population. This report deals with

two cases of special paternity testing. In the first case the widow of the putative father and their children, as well as the alleged children and their mother, were tested for the eleven DNA polymorphisms. From the results, the probabilities *a posteriori* for the possible genotypes of the deceased putative father were estimated by means of the principle given by Komatu based on Essen-Moller's theorem. Then, the probability of paternity was calculated according to the method described by Komatu. In the second case, for detection of the irregular repeats and confirmation of the genotypes, we used sequencing analysis from the bands of vertical polyacrylamide gel electrophoresis followed by sequencing analysis software Version 3.0.

2 Materials and methods

2.1 DNA extraction

Samples were obtained from Japanese individuals in disputed paternity casework. DNA was extracted from whole blood using John's method [9].

2.2 PCR amplification

Each amplified sample contained 50 ng DNA (0.25 units) of *Taq* DNA polymerase, 2.5 μ L of primer and 2.5 μ L of 10 \times dNTPs in 10 \times PCR buffer. PCR amplification was performed for 30 cycles in DNA Thermal Cycler 480 (Per-

Correspondence: Dr. Xiuling Wang, Department of Legal Medicine, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan
E-mail: xiuling@research.twmu.ac.jp
Fax: +81-3-5269-7300

Abbreviations: DP, distinguishing probabilities; MEC, mean exclusion chance; VNTR, variable number of tandem repeats

Table 1. The results of VNTR and STR analysis in the case of a deceased putative father

Locus	Widow	Son	Daughter 1	Daughter 2	Common law wife	Alleged daughter 1	Alleged daughter 2
D1S80	19, 43	19, 24	19, 25	24, 43	29, 43	25, 43	25, 29
CSF1PO	11, 12	12, 12	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12
F13A01	4, 6	6, 6	6, 6	4, 6	4, 6	4, 6	4, 6
F13B	8, 10	8, 8	8, 10	8, 8	9, 10	8, 9	8, 9
LPL	10, 10	10, 11	10, 11	10, 11	10, 12	11, 12	10, 11
TH01	7, 9	7, 9	7, 9	9, 9	6, 9	9, 9	9, 9
TPOX	8, 11	8, 8	11, 11	11, 11	11, 11	11, 11	11, 11
vWA	17, 18	18, 18	17, 18	17, 18	19, 20	18, 20	18, 20
D3S1744	15, 16	15, 19	15, 18	16, 19	16, 18	16, 18	18, 19
D12S1090	20, 26	12, 26	20, 26	12, 26	25, 27	12, 25	25, 26
D18S849	14, 16	15, 16	14, 17	15, 16	15, 16	15, 16	15, 17

Table 2. The estimative possible genotypes of the deceased putative father from the widow and children

Locus	Rate of possible genotypes of the deceased putative father		
D1S80	24, 25 (1.00)		
CSF1PO	12 (0.61),	11, 12 (0.26),	Other (0.13)
F13A01	4, 6 (0.31),	6 (0.62),	Other (0.07)
F13B	8 (0.13),	8, 10 (0.74),	Other (0.13)
LPL	10, 11 (0.55),	11 (0.31),	Other (0.14)
TH01	9 (0.50),	7, 9 (0.39),	Other (0.11)
TPOX	8, 11 (1.00)		
vWA	18 (0.35),	17, 18 (0.45),	Other (0.20)
D3S1744	18, 19 (1.00)		
D12S1090	26 (0.28),	12, 26 (0.60),	Other (0.12)
D18S849	15, 17 (1.00)		

kin Elmer, Foster City, CA, USA) according to standard protocols: denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 60°C for 1 min, and primer extension at 72°C for 1 min.

2.3 PAGE

The amplified DNA samples were loaded on a 0.75 mm thick and 130 mm long 8% polyacrylamide gel for D1S80 or 6% denaturing polyacrylamide gel for STR loci. Electrophoresis was performed at 400 V for 2 h. The gels were stained in 100 mL of SYBR green I nucleic acid gel staining buffer for 5 min at room temperature and then photographed.

