

政策提言

血中循環腫瘍 DNA を用いたがんゲノムプロファイリング検査の適正使用に関する政策提言

日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会
3 学会合同ゲノム医療推進タスクフォース

令和 3 年 1 月 20 日

目次

1.	はじめに.....	3
2.	血漿 CGP 検査の現状	4
3.	提言内容	7
4.	おわりに	9
5.	3 学会合同医療推進タスクフォース ゲノム医療部会部会（順不同・敬称略）	10
6.	政策提言作成委員一覧（順不同・敬称略）	10
7.	COI について.....	10
8.	参考文献	11

1 はじめに

2018年12月に本邦で、二つのがんゲノムプロファイリング検査が薬事承認、2019年6月に保険適用を受けた。これに先立ち、2017年11月に日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会による「次世代シーケンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドンス」（以下、「3学会ガイドンス」）が策定され、現在、がんゲノム医療中核拠点病院（12施設）、がんゲノム医療拠点病院（33施設）、および、がんゲノム医療連携病院（161施設）（いずれも2020年4月現在）において、3学会ガイドンスの記述に沿った包括的ゲノムプロファイリング検査（Comprehensive Genome Profile、以下、「CGP」）が実装されている。（注：2020年5月現在、3学会ガイドンスは第2.1版に更新されている）

血中遊離DNA（cell-free DNA、以下「cfDNA」）のうち、腫瘍由来のDNAを腫瘍由来循環DNA（circulating tumor DNA、以下「ctDNA」）と呼ぶ。米国では2020年8月にGuardant360 CDx及びFoundationOne Liquid CDxが血漿検体を用いたctDNAにおける遺伝子異常を検出するコンパニオン診断薬（以下、「CDx」）及びCGP機能を有する検査として承認された。

現在、本邦では、血漿検体を用いたctDNAにおける遺伝子異常を検出するCDxとして、肺がんに対するEGFR遺伝子変異検査、METex14遺伝子検査、また、大腸がんに対するRAS遺伝子変異検査が承認されているが、今後、本邦においても血漿検体を用いたctDNAにおける遺伝子異常を検出するCGP検査（以下、「血漿CGP検査」）が承認される見込みである。

現行の3学会ガイドンスは、組織検体を用いたCGP検査（以下、「組織CGP検査」）に関するガイドンスである。3学会ガイドンス第2.1版では、ctDNAにかかる留意点などが記載されているが、本邦においても、血漿CGP検査の実装にあたり、その使用に関する考え方についてより具体的に呈示することが早急に求められる。3学会ガイドンス（第2.1版、2020年5月発出）は、今後、改定版の制定や、補遺の作成がすすめられるものと考えられるが、組織CGP検査との使い分けなどエビデンスが限られている中で、本邦における血漿CGP検査の実装が遅滞なく行われるために、3学会合同ゲノム推進タスクフォースにより、この政策提言を発出することにした。

2 血漿 CGP 検査の現状

血漿 CGP 検査は、組織 CGP 検査に比べて、エビデンスがまだ十分とは言えない部分も存在する。その中で、本邦で承認されると見込まれる血漿 CGP 検査において参考となる主な情報を紹介する。

(1) 血漿検体の取扱い

- ① 血漿検体は組織検体に比べて検体の採取が容易である
- ② 血漿検体は炎症性疾患、自己免疫疾患、喫煙、妊娠、運動など様々な患者側因子により影響を受ける可能性がある¹⁻³。
- ③ cfDNA は、組織検体で行われるホルマリン固定処理等を経ないため、ホルマリン固定に伴うアーティファクトの影響がない。
- ④ 血漿から得られる腫瘍由来の ctDNA 量は、総じて正常細胞由来の cfDNA 量より少なく、3 学会ガイドランス 2.1 版に記載のとおり、がん遺伝子変異の検出率に影響するがん種や状態が存在する。

