

defined as an "uncertain CR" after confirmation of no progression for at least 3 months. The "uncertain CR" was included as CR when calculating the CR rate. When these criteria were not satisfied, a non-CR was assigned. The existence of erosion, a granular protruded lesion, ulcer scar, and 1.2 w/v% iodine/glycerin-voiding lesions did not prevent an evaluation of CR. The evaluations were performed every month for the first 3 months, and when the criteria for CR were not satisfied at 3 months, the result was changed to non-CR. Follow-up evaluations were performed thereafter every 3 months for 3 years by endoscopy and CT scan. After 3 years, patients were seen every 6 months. During the follow-up period, a routine course of physical examinations and clinical laboratory tests was performed to check the patient's health.

Severe Acute Toxicities during 5-FU/Cisplatin-Based CRT

This 5-FU/cisplatin-based CRT was associated with significant acute toxicities, predominantly leukopenia, stomatitis, and cheilitis.³⁻⁷ Toxicity was evaluated using criteria defined by the Japan Clinical Oncology Group.³⁰ These criteria were based on the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria. Toxicity was assessed on a 2 to 3 day basis during the CRT and subsequent hospitalization period and on every visit after the completion of CRT. Episodes of leukopenia, stomatitis, and cheilitis during the first 2 courses and subsequent 2 weeks (until day 70) were recorded as acute toxicities and those of grade 3 or more as severe acute toxicities.

Survival after 5-FU/Cisplatin-Based CRT

The survival time was defined as the time from the date of treatment initiation to that of death from any cause or to the last date of confirmation of survival. Survival data were updated on December 31, 2006, and the 2 year survival rate was assessed using the data for 38 patients with stage I/II/III/IVa (N = 9/8/16/5).

Systemic Exposure to 5-FU

Aliquots (5 mL) of blood were collected into EDTA-treated tubes at 5 PM on days 3, 10, 38, and 45, and at 5 AM on days 4, 11, 39, and 46.^{31,32} The plasma concentration of 5-FU was determined by high-performance liquid chromatography as described previously, and the systemic exposure to 5-FU was assessed as the area under the concentration time curve for 480 hours (AUC_{480h}), as calculated by 480 hours × the average values of eight measurements. The regimen consisted of four cycles of 120 hour infusions of 5-FU, and the blood sampling times (i.e., at 5 PM on the third day and at 5 AM on the fourth day) corresponded to 54 and 66 hours after the start of infusion for each of four cycles. Reportedly, the apparent elimination half-life of 5-FU is approximately 10 minutes,³³ and the plasma concentration will reach steady-state within a few hours at the most. The association with clinical response was assessed in 44 patients with stage I/II/III/IVa of the disease because preferable response would not be expected for the patients with postoperative recurrence, but severe acute toxicities were assessed in 49 patients.

VEGF Genotyping

VEGF genotypes of T-1498C and G-1154A in the promoter region, C-634G and C-7T in the 5'UTR, and C936T and G1612A in the 3'UTR, were evaluated using peripheral blood and the TaqMan MGB probe-based polymerase chain reaction and confirmed by direct sequencing, as described previously.²⁴ The association with clinical response was assessed in 44 patients with stage I/II/III/IVa of the disease and severe acute toxicities in 49 patients.

Statistical Analysis

All values reported are the mean ± standard deviation. The association of disease stage with the CR rate, the 2 year survival rate, and the AUC_{480h} values of 5-FU was analyzed with Fisher's exact test, log rank test, and an analysis of variance, respectively. The effect of disease stage on the frequency of severe acute toxicities was also examined with Fisher's exact test. The unpaired Student's *t* test/Welch's test were used for the two-group comparison of the AUC_{480h} values of 5-FU. The difference of overall survival curves was also analyzed by log rank test after stratification of patients by the AUC_{480h} values of 5-FU. The effects of VEGF genotypes on the CR rate, or frequency of severe acute toxicities, were assessed with Fisher's exact test.

RESULTS

The demographic and clinicopathologic characteristics of the 49 ESCC patients are summarized in Table 1. The clinicopathologic evaluation indicated that the ratio of well/moderate/poor was 9/29/8, and no data were obtained for 3 patients. The ratio of T1/T2/T3/T4 was 15/5/12/12, that of N0/N1 was 18/26, and that of M0/M1a was 37/7, resulting in a stage I/II/III/IVa ratio of 11/9/17/7; disease stage was not evaluated for 5 patients with postoperative recurrence.

The association between disease stage, the CR rate, 2 year survival rate, and AUC_{480h} values of 5-FU was evaluated with 44 stage I/II/III/IVa ESCC patients, and the results are summarized in Table 2. The CR rate was 50.0% (22/44) and

TABLE 1. Demographic and Clinicopathologic Characteristics of 49 Esophageal Squamous Cell Carcinoma Patients

Age, yr (range)	64.0 ± 7.9 (48–83)
Height, cm (range)	163.8 ± 6.6 (149.7–180.0)
Weight, kg (range)	54.7 ± 9.1 (33.4–72.0)
Sex	Male/female = 45/4
Race	Japanese
Performance status	0/1/2 = 23/21/5
Differentiation	Well/moderate/poor/unknown = 9/29/8/3
TNM	T1/T2/T3/T4 = 15/5/12/12 (n = 44) N0/N1 = 18/26 (n = 44) M0/M1a/M1b = 37/7/0 (n = 44)
Stage	I/II/III/IVa = 11/9/17/7 (n = 44)
Postoperative recurrence	5

Patients with noncervical primary tumors with positive supraclavicular lymph nodes were defined as M1a.

TABLE 2. Complete Response (CR) Rate, 2 Year Survival Rate, and Area Under the Concentration Time Curve (AUC)_{480h} Value of 5-Fluorouracil (5-FU) in 44 Stage I/II/III/IVa Esophageal Squamous Cell Carcinoma Japanese Patients

	N	CR Rate	2 Year Survival Rate (%)	AUC _{480h} of 5-FU, mg*h/L (%)
Total	44	22 (50.0)	19/38 (50.0)	53.9 ± 14.8
I	11	10 (90.9)	7/9 (77.8)	63.4 ± 19.4
II	9	7 (77.8)	6/8 (75.0)	51.2 ± 13.5
III	17	5 (29.4)	5/16 (31.3)	51.1 ± 10.6
IVa	7	0 (0.0)	1/5 (20.0)	49.1 ± 13.5
		<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.002	<i>P</i> = 0.103

The association of disease stage with CR rate, 2-year survival rate, and AUC_{480h} values of 5-FU was analyzed with Fisher's exact test, log-rank test, and analysis of variance (ANOVA), respectively.

depended on disease stage ($P = 0.0000545$, Fisher's exact test). The 2 year survival rate was 50.0% (19/38), again dependent on disease stage ($P = 0.002$, log rank test). The AUC_{480h} value of 5-FU tended to be higher in the patients with stage I ($P = 0.103$, analysis of variance). Seventeen of the 19 patients who survived for at least 2 years had been diagnosed as CR 1 month after the completion of CRT, whereas 16 of 19 patients who died within 2 years had been diagnosed as non-CR. The 2 year survival rate was 85.0% (17/20) for CR patients, whereas it was 11.1% (2/18) for non-CR patients. Of three patients with a CR, two died of head and neck cancers at 9.8 and 4.6 months, and the third died of disease progression/recurrence at 22.4 months. Severe acute leukopenia, stomatitis, and cheilitis were found at a rate of 38.8% (19/49), 12.2% (6/49), and 14.3% (7/49), respectively, and one or more of these severe acute toxicities were observed in 46.9% (23/49) of cases. The effect of disease stage on the frequency of severe acute toxicities was also evaluated, but no association was observed ($n = 44$, $P = 0.842$, Fisher's exact test).

The effect of AUC_{480h} value of 5-FU on the clinical response was evaluated in 44 patients, and the results are summarized in Table 3. The mean AUC_{480h} value of 5-FU in the patients with CR was 58.7 ± 16.8 mg*h/L, which was higher than that in the patients with non-CR, 49.0 ± 10.9 mg*h/L ($n = 44$, $P = 0.029$, Welch's test), but the difference of

TABLE 3. Effect of Area Under the Concentration Time Curve (AUC)_{480h} Value of 5-Fluorouracil (5-FU) (mg*h/L) on Clinical Response in 44 Stage I/II/III/IVa Esophageal Squamous Cell Carcinoma Japanese Patients

	CR		non-CR		<i>p</i>
	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	
Total	22	58.7 ± 16.8	22	49.0 ± 10.9	0.029
I	10	65.3 ± 19.3	1	43.7	—
II	7	52.1 ± 14.7	2	48.0	—
III	5	54.9 ± 11.0	12	49.5 ± 10.5	.388
IVa	0	—	7	49.1 ± 13.5	—

Statistical significance was assessed by unpaired Student's *t*-test/Welch's test.

overall survival curves was not significant after stratification of patients with cutoff of the overall average of 53.9 mg*h/L (Fig. 2) ($P = 0.180$, log rank test). The mean AUC_{480h} value of 5-FU in stage I/II patients with CR was 59.9 ± 18.3 mg*h/L, 1.3 times that in non-CR patients, 46.5 ± 8.7 mg*h/L, but the difference was not significant ($P = 0.095$, unpaired Student's *t* test). The effects of *VEGF* genotypes of T-1498C, G-1154A, C-634G, C-7T, C936T, and G1612A on the clinical response were also evaluated, but no associations were detected ($n = 44$, data not shown, Fisher's exact test).

The effect of AUC_{480h} value of 5-FU on the severe acute toxicities was evaluated in 49 patients, and it was found that the mean AUC_{480h} value of 5-FU was 55.6 ± 15.1 mg*h/L for the patients with one or more of severe acute leukopenia, stomatitis, or cheilitis and 50.9 ± 13.6 mg*h/L for those without ($n = 49$, $P = 0.258$, unpaired Student's *t* test). The associations between *VEGF* genotypes and severe acute leukopenia, stomatitis, and cheilitis are summarized in Table 4. *VEGF* G-1154A resulted in severe acute leukopenia ($P = 0.042$ for genotype, $P = 0.010$ for allele, Fisher's exact test) and cheilitis ($P = 0.025$ for genotype, $P = 0.010$ for allele, Fisher's exact test). *VEGF* T-1498C was also predictive of severe acute cheilitis ($P = 0.033$ for genotype, $P = 0.752$ for allele, Fisher's exact test).

