

55%，無増悪生存期間：7.7 ヶ月，生存期間中央値：19.5 ヶ月と FOLFOX と同程度の治療成績を認めた。この結果よりさらに，XELOX±bevacizumab および FOLFOX±bevacizumab の比較試験が実施された (TREE 1, 2 試験；次項参照)。2006 年 ESMO (欧州癌治療学会議) でも FOLFOX に対して XELOX の非劣性が示されている⁹⁾。

2. 分子標的治療薬の出現

続いての大腸癌化学療法における新たな breakthrough は，分子標的治療薬の出現である。2003 年の ASCO において，大腸癌領域において分子標的治療薬の臨床応用が初めて報告された。

1) 血管内皮増殖因子阻害薬

まず，bevacizumab (Avastin[®]) の第 III 相試験の報告である¹⁰⁾。本剤は，血管内皮細胞増殖因子 VEGF (vascular endothelial growth factor) に対するヒト化単クローン抗体である。IFL を対照群，IFL+bevacizumab 併用を試験群として初回化学療法例を対象に比較検討がなされた。結果は，奏効率 (35 vs 45%)，無増悪生存期間 (6.2 vs 10.6 ヶ月)，全生存期間 (15.6 vs 20.3 ヶ月)，のいずれにおいても併用群が有意に優れるというものであった (表 3)。有害事象は併用群において出血，血小板減少，蛋白尿，高血圧などが認められ，また，消化管穿孔が低頻度であるが認められてい

る。本剤は，血管新生阻害薬として初めて生存期間を延長するという事実を示し，2004 年 2 月にはアメリカにおいて承認されている。続いて現在の標準治療の 1 つである FOLFOX と bevacizumab の併用療法の有用性が 2 次治療症例を対象としたランダム化第 III 相試験 (E 3200 試験)¹¹⁾ で示された (生存期間中央値 bevacizumab 無 vs 有=10.8 vs 12.9 ヶ月) (表 4)。この結果を受け，現在海外においては FOLFOX+bevacizumab 併用療法が初回治療に対する標準治療と認識されている。さらに本レジメンの初回治療の有用性を検討した比較試験の結果 (TREE 1, 2 試験)¹²⁾¹³⁾ は 2006 年の ASCO でその最終解析が公表され，oxaliplatin と 3 つの異なるフッ化ピリミジンの併用療法 (mFOLFOX 6, bFOL=bolus 5-FU+oxaliplatin, CapeOX=XELOX : capecitabine+oxaliplatin) に bevacizumab を加えることにより，毒性は忍容可能な範囲にとどまりつつ，奏効率の改善と無増悪期間，全生存期間の延長が得られた。3 群併せての生存期間中央値は bevacizumab 無 vs 有=18.2 vs 24.4 ヶ月と，bevacizumab の併用でついに 2 年を超えた (表 5)。

ところで，VEGF の受容体 (VEGFR) には VEGFR-1 (Flt-1)，VEGFR-2 (KDR/Flk-1)，VEGFR-3 (Flt-4) の 3 種類がある。これらの構造は，血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) や GIST など過剰発現する c-kit と類似しており，

表 3 IFL+bevacizumab vs IFL 第 III 相試験の成績

	IFL+bevacizumab	IFL
症例数	402	411
奏効率 (%)	44.8	34.8
PFS (月)	10.6	6.2
MST (月)	20.3	15.6

PFS : 無増悪生存期間, MST : 生存期間中央値
(文献 10 より引用)

表 4 E 3200 試験の成績

	FOLFOX+BV	FOLFOX4	BV
症例数	271	271	230
奏効率 (%)	21.8	9.2	3.0
TTP (月)	7.2	4.8	2.7
MST (月)	12.9	10.8	10.2

BV : bevacizumab, TTP : 無増悪期間, MST : 生存期間中央値

(文献 11 より引用)

表5 TREE 1 および TREE 2 試験の成績

	TREE1			TREE2		
	mFOLFOX6	bFOL	CapeOx	FOLFOX +BV	bFOL +BV	CapeOx +BV
症例数	49	50	48	71	70	72
奏効率 (%)	43	22	35	52	34	46
TTP/TTF (月)	8.7/6.6	6.9/4.9	5.9/4.4	9.9/5.8	8.5/5.3	10.3/5.5
MST (月)	19.2	17.9	17.2	26.0	20.7	27.0
MST (3 群併せて; 月)		18.2			24.4	

BV : bevacizumab, TTP : 無増悪期間, OS : 全生存期間, MST : 生存期間中央値
(文献 12, 13 より引用)

VEGF 2, PDGFR, c-kit を抑える sunitinib や, VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-kit を抑える PTK/ZK (vatalanib) などは multi-target VEGFR 阻害薬として, 大腸癌ほか多くの癌で臨床試験が行われている。1 次治療例に対し FOLFOX 4 に PTK/ZK を併用した CONFIRM-1 試験¹⁴⁾では, 奏効率, 無増悪生存期間に差は認めなかったが, サブセット解析では LDH の高い群では PTK/ZK 群では良好な結果が得られた。そこで, 前治療を有する症例を対象に行った CONFIRM-2 試験の結果が 2006 年の ASCO で報告されたがやはり CONFIRM-1 同様, LDH の高い群のみでの生存期間の延長を示すに留まっている¹⁵⁾。

2) 上皮細胞増殖因子受容体阻害薬

また, 上皮細胞増殖因子受容体 EGFR (epidermal growth factor receptor) に対するマウス-ヒトキメラ単クローン抗体である cetuximab (Erbix[®]) も 2003 年の ASCO においてその irinotecan 不応性大腸癌に対する比較試験成績 (BOND 試験)¹⁶⁾が報告された(表 6)。EGFR 陽性で irinotecan 不応の症例に対して cetuximab 単独と cetuximab+irinotecan 併用群を比較する試験であり, 奏効率(11 % vs 23 %)や無増悪期間

(1.5 vs 4.1 ヶ月)での優位性は検証されたが, 全生存期間では有意でなかった。主な有害事象は, キメラ抗体であるため infusion reaction が認められること, にきび様の皮疹, 爪の変形, 肺臓炎などが報告されている。本剤もヨーロッパに続き, 2004 年 1 月にアメリカにて承認された。さらに, cetuximab/bevacizumab の併用療法も報告されてきている。Saltz らは irinotecan 不応性の切除不能再発結腸直腸癌 74 例を対象に, cetuximab+bevacizumab+irinotecan 併用療法を実施した (BOND 2 試験)¹⁷⁾。cetuximab+bevacizumab (CB)群/cetuximab+bevacizumab+CPT-11 (CBI)群の奏効率はそれぞれ, 23 %, 38 %, 無増悪生存期間は 6.8 ヶ月, 8.5 ヶ月という結果で, bevacizumab は irinotecan 不応例に対し, cetuximab 単剤または cetuximab/irinotecan 併用群の有効性を高めた。現在 bevacizumab 不応例に対し, CB/CBI 群の有用性の検討がなされている (BOND 3 試験)。

主に 2 次治療以降で検討されていた cetuximab の初回治療における有効性は, IFL, CPT-11+AIRegimen, FOLFIRI, FOLFOX, FUFOX との併用療法の第 II 相試験で報告されている。なかでも FOLFOX 4 と cetuximab の併用療法であ

表6 BOND 試験の成績

	Cetuximab 単独群	CPT-11+Cetuximab 併用群	P-value
症例数	111	218	
奏効率 (%)	10.8	22.9	0.0074
TTP (月)	1.5	4.1	<0.001
MST (月)	6.9	8.6	0.48

TTP：無増悪期間、MST：生存期間中央値

(文献16より引用)

る ACROBAT 試験では、奏効率 81%，無増悪生存期間 12.3 ヶ月、また当初切除不能であった転移巣の切除が 9 例で可能となるなど非常に良好な成績が報告された¹⁸⁾。また、FOLFIRI/FOLFOX±cetuximab の 4 群の比較試験の中間発表が 2006 年の ASCO でなされ、cetuximab あり：なしで奏効率は 52%：32%と有意に優れていた¹⁹⁾。現在、1 次治療として、CRYSTAL 試験 (FOLFIRI±cetuximab) が、2 次治療として FOLFOX 抵抗例に対する EPIC 試験 (CPT-11±cetuximab) が、また 5-FU, CPT-11 および oxaliplatin すべてに不応な症例に対して NCIC-CO.17 試験 (best supportive care vs cetuximab) が進行中あるいは終了している。cetuximab の大腸癌における survival benefit が検証されるか、結果の解析が待たれていたが、2006 年 11 月に、このうち NCIC-CO.17 試験で全生存期間において cetuximab 群が有意に優れていたとプレスリリースで報告された。詳細は 2007 年の学会で報告される予定である。

また、完全ヒト型抗 EGFR 抗体である panitumumab (ABX-EGF) は、キメラ抗体である cetuximab に比べ、infusion reaction などの有害事象の頻度が少ないと報告されている。CPT-11 および oxaliplatin に不応となり有効な治療法がない大腸癌患者を対象に panitumumab 単剤と BSC との比較試験が行われ、無再発生存期間において panitumumab が優れていた²⁰⁾。この結果、

2006 年 9 月、アメリカにおいて panitumumab 単剤が salvage 治療として承認された。現在、同剤と FOLFOX や FOLFIRI, bavacizumab などとの併用療法の検討も行われている。その他にも、EGFR 関連チロシンキナーゼ受容体阻害薬として gefitinib, erlotinib, lapatinib などが臨床試験において有効性を検証されつつある。

これら分子標的治療薬は 5-FU+LV, irinotecan, oxaliplatin に続く、第 4 の薬剤として大きな期待がもたれているが、現在その薬剤費の高価なことがアメリカにおいては大きな問題となっている。治療開始 2 ヶ月間の薬剤費が bevacizumab 併用で 2 万ドル、cetuximab 併用で 3 万ドルという事実²¹⁾は、個々の症例のみならず、社会全体としてこのような症状コントロールと延命を目的とした癌患者に対する高額医療をどのように受け入れるかのコンセンサスを必要とする。前述のように経口抗癌剤を持続点滴療法に置き換えることが可能となれば、利便性、医療経済性などの患者負担や臨床現場での負担が大幅に軽減することが可能となりその意義は大きいと考える。