(2) 血漿 CGP 検査の技術面

- ① 血液凝固時に生じる白血球溶解により、正常細胞由来の cell-free DNA (cfDNA) のコンタミネーションが増加すると、腫瘍由来の circulating tumor DNA (ctDNA) の検出感度に影響する¹。
- ② 腫瘍の部位によって heterogeneity が存在するため、組織検体で腫瘍全体の遺伝子異常を評価することは困難があるが、血漿検体では腫瘍全体の遺伝子異常を俯瞰できる^{4,5}
- ③ 採取から時間経過や治療介入により腫瘍の生物学的変化が起こりうるが、血漿検体は任意の採取時点における腫瘍の生物学的特性を反映した遺伝子異常の情報を得ることができる^{4,6}。
- ④ 分子標的薬治療後の耐性変化の検出においては、再生検による組織 CGP 検査よりも、血漿 CGP 検査の方が検出率が高いという報告もある⁴。
- ⑤ 緩徐な臨床経過を示し、増殖速度の遅い腫瘍、あるいは早期病期の腫瘍では、偽陰性となる頻度が高くなる⁷⁻¹⁰。
- ⑥ 肺がんにおいては、組織検体の検査結果と比較した場合、一般に血漿検体は一定の偽陰性が生じうる。このため、組織 CGP 検査を優先することが合理的な場合がある¹¹⁻¹³。
- ⑦ DNA ベースの血漿検体では、融合遺伝子などの検出率が低下することが知られている^{14,15}。
- ⑧ 血漿のみの解析では ctDNA の遺伝子変異と正常細胞内のクローン造血由来の遺伝子変異 (clonal hematopoiesis of indeterminate potential、以下「CHIP」) と区別することが困難である。クローン造血由来の遺伝子は高齢になるほど頻度が高いが、変異アリル頻度 (Variant Allele Frequency、以下「VAF」) は大半 (約 97%) が 1%未満である¹⁶。
- ⑨ 大腸がんでは、粘液がん、肺転移例のみ、腹膜播種例のみ、化学療法終了 30 日以内の症例、などにおいて、RAS 遺伝子変異の VAF が低いことが報告されている^{17,18}。
- ⑩ 組織 CGP 検査では、マイクロサテライト不安定性 (Microsatellite Instability、「以

下「MSI」) 検査や腫瘍遺伝子変異量 (tumor mutation burden : TMB) の結果が得られるが、血漿 CGP 検査では、MSI 検査において組織検体を用いた PCR 検査、NGS 検査との高い一致率が報告されている^{19,20}。

- ⑪ 血漿 CGP 検査においては、分子バーコード法やエラー除去等により、検出感度限界 (limit of detection、以下「LOD」) が向上した。一般的に、体細胞変異の変異アレル頻度は低いことから、組織 CGP 検査と比べると、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) との判別に難渋する場合や、生殖細胞系列の変異との区別に難渋する場合は比較的少ないと考えられる。
- ⑫ LOD は検査毎に異なり、検査法毎に検査結果が異なることが報告されている²¹。
- ⑬ cfDNA に対する ctDNA の割合 (tumor fraction、以下「TF」) が低い場合、コピー数変化についての評価が困難とされる (FoundationOne Liquid では、コピー数変化の検出限界は TF 20%とされている²²)。そのため、コピー数変化の偽陰性には注意が必要である²³。

(3) 検査所用時間 (Turnaround time, 以下 TAT) について

- ① 血漿 CGP 検査は、採取簡便性および検体採取から出検までの時間が短縮でき、組織 CGP 検査よりも TAT (検体採取から結果返却までの期間) が短い²⁴。
- ② 食道扁平上皮がん、胃がん、大腸がん、膵がん、胆道がんにおける検討では、組織 CGP 検査における TAT 中央値 19 日に対して、血漿 CGP 検査 (Guardant 360) において TAT 中央値 7 日が報告されている⁵。