DISCUSSION

Tahara et al.⁶ and Ishikura et al.⁷ recently summarized the data on 5-FU/cisplatin-based CRT in Japanese ESCC patients. Compared with those reports, this study was characterized by a relatively high ratio of patients with T1/T2 (45%

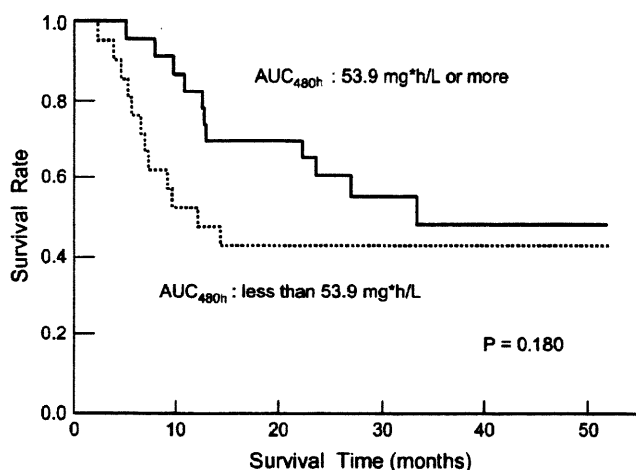


FIGURE 2. Overall survival curves for 44 stage I/II/III/IVa unresectable esophageal squamous cell carcinoma patients with the mean area under the concentration time curve (AUC)_{480h} value of 5-fluorouracil (5-FU) of 53.9 mg*h/L or more ($n = 23$) and that of less than 53.9 mg*h/L ($n = 21$). This cutoff value was the overall mean shown in Table 3. The mean AUC_{480h} value of 5-FU in the patients with complete response (CR) was 58.7 ± 16.8 mg*h/L, which was higher than that in the patients with non-CR, 49.0 ± 10.9 mg*h/L ($P = 0.029$, Welch's test), but the difference of overall survival curves was not significant ($P = 0.180$, log rank test).

TABLE 4. Effects of VEGF Genetic Polymorphisms on Severe Acute Toxicities in 49 ESCC Japanese Patients

	N	Leukopenia		p	Stomatitis		p	Cheilitis		p
		Yes	No		Yes	No		Yes	No	
		19	30		6	41		7	40	
T-1498C	TT	7	16	0.383 (0.258)	2	20	0.464 (0.333)	4	18	0.033 (0.752)
	TC	10	13		3	19		1	21	
	CC	2	1		1	2		2	1	
G-1154A	GG	12	27	0.042 (0.010)	5	33	0.175 (0.628)	4	34	0.025 (0.010)
	GA	5	3		0	7		1	6	
	AA	2	0		1	1		2	0	
C-634G	CC	4	4	0.733 (0.835)	2	6	0.121 (1.000)	1	7	1.000 (1.000)
	CG	9	17		1	24		4	21	
	GG	6	9		3	11		2	12	
C-7T	CC	14	19	0.848 (0.427)	3	28	0.455 (0.450)	7	24	0.163 (0.066)
	CT	5	10		3	12		0	15	
	TT	0	1		0	1		0	1	
C936T	CC	11	21	0.369 (0.796)	4	26	1.000 (1.000)	4	26	0.762 (1.000)
	CT	8	7		2	13		3	12	
	TT	0	2		0	2		0	2	
G1612A	GG	17	23	NC (0.475)	6	32	NC (0.598)	6	32	NC (1.000)
	GA	2	7		0	9		1	8	
	AA	0	0		0	0		0	0	

Episodes of leukopenia, stomatitis, and cheilitis during first 2 courses and subsequent 2 weeks (until day 70) were recorded as acute toxicities and those of grade 3 or more, as severe acute toxicities. The statistical significance was assessed with Fisher's exact test, and values for allele frequencies are in parentheses.

vs. 19%) or stage I/II (45% vs. 31%), but the CR rate of 50.0% was only slightly lower than in the previous reports, 56% to 58%,^{6,7} and the 2 year survival rate was 50.0%, again consistent with other results (i.e., a 3 year survival rate of 37–38%).^{6,7} Thus, because of the relatively high ratio of T1/T2 or stage I/II, it can be concluded that the CR rate was lower in this study, especially for stage II. This is, in part, because of the re-evaluation of the clinical response at 3 months after the completion of CRT and might reflect the higher 2 year survival rate, 85.0%, for the patients with CR versus approximately 75% in the previous studies.^{6,7}

The clinical response or survival rate could be predicted by using disease stage (Table 2). A CR rate of more than 70% was expected for the patients with stage I/II, compared with only 30% at maximum for stage III/IVa. The survival rate was well correlated with the clinical response, consistent with other reports.^{6,7,32} In this study, the AUC_{480h} value of 5-FU proved potentially useful for predicting the clinical response; that is, it was higher in the patients with CR than those with non-CR (Table 3). Statistical significance was obtained for all patients ($P = 0.029$), but the analysis was not powered to reach significance for stage I/II ($P = 0.095$) because of the small number of the patients with non-CR ($n = 3$). Pharmacokinetically guided administration has been studied for many antitumor agents,⁸ and, for 5-FU, the AUC value is understood to be a more useful predictor for efficacy and toxicity.⁹ For continuous 120 hour infusion, the threshold value for AUC was suggested to be 25 to 30 mg*h/L to provide a higher efficacy or toxicity.⁹ In our study, the mean AUC_{480h} values in the patients with CR and non-CR were 58.7 and 49.0 mg*h/L, respectively, comparable with the threshold value. In this

study, no measurement was performed for the plasma concentrations of platinum or cisplatin. In a systematic review published recently,³⁴ it was suggested that pharmacokinetically guided administration may be useful for carboplatin but not for cisplatin. There is little evidence for cisplatin, presumably because of its long half-life of more than 100 hours.

The expression of VEGF in solid tumors is predictive of resistance to radiotherapy, chemotherapy, and endocrine therapy,^{16–20} and, previously, we found that T-1498C in linkage with G-1190A, C-7T, and possibly C-634G resulted in higher levels of VEGF mRNA in colorectal adenocarcinomas,²⁴ but the association with VEGF genotypes were not confirmed in this study. Taken together, the AUC_{480h} value of 5-FU, but not VEGF genotype, would be useful as an additional marker of the clinical response.

Severe acute leukopenia, stomatitis, and cheilitis were independent of disease stage. The AUC_{480h} value of 5-FU was not a predictor for these severe acute toxicities. However, the VEGF genotype of G-1154A, but not of C-634G, C-7T, C936T, or G1612A, was associated with severe acute leukopenia and cheilitis, and VEGF T-1498C was also predictive of cheilitis (Table 4). Recent investigations have suggested that VEGF regulates hematopoietic stem cell survival by way of an internal autocrine loop mechanism.²¹ The migration of hematopoietic progenitor cells is reduced after treatment with VEGFR1 antibody, resulting in anti-inflammatory effects.²² The recruitment of VEGFR1-positive hematopoietic stem cells to a proliferative bone marrow microenvironment suggests VEGF-related hematopoiesis after the bone marrow's destruction.²³ Thus, VEGF and related proteins are important regulators of hematopoietic cell

development, survival, differentiation, and migration.¹⁶⁻²⁰ The effect of *VEGF* G-1154A on leukopenia found in this study might occur by way of an influence on VEGF expression in hematopoietic stem cells. In contrast, there are few experimental data suggesting an association with mucositis. VEGF is understood to be a key factor for aphthous ulceration, but its association is still being debated.^{35,36} *VEGF* genetic polymorphisms were investigated with regard to the genetically controlled production of VEGF; C-2578A,²⁵ G-1154A,²⁵ C-634G,²⁶ and C936T^{27,28} resulted in lower levels in plasma. G-1154A and C-634G were associated with lower levels, but C-2578A was associated with higher levels in non-small cell lung cancer,²⁹ and T-1498C and C-7T resulted in higher levels in colorectal adenocarcinomas.²⁴ Linkage disequilibrium among C-2578A, G-1154A, and C-634G suggests the importance of analyzing haplotypes for predicting the expression and susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis.^{37,38} Although no data are available for genetic effects on VEGF levels in bone marrow or hematopoietic cells, *VEGF* genotyping, not monitoring of plasma concentration of 5-FU, might be a promising tool for the prediction of severe acute leukopenia and cheilitis.

CONCLUSION

VEGF G-1154A was a predictor of severe acute toxicities during a 5-FU/cisplatin-based CRT in Japanese ESCC patients, whereas the AUC_{480h} value of 5-FU was predictive of the clinical response.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Associate Professor Chiho Ohbayashi, in the Surgical Pathology Division, Kobe University Hospital, for support with the pathohistologic examination and suggestions.

REFERENCES

- Cooper JS, Guo MD, Herskovic A, et al. Chemoradiotherapy of locally advanced esophageal cancer: long-term follow-up of a prospective randomized trial (RTOG 85-01). Radiation Therapy Oncology Group. *JAMA*. 1999;281:1623-1627.
- Minsky BD, Pajak TF, Ginsberg RJ, et al. INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy. *J Clin Oncol*. 2002;20:1167-1174.
- Ohtsu A, Boku N, Muro K, et al. Definitive chemoradiotherapy for T4 and/or M1 lymph node squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol*. 1999;17:2915-2921.
- Kaneko K, Ito H, Konishi K, et al. Definitive chemoradiotherapy for patients with malignant stricture due to T3 or T4 squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer*. 2003;88:18-24.
- Hironaka S, Ohtsu A, Boku N, et al. Nonrandomized comparison between definitive chemoradiotherapy and radical surgery in patients with T(2-3) N(any) M(0) squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;57:425-433.
- Tahara M, Ohtsu A, Hironaka S, et al. Clinical impact of criteria for complete response (CR) of primary site to treatment of esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2005;35:316-323.
- Ishikura S, Nihei K, Ohtsu A, et al. Long-term toxicity after definitive chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus. *J Clin Oncol*. 2003;21:2697-2702.
- van den Bongard HJ, Mathôt RA, Beijnen JH, et al. Pharmacokinetically guided administration of chemotherapeutic agents. *Clin Pharmacokinet*. 2000;39:345-367.
- Ploylearmsaeng SA, Fuhr U, Jetter A. How may anticancer chemotherapy with fluorouracil be individualised? *Clin Pharmacokinet*. 2006;45:567-592.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-985.
- Criscuolo GR, Merrill MJ, Oldfield EH. Further characterization of malignant glioma-derived vascular permeability factor. *J Neurosurg*. 1988;69:254-262.
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;161:851-858.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*. 1989;84:1470-1478.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246:1306-1309.
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989;246:1309-1312.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signaling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:359-371.
- Han W, Yu Y, Liu XY. Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration. *Cell Res*. 2006;16:189-195.
- Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol*. 2001;2:667-673.
- Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109:227-241.
- Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett*. 2006;580:2879-2887.
- Gerber HP, Malik AK, Solar GP, et al. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*. 2002;417:954-958.
- Luttun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med*. 2002;8:831-840.
- Hattori K, Heissig B, Wu Y, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med*. 2002;8:841-849.
- Yamamori M, Sakaeda T, Nakamura T, et al. Association of VEGF genotype with mRNA level in colorectal adenocarcinomas. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325:144-150.
- Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:260-264.
- Awata T, Inoue K, Kurihara S, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:1635-1639.
- Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, et al. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*. 2000;37:443-448.
- Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2003;106:468-471.
- Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, et al. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004;46:293-298.
- Tobinai K, Kohno A, Shimada Y, et al. Toxicity grading criteria of the Japan Clinical Oncology Group (The Clinical Trial Review Committee of the Japan Clinical Oncology Group). *Jpn J Clin Oncol*. 1993;23:250-257.
- Miki I, Tamura T, Nakamura T, et al. Circadian variability of pharmacokinetics of 5-fluorouracil and CLOCK T3111C genetic polymorphism in patients with esophageal carcinoma. *Ther Drug Monit*. 2005;27:369-374.
- Okuno T, Tamura T, Yamamori M, et al. Favorable genetic polymorphisms predictive of clinical outcome of chemoradiotherapy for Stage II/III esophageal squamous cell carcinoma in Japanese. *Am J Clin Oncol*. 2007;30:252-257.

33. Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, et al. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res.* 1987;47:2203–2206.
34. Loh GW, Ting LS, Ensom MH. A systematic review of limited sampling strategies for platinum agents used in cancer chemotherapy. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46:471–494.
35. Arbiser JL, Johnson D, Cohen C, et al. High-level expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in an aphthous ulcer. *J Cutan Med Surg.* 2003;7:225–228.
36. Brozovic S, Vucicevic-Boras V, Mravak-Stipetic M, et al. Salivary levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med.* 2002;31:106–108.
37. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003;34:383–394.
38. Prior SJ, Hagberg JM, Paton CM, et al. DNA sequence variation in the promoter region of the VEGF gene impacts VEGF gene expression and maximal oxygen consumption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290:1848–1855.

食道がん化学放射線療法における5-フルオロウラシル血漿中濃度と治療効果との相関

栞原晶子¹, 山森元博¹, 門脇祐子¹, 八木敬子², 中村 任^{1,3}, 奥野達哉^{3,4}, 茶屋原菜穂子^{3,4}, 三木生也⁴,
田村孝雄⁴, 平井みどり^{1,3}, 柴田敏之^{*1,3,5}

Association of the Plasma Concentration of 5-Fluorouracil with Clinical Efficacy after FP+RT
Chemoradiotherapy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Japanese

Akiko KUWAHARA¹, Motohiro YAMAMORI¹, Yuko KADOWAKI¹, Keiko YAGI², Tsutomu NAKAMURA^{1,3},
Tatsuya OKUNO^{3,4}, Naoko CHAYAHARA^{3,4}, Ikuya MIKI⁴, Takao TAMURA⁴, Midori HIRAI^{1,3},
Toshiyuki SAKAEDA^{*1,3,5}

Department of Hospital Pharmacy, Kobe University, 7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan¹

Department of Clinical Pharmacy, Kobe Pharmaceutical University, 4-19-1 Motoyamakitamachi, Higashinada-ku,
Kobe 658-8558, Japan²

Division of Clinical Pharmacokinetics, Department of General Therapeutics, Kobe University Graduate School of
Medicine, 7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan³

Division of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Department of Clinical Molecular Medicine, Kobe University
Graduate School of Medicine, 7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan⁴

Center for Integrative Education of Pharmacy Frontier (Frontier Education Center), Graduate School of
Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan^{*5}

ABSTRACT

The association of plasma concentration of 5-fluorouracil (5-FU) with clinical efficacy, i.e., clinical response and prognosis, after treatment with one of the standard protocols of 5-FU/cisplatin (CDDP) - based chemoradiotherapy, i.e., FP+RT therapy, was evaluated in 30 Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Here, one course of treatment consisted of protracted venous infusions of 5-FU (400 mg/m²/24 h for day 1-5 and 8-12) and CDDP (40 mg/m²/3 h on day 1 and 8), and radiation

(2 Gy/day on day 1-5, 8-12 and 15-19), and a second course was successively repeated after a 2-week interval. Clinical response was evaluated about 1 month after the completion of FP+RT therapy as well as the prognosis. A total of 8 measurements of the plasma concentration of 5-FU was done per patient, by means of high performance liquid chromatography, and their average values were adopted as the data. It was found that the plasma concentration of 5-FU tended to be independent of disease stage. Prognosis was associated with the plasma concentrations of 5-FU, and presumably clinical response could be also, that is, the values

1 Akiko KUWAHARA, Motohiro YAMAMORI, Yuko KADOWAKI, Tsutomu NAKAMURA, Midori HIRAI, Toshiyuki SAKAEDA

神戸大学医学部附属病院薬剤部 (〒650-0017神戸市中央区楠町7-5-2)

2 Keiko YAGI, Midori HIRAI

神戸薬科大学臨床薬学研究室 (〒658-8558神戸市東灘区本山北町4-19-1)

3 Tsutomu NAKAMURA, Tatsuya OKUNO, Naoko CHAYAHARA, Midori HIRAI, Toshiyuki SAKAEDA

神戸大学大学院医学系研究科薬物動態学分野 (〒650-0017神戸市中央区楠町7-5-2)

4 Tatsuya OKUNO, Naoko CHAYAHARA, Ikuya MIKI, Takao TAMURA

神戸大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝・内分泌内科学分野 (〒650-0017神戸市中央区楠町7-5-2)

5 Toshiyuki SAKAEDA*

京都大学大学院薬学研究科統合薬学フロンティア教育センター (〒606-8501京都府京都市左京区吉田下阿達町46-29)

受付日: 2007.12.20

受理日: 2008.5.21

tended to be higher in the patients with CR than those with non-CR ($p=0.100$), and the patients with survival of more than 2 years showed higher values compared with those with less than 2-years survival ($p=0.047$). Examination with each of 8 points suggested that the plasma concentrations on day 4 ($p=0.053$) and day 10 ($p=0.062$) might be predictive of prognosis, hopefully instead of the average values of 8 measurements. Collectively, the monitoring of 5-FU plasma concentration is one of promising way to optimize the FP+RT therapy, via the dose-adjustment of 5-FU.

Keywords : esophageal squamous cell carcinoma, chemoradiotherapy, 5-fluorouracil, plasma concentration, clinical response

要 旨

食道がんに対する標準的治療のひとつである化学放射線療法（以下、FP+RT療法）に関して、30症例を対象に、5-フルオロウラシル（以下、5-FU）血漿中濃度と治療効果との相関を解析した。FP+RT療法とは、5-FUの120時間持続点滴投与（400 mg/m²/day, 1～5日目, 8～12日目）、シスプラチン（以下、CDDP）の3時間点滴投与（40 mg/m²/day, 1日目, 8日目）、放射線照射（2Gy/day, 1～5日目, 8～12日目, 15～19日目）を1コースとし、2週間の休薬期間を設け、2コース目を繰り返す方法である。治療効果の指標として、治療終了約4週間後に、常法に従い抗腫瘍効果を評価するとともに、予後を解析した。患者1名あたり8点の採血を行い、高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC）で、5-FU血漿中濃度を測定し、8点の平均値をデータとして採用した。その結果、1）病期と5-FU血漿中濃度は相関しないこと、2）治療終了約4週間後における評価にて著効（complete response；以下、CR）となった症例では、non-CR症例と比較して、5-FU血漿中濃度が高い傾向にあること（ $p=0.100$ ）、3）生存期間が2年以上であった症例では、2年未満であった症例と比較して、5-FU血漿中濃度が有意に高いこと（ $p=0.047$ ）が明らかになった。また、8点個々の値と予後との関係を解析した結果、4）予後の指標とする採血ポイントとしては、1コース目の4日目と10日目に設定できる可能性があること（ $p=0.053\sim 0.062$ ）が明らかとなった。すなわち、FP+RT療法の適用に際し、患者個々に、5-FU血漿中濃度のモニタリングを行い、5-FU血漿中濃度の結果に基づいて、5-FUの投与量を最適化できる可能性があると思われた。

索引用語：食道がん, 化学放射線療法, 5-フルオロウラシル, 血漿中濃度, 治療効果

I はじめに

一般的に、がん化学療法においては、治療効果や副作用発現に明らかな個人差が観察され、患者個々に最適な治療計画を立てることが火急の課題とされており、これらの点、食道がんも例外ではない。本邦では、食道がんに対して、1999年、Ohtsuらにより、5-FUの5日間持続点滴投与、CDDPの点滴投与、ならびに放射線照射を併用する化学放射線療法、いわゆる、FP+RT療法が提唱されており¹⁾、多数症例による長期間の予後に関する詳細な情報が収集され²⁻⁵⁾、現在では、FP+RT療法は食道がんに対する標準的治療法のひとつであると認識されている。

我々は、FP+RT療法の最適化を目的として、様々な検討を行ってきた⁶⁻⁸⁾。まず、治療効果や副作用発現の指標の探索を目的として、各種遺伝子の多型とともに、5-FU血漿中濃度に注目した。FP+RT療法は5-FU、CDDPおよび放射線照射から構成されているが、このうち、CDDPが不適と思われる患者に対しては、投与量を減量しても、CDDPを投与しなければならないというエビデンスはなく、多くの場合で、CDDP以外の白金系抗がん剤に変更される。これと比較して、5-FUの代替になる同種の抗がん剤はなく、投与量を減量せざるを得ないが、何を指標に、どの程度減量するかの方法は確立されていない。さらには、CDDPの血漿中濃度の測定は非常に困難であり、白金濃度でCDDPの体内動態を表現せざるを得ない一方で、5-FUの血漿中濃度の測定は比較的簡便である。以上のような状況を勘案し、放射線の照射量とともに、5-FUの投与量を変更することによって、FP+RT療法を最適化できるのではないかと考えた。患者ひとりあたり8点の採血を行い、その結果、これまでに、1）5-FU血漿中濃度の個体間変動と個体内変動（日内変動）が非常に大きいことを明らかにするとともに⁶⁾、さらに、2年間の予後を追跡調査し、2）病期と予後が相関すること、3）治療終了約4週間後における評価、具体的にはCRであるか否かで予後が決定することを明らかにした⁸⁾。すなわち、非常に優れた抗腫瘍効果が認められない限り予後も良好とはならないと予測できることから、抗腫瘍効果に影響を与える因子を患者個々に最適化することにより、予後を改善できる可能性があると考えられた。そこで、本研究では、神戸大学医学部附属病院（以下、当院）にてFP+RT療法を受けた患者30名を対象に、5-FU血漿中濃度と治療終了約4週間後における評価との関係を解析し、さらには、予後との関係も解析した。