3. 現在の治療体系

現在 NCI-PDQ²²⁾ や全米癌総合ネットワーク (National Comprehensive Cancer Network : NCCN)²³⁾ (図 1) などにおいてこれらの臨床試験の結果に基づいた治療法選択のガイドラインが公表されており、腫瘍専門医がこの情報をもとに治

療法を選択するという流れが起こっている。それによると、1次治療として FOLFOX (または CapeOx)+bevacizumab を行った場合、2次治療は FOLFIRI もしくは irinotecan 単剤+cetuximab, そして3次治療で cetuximab+irinotecan あるいは panitumumab となっている。または、1次治療で FOLFIRI+bevacizumab を選択した場合は、2次治療、3次治療で FOLFOX (または CapeOx) もしくは cetuximab+irinotecan あるいは panitumumab を用いることが推奨されている。ゆえに、現在は Grothey の説いた“3剤”に bevacizumab, cetuximab および panitumumab を加えた“6剤”の薬剤を変更しながら治療を継続し、生存期間の最大限の延長を求めていくこととなる。

わが国における大腸癌化学療法の変遷と現状

はじめに、2006年12月現在、アメリカおよびわが国で大腸癌治療に認可されている抗癌剤の一覧を示す(表7)。わが国においては、主に経口フッ化ピリミジン製剤が汎用されてきた歴史がある。特に術後補助療法ではその利便性から長期にわたり使用されてきたが十分な臨床的意義は確認されていなかった。1995年には irinotecan が承認されたが標準化使用には至らず、その後1999年にわが国での後期第Ⅱ相試験の結果をもとに5-FU/LVが RPMI レジメンにて承認され、最近まで頻用されてきた。2003年には UFT/LV²⁴⁾, S-1²⁵⁾²⁶⁾が使用可能となり、その後、IFLが臨床応用されるようになったが、FOLFOX4に劣ることが報告され、また有害事象も強く出現しやすい

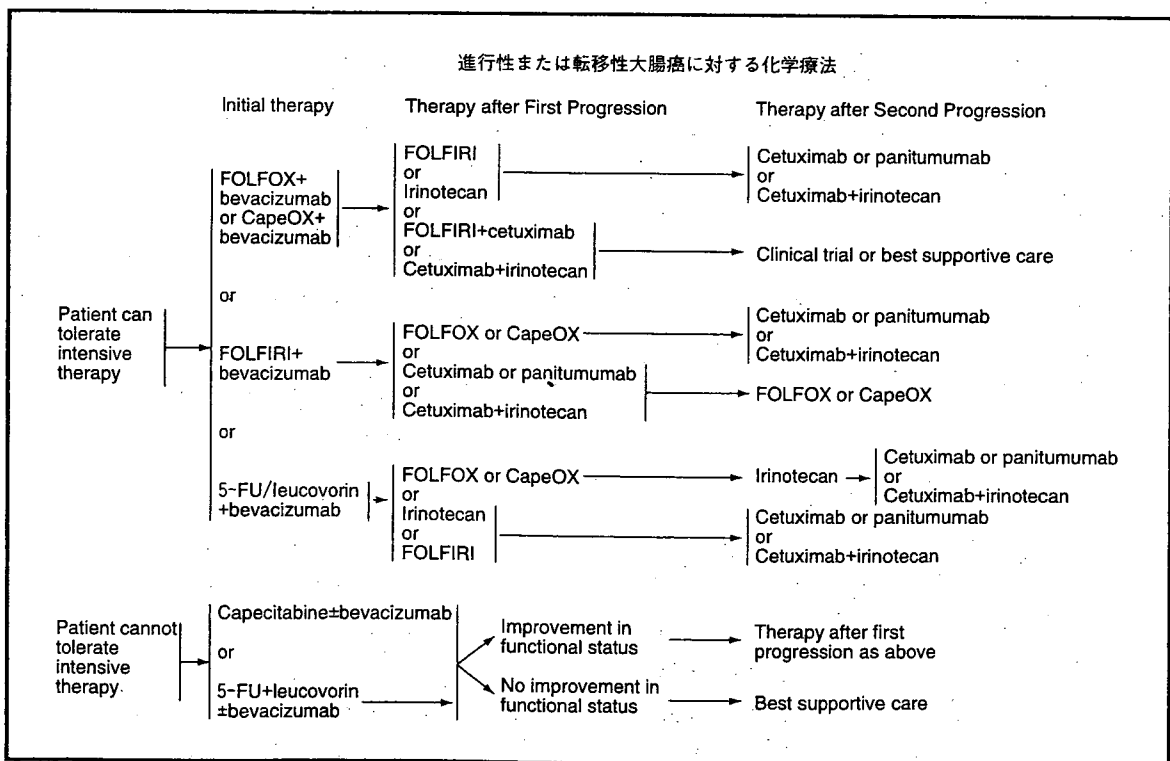


図1 NCCN ガイドライン

表7 大腸癌治療に認可されている薬剤とその認可年度

レジメン	アメリカ	日本
5-FU	1962	1967
5-FU/LV	1991	1999
Irinotecan	1996	1995
FOLFIRI	2000	2005
Capecitabine	2001	未承認
FOLFOX	2002	2005
Cetuximab (±IRI)	2004	未承認(2007?)
Bevacizumab (+FOLFOX/IRI)	2004	未承認(2007?)
Panitumumab	2006/9	未承認
S-1	未承認	2003
UFT/LV	未承認	2003

く早期死亡例も出現したため現在は使用が減少しつつある。2005年2月、持続点滴による5-FU/LV療法が、2005年3月にoxaliplatinが承認され、その結果2005年4月よりFOLFOXレジメンが使用可能となり標準治療として急速に普及した。また、FOLFIRIも用量の規制はあるものの使用可能となって普及し、2006年秋には安全性確認試験の結果が報告された²⁷⁾。さらにcapecitabineの海外用量での検討が終了している。bevacizumab, cetuximab, panitumumabなどの分子標的薬剤も第II相試験が進行中で、承認は早くて2007年中となる見込みである。また標準治療へ経口抗癌剤導入の試みとしてはS-1とoxaliplatinやirinotecanとの併用療法の検討がなされているところである。一方、肝動注療法は、全身化学療法と比して腫瘍縮小効果は優れているものの、肝外病変の出現などが問題であり、現在肝動注+CPT-11全身投与の臨床第I/II相試験が進行中であるが、その評価ははまだ定まっていない。

以上より、わが国においては現時点ではFOL-

FOX, FOLFIRIが、進行大腸癌に対する第1選択の治療とされる。FOLFOX, FOLFIRIいずれを先行させるべきかについては明確なコンセンサスはないが、消化管閉塞の可能性や全身状態を懸念し、有害事象を患者に十分説明した上で決定すべきである。高齢者やPS (performance status)不良例では5-FU/LVやUFT/LV, S-1なども第1選択となりうる。これらは2005年7月に大腸癌研究会から発表された「大腸癌治療ガイドライン²⁸⁾」にも記されている。

FOLFOXの投与スケジュールおよび神経毒性について

前述のとおり、2005年3月、oxaliplatinが承認され、わが国でもFOLFOX療法が使用可能となりもうすぐ2年が経過しようとしている。FOLFOX療法は現在、比較試験で検討されているFOLFOX4やその5-FU/LVの2日間の繰り返し投与を1日に簡便化したFOLFOX6²⁹⁾やFOLFOX7³⁰⁾が使用されている。しかしながら、どのレジメンが優れているかについては比較検討がさ

れておらず十分なデータがない。わが国における承認時には欧米でのエビデンスを考慮し、FOLFOX 4 を推奨する形で認可されているが、2 週間ごとに 2 日外来通院しなければならないことが問題である。わが国ではその簡便さより FOLFOX 6 が好まれ、さらに、oxaliplatin の投与量を承認用量内の 85 mg/m² に減量した modified FOLFOX 6 (mFOLFOX 6) の有用性が報告されている³¹⁾。当院においても現在は主に mFOLFOX 6 を使用しており、初回投与例の retrospective な検討³²⁾において、奏効率、無増悪生存期間、毒性において海外での FOLFOX 4³²⁾、FOLFOX 6³³⁾ の報告と明らかな差を認めていない。

一方、咽頭・喉頭の違和感、末梢神経炎といった oxaliplatin 特有の神経毒性のため、効果が得られながら FOLFOX を継続できない場合が少なくないことが判明した。oxaliplatin の神経毒性は蓄積性があり、850 mg/m² 以上でその頻度が高くなり、回復性が遷延するとされる³⁴⁾。そこで oxaliplatin の dose intensity を高める検討がなされてきた。2004 年 ASCO で発表された OPTIMOX 1 (FOLFOX 4 vs FOLFOX 7×6+sLV 5 FU 2×12+FOLFOX 7×6) の結果は両者とも奏効率：約 58%，全生存期間：約 20 ヶ月で同等であったが、神経毒性は後者で有意に減少した³⁵⁾。引き続き 2006 年の ASCO では OPTIMOX 2 が発表され、FOLFOX 7 を 6 サイクル施行後に sLV 5 FU 2 による維持療法を行わずに休薬する chemotherapy free interval (CFI) をおくことが可能かについて検討がなされた³⁶⁾。primary endpoint である DDC (duration of disease control) は同等であったが、無増悪生存期間は CFI 群で有意に短かった。全生存期間は公表されておらず、この結果だけでは CFI をおくことの可否の根拠にはなり得ない。また、neuromodulatory agents として神経毒性を回避する目的で xaliproden や Ca/Mg などいくつかの薬剤について臨床試験が行われているが、現在まで明らかな有効性を示したものはな