(4) 複数回検査に関して

- ① ホルモン受容体陽性乳がんにおける検討では、血漿 CGP 検査による ESR1 変異の経時的増加の検出が報告されている²⁵。
- ② CDx として、RAS 遺伝子変異検出キット OncoBEAM™ RAS CRC キットは、組織検体を用いた検査が困難な場合 (この場合は 1 回のみ許容) だけではなく、抗 EGFR 抗体薬の再投与の可否を判断するために複数回の検査がすでに許容されている。抗 EGFR 抗体薬の耐性機序として起こる獲得 RAS 遺伝子変異は、minor なアレルであり、経時的に減衰していく事が知られており、血漿検体を用いた RAS 遺伝子検査で変異が検出されない症例では、抗 EGFR 再投与で臨床的な効果が再度得られることが報告されている²⁶⁻²⁸。
- ③ CDx として、非小細胞肺癌では、EGFR 遺伝子変異、および ALK 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌における耐性変異や、大腸がんの治療経過における RAS 遺伝子変異の変化について、血漿検体を用いた遺伝子検査を複数回行うことで適切な評価が可能となり、適切な後治療の選択に寄与することが報告されている²⁴。

(5) 治療へのつながりについて

- ① 本邦で実施された食道扁平上皮がん、胃がん、大腸がん、膵がん、胆道がんにおける検討では、組織 CGP 検査では 4.1%が、血漿 CGP 検査 (Guardant 360) では 9.5% の症例が、その後に遺伝子異常に対応した臨床試験に登録 ($p < 0.0001$) された⁵。
- ② 大腸がんでは、抗 EGFR 抗体薬投与後の耐性機序として、獲得 RAS 遺伝子変異、EGFR 細胞外ドメイン変異、EGFR、MET、ERBB2 の遺伝子増幅などが報告されてお

り、治療後期（late line）における治療選択肢の検討において血漿 CGP 検査が有用と考えられている^{6,29}。

- ③ 非小細胞肺癌におけるコホート研究（n=323）では、血漿 CGP 検査のみを用いたコホートでは分子標的薬による治療対象遺伝子（EGFR、ALK、MET、BRCA1、ROS1、RET、ERBB2、BRAF）検出率が 33%であったのに対し、組織 CGP 検査のみのコホートでは 20.5%にとどまった。また、組織 CGP 検査と血漿 CGP 検査を併用したコホートでは、検出率は 35.8%であった³⁰。また、組織検査において EGFR、ALK、ROS1 が検出不能であった 93 例における血漿 CGP 検査の検討では、アクションナブル（OncoKB レベル 1～4）、およびレベル 1～2A の遺伝子異常が、各々 53 例（57%） 13 例（14%）同定され、20 例（13%）が遺伝子異常に対応した治療に至った³¹。
- ④ 非小細胞肺癌では、EGFR 遺伝子変異の場合に加えて、ALK 融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌においても、二次的変異の検出が ALK 阻害薬の選択に有効である。例えば、L1196M または S1206Y 変異はクリゾチニブには耐性を示すが、セリチニブには耐性を示さない、I1171T および V1180L 変異は、アレクチニブおよびクリゾチニブには耐性を示すが、セリチニブには耐性を示さない、G1202R、G1123S または F1174 変異はクリゾチニブに耐性を示す、などが知られており包括的な遺伝子解析が有用な場合がある。現在は進行部位での生検組織から解析されているが、再発巣の解析は困難なことが多い事から血漿 CGP 検査による低侵襲での二次的変異の検出は有用である。以上より、ALK 阻害薬治療中に進行した非小細胞肺癌における ALK 二次性抵抗性変異の検出は、現時点では必須ではないが、異なる変異に対する活性が異なる ALK 阻害薬の最適な選択を決定する上で貴重であり、進行部位の再生検が不可能な場合には、血漿 CGP 検査が好ましいことが IASLC（世界肺癌学会）の statement において発出された¹³。