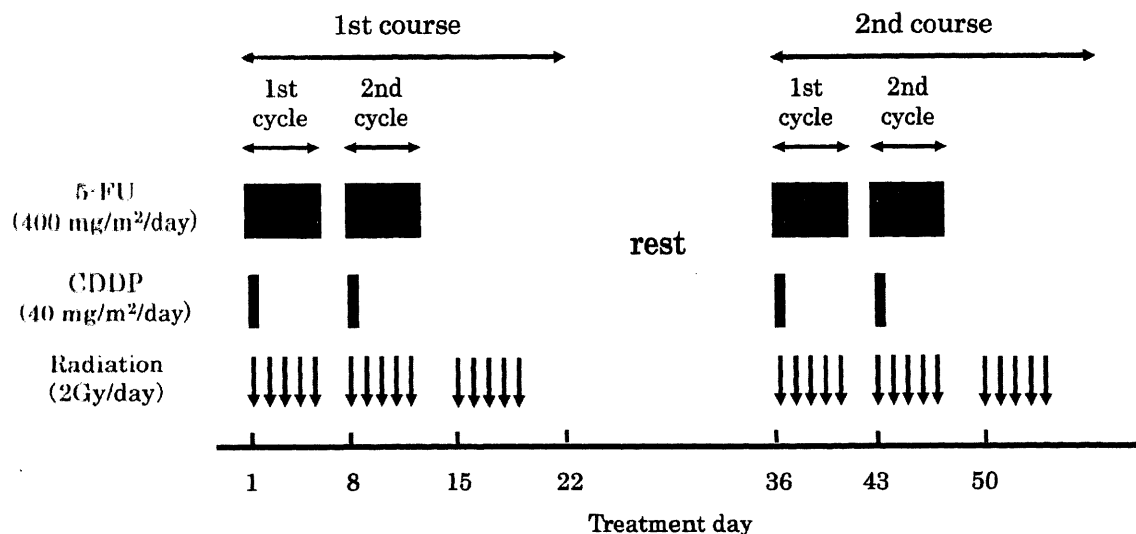


図1 FP+RT療法の標準スケジュール

表1 患者背景

患者数	30	(M29, F1)
身長 (cm)	164.6 ± 6.8	(149.7-180.0)
体重 (kg)	56.3 ± 9.4	(37.2-73.6)
年齢 (才)	65.8 ± 7.2	(48-78)
観察期間 (月)	22.1 ± 14.9	(2-46.2)
CR 0/1/2/不明	14/14/1/1	
Stage I/IIA/IIIB/IIIC/IVA/IVB/術後再発	10/5/3/6/2/1/3	

II 対象及び方法

1. FP+RT療法の標準スケジュール

FP+RT療法の標準スケジュールを図1に示した。FP+RT療法とは、5-FUの5日間持続点滴投与（400 mg/m²/day, 1～5日目, 8～12日目）、CDDPの点滴投与（40 mg/m²/day, 1日目, 8日目）、放射線照射（2 Gy/day, 1～5日目, 8～12日目, 15～19日目）を1コースとし、2週間の休薬期間を設け、引き続き2コース目を施行する治療レジメンである。

2. 解析対象患者

2002年8月から2005年5月の間に治療を受け、標準スケジュールを完遂した患者30例を対象とした。患者背景を表1に示した。病期分類には、UICC (The International Union Against Cancer) のTNM (tumor, node, metastasis) 分類を用いた。なお本研究は、ヘルシンキ宣言の趣旨を尊重し、研究の対象となる個人の人権の尊重、理解を求める同意を得る方法、研究対象となる個人への不利益および危険性について詳述した上で、研究内容について理解を求め、被験者となる同意を得る方法を明記した研究計画書を神戸大学医学部医学倫理委員会に

提出し、承認を得ている。研究目的で利用される診療情報については、別途設定した個人情報管理者により連結可能匿名化されており、新たに定義されたコード番号で取り扱われるため、個人情報は保護されている。

3. 5-FU血漿中濃度測定

1) 採血および前処理

患者ひとりあたり合計8点、すなわち、1コース目における3日目、10日目の17時、4日目、11日目の5時、2コース目における38日目、45日目の17時、39日目、46日目の5時に、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム塩 (EDTA-2Na) 処理した採血管を用いて、採血を行った。直ちに、遠心分離 (3,000 rpm × 10分) により血漿を分離し、測定まで-80℃で凍結保管した。

2) 5-FU血漿中濃度測定法

5-FU血漿中濃度を、UV検出器 (SPD-6 AV, 島津製作所株) を備えたHPLCシステム (LC-6 A, 島津製作所株) で定量した。カラムには逆相用カラム (CHEMCOSORB, 5-ODS-H, 4.6 mm × 250 mm; ケムコ (株)) を、移動相には10 mM酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.0:メタノール=99:1 (v/v) を用いた。また、内部標準物質として5-ブromouracil (以下、5-BrU) を用いた。これらの試薬類は入手できる最高純度のものを購入して用いた。流速は1.5 mL/min, カラム温度は40℃, 測定波長は266 nmに設定した。以上の条件で、5-FUの保持時間は3.6～4.0分, 5-BrUの保持時間は7.8～8.5分であった。測定毎に、検量線用のサンプルを同時に測定し、ピーク面積比を基準に検量線を構築した。検量線の相関係数r²は、常に、0.999以上であった。定期的に、3水準の濃度のクオリティーコントロールサンプル (健康人血漿を利用) を用いて精度の検討を行い、問題がないことを確認した。精度に問題がなくとも、カラ

ム圧が初期の10%以上上昇した時点で、新規なカラムに交換した。

4. 治療終了約4週間後における評価

常法に従い、FP+RT療法による治療終了約4週間後に抗腫瘍効果を評価した。内視鏡による標的病変の評価にリンパ節の評価を加えて総合的に評価した。標的病変がすべて消失したものをCRとし、標的病変の縮小が25%までのものを有効 (partial response ; PR), 以下, 不変 (stable disease ; SD), 進行 (progressive disease ; PD) とした。

5. 予後の評価

30例中24例で、観察期間が2年以上であり、このうち病期不明例, 転帰不明例, 2年生存率算出不能例, 各1例を除外した21例を対象に, 2年生存率を算出した。また, Kaplan-Meier法を適用し, 予後を推定した。

6. データ処理および統計処理

8点の5-FU血漿中濃度の平均値を算出し, 当該患者の5-FU血漿中濃度データとして, 病期, 治療終了約4週間後における評価および予後との関係を解析した。さらに, 8点個々の値と予後との関係も解析した。値は平均±標準偏差で表記した。5-FU血漿中濃度の2群間比較には, unpaired Student's *t*-test もしくはWelch's test を用いた。3群以上の比較は, 分散分析 (ANOVA) で行った。また, 頻度, 予後の群間比較には, 各々, Fisher's exact test, Log-rank testを用いた。

Ⅲ 結果

1. 病期と5-FU血漿中濃度との関係

表2に結果を示した。術後再発3例を除外し, 27例を対象として, データをまとめた。Stage Iにおいて5-FU血漿中濃度が若干高い傾向にあったが, 病期と5-FU血漿中濃度との間には, 有意な関係は認められなかった ($p=0.729$, ANOVA)。

2. 治療終了約4週間後における評価と5-FU血漿中濃度との関係

表3に結果を示した。術後再発3例と評価不能1例を除外し, 26例を対象とした。有意な関係は認められなかったものの, CR症例では, non-CR症例と比較して, 5-FU血漿中濃度が高い傾向にあった ($p=0.100$, unpaired Student's *t*-test)。

3. 予後と5-FU血漿中濃度との関係

表4に結果を示した。生存期間が2年以上であった症例では, 2年未満であった症例と比較して, 5-FU血漿

表2 病期と5-FU血漿中濃度 (8点の平均値) との関係

病期	N	平均血漿中濃度 (μg/mL)
Stage I	10	0.121 ± 0.048
Stage II	8	0.111 ± 0.027
Stage III	6	0.100 ± 0.030
Stage IV	3	0.107 ± 0.040
全体	27	0.112 ± 0.037

Stage I vs II vs III vs IV : $p=0.729$ (ANOVA)

表3 治療終了約4週間後における評価と5-FU血漿中濃度 (8点の平均値) との関係

	N	平均血漿中濃度 (μg/mL)
CR	17	0.122 ± 0.037
non-CR	9	0.098 ± 0.028
全体	26	0.114 ± 0.036

CR vs non-CR : $p=0.100$ (unpaired Student's *t*-test)

表4 予後と5-FU血漿中濃度 (8点の平均値) との関係

生存期間	N	平均血漿中濃度 (μg/mL)
2年以上	12	0.126 ± 0.037
2年未満	9	0.093 ± 0.032
全体	21	0.112 ± 0.038

2年以上 vs 2年未満 : $p=0.047$ (unpaired Student's *t*-test)

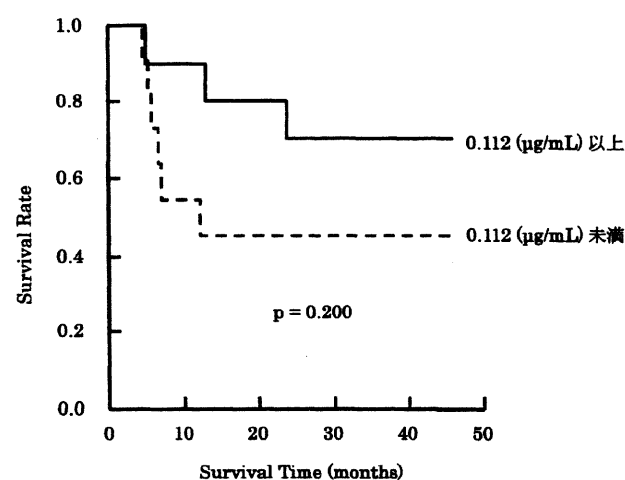


図2 5-FU血漿中濃度と生存曲線との関係 (N=21)
平均血漿中濃度0.112 μg/mLをカットオフ値として2群の比較を行った。Log-rank testにより検定を行った結果, 危険率は0.200であった。