い。当院での検討³⁷⁾および海外での報告³⁸⁾によると、機能障害を呈した場合の改善までの期間の中央値は約 13 週とされ、その間に PD (progressive disease) となってしまう症例が多く認められている。それゆえ機能障害を呈するような重篤な毒性が出現する前に休薬を行うことが肝要と考えられ、FOLFOX 療法の効果を得られていれば sLV 5 FU 2 による維持療法を行い回復を待つのが妥当と考える。

まとめ

切除不能転移性大腸癌に対する化学療法は、1990 年代後半から 10 年足らずの間に大きな進歩がみられている。科学的に計画された臨床試験の積み重ねにより、最短時間で新規治療法の評価と一般化を進め、切除不能転移性大腸癌の生存期間は無治療の 8 ヶ月から今や 2 年を超える時代となった。臨床現場では、欧米との格差および国内での地域・病院間格差を少しでも縮めていこうとする自覚と患者の QOL や医療経済的概念も熟知した上での適切な薬剤選択と治療継続の判断を行うことがますます重要となっている。国際的標準治療の変化を常にフォローしながら、最善の治療法を患者に提供することができる臨床能力が個々の腫瘍専門医に求められている。

References

- 1) 国立がんセンターホームページ : www.ncc.go.jp/jp/statistics/2005/index.html
- 2) Colorectal cancer collaborative group : Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer : systematic review and meta-analysis. *BMJ* 321 : 531-535, 2000
- 3) Kidani Y, Noji M, Tashiro T : Antitumor activity of platinum (II) complexes of 1,2-diamino-cyclohexane isomers. *Gann* 71 : 637-643, 1980
- 4) Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al : A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorec-

- tal cancer. *J Clin Oncol* 22 : 23-30, 2004
- 5) Tournigand C, Andre T, Achille E, et al : A FOLFIRI followed by FOLFOX 6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer : a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22 : 229-237, 2004
 - 6) Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, et al : Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 22 : 1209-1214, 2004
 - 7) Falcone A, Masi G, Brunetti I, et al : The triplet combination of irinotecan, oxaliplatin and 5 FU/LV (FOLFIRI) vs the doublet of irinotecan and 5 FU/LV (FOLFIRI) as first-line treatment of metastatic colorectal cancer (MCRC) : Results of a randomized phase III trial by the Gruppo Oncologico Nord Ovest (G.O.N.O.). *Proc ASCO* 24 : 18 S (abst#3513), 2006
 - 8) Cassidy J, Taberero J, Twelves C, et al : XELOX (capecitabine plus oxaliplatin) : Active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22 : 2084-2091, 2004
 - 9) Cassidy J, et al : First efficacy and safety results from XELOX-1/NO 16966, a randomised 2 x 2 factorial phase III trial of XELOX vs. FOLFOX+bevacizumab or placebo in first-line metastatic colorectal cancer. *Annals Oncol* 17 supplement 9 (abst#LBA 30), 2006
 - 10) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Cartwright T, et al : Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350 : 2335-2342, 2004
 - 11) Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al : High-dose bevacizumab improves survival when combined with FOLFOX 4 in previously treated advanced colorectal cancer : Results from the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study E 3200. *Proc ASCO* 23 : 1 S (abst#2), 2005
 - 12) Hochster HS, Welles L, Hart L, et al : Safety and efficacy of bevacizumab (Bev) when added to oxaliplatin/fluoropyrimidine (O/F) regimens as first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) : TREE 1 & 2 Studies. *Proc ASCO* 23 : 16 S (abst#3515), 2005
 - 13) Hochster HS, Hart L, Ramanathan RK, et al : Safety and efficacy of oxaliplatin/fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) : Final analysis of the TREE-Study. *Proc ASCO* 24 : 18 S (abst#3510), 2006
 - 14) Hecht JR, Trarbach T, Jaeger E, et al : A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study in patients (Pts) with metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum receiving first-line chemotherapy with oxaliplatin/5-fluorouracil/leucovorin and PTK 787/ZK 222584 or placebo (CONFIRM-1). *Proc ASCO* 23 : 16 S (abst#3), 2005
 - 15) Koehne C, Bajetta E, Lin E, et al : Results of an interim analysis of a multinational randomized, double-blind, phase III study in patients (pts) with previously treated metastatic colorectal cancer (mCRC) receiving FOLFOX 4 and PTK 787/ZK 222584 (PTK/ZK) or placebo (CONFIRM 2). *Proc ASCO* 24 : 18 S (abst#3508), 2006
 - 16) Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al : Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351 : 337-345, 2004
 - 17) Cunningham D, Pyrhonen S, James RD, et al : Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 352 : 1413-1418, 1998
 - 18) DiRubio E, Taberero J, van Cutsem E, et al : Cetuximab in combination with oxaliplatin/5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA) (FOLFOX-4) in the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing metastatic colorectal cancer : An international phase II study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 23 : 3535, 2005
 - 19) Venook A, Niedzwiecki D, Hollis D, et al : Phase III study of irinotecan/5 FU/LV (FOLFIRI) or oxaliplatin/5 FU/LV (FOLFOX) ± cetuximab for patients (pts) with untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCRC) : CALGB 80203 preliminary results. *Proc ASCO* 24 : 18 S (abst#3509), 2006
 - 20) Peeters M, Van Cutsem E, Sienna S, et al : A phase 3 multicenter randomized controlled trial (RCT) of panitumumab plus best supportive care (BSC) vs BSC alone in patients with metastatic colorectal cancer. *American Association for Cancer research 2006 Annual Meeting* : abstract CP-1.
 - 21) Schrag D : The Price Tag on progress-Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 351 : 317-319, 2004
 - 22) NCI homepage : <http://www.nci.nih.gov/cancerinfo/pdq/treatment/colon/healthprofessional/>
 - 23) NCCN Practice Guidelines in Colon Cancer : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/
 - 24) Shirao K, Hoff PM, Ohtsu A, et al : Comparison of

- the efficacy, toxicity, and pharmacokinetics of a uracil/tegafur (UFT) plus oral leucovorin (LV) regimen between Japanese and American patients with advanced colorectal cancer : joint United States and Japan study of UFT/LV. *J Clin Oncol* 22 : 3466-3474, 2004
- 25) Ohtsu A, Baba H, Sakata Y, et al : Phase II study of S-1, a novel oral fluoropyrimidine derivative, in patients with metastatic colorectal carcinoma. S-1 Cooperative Colorectal Carcinoma Study Group. *Br J Cancer* 83 : 141-145, 2000
- 26) Shirao K, Ohtsu A, Takada H, et al : Phase II study of oral S-1 for treatment of metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 100 : 2355-2361, 2004
- 27) 宇良敬, 稲葉吉隆, 佐藤洋造, 他 : 切除不能転移・再発大腸癌患者を対象とした5-FU/1-ロイコボリンと塩酸イリノテカン併用療法(FOLFIRI)の安全性確認試験. *日本癌治療学会誌* 41 : 321, 2006
- 28) 大腸癌研究会(編) : 大腸癌治療ガイドライン 2005 年版. 金原出版, 東京, 2005
- 29) Maindrault-Goebel F, Louvet C, André T, et al : Oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (FOLFOX 6). *Eur J Cancer* 35 : 1338-1342, 1999
- 30) Maindrault-Goebel F, De Gramont A, Louvet C, et al : High-dose intensity oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (FOLFOX 7). *Eur J Cancer* 37 : 1000-1005, 2001
- 31) Cheeseman SL, Joel SP, Chester JD, et al : A 'modified de Gramont' regimen of fluorouracil, alone and with oxaliplatin, for advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 87 : 393-399, 2002
- 32) Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al : A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22 : 23-30, 2004
- 33) 平島詳典, 加藤 健, 高島淳生, 他 : 切除不能・再発大腸癌患者の初回化学療法を対象とした modified FOLFOX 6 療法の有効性および安全性の検討. *日本癌治療学会誌* 41 : 321, 2006
- 34) De Gramont A, Figuer A, Seymour M, et al : Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18 : 2938-2947, 2000
- 35) De Gramont A, Cervantes A, Andre T, et al : OPTIMOX study : FOLFOX 7/LV 5 FU 2 compared to FOLFOX 4 in patients with advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 23 : 251 s (abstr 3525), 2004
- 36) Maindrault-Goebel F, Lledo G, Chibaudel B, et al : OPTIMOX 2, a large randomized phase II study of maintenance therapy or chemotherapy-free intervals (CFI) after FOLFOX in patients with metastatic colorectal cancer (MRC). A GERCOR study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 24 : 18 S (abst#3504), 2006
- 37) 堀田洋介, 加藤 健, 高張大亮, 他 : modified FOLFOX 6 療法における末梢神経障害の検討. *日本癌治療学会誌* 41 : 511, 2006

[連載]

最新 癌の化学療法マニュアル

第①回 総論

島田安博*

はじめに—抗癌薬治療の意義

消化器癌をはじめとする固形癌に対する抗癌薬治療は、癌患者の多くをその治療対象とするが、有効な抗癌薬がなく、しばしば臨床的意義が疑問視されていた。すなわち、消化器毒性、血液毒性、神経毒性などの有害事象(副作用)と臨床効果とのバランスが妥当であるかという点である。手術不能癌に対する治療法として、抗癌薬治療の選択肢しか考慮されなかった時代には、患者の全身状態が不良であってもわずかの可能性に期待して抗癌薬治療を実施することもあった。最近では、ランダム化比較試験(RCT)により、抗癌薬治療を用いない群と積極的に抗癌薬治療を用いる群の治療成績を生存期間で比較・検討した結果が報告されている。胃癌や大腸癌では生存期間が2~3倍に延長することが示され、全身状態の良好な患者に対して積極的に抗癌薬治療が実施されている。これらのデータは抗癌薬治療が可能であった群と不可能であった群の比較でないことが重要である。不可能である群は、予後不良な患者が多く含まれ治療効果を見かけ上わるくみせるからである。