3 提言内容

本政策提言は、進行固形がんに対する血漿 CGP 検査の保険診療下での実施にあたり、基本的な考え方を示すものである。なお、本政策提言が対象とするのは薬事承認を受けた血漿 CGP 検査であり、CDx 機能は対象としない。また、特定の血漿 CGP 検査の使用を推奨するものでもない。

以下に組織検体又は血漿検体が優先される状況について、基本的な考え方、および例を呈示するが、一般に、組織検体と比べて、血漿検体での偽陰性率は高いことが示されているため¹¹⁻¹³、偽陰性率を低減させるため腫瘍検体を用いた CGP 検査が優先することが合理的であると考えられる。ただし、実際の判断においては様々な状況が混在する場合もあり、個々の患者の状態に応じて総合的に適切な検体を選択することが重要となる。

(1) エキスパートパネルについて

- ① 現在、保険診療下で実施されている組織 CGP 検査におけるエキスパートパネルと、同様に、血漿 CGP 検査においてもエキスパートパネルによる検討を実施する。
- ② 生殖細胞系列遺伝子の病的バリエーションの存在が疑われた場合には、エキスパートパネル実施施設において、遺伝相談外来などとの連携を行い、遺伝カウンセリングを検討する。

(2) 血漿検体、組織検体を用いた CGP 検査の利点と注意点は下表のとおりである（表 1）。

表 1：血漿検体及び組織検体を用いた CGP 検査の利点と注意点

	利点	注意点
血漿 CGP	検体採取が容易であり、採取時点における腫瘍の遺伝子異常の情報を取得可能 結果判明までの時間が短い	腫瘍量が十分でない場合、検出されない可能性がある。 組織検体に比べると偽陰性が高いとされる 加齢に伴い CHIP による偽陽性の頻度が高まる コピー数変化、および、遺伝子融合の評価が困難な場合がある
組織 CGP	腫瘍細胞における遺伝子異常を直接評価可能	検体採取に患者負担、合併症のリスクなどがある 結果判明までに時間を要する 腫瘍細胞割合が低い場合には偽陰性となる 過去の検体は現時点の腫瘍細胞における遺伝子異常を反映していない可能性がある。 検体採取から 3～5 年以上経過している場合には検体が劣化する

(3) 組織検査に比して血漿検体を用いることが優先される状況。

- ① 血漿検査が組織検体よりも CGP 検査時の病態をより反映すると考えられる場合

- 組織採取が困難ながん種であり、検査基準をクリアする腫瘍含有割合が見込めない。
 - 病変が複数あり、原発巣あるいは一部の腫瘍組織を用いた解析のみでは全体を反映することが難しい。
 - 組織検体の保管期間が3～5年以上経過している³²。
 - 組織検体において、ホルマリンによる過固定や脱灰処理など検体の処理のために検出率が落ちることが懸念される。
 - 組織検体において、腫瘍含有割合又は腫瘍細胞数が十分でない。(がん薬物療法、および、放射線療法後など)
 - 組織検体において、十分な核酸品質が得られない。
- ② 早急な CGP 検査結果の返却が必要であると考えられる場合
- 病勢の進行が比較的早く、早急な結果の確認が必要な場合。
 - 標準治療の確立していないがん種で一次治療開始前の決定に CGP 検査の結果が必要な場合 (原発不明がんで組織検体の十分な採取が困難な場合など)。
- (4) 血漿検体に比して組織検体を用いることが優先される状況
- ① 血漿検査のみでの検査結果を解釈するうえで留意すべき点は以下の通りである。
- 血漿検体での遺伝子異常の検出率が低いとされるがん種や病態
 - 脳腫瘍、膀胱がん、および、膵がん^{8,33}。ただし、膵がんにおける検討では、EUS-FNA で採取された組織検体を用いた NGS 検査の成功率が 57.4%の報告もあり、組織採取時に注意が必要と考えられる³⁴。
 - 大腸がんでは肺転移のみ、腹膜転移のみを有する場合^{17,18}
 - 緩徐な臨床経過を示し、増殖速度の遅い腫瘍
- ② 腫瘍由来以外の遺伝子変異の検出による偽陽性が想定される場合
- CHIP (正常細胞内のクローン造血由来の遺伝子変異) の可能性が考えられる場合
- ③ 血漿検体において偽陰性となりやすい遺伝子異常が重要となる場合
- 非小細胞肺癌における融合遺伝子や METex14 skipping
- (5) 血漿 CGP 検査の複数回検査における考え方
- ① 血漿検体の採取は低侵襲であるがゆえに、複数回検査が可能と考えられるが、本邦における保険診療下での、複数回検査の実施については以下のような点に留意する。
- ② 組織 CGP 検査が解析不成功であった場合
- 組織 CGP 検査においても、一定の割合で解析不成功となる。この場合、治療に結び付く遺伝子異常の検出率が高いと考えられる対象においては、血漿検体を用いた再検査を実施することが望ましい。同様に、血漿 CGP 検査で解析不成功であった場合で、その後の組織検体採取が可能となった場合には、組織検体を用いた再検査を実施することが望ましい。
- ③ 治療方針決定における実施回数について
- 本邦において、保険診療下で実施される CGP 検査については、回数の制限が設けられ、組織 CGP 検査は、一回を限度として実施されるものとされている³⁵。血漿 CGP 検査は、組織 CGP 検査と同様に、個々の患者におけるがんの遺伝子変化を明らかに