2.4 Sequencing analysis

The sequence was analyzed from bands of PAGE using the polymer capillary electrophoresis of ABI PRISM 310 Genetic Analyzer at 7.5 kV for 60 min at 42°C. The sequence analysis used sequencing analysis software Version 3.0.

Table 3. The results of VNTR and STR analysis in a disputed paternity case

Locus	Mother	Daughter	Son*	Putative father
D1S80	18, 28	28, 30	18, 30	25, 30
CSF1PO*	10, 13	10, 12	9, 10*	11, 12*
F13A01	4, 6	4, 6	4, 6	6, 6
F13B	9, 10	10, 10	9, 10	8, 10
LPL	11, 12	12, 12	11, 12	10, 12
TH01*	7, 8	7, 9	7, 9.3*	6, 9*
TPOX	8, 11	8, 11	8, 11	8, 8
vWA	14, 17	14, 17	14, 17	17, 17
D3S1744	18, 20	19, 20	18, 20	18, 19
D12S1090	20, 23	21, 23	23, 26	21, 26
D18S849	16, 17	16, 16	15, 17	15, 16

3 Results

The D1S80, vWA, F13B, TH01, TPOX, CSF1PO, F13A01, LPL, D3S1744, D12S1090, and D18S849 were analyzed in the case of the putative father and the disputed paternity case by using the PCR with PAGE technique followed by SYBR green I staining. The calculated distinguishing probabilities (DP) and the mean exclusion chance (MEC) were 0.9999 and 0.9989, respectively. In the case of the deceased putative father, the results of variable number of tandem repeats (VNTR) and STR polymorphic analysis are shown in Table 1. The rate of possible genotypes of the deceased putative father is shown in Table 2. The probability of paternity thus obtained was 0.9998 and 0.9999 for alleged daughter 1 and alleged daughter 2, respectively. The results of VNTR and STR polymorphic analysis for the disputed paternity are shown in Table 3. The CSF1PO locus and TH10 locus excluded the paternity by the PAGE technique. The detection of the irregular repeats and confirmation of the genotypes used sequencing analysis for the son from the

thus obtained was 0.999 for the daughter. These results demonstrated that analysis of VNTR and STR polymorphisms are an extremely effective method for paternity testing and personal identification in forensic sciences. The sequence analysis is an important complement for detection of the irregular repeats and confirmation of the genotypes.

We would like to thank Dr. Miwa Mikami for the assistance in the research work. This work was supported by The Japan China Medical Association – The Japan Foundation Subsidy.

Received June 15, 1999

5 References

- [1] Anderson, J. F., Greenhalgh, M. J., Bulter, S. R., *Foren. Sci. Int.* 1994, 55, 175–189.
- [2] Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A. M., Eisenberg, A. J., Allen, R. C., *Am. J. Hum. Genet.* 1991, 48, 137–144.
- [3] Sjerpes, M., Geest, N., Pieron, C., Gajadhar, M., Kloosterman, A., *Int. J. Legal. Med.* 1995, 108, 127–134.
- [4] Brinkmann, B., Sajantila, A., Goedde, H. W., Matsumoto, H., Nishi, K., Wiegand, P., *Eur. J. Hum. Genet.* 1996, 4, 175–182.
- [5] Nagai, A., Yamada, S., Bunai, Y., Ohya, I., *DNA Polymorphism*, Toyoshoten, Tokyo 1994, pp. 82–86.
- [6] Nagai, A., Yamada, S., Watanabe, Y., *Int. J. Leg. Med.* 1996, 109, 34–36.
- [7] Yamaguchi, H., Takizawa, H., Shimasaki, C., *Jpn. J. Legal. Med.* 1996, 50, 163–167.
- [8] Wang, X., Sawaguchi, T., Yamashita, K., Sawaguchi, A., *DNA Polymorphism*, Toyoshoten, Tokyo 1998, pp. 50–55.
- [9] John, S. W. M., Weitzner, G., Rozen, R., Scriver, C. R., *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 408.
- [10] Komatu, Y., *Acta Crim. Jpn.* 1939, 13, 485–494.
- [11] Essen-Moller, E., *Anthropol. Ges. Wien* 1938, 68, 9–53.
- [12] Asano, M., *Jpn. J. Legal. Med.* 1991, 45, 277–287.