① 抗癌薬治療の適応とインフォームド・コンセント

抗癌薬治療の適応については、一般に以下の適

応規準が用いられている。一般診療においては、これらを遵守することができない状況も起りうるが、そのさいには患者自身に十分に治療の必要性を説明する必要がある。

- 1) 組織学的に癌の診断がされている。
- 2) 転移を有し、治癒切除が不能である。術後補助療法の場合には、治癒切除が実施されたが、術後再発のリスクが高いと判断される症例。術前投与の場合には、抗癌薬投与後に治癒切除が期待される症例
- 3) 全身状態の指標であるPS(performance status)が0~1である。PS 2以上については有害事象が高度になる可能性も高く、適応を慎重に判断する。PS 4は一般に適応はない。
- 4) 年齢：20~75歳を目安とする。全身状態が良好であれば高齢者への抗癌薬治療は必ずしも禁忌ではないが、臓器機能が潜在的に低下している可能性があり、慎重な適応判断が必要である。
- 5) 主要臓器機能が保たれている。WBC, PLTなどの血液検査, T-Bil, AST/ALT, 血清CREなどで規準を規定する。
- 6) 術前・術後の抗癌薬治療については、対象とする病期, 根治度, 治療開始と手術との間隔の規定などが必要である。術後補助療法では、手術の影響から回復を待つて4~8週を目処に抗癌薬治療を開始することが多い。
- 7) 患者本人からインフォームド・コンセントが得られている。治療に関する説明と同意に関しては多くの議論が行われてきたが、現在では十分

* Y. Shimada(医長)：国立がんセンター中央病院消化器内科(〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1)。

な説明の後、本人より文書にて同意を得ることが標準的である。癌の診断名、病期、治療内容、有害事象、合併症、治療関連死亡、医療費、他の治療法の選択肢などについて事前に説明し、患者自身から治療に関する同意を得ることが必須である。とくに試験的治療では、施設倫理審査委員会(IRB)の承認済みの書類にて実施することが義務づけられている。多忙な臨床現場で、このような時間を要する説明を行うことはたいへんであるが、治療を患者と医療者の共同作業と理解すれば、重要であることは明らかである。

8) 治療の妨げとなる合併症は除外するか、適切に治療を行いコントロールすることが必要である。高血圧、糖尿病、心臓病など、患者の高齢化に伴い生活習慣病を合併する患者は多くなっている。

II 標準治療の確立とRCT—治療ガイドラインの意義

最近では多くの癌腫に対して治療ガイドラインが作成され発表されている。医師向けあるいは患者・家族向けが公表され、情報公開、情報共有にきわめて重要な役割を担っている。ガイドラインは本来RCTによる臨床試験成績に基づき、作成委員会でエビデンスが選別され、素案が作成される。その後、作成とは関連のない評価委員会にて科学的臨床的な妥当性が外部評価され、公表される。新規エビデンスが発表されると再度吟味されて改訂される。抗癌薬治療に関しては海外での多くのRCTによるエビデンスに基づき、エビデンスレベルと推奨度が決定されて公表されている。しかしながら、診断法や手術方法などに関しては、歴史的にRCTになじまず、手技の工夫、発明により進歩し、安全性、有効性が確認され臨床に受け入れられている。したがって、欧米式のガイドラインには厳密には当てはまらないが、国内を中心に多くの臨床実績が積み重ねられており、これらを基礎に一般臨床を実施することは妥当であると考えられる。臨床実績が学会などの全国規模の組織で管理、維持されて一定の質が保証されており、膨大な症例数を経験しているがんセンターなどの専門

病院の臨床成績に基づくのであれば、受け入れは可能と考える。当然、将来的にRCTを計画実施して新規エビデンスの創生が必要であることはいうまでもない。

「標準治療」という言葉がガイドラインではしばしば使用されている。これの対語としては「試験治療」がある。胃癌治療ガイドラインでは、混乱した臨床現場を整理する目的もあり、治療法を「日常診療におけるStage分類別の治療法の適応」と「臨床研究としてのStage分類別の治療法の適応」に二分し、これになじみ深いT分類、N分類に基づくStage分類を重ねて整理している。「日常診療」ではここまでは実施しても過去の臨床実績からは治療成績は保証できる(確立された治療法)と明示している。一方、「臨床研究」に含まれる治療法は、現在検討中であり、確立された治療法ではないことを示している。もちろん、経験のある施設では「臨床研究」の治療法が「日常診療」になっていることもありうる。しかしながら、個々の治療法が現時点で確立された「日常診療」であるか、未確定要素を含んだ「臨床研究」であるかを治療担当医に認識をしてほしいということがガイドライン作成委員会の強い意向である。

臨床実績から臨床試験へ、データからエビデンスへ、今外科医が大きく変貌しつつあると内科医からもしっかり認識される。胃癌における大動脈周囲リンパ節郭清意義を検証するRCT、噴門部胃癌に対する開胸アプローチを検証するRCT、胃癌脾摘の意義を検証するRCT、胃癌腹腔鏡手術の意義を検証するRCT、直腸癌側方リンパ節郭清の意義を検証するRCT、結腸癌腹腔鏡手術の意義を検証するRCTなど手術手技を検証する多くのRCTが国内で実施されている。数年後には国内発のRCTエビデンスによるガイドラインの改訂が現実のものになることは確実である。このような臨床試験指向の中で、再度抗癌薬治療に関するRCTも見直されている。多くの術後補助療法や化学放射線療法のRCTがきわめて質の高い試験として実施されている。臨床医が臨床試験の意義に目覚めたともいえる大きな意識変化である。国内での臨床実績をRCTという国際共通語

で翻訳し、海外に向けて積極的に情報発信を目指しているのである。

治療ガイドラインを通じて日本全国の治療担当医が共通の認識で治療を行うことにより、治療格差が最小となることが理想である。さらに、ガイドラインに採用されている治療レジメンの根拠やその実際に関しても多くの雑誌で取り上げられているので参考にさせていただきたい。また、各学会のホームページや日本病院機能評価機構のMINDSのウェブサイトでも概要や主要文献の抄録が確認できる。

III 補助療法と転移性癌に対する抗癌薬治療

抗癌薬治療は、大きく分けて主たる治療法である手術療法と関連して実施される術前・術後補助療法と、切除不能進行・再発の転移性癌に対する抗癌薬治療の二つがある。

治療の目的は、前者は治癒切除の効果をより増強し治癒を目指す目的であり、後者は腫瘍増大による症状コントロールが目的である。したがって、治療方針に関しても若干異なる。補助療法では、転移性癌で有用性の確認された治療レジメンを最大限の支持療法を行って治療強度を維持して実施する。一方、転移性癌に対する治療も同様ではあるが、減量や休薬を適宜行い、腫瘍増大を抑制する期間を延長することがポイントとなる。このコンセプトは、従来行われてきた補助療法は少量長期間経口抗癌薬投与というものとまったく異なる。最近では、術後補助療法が転移性癌を対象としたRCTで評価された治療レジメンを減量なしにそのまま適応して再発抑制を確認していることが多く、結果的にもこの戦略により、術後補助療法の標準治療が確立されてきている。Stage III 結腸癌に対する5-FU/leucovorin(LV)、FOLFOX、胃癌に対するS-1などはこの開発戦略による成果である。術後の回復状態が不十分であるので、減量して実施する、あるいは再発までの長期間継続することについての十分なエビデンスはないと考えられ、現状では臨床試験で規定された治療期間を基本として一般臨床では実施すべきと考えられる。

IV 経口抗癌薬の臨床的意義—日本における問題点

消化器癌や乳癌では、従来から治療担当医が外科医であることが通常であった。これは国内の癌治療が診断は内科、外科治療・抗癌薬は外科というすみ分けが行われてきたこと、さらには海外のような腫瘍内科医が育成されなかったことなどによると考えられる。臨床現場の多忙や静注治療を実施するための外来治療センターなどの基盤整備が不十分であったことから、抗癌薬治療の主役は静注抗癌薬よりも経口抗癌薬にならざるをえなかったのはやむをえない。結果的に世界的にももっとも経口抗癌薬の臨床経験に富む国となった。しかしながら、経口抗癌薬の表面的な利便性や有害事象が少ないというイメージのみが先行し、臨床的意義である生存期間や無再発生存期間などの評価項目での臨床評価が遅れてしまった。UFTやdoxifluridine、S-1あるいはcapecitabineなどの国内発の優れた経口抗癌薬の5-FU/LVとの大腸癌での直接比較であるRCTは海外において実施され、UFT/LVとcapecitabineの非劣性が検証されたのは最近のことである。この間に、大腸癌治療は再度静注治療法が主役となり、IFL、FOLFOX、FOLFIRIなど多忙な国内医療環境になじまない複雑な治療レジメンが標準治療と位置づけられるというジレンマを経験することになる。国内においてこれら静注治療法を導入しているあいだに海外ではcapecitabineの併用療法であるXELOX(capecitabine+oxaliplatin)療法が積極的に評価され、転移性大腸癌ではXELOX療法とFOLFOX4療法の非劣性が検証されている。すなわち、経口抗癌薬の併用療法が静注療法に置き換え可能であるという証明がされたのである。経口抗癌薬の先進国であった日本が、結果としてその長所を生かすことなく欧米の後追いをしている現実はきわめて残念である。今後は、経口抗癌薬の長所をさらに伸ばすために術後補助療法での評価が実施されることになることが予想される。この点で、ACTS-GC試験により胃癌術後補助療法におけるS-1の臨床評価が国内で実施完了したこと