表 5 予後と1コース目の5-FU血漿中濃度との関係

	N	第1サイクル		第2サイクル	
		3日目	4日目	10日目	11日目
		17:00	5:00	17:00	5:00
2年以上	12	0.112±0.080	0.095±0.051	0.186±0.095	0.136±0.040
2年未満	9	0.083±0.063	0.048±0.041	0.106±0.056	0.132±0.044
		p = 0.420 ^{a)}	p = 0.053 ^{a)}	p = 0.062 ^{b)}	p = 0.097 ^{b)}

a) unpaired Student's t-test ; b) Welch's test

表 6 予後と2コース目の5-FU血漿中濃度との関係

	N	第1サイクル		第2サイクル	
		38日目	39日目	45日目	46日目
		17:00	5:00	17:00	5:00
2年以上	12	0.124±0.068	0.096±0.043	0.158±0.066	0.125±0.064
2年未満	9	0.088±0.034	0.074±0.040	0.122±0.049	0.106±0.046
		p = 0.165 ^{a)}	p = 0.240 ^{a)}	p = 0.297 ^{b)}	p = 0.449 ^{a)}

a) unpaired Student's t-test ; b) Welch's test

中濃度が有意に高いことが明らかとなった ($p=0.047$, unpaired Student's *t*-test)。なお、両群における病期の比率は、各々、Stage I/II/III/IV =5/5/2/0, 1/2/3/3であり、両群間に有意差を認めるには至らなかった ($p=0.095$, Fisher's exact test)。続いて、Kaplan-Meier法を用いて、5-FU血漿中濃度を指標とした予後推定の可能性について検討を行った。21例の平均血漿中濃度 $0.112 \mu\text{g/mL}$ をカットオフ値として2群間の比較を行った結果を図2に示した。5-FU血漿中濃度が高いほど、生存期間が長い傾向にあることが確認できた ($p=0.200$, Log-rank test)。

4. 予後と、個々の5-FU血漿中濃度との関係

表5、表6に結果を示した。1コース目、2コース目、合計8点の採血ポイント全てにおいて、生存期間が2年以上であった症例では、2年未満であった症例と比較して、5-FU血漿中濃度が高い傾向にあることが確認できた。特に、1コース目の4日目と10日目において、生存期間による差が大きかったものの、これら2点を含め8点全てで、有意差を得るには至らなかった。

Ⅳ 考察

日本人の食道がんの多くは扁平上皮がんであり、本邦では、これまで、外科的処置が食道がんに対する標準的治療法であるとされてきた。しかしながら、従来から、遠隔転移の改善が期待できないこと、進行がんでは治療が期待できないこと、治療後のQuality of Lifeの低下が著しいこと、などの問題点が指摘されており、1990年代に入りようやく、各種の集学的な治療法の開発が検討されるようになった。このような中、Ohtsuらによって提唱されたFP+RT療法は、切除不能であるT4/M1a症例においても、CR率が33%、3年生存率が23%と、非常に良好な成績を示した¹⁾。続いて、本邦の他施設においても非常に優れた治療成績が得られること²⁾、T2/3症例を対象に外科的処置と同等以上の治療成績が望めること³⁾などが明らかとされるとともに、多数例による長期間の予後に関する詳細な情報が収集され^{4,5)}、現在では、FP+RT療法は、食道がん、特に進行性の食道がんに対する標準的治療法のひとつであると認識されている。食道がんは、局所に腫瘤を形成するとともに、早期の段階でリンパ節転移を来し、全身疾患としての性格をもつことから、局所治療としての放射線療法と全身治療としての化学療法という理解の上、理にかなった治療戦略として推進されている⁹⁾。しかしながら、他のがん化学療法と同様に、治療効果や副作用発現における明らかな個人差が問題となっており、FP+RT療法の適用が望ましい患者の識別方法、もしくは患者個々に最適なFP+RT療法のスケジュールの設定方法の確立が課題となってい

る。具体的には、外科的処置との併用、5-FUやCDDPの投与量や投与方法の変更、CDDP以外の白金系抗がん剤への変更、放射線照射量の変更などについて、医学的、薬学的な観点から、様々な論議が行われており、また一部、臨床的な検討も行われている。

我々は、FP+RT療法の最適化を目的とし、5-FU血漿中濃度に注目し、様々な検討を行ってきた⁶⁻⁸⁾。本研究では、当院にてFP+RT療法を受けた患者30名を対象に、5-FU血漿中濃度と治療効果、すなわち治療終了約4週間後における評価もしくは予後との関係を解析した。一般的には、病期により治療効果が推定可能とされており、この点、我々はこれまでに、CR率もしくは2年生存率が病期に依存することを明らかにしている⁸⁾。本研究にて、Stage Iで5-FU血漿中濃度が若干高い傾向にあるものの、全体的には、病期と5-FU血漿中濃度が相関しないことが明らかとなり(表2)、病期と治療効果との関係は、5-FU血漿中濃度を介したものではないと推察された。一方、本研究により、生存期間が2年以上であった症例では、2年未満であった症例と比較して、病期の比率に違いがないものの、5-FU血漿中濃度が有意に高いことが明らかとなった(表4)。ただし、治療終了約4週間後における評価との相関は有意差を得るには至らなかった(表3)。上述したように、病期による治療効果の推定は可能であるが、病期と5-FU血漿中濃度が相関しないと推察されることから、5-FU血漿中濃度によって、抗腫瘍効果もしくは予後の推定が可能であると思われた。すなわち、FP+RT療法の適用に際し、患者個々に、5-FU血漿中濃度のモニタリングを行い、5-FU血漿中濃度の結果に基づいて、5-FUの投与量を最適化できる可能性があると思われた。ただし、より多くの症例を対象に検討を行い、治療効果に対する病期および5-FU血漿中濃度の影響についての多変量解析を行い、5-FU血漿中濃度モニタリングの有用性について明らかにすることが必要と思われた。

ところで、以上の結果は、患者ひとりあたり8点の採血を行い、8点の5-FU血漿中濃度の平均値による検討結果である。しかしながら、患者ひとりあたり8点の採血を行うことは実用的でなく、1~2点の採血により、治療方針を設定することが望ましい。5-FUの半減期は10分程度とされており、持続点滴投与した場合、定常状態に達するまでにそれほど時間を要しない。よって、理論的には、8点の5-FU血漿中濃度は同じであり、1~2点の採血で十分のはずである。しかしながら、現実的には、5-FU血漿中濃度の個体間変動と個体内変動(日内変動)は非常に大きく、8点の5-FU血漿中濃度は一定にならない(表5、表6)。本研究では、8点個々の値と予後の関係についても解析を行った。表5、表6に示したように、1コース目の4日目、10日目に特

引用文献

定できる可能性が示されたが、8点の5-FU血漿中濃度の平均値のように有意差を得ることはできなかった。この点についても、症例の追加を行い、更なる検討が必要と思われた。

以上、食道がんに対する標準的治療法のひとつであるFP+RT療法に関して、5-FU血漿中濃度と治療効果との相関を解析した。患者1名あたり8点の採血を行い、8点の平均値をデータとして採用した。その結果、1) 病期と5-FU血漿中濃度は相関しないこと、2) 治療終了約4週間後における評価にてCRとなった症例では、non-CR症例と比較して、5-FU血漿中濃度が高い傾向にあること、3) 生存期間が2年以上であった症例では、2年未満であった症例と比較して、5FU血漿中濃度が有意に高いことが明らかになった。また、8点個々の値と予後との関係を解析した結果、4) 予後の指標とする採血ポイントとしては、1コース目の4日目と10日目に設定できる可能性があることが明らかとなった。すなわち、FP+RT療法の適用に際し、患者個々に、5-FU血漿中濃度のモニタリングを行い、5-FU血漿中濃度の結果に基づいて、5-FUの投与量を最適化できる可能性があると思われた。今後、さらに症例の追加を行い、5-FU血漿中濃度と副作用発現との関係も解析し、情報を整理することも必要であるが、5-FU血中濃度モニタリングを治療期間中できる限り早期に実施し、その結果に基づいて以後の投与量を調整した場合についてprospective studyを実施する必要があると思われた。また、表4に示すように、生存期間が2年以上であった症例の平均値が $0.126 \mu\text{g/mL}$ 、全体の平均値が $0.112 \mu\text{g/mL}$ であったことから、FP+RT療法においては、5-FUの投与量を $400 \text{ mg/m}^2/\text{day}$ から $450 \text{ mg/m}^2/\text{day}$ へ増量すれば、より高い治療効果が得られるものと推察できた。この点についてもprospective studyを行い、副作用の発現状況とともに、評価を行う必要があると思われた。

- 1) Ohtsu A, Boku N, Muro K, et al. Definitive chemoradiotherapy for T4 and/or M1 lymph node squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2915-2921.
- 2) Kaneko K, Ito H, Konishi K, et al. Definitive chemoradiotherapy for patients with malignant stricture due to T3 or T4 squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer* 2003; 88: 18-24.
- 3) Hironaka S, Ohtsu A, Boku N, et al. Nonrandomized comparison between definitive chemoradiotherapy and radical surgery in patients with T (2-3) N (any) M (0) squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 425-433.
- 4) Tahara M, Ohtsu A, Hironaka S, et al. Clinical impact of criteria for complete response (CR) of primary site to treatment of esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 316-323.
- 5) Ishikura S, Nihei K, Ohtsu A, et al. Long-term toxicity after definitive chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2697-2702.
- 6) Miki I, Tamura T, Nakamura T, et al. Circadian variability of pharmacokinetics of 5-fluorouracil and CLOCK T3111C genetic polymorphism in patients with esophageal carcinoma. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 369-374.
- 7) Okuno T, Tamura T, Yamamori M, et al. Favorable genetic polymorphisms predictive of clinical outcome of chemoradiotherapy for Stage II/III esophageal squamous cell carcinoma in Japanese. *Am J Clin Oncol* 2007; 30: 252-257.
- 8) 栗原晶子, 山森元博, 横本博雄ら. 食道がん化学放射線療法における病期, 奏効と予後との相関. *医療薬学* 2008; 34: 13-19.
- 9) 日本臨床腫瘍学会編. *臨床腫瘍学* (第三版). 東京: 癌と化学療法社, 2003: 582-613.