し、最適ながん治療の機会を供与することを目的とするものであることに加えて、検査時の腫瘍全体の状態を反映した検査であることを考慮し、複数回の検査を行う意義は大きい。多くの患者においては1回の検査でゲノムプロファイルの取得が可能であると考えられるが、治療経過において、耐性変化や二次的変異の出現が想定される場合には、複数回の検査実施を許容する。

- 血漿検体を用いた検査は、複数回検査による病勢モニタリングにおける有用性が報告されている³⁶⁻⁴²。しかしながら、現時点では、固形がんにおける血漿 CGP 検査は治療に結び付けることを目的とするため、治療または病勢モニタリングを目的とした使用には合致しないが、有用性を鑑みの上で参考となる報告もあり、今後、さらなるエビデンスの集積によって検討の余地が残される³⁶⁻⁴²。

4 おわりに

2021年に本邦で承認が見込まれる血漿 CGP 検査の使用に関する考え方を政策提言という形でまとめた。科学技術の進歩により CGP 検査をはじめとする遺伝子解析技術は急速に進歩しつつあり、今後もエビデンスの蓄積により、本提言が大きく変化する可能性についても十分留意された上で、参考にしていただければ幸いである。

- 5 3 学会合同ゲノム医療推進タスクフォース（順不同・敬称略，*座長）
油谷浩幸，河野隆志，間野博行，野田哲生（日本癌学会）
青木大輔，北川雄光，森 正樹，武藤 学，林田 哲（日本癌治療学会）
秋田弘俊，石岡千加史，田村研治*，西尾和人，山本 昇（日本臨床腫瘍学会）
井本逸勢（日本人類遺伝学会）
三宅秀彦（日本遺伝カウンセリング学会）
中山智祥（日本遺伝子診療学会）

- 6 政策提言作成委員一覧（順不同・敬称略）
国立がん研究センター中央病院・山本 昇（委員長）
島根大学医学部附属病院・田村研治（副委員長）
国立病院災害医療センター・植竹宏之
北海道大学病院・木下一郎
国立がん研究センター研究所・高阪真路
東北大学病院・小峰啓吾
国立がん研究センター中央病院・角南久仁子
国立がん研究センター東病院・高橋秀明
近畿大学医学部・武田真幸
国立がん研究センター先端医療開発センター・土原一哉
岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・豊岡伸一
国立がん研究センター東病院・内藤陽一
近畿大学医学部・西尾和人
慶應義塾大学病院・林田 哲
愛知県がんセンター・坂東英明
九州大学病院別府病院・三森功士
国立がん研究センター中央病院・谷田部 恭
近畿大学医学部・松村 到（アドバイザーとして参画）
京都大学大学院医学研究科・武藤 学（アドバイザーとして参画）