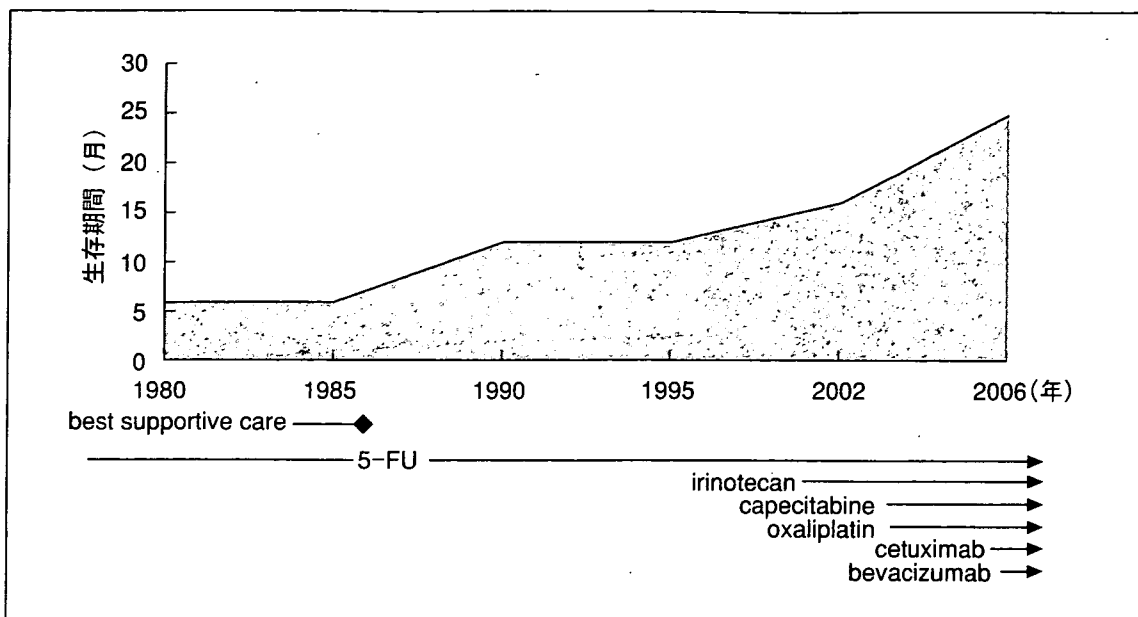


図1. 転移性大腸癌治療成績の進歩. 新薬登場と生存期間の延長

は特筆すべき快挙である。長期的戦略のもとに、全国規模で臨床試験を展開すれば十分国際的に評価される臨床試験を実施できるのである。このような実績をもとに、海外との国際共同試験における主要メンバーとしての参加が可能となると考えられる。

Ⅴ 新規薬剤の臨床的意義(図1)

大腸癌治療を例にとると2005年のoxaliplatin承認以降、新規抗癌薬であるbevacizumabやcetuximabなどに多くの期待が寄せられている。患者数を考慮すると乳癌に対するtrastuzumabやリンパ腫に対するrituximab以上のインパクトが予想される。すでに多くの海外臨床成績が報告され、一次治療、二次治療での有効性や、5-FU/LV, IFL, FOLFOX4などの基本抗癌薬治療との併用の組み合わせでの有効性が確認されているbevacizumabではさらに大きな期待が寄せられている。このような分子標的治療薬や抗体医薬品は新しい治療の可能性を開拓した点では大きな進歩である。癌の生物学的特徴の解析が臨床で開花したともいえる。しかしながら、その特異的な作用機序のために従来経験したことのない有害事象が報告されている。高血圧、腸管穿孔、血管塞栓

などである。頻度は必ずしも高くはないが、経験がない事象ではしばしば発見、対応が遅れることがあるので十分に観察する必要がある。また、臨床的な有用性が認められた患者集団を再度確認する必要がある。治療抵抗性となった全身状態不良の患者に対する魔法の薬でないことは明らかである。適応対象を慎重に選択し、標準投与量をスケジュールに従い投与し、有害事象の発現に応じて適切に減量、休薬を実施することにより最大限の治療効果を実現できるのである。もちろん、併用される抗癌薬治療レジメンも今までの臨床試験成績を参考に、標準的投与量で実施すべきである。安全性を優先して、低用量で実施することで期待される有効性を実現することは一般に不可能である。また、分子標的治療薬は有害事象がなく、長期間腫瘍増大をきたさないという当初のキャッチフレーズは現在では受け入れられていないので、使用に関しては十分な知識が必要となる。

Ⅵ 先行する海外臨床試験の国内導入

海外臨床試験成績が海外学会やインターネットなどで先行発表される時代となり、国内臨床現場での混乱がみられる。国内メディアの偏向報道にも一因がある。毒性や医療費に関するマイナス面

に関する報道が不十分である。臨床医は、臨床試験成績を包括的に概観し、新治療によるベネフィットとリスクについて十分に自ら理解しなければならない。常に最先端には未知のリスクが伴う。すでに述べた bevacizumab に関して、海外臨床成績をそのまま国内臨床に持ち込むことが現実的に可能であろうか。多忙な臨床現場、治療の主体を担う外科医、数少ない腫瘍内科医、医療費への無関心など多くの国内医療環境の問題点がある。海外との医療レベルを比較することは、国内での医療格差を考慮すればむずかしいことは容易に理解できるが、国内の標準的医療をどのレベルに求めるかは医療関係者のみならず、患者や医療費支払機関、さらには国民の合意が必要な大きな問題である。欧米と同様の最先端医療を享受したいのは患者の希望である。しかし、海外では医療を受けることのできない患者も多数おり、国家単位の医療レベルでは日本は決して低い国ではない。いわゆる先進医療をどの程度、どの時期に、誰が負担して国内導入に踏み切るか、最近の新規有効抗癌薬が登場したこの時期にこそ十分な議論が必要と考える。

Ⅶ 異なる国内医療環境における新治療の適応

国内の癌治療は X 線検査、内視鏡検査、病理検査などの診断学、外科治療学を中心に臓器ごとに進歩してきた。この結果、治療成績はきわめて順調に向上してきたのも事実である。しかしながら対照的に、転移、再発癌患者の治療成績の進歩がみられないことも明らかとなった。

このような中、海外を中心に臨床評価された新規抗癌薬の登場により転移・再発癌の治療成績は着実に向上している。新規薬剤を国内導入するさいには、海外と比較して診断学、外科治療学の進歩している国内環境が大きなアドバンテージを有していることは明らかである。

ACTS-GC による胃癌の術後補助療法や NSAS-CC および TAC-CR による直腸癌の術後補助療法の成績は国内の優れた外科手術と、多くの切除リンパ節を検索してくれる病理医の共同作業が基礎にある。残念ながら海外では数施設以外に国内医療を再現することはむずかしいであろう。

一方、北米では胃癌術後補助療法は化学放射線療法であり、大腸癌術後補助療法が oxaliplatin 併用の FOLFOX 療法に移行している状況を見ると、癌治療は診断、外科、抗癌薬治療(放射線治療)の集学的治療のたまものと再認識する。

治療戦略が異なる領域や、臨床試験が実施可能な領域では、国内環境への導入の可否につきなんらかの臨床試験で確認していく必要があると考えている。保守的な考えとの批判はあるが、臨床医として「エビデンスと経験」に基づいた医療を患者に提供するためには、海外データの直輸入には抵抗を感じてしまう。

臨床試験により多くのエビデンスが創生され構築された。治療成績が進歩したことも事実である。しかし、大多数の臨床現場でその事実を再現し、治療の進歩を患者に提供するためには、臨床医には多くの仕事が残されている。

おわりに

最近の抗癌薬治療の進歩は目覚ましい。これらは多くの海外臨床試験成績に基づくものである。患者は最善の治療効果を期待するのは当然であり、臨床医はそれに応える努力が必要である。しかし、医療の現場は日本国内の医療現場である。海外での治療進歩を目の前の癌患者でいかにして再現するかはまだ多くの問題を抱えているが、多くの臨床医が着実な進歩を実感しているのも事実である。第一線の臨床医が抗癌薬治療に精通して治療成績を向上することにおおいに期待したい。

*

*

*

Genetic variations and haplotype structures of the *DPYD* gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences

Keiko Maekawa · Mayumi Saeki · Yoshiro Saito · Shogo Ozawa ·
Kouichi Kurose · Nahoko Kaniwa · Manabu Kawamoto · Naoyuki Kamatani ·
Ken Kato · Tetsuya Hamaguchi · Yasuhide Yamada · Kuniaki Shirao ·
Yasuhiro Shimada · Manabu Muto · Toshihiko Doi · Atsushi Ohtsu ·
Teruhiko Yoshida · Yasuhiro Matsumura · Nagahiro Saijo · Jun-ichi Sawada

Received: 30 May 2007 / Accepted: 26 July 2007 / Published online: 9 September 2007
© The Japan Society of Human Genetics and Springer 2007

Abstract Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is an inactivating and rate-limiting enzyme for 5-fluorouracil (5-FU), and its deficiency is associated with a risk for developing a severe or fatal toxicity to 5-FU. In this study, to search for genetic variations of *DPYD* encoding DPD in Japanese, the putative promoter region, all exons, and flanking introns of *DPYD* were sequenced from 341 subjects including cancer patients treated with 5-FU. Fifty-five genetic variations, including 38 novel ones, were found and consisted of 4 in the 5'-flanking region, 21 (5 synonymous and 16 nonsynonymous) in the coding exons, and 30 in the introns. Nine novel nonsynonymous SNPs, 29C>A (Ala10Glu), 325T>A (Tyr109Asn), 451A>G (Asn151Asp), 733A>T (Ile245Phe), 793G>A (Glu265Lys), 1543G>A

(Val515Ile), 1572T>G (Phe524Leu), 1666A>C (Ser556-Arg), and 2678A>G (Asn893Ser), were found at allele frequencies between 0.15 and 0.88%. Two known nonsynonymous variations reported only in Japanese, 1003G>T (*11, Val335Leu) and 2303C>A (Thr768Lys), were found at allele frequencies of 0.15 and 2.8%, respectively. SNP and haplotype distributions in Japanese were quite different from those reported previously in Caucasians. This study provides fundamental information for pharmacogenetic studies for evaluating the efficacy and toxicity of 5-FU in Japanese and probably East Asians.