食道がん化学放射線療法における病期、奏効と予後との相関

栞原晶子¹, 山森元博¹, 榎本博雄¹, 西口工司¹, 八木敬子²

奥野達哉^{3,4}, 茶屋原菜穂子^{3,4}, 三木生也⁴, 田村孝雄⁴,

平井みどり¹⁻³, 柴田敏之^{*1,3,5}

神戸大学医学部附属病院薬剤部¹

神戸薬科大学臨床薬学研究室²

神戸大学大学院医学系研究科薬物動態学分野³

神戸大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝・内分泌内科学分野⁴

京都大学大学院薬学研究科統合薬学フロンティア教育センター⁵

Association of Disease Stage and Response with Survival Following FP+RT Chemoradiotherapy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Japanese Patients

Akiko Kuwahara¹, Motohiro Yamamori¹, Hiroo Makimoto¹, Kohshi Nishiguchi¹,

Keiko Yagi², Tatsuya Okuno^{3,4}, Naoko Chayahara^{3,4}, Ikuya Miki⁴,

Takao Tamura⁴, Midori Hirai¹⁻³ and Toshiyuki Sakaeda^{*1,3,5}

Department of Hospital Pharmacy, Kobe University¹

Department of Clinical Pharmacy, Kobe Pharmaceutical University²

Division of Clinical Pharmacokinetics, Department of General Therapeutics,

Kobe University Graduate School of Medicine³

Division of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Department of Clinical Molecular Medicine,

Kobe University Graduate School of Medicine⁴

Center for Integrative Education of Pharmacy Frontier (Frontier Education Center),

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University⁵

{ Received May 24, 2007
Accepted October 19, 2007 }

The association of disease stage and response with survival following treatment with 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy (CRT) was evaluated in 51 Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). One course of treatment consisted of protracted venous infusions of 5-fluorouracil (400 mg/m²/24 h for days 1-5 and 8-12) and cisplatin (40 mg/m²/3 h on day 1 and 8), and radiation (2 Gy/day on days 1-5, 8-12 and 15-19), and a 2nd course was given after a 2-week interval. The response was assessed about 4 weeks after the CRT by endoscopy, and chest and abdominal CT scans. The CR+PR rate was 80%, which was consistent with other institutions, and we confirmed that this CRT procedure was effective even for Stage III ESCC. The 2-year survival rate was 52%, which was comparable with or better than other institutions. Our results also showed that survival depended on the disease stage ($p=0.027$, Log-rank test). The response (CR or non-CR) was also associated with survival ($p<0.0001$, Log-rank test) with 2-year survival rates of 88% and 13% for CR patients and non-CR patients, respectively. Overall, we concluded that the prognosis could be predicted from the disease stage or response, hopefully with good accuracy.

Key words — esophageal squamous cell carcinoma, chemoradiotherapy, disease stage, response, survival

* 京都市左京区吉田下阿達町 46-29; 46-29, Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, 606-8501 Japan

結 言

日本人の食道がんの多くは扁平上皮がんであり、わが国では、これまで、外科的処置が食道がんに対する標準的治療法であるとされてきた。しかしながら、従来から、遠隔転移の改善が期待できないこと、進行がんでは治療が期待できないこと、治療後の Quality of life(以下、QOLと略す)の低下が著しいこと、などの問題点が指摘されており、1990年代に入りようやく、各種の集学的な治療法の開発が検討されるようになった。このようなか、1999年、Ohtsuらにより、5-fluorouracil(以下、5-FUと略す)と cisplatin(以下、CDDPと略す)、および放射線照射を併用する化学放射線療法(JCOG 9906; 以下、FP+RT療法と略す)が提唱され、切除不能である T4/M1a 症例においても、組織学的著効 complete response(以下、CRと略す)率が33%、3年生存率が23%と、非常に良好な成績が得られたことから、FP+RT療法に非常に大きな注目が集まった¹⁾。続いて、Kanekoらにより、わが国の他施設においても非常に優れた治療成績が得られること²⁾、Hironakaらにより、T2/3症例を対象に外科的処置と同等以上の治療成績が望めること³⁾、などが明らかとされるとともに、Taharaら、もしくは Ishikuraらにより、多数例による長期間の予後に関する詳細な情報が収集され^{4,5)}、現在では、FP+RT療法が、食道がん、特に進行性の食道がんに対する標準的治療法と認識されるようになってきている。

ところで一般的に、がん化学療法においては、治療効果や副作用発現に明らかな個人差が観察され、患者個々に最適な治療計画を立てることが火急の課題とされている。食道がん化学療法についても例外ではない。われわれは、これまでに、FP+RT療法について、治療効果や副作用発現の指標の探索を目的として、5-FU血漿中濃度に注目し、患者ひとりあたり8点の採血を行い、5-FU

血漿中濃度の個体間変動と個体内変動(日内変動)が非常に大きいことを明らかにした⁶⁾。また、適用の可否を事前に診断する方法の確立を目的として、5-FUとCDDPの抗腫瘍効果に関与する酵素に注目し、それらをコードする遺伝子の多型と治療効果との関係について検討を行い、良好な予後が期待できる遺伝的特徴を明らかにした⁷⁾。ところで、現状、予後は、病期、奏効したか否か、などによって推定される。予後の推定において、5-FU血漿中濃度測定もしくは遺伝子型診断が利用されるためには、推定精度の点で、病期、奏効したか否か、と同等以上でなければならない。われわれは、外科的処置について、QOL低下などの問題点が少なからず指摘されていることに注目し、非進行性の食道がんに対しても、FP+RT療法が外科的処置に代わり得ると考え、T1/2の症例に対しても、積極的に本法を適用した。本研究では、神戸大学医学部附属病院(以下、当院と略す)にてFP+RT療法を受けた患者を対象に2年間の予後を追跡調査し、病期あるいはFP+RT療法による治療終了約4週間後における評価と、予後との関係を解析した。

方 法

1. FP+RT療法の標準スケジュール

FP+RT療法の標準スケジュールを図1に示した¹⁻³⁾。FP+RT療法とは、5-FUの5日間持続点滴投与(400 mg/m²/day, day 1~5・8~12)、CDDPの点滴投与(40 mg/m²/day, day 1・8)、放射線照射(2 Gy/day, day 1~5・8~12・15~19)を1st courseとし、2週間の休薬期間を設け、引き続き2nd courseを施行する治療レジメンである。

なお、5-FU投与量については、基本的には、400 mg/m²/dayであるが、患者の状態によっては、適宜、500もしくは550 mg/m²/dayに増量した(以下、Dose escalation

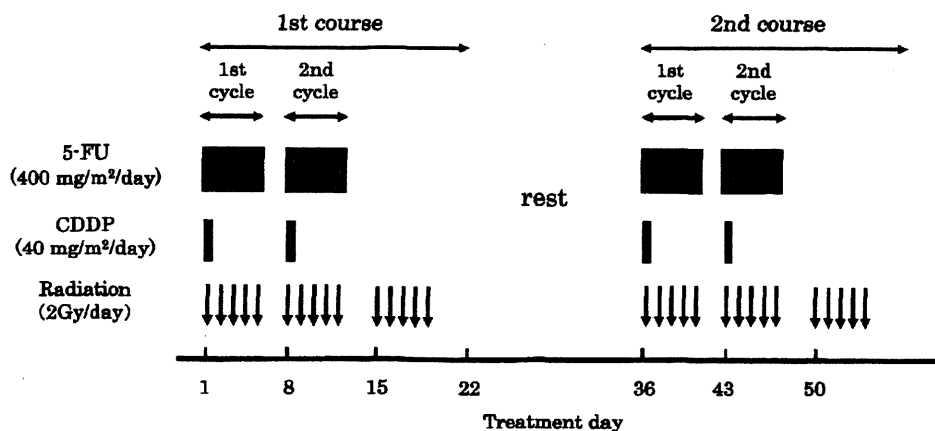


図1. FP+RT療法の標準スケジュール

例と略す)。また、奏効が期待でき、重篤な副作用が認められない症例に対しては、標準スケジュール完遂後、2週間の休薬期間を設け、同様の治療を追加した(以下、追加治療例と略す)。追加治療は、基本的には、標準スケジュールに従ったが、放射線照射を行わず、5-FUの5日間持続点滴投与、CDDPの点滴投与のみとした。

2. 解析対象患者

2002年8月から2005年5月の間にこの治療を受けた患者のうち、標準スケジュールを完遂した51例を対象とした。患者背景を表1に示した。病期分類には、UICC (The International Union Against Cancer)のTNM (tumor, node, metastasis)分類を用いた。また、5-FUおよびCDDPの平均投与量を表2に示した。51例のうち、Dose escalation例数は6、追加治療例数は19であった。

3. 治療終了約4週間後における評価

標的病変がすべて消失したものをCR、標的病変の縮小が25%までのものを有効(partial response, 以下、PRと略す)と定義し、以下、不変(stable disease, 以下、SDと略す)、進行(progressive disease, 以下、PDと略す)と評価した。奏効率を、著効率と有効率の和(CR+PR)と定義し、FP+RT療法による治療終了約4週間後に評価を行った。内視鏡による標的病変の評価にリンパ節の評価を加え、総合的に評価した。治療終了約4週間後における評価の結果を、年齢別、病期別に分類して、それらの関係を解析した。

4. 医学倫理に対する配慮の概要

ヘルシンキ宣言の趣旨を尊重し、研究の対象となる個人の人権の尊重、理解を求める同意を得る方法、研究対象となる個人への不利益および危険性について詳述した上で、研究内容について理解を求め、被験者となる同意を得る方法を明記した研究計画書を神戸大学医学部医学倫理委員会に提出し、承認を得ている。研究目的で利用される診療情報については、別途設定した個人情報管理者により連結可能匿名化されており、新たに定義された

表2. 5-FU および CDDP の平均投与量

5-FU (mg/day)	1 st course	650.2±86.3	(480-970) ^{a)}
	2 nd course	648.9±84.5	(490-980) ^{a)}
	平均	649.6±85.3	
CDDP (mg/day)	1 st course	63.4±5.5	(48-76) ^{a)}
	2 nd course	63.2±5.2	(49-75) ^{a)}
	平均	63.3±5.3	
Dose escalation 例数 ^{b)}		6/51	
追加治療例数 ^{c)}		19/51	

a) 投与量の幅

b) 5-FU 投与量を500もしくは550 mg/m²/dayとした症例

c) 標準スケジュール完遂後、2週間の休薬期間を設け、同様の治療を追加した症例

コード番号で取り扱われるため、個人情報情報は保護されている。

5. 統計処理

51例中31例で、観察期間が2年以上であり、この31例を対象に2年生存率を算出した。また、Kaplan-Meier法を適用し、Log-rank testを行い、群間比較を行った(SYSTAT[®] 11, Hulinks Inc., Tokyo, Japan)。

結 果

1. 患者背景

51例のうち女性は2例であり、当院における食道がん患者数においても、疫学的報告と同様、性差がみられた。T1/2は全体の43%、Stage I/IIの比率は全体の41%であった。Taharaらの報告⁴⁾、もしくはIshikuraらの報告⁵⁾にあるT1/2率19%、Stage I/II率31%と比較して、当院では、ともに大きいこと、すなわち、進行性のがんが少ないことが特徴として挙げられた。

2. 治療終了約4週間後における評価

表3に結果をまとめた。奏効率は全体で80%であった。Stage I/II/IIIにおける奏効率が80%以上に達して

表1. 患者背景

患者数	51	(M 49, F 2)
身長(cm)	164.6±6.3	(149.7-180.0) ^{a)}
体重(kg) ^{b)}	55.9±9.3	(33.4-78.6) ^{a)}
年齢(歳)	63.6±7.3	(48-78) ^{a)}
観察期間(月) ^{b)}	18.1±13.9	(1-46.2) ^{a)}
PS 0/1/2/不明	23/24/2/2	
Stage I/IIA/IIB/III/IVA/IVB/術後再発	11/5/3/17/4/6/5	

a) 身長、体重、年齢、観察期間の幅

b) 不明1例含む

おり、進行がんに対しても、FP+RT療法が有効であることが確認できた。なお、年齢との関係については、何らかの傾向を見出すことはできなかった。一方、Stage I/IIと比較して、Stage III/IVで著効率が低い傾向にあった。