7 COIについて

本政策提言作成において、自主規制として各委員のCOIを確認

対象とした企業

中外製薬

シスメックス

ガーダント

イルミナ

2018～2020年（平成30年，令和01年，令和02年）度において、寄付金・契約金等のCOIが500万円を超える委員はアドバイザーとして参画、本政策提言の作成には関与せず。（500万円の上限については、厚労省・医薬品第二部会のCOI規程を参考にした）

8 参考文献

1. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al: Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol* 36:1631–1641, 2018
2. Siravegna G, Mussolin B, Venesio T, et al: How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Ann Oncol* 30:1580–1590, 2019
3. Guibert N, Pradines A, Favre G, et al: Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages. *Eur Respir Rev* 29, 2020
4. Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, et al: Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med* 25:1415–1421, 2019
5. Nakamura Y, Taniguchi H, Ikeda M, et al: Clinical utility of circulating tumor DNA sequencing in advanced gastrointestinal cancer: SCRUM–Japan GI–SCREEN and GOZILA studies. *Nat Med* 26:1859–1864, 2020
6. Strickler JH, Loree JM, Ahronian LG, et al: Genomic Landscape of Cell-Free DNA in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Discov* 8:164–173, 2018
7. Avanzini S, Kurtz DM, Chabon JJ, et al: A mathematical model of ctDNA shedding predicts tumor detection size. *Sci Adv* 6, 2020
8. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al: Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6:224ra24, 2014
9. Newman AM, Bratman SV, To J, et al: An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 20:548–54, 2014
10. Yoshinami T, Kagara N, Motooka D, et al: Detection of ctDNA with Personalized Molecular Barcode NGS and Its Clinical Significance in Patients with Early Breast Cancer. *Transl Oncol* 13:100787, 2020
11. Esagian SM, Grigoriadou G, Nikas IP, et al: Comparison of liquid-based to tissue-based biopsy analysis by targeted next generation sequencing in advanced non-small cell lung cancer: a comprehensive systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol* 146:2051–2066, 2020
12. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al: Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 13:323–358, 2018
13. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, et al: Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. *J Thorac Oncol* 13:1248–1268, 2018
14. Dagogo-Jack I, Rooney M, Nagy RJ, et al: Molecular Analysis of Plasma From Patients With ROS1-Positive NSCLC. *J Thorac Oncol* 14:816–824, 2019
15. Supplee JG, Milan MSD, Lim LP, et al: Sensitivity of next-generation sequencing assays detecting oncogenic fusions in plasma cell-free DNA. *Lung Cancer* 134:96–99, 2019
16. Razavi P, Li BT, Brown DN, et al: High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med* 25:1928–1937, 2019
17. Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, et al: Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 28:1325–1332, 2017
18. Bando H, Kagawa Y, Kato T, et al: A multicentre, prospective study of plasma circulating tumour DNA test for detecting RAS mutation in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 120:982–986, 2019
19. Willis J, Lefterova MI, Artyomenko A, et al: Validation of Microsatellite Instability Detection Using a Comprehensive Plasma-Based Genotyping Panel. *Clin Cancer Res* 25:7035–7045, 2019
20. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, et al: Blood-based tumor mutational burden as a predictor