Keywords *DPYD* · SNP · Haplotype · Japanese · 5-fluorouracil

K. Maekawa (✉) · Y. Saito · J. Sawada
Division of Biochemistry and Immunochimistry,
National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501, Japan
e-mail: maekawa@nihs.go.jp

K. Maekawa · M. Saeki · Y. Saito · S. Ozawa ·
K. Kurose · N. Kaniwa · J. Sawada
Project Team for Pharmacogenetics,
National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

S. Ozawa
Division of Pharmacology,
National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

K. Kurose · N. Kaniwa
Division of Medicinal Safety Science,
National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

M. Kawamoto · N. Kamatani
Division of Genomic Medicine,
Department of Advanced Biomedical Engineering and Science,
Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

K. Kato · T. Hamaguchi · Y. Yamada ·
K. Shirao · Y. Shimada
Gastrointestinal Oncology Division, National Cancer Center
Hospital, National Cancer Center, Tokyo, Japan

M. Muto
Gastrointestinal Oncology Division,
National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan

T. Doi · A. Ohtsu
Division of GI Oncology/Digestive Endoscopy,
National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan

T. Yoshida
Genetics Division, National Cancer Center Research Institute,
National Cancer Center, Tokyo, Japan

Y. Matsumura
Research Center of Innovative Oncology,
National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan

N. Saijo
Deputy Director, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa,
Japan

Introduction

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is an inactivating and rate-limiting enzyme for 5-fluorouracil (5-FU), which is used in various therapeutic regimens for gastrointestinal, breast and head/neck cancers (Grem 1996). While the antitumor effect of 5-FU is exerted via anabolic pathways responsible for its intracellular conversion into anti-proliferative nucleotides, DPD affects 5-FU availability by rapidly degrading it to 5, 6-dihydrofluorouracil (DHFU) (Heggie et al. 1987). The importance of DPD in 5-FU metabolism was also highlighted by a lethal drug interaction between 5-FU and the antiviral agent sorivudine. Due to inhibition of DPD by a sorivudine metabolite, severe systemic exposure to 5-FU caused several acute deaths in Japan (Nishiyama et al. 2000).

5-FU catabolism occurs in various tissues, including tumors, but is highest in the liver (Naguib et al. 1985; Lu et al. 1993). Wide variations in DPD activity (8- to 21-fold) were shown in Caucasians, and 3–5% of Caucasians had reduced DPD activity (Etienne et al. 1994; Lu et al. 1998). This variability, which is partially attributed to genetic defects of the DPD gene (*DPYD*), leads to differential responses of cancer patients, resistance to or increased toxicity of 5-FU (van Kuilenburg 2004). Complete DPD deficiency is also associated with the inherited metabolic disorder, thymine-uraciluria, which is characterized by neurological problems in pediatric patients (Bakkeren et al. 1984).

To date, at least 30 variant *DPYD* alleles have been published, with or without deleterious impact upon DPD activity (Gross et al. 2003; Ogura et al. 2005; Seck et al. 2005; van Kuilenburg 2004; Zhu et al. 2004). Of these variations, a splice site polymorphism, IVS14 +1G>A, which causes skipping of exon 14, is occasionally detected in North Europeans with allele frequencies of 0.01–0.02 (van Kuilenburg 2004). Detection of IVS14 +1G>A in patients suffering from 5-FU-associated grade 3 or 4 toxicity revealed that 24–28% of them were heterozygous or homozygous for this single nucleotide polymorphism (SNP) (van Kuilenburg 2004). However, this SNP has not been reported in Japanese and African-Americans. Recently, Ogura et al. (2005) have shown that a Japanese population exhibits a large degree of interindividual variations in DPD activity of peripheral blood mononuclear cells. They also identified a novel variation, 1097G>C (Gly366Ala), in a healthy volunteer with the lowest DPD activity and demonstrated that the 366Ala variant has reduced activity towards 5-FU in vitro. At present, however, information on variant alleles with clinical relevance in Japanese is limited and cannot fully explain polymorphic DPD activity.

In this study, we searched for genetic variations in *DPYD* by sequencing 5' regulatory regions, all exons and

surrounding introns from 341 Japanese subjects. Fifty-five variations including nine novel nonsynonymous ones were identified. Then, linkage disequilibrium (LD) and haplotype analyses were performed to clarify the *DPYD* haplotype structures in Japanese.

Materials and methods

Human DNA samples

Three hundred and forty-one Japanese subjects in this study included 263 cancer patients and 78 healthy volunteers. All 263 patients were administered 5-FU or tegafur for treatment of various cancers (mainly stomach and colon) at the National Cancer Center, and blood samples were collected prior to the fluoropyrimidine chemotherapy. The healthy volunteers were recruited at the Tokyo Women's Medical University. DNA was extracted from the blood of cancer patients and Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells derived from healthy volunteers. Written informed consent was obtained from all participating subjects. The ethical review boards of the National Cancer Center, the Tokyo Women's Medical University and the National Institute of Health Sciences approved this study.

PCR conditions for DNA sequencing

To amplify 22 exons (exons 2–23) of *DPYD*, multiplex PCRs were performed by using four sets of mixed primers (mix 1 to mix 4 of "first PCR" in Table 1). Namely, five exonic fragments were simultaneously amplified from 50 ng of genomic DNA using 0.625 units of Ex-Taq (Takara Bio. Inc., Shiga, Japan) with 0.20 μ M primers. Because of the high GC content in exon 1 of *DPYD*, this region was separately amplified from 50 ng of genomic DNA with 2.5 units of LA-Taq and 0.2 μ M primers (listed in Table 1) in GC buffer I (Takara Bio. Inc.). The first PCR conditions were 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 1 min, and 72°C for 2 min; and then a final extension for 7 min at 72°C. Next, each exon was amplified separately from the first PCR products by nested PCR (2nd PCR) using the primer sets (0.2 μ M) listed in "second PCR" of Table 1. The second PCR conditions were the same as those of the first PCR, and LA-Taq (2.5 units) for exon 1 and Ex-Taq (0.625 units) for exons 2–23 were used. All PCR primers were designed in the flanking intronic sites to analyze the exon-intron splice junctions. The PCR products were treated with a PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB Co., Cleveland, OH) and sequenced directly on both strands using an ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems,

Table 1 Primer sequences for human DPYD

Amplified and sequenced region		Forward primer	Reverse primer	PCR product (bp)
		Sequences (5' to 3')	Sequences (5' to 3')	Position ^a
First PCR	5'-UTR to exon 1	GTCTGGAAAGGTAATCTGTGATGG	ACGACATACAGGAGGTGAAG	52205443
	Mix 1	CTACTTGGGAGACTAAGGTG	GTATCATTTGTCAATTAGGC	52168732
	Exon 2	TCCCTTCATCTTAGTCAATG	CTGAGGCTTAACATTTATGC	52112876
	Exon 3	TCTGAGAGGAGGGACAGTTA	AATCACAACCTTGGAAAGTGC	52025165
	Exon 4	AAATGGAGGATAACCTGAGT	TAATAAACCCTCTGGGATTC	52006234
	Exon 5	AGAGGAGGACACTTAATGT	TGCTTCAAGCCAACTGCAAA	51984115
	Exon 6	CTCAAAATAATAGTCCCATAGG	CAGTAGACAGACAAAATGCC	51976498
	Exon 7	CACATCGTCTTTGAACATA	CCAACTCCATCCTTTATGAT	51963667
	Exon 8	TGAGGCAAGAATAAACCCTG	TCCGTATGTGTCTTTATTACC	51877795
	Exons 9 and 10	AGAAATACCTTATGATGCCG	GCCTTTTGAATCAAAGATTGC	51858562
	Exon 11	CTCCCTATGCTTCAGTTCAC	TGCCCTGCCCAATTTACTAC	51658114
	Exon 12	CCGCTCTGAAACAATTGACCA	CTGGGATTATAGGCATTAGG	51834279
	Exon 13	GCCTATCTCTGAGCACTA	ATCTTTTGTCTTCTTAGAC	51800450
	Exon 14	CCTTCACTGATTTACATCGG	CCAGCCACATACAGTGAATA	51734704
	Exon 15	AGCCAGTAAAATCCTCTCTA	TATGGAAAAACCTGTCTGACTA	51666815
	Exon 23	TGGAAAGACCCGAACTCTGC	AGCGAAGGGGATTTTACTTTA	51363336
	Exons 17 and 18	TTCTAAAGGCTCTGTTGAGG	TGGCAAAAGAACTGAGAGAC	51589933
	Exon 19	CGTGGATCAAGCAGTTTTC	AGACAGTGGGTTCTGTAAGCC	51519586
	Exon 20	CTGTGACACCAATTACCAITG	TGCCAGTCAATCACCACAGTA	51477733
	Exon 21	GAACTGTATACCCGAGAGAC	AAATGTCCAGGCTTTCCAGA	51382987
Exon 22	GCCATAACAACCTCACACGGG	TTGGCAGAAAGGAATCATAGC	51366885	
Second PCR	5'-UTR to exon 1	TGTGGATGTTTTTGTCTCGC	AGTAAACAGGTCCTCCGACGC	52205586
Exon 2	GTGAACCTGAGATTGTACCCTGC	CATATCCCTTATCAAAAATGCTT	52167924	
Exon 3	GAATGCTACCCAATTAAGTGG	TTCAAAACCAAAATACAGCCTC	52112899	
Exon 4	TGCCAAAGATGAACACAGA	ACCCACAGATAATAGAGAACAAGA	52025273	
Exon 5	TGATGGTCTCTGATAGTATTG	TGTCACTAAAATGTTGGG	52006348	
Exon 6	AAGAAAAGACTGAAAGTTAGCC	GAGCCTGAAGTTCTCTATATGAT	51984201	
Exon 7	TTTACTGTATCTTCACTCCACG	GCTTCTGCCCTGATGTAGC	51976541	
Exon 8	GGCTGACTTTTCAATCTTTTT	CATCTTGGCGAAAATCTCTCC	51963831	
Exon 9	TGTGATTTACGATGTGTACTTGG	GCAAGGTTGGGTGTGAGAG	51879895	
Exon 10	AAAATGGGAATAAAACTGTCTT	TCAGGATATGGAAAGACTTAGCAC	51877859	
Exon 11	ACTGGTAACTGAAACTCAG	CAATCCCTGAAAAGCTAG	51858628	
Exon 12	TCAGTGCCTTCAAATGTGT	ACCAAATAGAAAATGCTCTTATAGA	51834414	
Exon 13	TCGGATGCTGTGTTGAAGTG	TGTGTAATGATAGGTCGTGTC	51800543	