3. 2年生存率～病期, 5-FU投与量との関係

2年生存率は全体で52%であった。病期との関係を表4にまとめた。Stage I/IIでは2年生存率が50%を超えていた。一方、Stage IIIでは31%, Stage IVでは25%であった。病期分類不能な術後再発例を除外し、Stage I, II, III, IVで分類し、生存曲線を描いた。結果を図2に示した。病期の進行に伴い生存率が低下することが明らかとなった(p=0.027, Log-rank test)。

5-FU投与量と2年生存率との関係を表5に示した。500~600 mg 未満群, 600~700 mg 未満群, 700~800 mg 未満群, いずれの群でも2年生存率は50~70%であった。

4. 治療終了約4週間後における評価と2年生存率との関係

治療終了約4週間後における評価と2年生存率との関係を表6にまとめた。CR例での2年生存率が85%を超えていた。CR例とCR以外であった症例(以下, non-CR例)に分類し、生存曲線を描いた。結果を図3に示した。non-CR例で生存率が低下することが明らかとなった(p<0.0001, Log-rank test)。

表4. 病期と2年生存率との関係^{a)}

	No.	%
全体	16/31	51.6
Stage I	5/6	83.3
Stage IIA	2/4	50.0
Stage IIB	3/3	100.0
Stage III	4/13	30.8
Stage IVA	1/3	33.3
Stage IVB	0/1	0
術後再発	1/1	100.0

a)病期分類不能な術後再発1例を含む

表3. 治療終了約4週間後における評価

	CR		PR		SD		PD		不明		CR+PR	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
全体	23	45.1	18	35.3	2	3.9	4	7.8	4	7.8	41	80.4
年齢												
40-49			1	50.0			1	50.0			1	50.0
50-59	2	16.7	9	75.0					1	8.3	11	91.7
60-69	12	52.2	5	21.7	1	4.3	2	8.7	3	13.0	17	73.9
70-79	9	64.3	3	21.4	1	7.1	1	7.1			12	86.7
病期 ^{a)}												
Stage I	9	81.8							2	18.2	9	81.8
Stage IIA	3	60.0	1	20.0			1	20.0			4	80.0
Stage IIB	3	100.0									3	100.0
Stage III	5	29.4	12	70.6							17	100.0
Stage IVA			3	75.0			1	25.0			3	75.0
Stage IVB	2	33.3	2	33.3	1	16.7	1	16.7			4	66.7
術後再発	1	20.0			1	20.0	1	20.0	2	40.0	1	20.0

a) 病期分類不能な術後再発5例を含む

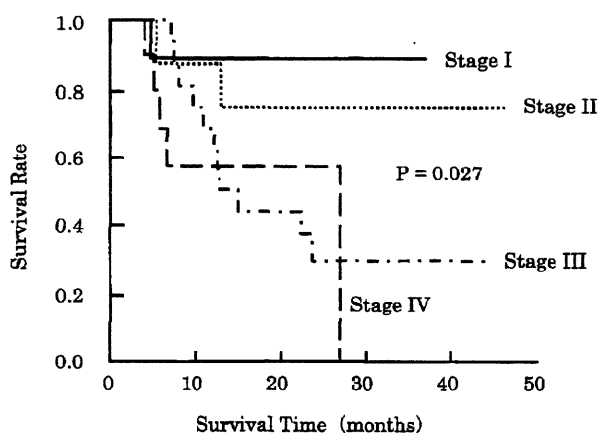


図2. 病期と生存曲線との関係
病期分類不能な術後再発例を除外し, Stage I, II, III, IVで分類し, 生存曲線を描いた. Log-rank testにより検定を行った結果, 危険率は0.027であった.

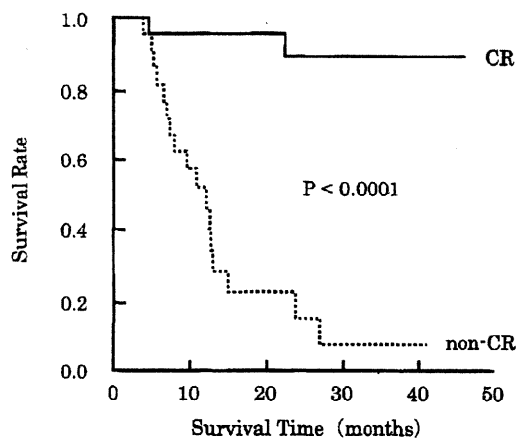


図3. 治療終了約4週間後における評価と生存曲線との関係
CR例とnon-CR例に分類し生存曲線を描いた. Log-rank testにより検定を行った結果, 危険率は0.0001未満であった.

表5. 5-FU投与量(mg/day)^{a)}と2年生存率との関係

	No.	%
全体	16/31	51.6
400~	0/1	0
500~	4/6	66.7
600~	11/22	50.0
700~	1/2	50.0
800~	0/0	—
900~	0/0	—

a) 1st course, 2nd courseの平均投与量

表6. 治療終了約4週間後における評価と2年生存率との関係

	No.	%
全体	16/31	51.6
CR	14/16	87.5
PR	2/12	16.7
SD	0/0	0
PD	0/3	0
不明	0/0	—

5. 2年生存率~TNM(tumor, node, metastasis)分類による予測

T因子(原発巣), M因子(遠隔転移の有無)と生存率との関係について検討を行った. なお, N因子(リンパ節転移の有無)に関する検討は行わなかった. 51例中T因子, M因子が不明である症例を除外し, 検討を行った.

その結果, T因子が進行するほど生存率が低下すること, が明らかとなった. すなわち, 1年生存率は, T1, T2, T3, T4で, おおの, 90%, 80%, 70%, 55%であった. また, 2年生存率は, T1, T2, T3, T4で, おおの, 88%, 50%, 29%, 44%であった.

M因子についても同様であった. 遠隔転移のない症例に比較し, 遠隔転移のある症例において, 生存率は低下していた. 具体的には, M0, M1で, 1年生存率は, おおの, 77%, 40%, 2年生存率は, おおの, 56%, 33%であった.

考 察

わが国における医療統計(国立がんセンターがん対策情報センター; <http://ganjoho.ncc.go.jp/public/index.html>)によると, 2003年度, 食道がん死亡者数は11,048人(男性9,397人, 女性1,651人)であり, これは全がん死の3.57%にあたる. 近年の罹患率・死亡率は, ともにほぼ横ばいで推移している. 食道がんは, 男性に圧倒的に多く発症しており, 性差がみられるがん種である. 病理学的には, 日本人の92%は扁平上皮がんであり, 腺がんは1~2%にすぎないが, 欧米では近年, 扁平上皮がんが横ばいもしくは減少している一方で, 腺がんが急速に増加している⁸⁾.

食道がんの治療は, 早期がんに対する内視鏡的治療の開発と普及, 外科手術における頸部・胸部・腹部の三領域リンパ節郭清術の確立や術後管理の改善, さらに最近では放射線療法の工夫や化学療法への積極的取り組み, 化学放射線療法の開発などにより大きく変貌している. 食道がんは, 局所に腫瘤を形成するとともに, 早期

の段階でリンパ節転移を来し、全身疾患としての性格をもつことから、化学放射線療法については、局所治療としての放射線療法と全身治療としての化学療法という理解の上、理にかなった治療戦略として推進されている⁹⁾。

1999年、Ohtsuらにより提唱されたFP+RT療法¹⁾は、その良好な成績から、非常に大きな注目を集め、多数例による長期間の予後に関する情報が収集された^{4,5)}。また、FP+RT療法と同様のプロトコールが欧米でも試験され、FP+RT療法と同様に、良好な結果が得られることが明らかにされた^{10,11)}。わが国では、さらに、UICC Stage II/III(T4を除く)の胸部食道扁平上皮がんに対するJCOG 9906の試験が進行中であり(2000.4~2002.3に76例の登録を完了、現在症例追跡中)、中間解析ではあるが、37例中CR 24例(65%)という良好な結果が得られている¹²⁾。以上のような経緯を経て、現在、わが国では、FP+RT療法が、食道がん、特に進行性の食道がんに対する標準的治療法と認識されている。

本研究では、当院にてFP+RT療法を受けた患者を対象に2年間の予後を追跡調査し、病期あるいはFP+RT療法による治療終了約4週間後における評価と、予後との関係を解析した。当院における奏効率は80%であり、Kanekoら²⁾の81%、Ohtsuら¹⁾の87%とほぼ同程度であった。また、Stage I/II/IIIにおける奏効率が80%以上に達しており、FP+RT療法が進行食道がんに対しても有効であることが確認できた。一方、2年生存率は全体で52%であった。Ohtsuら¹⁾の1年生存率41%、3年生存率23%、Taharaら⁴⁾、もしくは、Ishikuraら³⁾の3年生存率37-38%、また、スケジュールは同じであるが、CDDPや5-FUの総投与量、放射線の総線量ともに、FP+RT療法より多いJCOG 9516¹³⁾での2年生存率31.5%と比較して、同等、あるいはやや優れている結果であった。

わが国におけるFP+RT療法に関する報告^{1,2,4,5)}の多くは、主にT3/4を対象としており、病期と予後の関係を明確にすることは難しい。当院では、T1/2に対しても、T3/4とほぼ同等の比率で、FP+RT療法を適用されており、その結果、図2に示すように、病期と予後が相関することが明らかになった。また、図3に示すように、治療終了約4週間後における評価で、CR例と比較して、non-CR例において生存率が著しく低下することも明らかとなった。ところで、Taharaらの報告⁴⁾、もしくはIshikuraらの報告³⁾は、FP+RT療法に関する代表的な報告であると位置づけることが可能である。彼らの報告^{4,5)}では、T1/2率が19%、Stage I/II率が31%の患者に対して、CR率が56-58%、2年生存率が40-45%、CR例の2年生存率が70-75%、となっており、一方、本研究では、T1/2率が43%、Stage I/II率が41%に対して、CR率が45%、2年生存率が52%、CR例の2

年生存率が88%、となった。両者の比較から、当院では、非進行性の食道がんが多く、CR率はやや低く、予後は同等、あるいはやや優れている、という結果であると判別された。非進行性の食道がんが、進行性のものと比較して、良好な結果が得られることから、当院ではCRと判定されがたい、と考えられ、このことは、当院で、CR例の2年生存率が高いことと矛盾しないと思われた。当院では、治療終了約4週間後の評価で、1cm未満のリンパ節の腫脹が認められる場合、常法に従い、“uncertain CR”と評価し¹⁾、さらに、3カ月後に再検査を行う。このことがCR判定基準の違いに少なからず関与しているもの、と推察された⁷⁾。