- of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med* 24:1441–1448, 2018
21. Torga G, Pienta KJ: Patient-Paired Sample Congruence Between 2 Commercial Liquid Biopsy Tests. *JAMA Oncol* 4:868–870, 2018
 22. Woodhouse R, Li M, Hughes J, et al: Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *PLoS One* 15:e0237802, 2020
 23. Clark TA, Chung JH, Kennedy M, et al: Analytical Validation of a Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Genomic Profiling of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *J Mol Diagn* 20:686–702, 2018
 24. Leigh NB, Page RD, Raymond VM, et al: Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 25:4691–4700, 2019
 25. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, et al: Emergence of Constitutively Active Estrogen Receptor- α Mutations in Pretreated Advanced Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 20:1757–1767, 2014
 26. Parseghian CM, Loree JM, Morris VK, et al: Anti-EGFR-resistant clones decay exponentially after progression: implications for anti-EGFR re-challenge. *Ann Oncol* 30:243–249, 2019
 27. Sunakawa Y, Nakamura M, Ishizaki M, et al: RAS Mutations in Circulating Tumor DNA and Clinical Outcomes of Rechallenge Treatment With Anti-EGFR Antibodies in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *JCO Precision Oncology*:898–911, 2020
 28. Cremolini C, Rossini D, Dell'Aquila E, et al: Rechallenge for Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer With Acquired Resistance to First-line Cetuximab and Irinotecan: A Phase 2 Single-Arm Clinical Trial. *JAMA Oncol* 5:343–350, 2019
 29. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al: Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med* 21:795–801, 2015
 30. Aggarwal C, Thompson JC, Black TA, et al: Clinical Implications of Plasma-Based Genotyping With the Delivery of Personalized Therapy in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 5:173–180, 2019
 31. Zugazagoitia J, Ramos I, Trigo JM, et al: Clinical utility of plasma-based digital next-generation sequencing in patients with advance-stage lung adenocarcinomas with insufficient tumor samples for tissue genotyping. *Ann Oncol* 30:290–296, 2019
 32. 小田義直, 畑中豊, 桑田健, et al: ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. 日本病理学会 ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程策定ワーキンググループ, 2018
 33. Zhang Q, Luo J, Wu S, et al: Prognostic and Predictive Impact of Circulating Tumor DNA in Patients with Advanced Cancers Treated with Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov* 10:1842–1853, 2020
 34. Park JK, Lee JH, Noh DH, et al: Factors of Endoscopic Ultrasound-Guided Tissue Acquisition for Successful Next-Generation Sequencing in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gut Liver* 14:387–394, 2020
 35. 元. 5. 29 中総: 「診療報酬の算定方法の一部改正に伴う実施上の留意事項について」等の一部改正について (令和元年 5 月 31 日保医発 0531 第 1 号) . <https://www.mhlw.go.jp/content/12404000/000513115.pdf>, 2019
 36. Sun Q, Liu Y, Liu B, et al: Use of Liquid Biopsy in Monitoring Colorectal Cancer Progression Shows Strong Clinical Correlation. *Am J Med Sci* 355:220–227, 2018
 37. Iwama E, Sakai K, Hidaka N, et al: Longitudinal monitoring of somatic genetic alterations in circulating cell-free DNA during treatment with epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* 126:219–227, 2020
 38. Dagogo-Jack I, Rooney M, Lin JJ, et al: Treatment with Next-Generation ALK Inhibitors Fuels Plasma ALK Mutation Diversity. *Clin Cancer Res* 25:6662–6670, 2019

39. Mok T, Wu YL, Lee JS, et al: Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 21:3196–203, 2015
40. Horn L, Whisenant JG, Wakelee H, et al: Monitoring Therapeutic Response and Resistance: Analysis of Circulating Tumor DNA in Patients With ALK+ Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 14:1901–1911, 2019
41. Lam VK, Zhang J, Wu CC, et al: Genotype-specific differences in circulating tumor DNA levels in advanced NSCLC. *J Thorac Oncol*, 2020
42. Sakai K, Takahama T, Shimokawa M, et al: Predicting osimertinib-treatment outcomes through EGFR mutant-fraction monitoring in the circulating tumor DNA of EGFR T790M-positive patients with non-small cell lung cancer (WJOG8815L). *Mol Oncol*, 2020