Table 1 Primer sequences for human *DPYD*

Amplified and sequenced region		Forward primer		Reverse primer		PCR product (bp)
		Sequences (5' to 3')	Position ^a	Sequences (5' to 3')	Position ^a	
Exon 14		TGC AAA T A T G T G A G G A G G G A C C	5173287	C A G C A A A G C A A C T G C C A G A T T C	51734877	411
Exon 15		G C T A T C T T A C C C T G C T A T T T T C	51667571	T A G G T A G T G T G T G A A A T C C A A A G G	51667107	465
Exon 16		C C C C T T A T G A G C A C T G A G T A A A T	51658821	T A G T A A C T A T C C A T A C G G G G G	51658440	382
Exon 17		A G T C T A G G T G T A A T A C T G A G G A G G	51591407	A T C A A G T C T C A A C T G G A A A C T	51590986	422
Exon 18		G T G A A G A A C T T T G A G G A A G A C	51590461	C A T C C T G T G C T G T C A C T T T G A	51590026	436
Exon 19		A T T T G C C A G T G A C G C T G T C	51520048	T C A G G T C T C T T C A T A A C T T T G T C A G	51519629	420
Exon 20		G A G A A G T G A A T T T G T T T G G A G	51478265	T T T G T T A G T G A G A A T G T G A G A T G G	51477926	340
Exon 21		A G T G G T C C A A A C A A T G A G T G	51383737	T G C T T G C C A G T G T T C T A A A A	51383221	517
Exon 22		G G G T G C A T T T A T T C T T C T G T C	51367723	G G C T G A T G A A A T G G T A T A A A A A	51367033	691
Exon 23		G T T G T C T A T A G T G T G G C T C T C	51364206	T T T T T C A T A A G A C A A C T G G C A	51363641	566
5'-UTR to exon 1		T G T G G A T G T T T T T G C T C G C	52206503			
5'-UTR to exon 1		C G G A C T G C T T T T A C C T T T T G C	52206258	C C A G A G A G C C A A G T G A C A G C	52205933	
5'-UTR to exon 1		C C C T A G T C T G C C T G T T T T C G	52205987	A G T A A A C A G G T C C C G A C G C	52205586	
Exon 2		G T G C A A A A G T G A G A G A C C G T	52168436	G C C T T A C A A T G T G T G G A G T G A G	52168152	
Exon 3		G A A T G T A C C C A A T T A A A G T G G	52113285	T T C A A A C C A A A T A C A C C C T C	52112899	
Exon 4		T G C C A A A G A T G A A C A C A G A	52025601	A C C C A C A G A T A T A G A G A A C A A G A	52025273	
Exon 5		T G A T G G T T C C T G A T A G T A G T A T T G	52006775	T G T C A C A C T A A A A A T G T T G G G	52006348	
Exon 6		A A A A T A T G T T G A G G A T G T A A G C	51984560	G A G C C T G A A G T T C C T A T A T G A T	51984201	
Exon 7		T T C T A C T G A T C T T C A C T C C A G G	51976953	G C T T C G C C T G A T G T A G C	51976541	
Exon 8		G G C T G A C T T T C A T T C T T T T T	51964221	C A T C T T G C C G A A A T C T C T C C	51963831	
Exon 9		T G T G A T T A C G A T G T G T A C T T G G	51880335	G C A A G G T T G G G T G T G A G A G	51879895	
Exon 10		A A A A T G G G A T A A A A C T G T C T T	51878507	T T C A T C T C T A A A A A T C T G T T G G	51878109	
Exon 11		A C T G G T A A C T G A A A C T C A G	51859069	C A A T T C C C T G A A A G C T A G	51858628	
Exon 12		T C A G T C C C T T C A A A T G T G T	51834881	G A G T A T C A A A A A T A A A T G A A G C A C	51834439	
Exon 13		T C G G A T G C T G T G T T G A A G T G	51800982	T G T G T A A T G A T A G G T G C T G T C	51800543	
Exon 14		T G C A A A T A T G T G A G G A G G G A C C	51735287	C A G C A A A G C A A C T G C C A G A T T C	51734877	
Exon 15		G C T A T C T T A C C C T G C T A T T T C	51667571	T A G T A G T G T G T G A A A T C C A A G G	51667107	
Exon 16		C C C C T T A T G A G C A C T G A G T A A A T	51658821	T A G T A A C T A T C C A T A C G G G G G	51658440	
Exon 17		A G T C A G G T G T A A T A C T G A G G A G G	51591407	A T C A A G T C T C A A C T G G A A A C T	51590986	
Exon 18		G T G A A G A A C T T T G A G G A A G A C	51580461	C A T C C T G T G C T G T C A C T T T G A	51590026	
Exon 19		A T T T G T C C A G T G A C G C T G T C	51520048	C G A A T C T A T T T T T T T T T T T G T C A C	51519715	
Exon 20		G A G A A G T G A A T T T G T T T T G G A G	51478265	T T T G T T A G T G A G A A T G T G A G A T G G	51477926	
Exon 21		T A T C T T C C C A T T T T T C T C T C T C	51383644	T G C C A G T T T C T A A A A A A G T A T A A A	51383225	
Exon 22		G T A T A A A A A C A G G A A A A T G C T G A	51367510	A T A A G G G T G A C A G G A C A G A A A G	51367125	
Exon 23		G T T G T C T A T A G T G T G G C T C T C	51364206	T A T T T G T T T A A T T T T G G A A A G A G	51363821	

^a Nucleotide position of the 5' end of each primer on NT_032977.7

Foster City, CA) with the primers listed in “sequencing” of Table 1. Excess dye was removed with a DyeEx96 kit (Qiagen, Hilden, Germany). The eluates were analyzed on an ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems). All novel SNPs were confirmed by sequencing of PCR products generated from new genomic DNA amplifications. The genomic and cDNA sequences of *DPYD* obtained from GenBank (NT_032977.7 and NM_000110.2, respectively) were used as reference sequences. SNP positions were numbered based on the cDNA sequence, and adenine of the translational initiation site in exon 1 was numbered +1. For intronic polymorphisms, the position was numbered from the nearest exon.

Linkage disequilibrium (LD) and haplotype analyses

Hardy-Weinberg equilibrium and LD analyses were performed by SNPalyze software (Dynacom Co., Yokohama, Japan), and pairwise LD parameters between variations were obtained as the $|D'|$ and rho square (r^2) values. Some haplotypes were unambiguously identified from subjects with homozygous variations at all sites or a heterozygous variation at only one site. Diplotype configurations were inferred by LDSUPPORT software, which determines the posterior probability distribution of the diplotype for each subject based on the estimated haplotype frequencies (Kitamura et al. 2002). Although the nomenclature for nonsynonymous *DPYD* alleles (*DPYD*1* to *DPYD*13*) have been already publicized (McLeod et al. 1998; Collie-Duguid et al. 2000; Johnson et al. 2002), several reported alleles remain unassigned. To avoid confusion with the previous *DPYD* allele nomenclature, our block haplotypes in this study were tentatively defined by using “#” instead of “*”. A group of haplotypes without any amino acid change is designated as #1, and the haplotype groups bearing already defined alleles, *DPYD*5* (Ile543Val), *DPYD*6* (Val732Ile), *DPYD*9* (Cys29Arg) and *DPYD*11* (Val335Leu), were numbered by using the corresponding Arabic numerals, #5, #6, #9, and #11, respectively. Other haplotypes with known nonsynonymous SNPs such as 496A>G (Met166Val) or with the novel nonsynonymous SNP were represented by “#” plus amino acid positions followed by variant residues (for example, #166V). Subtypes within each haplotype group were consecutively named with small alphabetical letters depending on their frequencies. Haplotypes ambiguously inferred in only one patient were indicated in the Fig. 3 legend. Combinations of block haplotypes were analyzed by Haploview software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>) (Barrett et al. 2005), and the long-range (whole gene) haplotypes spanning all blocks were inferred by Hapblock

software (www.cmb.usc.edu/msms/HapBlock/) (Zhang et al. 2005).

Typing data on *DPYD* from unrelated 44 Japanese and 30 Caucasian trios were also obtained from the HapMap project (HapMap release 19: <http://www.hapmap.org/>). The LD profiles and haplotypes of the HapMap data were obtained by Marker beta in Gmap Net (<http://www.gmap.net/marker/>) using its four (1254711, 1254712, 1254713, and 1254714) and six (1166276, 1166277, 1166278, 1166279, 1166280, and 1166281) datasets covering *DPYD* genomic regions for Japanese and Caucasians, respectively.

Drawing of protein structures

The coordinate data (1gth) of the crystal structure of pig DPD (Dobritzsch et al. 2002) was obtained from the Protein Data Bank. Protein Explorer (<http://proteinexplorer.org>) (Martz 2002) was used to display the structural features of pig DPD and depict three-dimensional views.