本研究では、T因子、M因子によっても予後が推定できる可能性が示された。ところで、Kanekoら²⁾は、T因子により予後の推定が可能であるものの、M因子については推定が困難であることを示している。具体的には、T3とT4の生存期間(中央値)はおのおの29カ月と11カ月であり、統計学的に有意な差異が認められるものの、M0とM1ではおのおの15カ月と12カ月であり、大きな違いがないことを報告している。T因子、M因子による予後の推定についてはさらに詳細な検討が必要であると思われた。なお、2年生存率は、5-FU投与量(mg/day)に依存しないものと推察された。

以上、2年間の予後を追跡調査し、病期あるいは治療終了約4週間後における評価と、予後との関係を解析した。その結果、1)当院における奏効率は80%であり、わが国における他施設の結果と同等であること、2)進行性の食道がんに対しても有効であること、3)2年生存率は52%であり、わが国における他施設の結果と同等、あるいはやや優れていること、4)病期と予後が相関すること、5)治療終了約4週間後における評価、具体的には著効したか否か、で予後が決まること、6)T因子、M因子も予後の推定因子になり得るかもしれないこと、を確認もしくは明らかにした。当院におけるFP+RT療法の治療成績も他施設の結果と同等であり、FP+RT療法は、施設に依存することなく高い治療成績を得ることができることから、食道がんにおける標準治療法となる可能性が示唆された。

引用文献

- 1) A. Ohtsu, N. Boku, K. Muro, K. Chin, M. Muto, S. Yoshida, M. Satake, S. Ishikura, T. Ogino, Y. Miyata, S. Seki, K. Kaneko, A. Nakamura, Definitive chemoradiotherapy for T4 and/or M1 lymph node squamous cell carcinoma of the esophagus, *J. Clin. Oncol.*, **17**, 2915-2921 (1999).
- 2) K. Kaneko, H. Ito, K. Konishi, T. Kurahashi, T. Ito, A. Katagiri, T. Yamamoto, T. Kitahara, Y. Mizutani, A.

- Ohtsu, K. Mitamura, Definitive chemoradiotherapy for patients with malignant stricture due to T3 or T4 squamous cell carcinoma of the esophagus, *Br. J. Cancer*, **88**, 18-24 (2003).
- 3) S. Hironaka, A. Ohtsu, N. Boku, M. Muto, F. Nagashima, H. Saito, S. Yoshida, M. Nishimura, M. Haruno, S. Ishikura, T. Ogino, S. Yamamoto, A. Ochiai, Non-randomized comparison between definitive chemoradiotherapy and radical surgery in patients with T(2-3)N(any)M(0) squamous cell carcinoma of the esophagus, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **57**, 425-433 (2003).
 - 4) M. Tahara, A. Ohtsu, S. Hironaka, N. Boku, S. Ishikura, Y. Miyata, T. Ogino, S. Yoshida, Clinical impact of criteria for complete response (CR) of primary site to treatment of esophageal cancer, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **35**, 316-323 (2005).
 - 5) S. Ishikura, K. Nihei, A. Ohtsu, N. Boku, S. Hironaka, K. Mera, M. Muto, T. Ogino, S. Yoshida, Long-term toxicity after definitive chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus, *J. Clin. Oncol.*, **21**, 2697-2702 (2003).
 - 6) I. Miki, T. Tamura, T. Nakamura, H. Makimoto, N. Hamana, H. Uchiyama, D. Shirasaka, Y. Morita, H. Yamada, N. Aoyama, T. Sakaeda, K. Okumura, M. Kasuga, Circadian variability of pharmacokinetics of 5-fluorouracil and CLOCK T3111C genetic polymorphism in patients with esophageal carcinoma, *Ther. Drug Monit.*, **27**, 369-374 (2005).
 - 7) T. Okuno, T. Tamura, M. Yamamori, N. Chayahara, T. Yamada, I. Miki, N. Okamura, Y. Kadowaki, N. Aoyama, T. Nakamura, K. Okumura, T. Azuma, M. Kasuga, T. Sakaeda, Favorable genetic polymorphisms predictive of clinical outcome of chemoradiotherapy for Stage II/III esophageal squamous cell carcinoma in Japanese, *Am. J. Clin. Oncol.*, **30**, 252-257 (2007).
 - 8) 室圭, 食道がんの標準的治療—各種治療成績と問題点, *医学のあゆみ*, **215**, 420-427 (2005).
 - 9) 日本臨床腫瘍学会編, “Third edition 臨床腫瘍学”, 癌と化学療法社, 2003, pp. 582-613.
 - 10) J.S. Cooper, M.D. Guo, A. Herskovic, J.S. Macdonald, J.A. Martenson Jr., M.Al-Sarraf, R. Byhardt, A.H. Russell, J.J. Beitler, S. Spencer, S.O. Asbell, M.V. Graham, L.L. Leichman, Chemoradiotherapy of locally advanced esophageal cancer: long-term follow-up of a prospective randomized trial (RTOG 85-01). Radiation Therapy Oncology Group, *JAMA*, **281**, 1623-1627 (1999).
 - 11) B.D. Minsky, T.F. Pajak, R.J. Ginsberg, T.M. Pisansky, J. Martenson, R. Komaki, G. Okawara, S.A. Rosenthal, D.P. Kelsen, INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy, *J. Clin. Oncol.*, **20**, 1167-1174 (2002).
 - 12) 有吉寛監修, “エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック”, メディカルレビュー社, 2005, pp.170-171.
 - 13) K. Ishida, N. Ando, S. Yamamoto, H. Ide, M. Shinoda, PhaseII study of cisplatin and 5-fluorouracil with concurrent radiotherapy in advanced squamous cell carcinoma of the esophagus: a Japan Esophageal Oncology Group (JEOG)/Japan Clinical Oncology Group Trial (JCOG 9516), *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **34**, 615-619 (2004).

Research Paper

Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines

A paradigm for cell line cross-contamination

Hanna Berglind,¹ Yudi Pawitan,² Shunsuke Kato,³ Chikashi Ishioka³ and Thierry Soussi^{1,4,*}

¹Karolinska Institute; Department of Oncology-Pathology; Cancer Center Karolinska (CCK); Stockholm, Sweden; ²Karolinska Institute; Department of Medical Epidemiology and Biostatistics; Stockholm, Sweden; ³Department of Clinical Oncology; Institute of Development, Aging and Cancer; Tohoku University; Sendai, Japan; ⁴Université Pierre et Marie Curie-Paris6; Paris, France

Key words: p53 mutations, cancer, human cancer cell lines, NCI-60 panel, cell lines cross contaminations

Cancer cell lines are essential tools used in many areas of biomedical research. Using the last release of the UMD_p53 database (2007) (<http://p53.free.fr>), we analysed the p53 status of 1,211 cell lines published between 1989 and 2007. p53 mutations in cell lines from various types of cancers display a striking similarity in the distribution of mutations and in the pattern of mutational events compared to tumors, indicating that they are representative of the cells from which they were derived. Analysis of the residual transcriptional activity of p53 mutants identified in cell lines that displayed two different p53 mutations show that there is a high frequency of weak mutations that are paired with more potent mutations suggesting a driver/passenger configuration. Strikingly, we found discrepancies in the p53 status for 23% (88/384) of cell lines, for which the p53 status was established independently in two laboratories. Using the NCI-60 cell line panel as a model widely used in the literature, the p53 status could not be ascertained for 13 cell lines due to a lack of homogeneous data in the literature. Our study clearly confirms that misidentified cell lines are still a silent and neglected danger and that extreme care should be taken as a wrong p53 status could lead to disastrous experimental interpretations. The p53 web site has been updated with new sections describing the p53 status in the majority of cell lines and a special section devoted to cell lines with controversial p53 status.

Introduction

Continuous cell lines derived from human tumors are widely used in laboratory research. They can be used for drug screening (the NCI-60 panels), for production of various macromolecules, for modelling human tumors or, most frequently, as biological test tubes for a large variety of experiments.¹ To draw valid conclusions from such experiments, it is essential for cell lines to be clearly characterized at the molecular level. For a long time, these genetic characterizations

were performed by studies focusing on one gene and the information was scattered in the literature. Recently, the Sanger Institute developed a Catalog Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) that gathers information on genetic alterations in human tumor cell lines.² To date, data in the COSMIC cell line database is a mix of information taken from the literature and in-house sequencing.^{2,3}

Cell line cross-contamination (CLCC) is not a novel problem,^{4,5} as it was discovered as early as 1974 that one in three cell lines were contaminated, mostly by HeLa cells.⁶ Despite the tremendous work conducted by Nelson-Rees et al., this problem is still "a silent and neglected danger", as a recent study indicates a CLCC of 18% at a German cell line repository.^{4,7,8} CLCC is not trivial, as the use of wrong cell lines can lead to erroneous conclusions associated with years of wasted time and effort.⁹⁻¹¹

p53 mutation is the most common genetic abnormality found in human cancer.¹² In cell lines, loss of p53 activity is usually linked with several specific landmarks such as defect in growth arrest or apoptosis after DNA damage and lack of induction of p53-regulated genes.^{13,14} The p53 status is also a key factor for the sensitivity to anticancer agents and multiple studies have focused on this subject.^{15,16} Although the majority of studies found a correlation between loss of p53 function and p53 alteration, a few publications report opposite results.^{15,17,18} This situation is complicated by the observation that some mutant p53 proteins expressed in cell lines have only a partial loss of activity or present a temperature-sensitive transcriptional activity.¹⁹

For more than 17 years, we have collected and compiled p53 mutations in human tumors and cell lines.^{20,21} Although numerous studies on p53 mutations in human tumors have been published, no systematic analysis of the p53 status of cell lines is currently available. In the course of updating the various versions of the UMD p53 database, we have noticed a number of discrepancies in the p53 status of several cell lines. The situation has recently been worsened, as these discrepancies have been randomly published in the literature, a situation that can lead to serious problems of data analysis. Many drug sensitivity studies are based on the p53 status reported in the literature without any new genetic analysis.

In the present study, using the UMD-p53 database as a framework, we performed a precise and thorough analysis of p53 status in 1,211 tumor cell lines. Our analysis shows that p53 mutations in cell lines from various types of cancers display a striking similarity in

*Correspondence to: Thierry Soussi; Karolinska Institute; Department of Oncology-Pathology; Cancer Center Karolinska (CCK); Stockholm SE-171 76 Sweden; Email: thierry.soussi@ki.se

Submitted: 01/25/08; Revised: 02/11/08; Accepted: 02/11/08

Previously published online as a *Cancer Biology & Therapy* E-publication: <http://www.landesbioscience.com/journals/cbt/article/5712>