Results

DPYD variations found in a Japanese population

We identified 55 variations, including 38 novel ones by sequencing the promoter regions (up to 613 bp upstream from the translational initiation site), all 23 exons and their flanking regions of *DPYD* from 341 Japanese subjects (Table 2). The distribution of the variations consisted of 4 in the 5' flanking region, 21 (5 synonymous and 16 nonsynonymous ones) in the coding exons (Fig. 1) and 30 in the introns. Since we did not find any significant differences in allele frequencies between healthy volunteers and cancer patients ($P > 0.05$ by χ^2 test or Fisher's exact test) except for one variation, IVS14 + 19C>A, ($P = 0.027$ by Fisher's exact test); the data for all subjects were analyzed as one group. All detected variations except for 451A>G (Asn151Asp) and IVS13 + 40G>A were in Hardy-Weinberg equilibrium ($P \geq 0.24$).

Thirteen novel variations in the coding region (enclosed by a square in Fig. 1) contain four synonymous SNPs, 474T>C (Phe158Phe), 639C>T (Asp213Asp), 1752A>G (Thr584Thr), and 2424T>C (Ser808Ser) and nine nonsynonymous SNPs, 29C>A (Ala10Glu), 325T>A (Tyr109Asn), 451A>G (Asn151Asp), 733A>T (Ile245Phe), 793G>A (Glu265Lys), 1543G>A (Val515Ile), 1572T>G (Phe524-Leu), 1666A>C (Ser556Arg), and 2678A>G (Asn893Ser). 451A>G (Asn151Asp), 325T>A (Tyr109Asn), and 2678A>G (Asn893Ser) were found at frequencies of 0.009, 0.003 and 0.003, respectively. The others were detected as single heterozygotes (allele frequencies = 0.0015).

Table 2 Summary of *DPYD* SNPs detected in a Japanese population

SNP ID	dbSNP (NCBI)	Location	Position	From the translational initiation site or from the end of nearest exon		Nucleotide change and flanking sequences (5' to 3')	Amino acid change	Reported alleles	Allele frequency (341 subjects)
				NT_032977.7					
MP16_DPD001 ^a		5'-Flank	52206480	-609		TTGCTCGCTCCCTTCCCTCCCGC			0.021
MP16_DPD002 ^a		5'-Flank	52206348	-477		TTGAGGAGTTCCTTGGAAAATGCAGTT			0.026
MP16_DPD003 ^a		5'-Flank	52206137	-266		CTCCTCCCTCCCTAATCTGCTTGCGAG			0.045
MP16_DPD004 ^a		5'-Flank	52206114	-243		AGGCTGGGGGGGG/AGAGCGGGCTGAA			0.0059
MP16_DPD005 ^a		Exon 1	52205843	29		GTAAGGACTCGGC/AGGCACTCGAGGT	Ala10Glu		0.0015
MP16_DPD006 ^a	rs1801265	Exon 2	52168278	85		CATGCACTCTGTTCGTTCCACTTCGG	Cys29Arg	*9	0.029
MP16_DPD007 ^a		Intron 2	52168055	IVS2 + 158		TTTGAAAGTGTATCTTTTAAATTACAC			0.0015
MP16_DPD008 ^a		Intron 3	52113040	IVS3 + 23		GTCACATAGCA/GCAGTCCACAGATG			0.0029
MP16_DPD009 ^a		Exon 5	52006617	325		ATTTTGCAGAACTAATTATGGAGCTG	Tyr109Asn		0.0029
MP16_DPD010 ^a		Exon 5	52006491	451		GAGGACCCATTATGATATTTGGTGGAT	Asn151Asp		0.0088
MP16_DPD011 ^a		Exon 5	52006468	474		ATTGACGCAATTTGCGTACTGAGGTA	Phe158Phe		0.0044
MP16_DPD012 ^a		Intron 5	51984611	IVS5--115		CATATTAATACTG/AAAAATGTACTGCG			0.021
MP16_DPD013 ^a		Exon 6	51984484	496		GTATTCAAAGCA/ATGTGAGTATCCAC	Met166Val		0.022
MP16_DPD014 ^a	rs2297595	Exon 6	51984341	639		GGGTACTCTGACTATCACTATATT	Asp213Asp		0.0088
MP16_DPD015 ^a		Exon 7	51976695	733		GTGAATTTGAGATTTTGAGCTAAATGA	Ile245Phe		0.0015
MP16_DPD016 ^a		Intron 7	51976602	IVS7 + 64		CTCTACACTAAAGT/ATTAACAGCAAA			0.0015
MP16_DPD017 ^a		Exon 8	51964101	793		TTTCAGTGAATG/AAAAATGACTCTTA			0.0015
MP16_DPD018 ^a		Intron 8	51963953	IVS8 + 91		TTCAGACATTTCTGTGTGATGAAAGTT			0.0088
MP16_DPD019 ^a		Intron 9	51878456	IVS9--120		TTTGATAGTGACA/CTTTCATCCTGGA			0.0029
MP16_DPD020 ^b		Exon 10	51878292	1003		ATACGGGAGTCTGTGATTTGACTTG			0.0015
MP16_DPD021 ^a		Intron 10	51878143	IVS10 + 24		CCATCAGAAAAT/AGTGGAGTTGTACT	Val335Leu	*1/	0.0015
MP16_DPD022 ^a		Intron 10	51858934	IVS10-15		TTTCTCTCTGT/CTCTGTTTTGTTTT			0.018
MP16_DPD023 ^a		Intron 12	51800901	IVS12-11		AAGTATTGGTTTG/ATAATTTTGCAGTC			0.038
MP16_DPD024 ^a		Intron 12	51800899	IVS12-9		GTATTGGTTTGGT/ATTTTGCAGTCAC			0.0073
MP16_DPD025 ^a		Exon 13	51800872	1543		TATGGAGCTTCG/ATTTCTGCCAAGC	Val151Ile		0.0015
MP16_DPD026 ^a		Exon 13	51800843	1572		ACTACCCCTCTT/GTACACTCTATT	Phe524Leu		0.0015
MP16_DPD027 ^a	rs1801159	Exon 13	51800788	1627		GGATTGAAGTTT/AGTAAATCCCTTTG	Ile543Val	*5	0.283
MP16_DPD028 ^a		Exon 13	51800749	1666		ACTCCAGCCACCA/GCCACATCAATGA	Ser556Arg		0.283
MP16_DPD029	rs2786783	Intron 13	51800636	IVS13 + 39		AGAAATGCTATCT/ATATATTTTAAAT			0.179
MP16_DPD030	rs2811178	Intron 13	51800635	IVS13 + 40		GAAATGCTATCTG/ATATATTTTAAAT			0.0015
MP16_DPD031 ^a		Intron 13	51735220_51735219	IVS13-47_-48		ATAAAGATTATA-TTAGCTTTTCTTTGT			0.0015
MP16_DPD032 ^a		Exon 14	51735161	1752		GGACATTTGACAG/AAATGTTTCCCCC	Thr584Thr		0.0015
MP16_DPD033 ^f		Exon 14	51735139	1774		CCCAGAATCATCT/CTGGGAACCACT	Arg592Trp		0.0015
MP16_DPD034 ^a	rs17376848	Exon 14	51735017	1896		AAAGCTGACTT/CCAGACAACGTA	Phe632Phe		0.139
MP16_DPD035 ^a		Intron 14	51734989	IVS14 + 19		GTGATTTAACACATCA/TAACAACAAGAGA			0.0088
MP16_DPD036 ^a		Intron 14	51734908	IVS14 + 100		TTAAATGTTATAT/CTTTTAAAGAA			0.0015
MP16_DPD037 ^a		Intron 14	51667533	IVS14-123		GAITTAATTTTTT/CAACAGTTTGAAA			0.155
MP16_DPD038 ^a		Intron 14	51667431	IVS14-21		TGAACCTATAT/CTTTTGTTTTCT			0.0015
MP16_DPD039 ^d		Intron 15	51667267	IVS15 + 75		TAAAGAGCTGCCA/GTGAGAAATAATA			0.155
MP16_DPD040 ^a		Intron 16	51591373	IVS16-127		GGAAATTTGAGAA/AGTATATCATGTAG			0.0015

Table 2 continued

SNP ID	Location	Position	Nucleotide change and flanking sequences (5' to 3')	Amino acid change	Reported alleles	Allele frequency (341 subjects)
This study	dbSNP (NCBI)	NT_032977.7	From the translational initiation site or from the end of nearest exon ^a			
MP16_DPD041 ^b	Intron 16	51591340	IVS16-94			0.378
MP16_DPD042 ^a	Intron 17	51591092	IVS17 + 34			0.0015
MP16_DPD043 ^a	Intron 17	51591079	IVS17 + 47			0.0015
MP16_DPD044	Exon 18	51590313	2194	Val732Ile	*6	0.015
MP16_DPD045 ^b	Intron 18	51519982	IVS18-39			0.032
MP16_DPD046 ^c	Exon 19	51519940	2303	Thr768Lys		0.028
MP16_DPD047 ^a	Exon 19	51519819	2424	Ser808Ser		0.0029
MP16_DPD048 ^a	Exon 21	51383526	2678	Asn893Ser		0.0029
MP16_DPD049 ^a	Intron 21	51383358	IVS21 + 80			0.0015
MP16_DPD050 ^a	Intron 21	51383325	IVS21 + 113			0.0015
MP16_DPD051 ^b	Intron 21	51383302	IVS21 + 136			0.0029
MP16_DPD052 ^a	Intron 21	51383276	IVS21 + 162			0.0029
MP16_DPD053 ^a	Intron 22	51367150	IVS22 + 129			0.0073
MP16_DPD054 ^b	Intron 22	51364164	IVS22-69			0.0029
MP16_DPD055 ^c	Intron 22	51364153	IVS22-58			0.0029

^a Novel variations detected in this study

^b Kouwaki et al. 1998

^c Collie-Duguid et al. 2000

^d Seck et al. 2005

^e Ogura et al. 2005

^f Cho et al. 2007

^g Variations overlapping with the HapMap project