

ORIGINAL ARTICLE

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の re-biopsy の現状と課題

津谷あす香¹・柴田裕美¹・勝島詩恵¹・秋吉宏平¹・徳永伸也¹・
駄賀晴子¹・住谷充弘²・少路誠一²・武田晃司¹

The Current Situation and Problems of Re-biopsy in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients with EGFR Mutations

Asuka Tsuyal; Yumi Shibata¹; Utae Katsushima¹; Kohei Akiyoshi¹; Shinya Tokunaga¹;
Haruko Daga¹; Mitsuhiro Sumitani²; Seiichi Shoji²; Koji Takeda¹

¹Department of Medical Oncology, ²Department of Respiratory Medicine, Osaka City General Hospital, Japan.

ABSTRACT — **Objective and Method.** We examined the changes in the EGFR mutation status, including the frequency of acquired T790M mutations, in 25 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations who underwent a re-biopsy (include pleural effusion) from January 2013 to March 2015. **Results.** The male:female ratio was 7/18, at the time of the initial chemotherapy the median age was 67 years (range, 33-77), the types of EGFR mutation included exon19 del (n=12), L858R (n=11), L858R + T790M (n=1), and T751-I759 del ins N (n=1). Eighteen patients were treated with gefitinib as first-line treatment, and 12 patients underwent a re-biopsy just before the administration of a second-line treatment. The biopsy sites at the initial examination were the primary lung tumor (n=21), pleural dissemination (n=1), the bone (n=2), and pleural effusion (n=1). The biopsy site at re-biopsy was the primary tumor (n=9), pleural effusion (n=15), and the lymph nodes (n=1). At re-biopsy, 10 patients (40%) had acquired the T790M mutation. In four cases that received a biopsy using a bronchoscope, the results between the specimen and a mutation analysis were discordant. **Conclusion.** The presence of a resistance gene affects the choice of subsequent treatment. However, the ability to perform a genetic analysis using biopsied tissue samples is limited. We should therefore consider the use of cytology specimens, including fluid samples.

(JLCC. 2016;56:331-336)

KEY WORDS — Re-biopsy, T790M, EGFR-TKI, Companion diagnostic test

Corresponding author: Koji Takeda.

Received February 23, 2016; accepted June 18, 2016.

要旨 — **目的・方法.** 2013年1月～2015年3月までに re-biopsy (胸水を含む) を行った上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異陽性肺癌患者 25 例について, T790M の出現頻度を含む EGFR 遺伝子変異の変化について検討を行った. **結果.** 男性/女性: 7/18 例, 初回化学療法時の年齢中央値 67 歳 (33～77 歳), EGFR 遺伝子変異: exon19 del/L858R/L858R + T790M/T751-I759 del ins N: 12/11/1/1 例, 初回治療は Gefitinib 18 例, re-biopsy のタイミングは 12 例が 2 次治療前に行われていた. 診断時の生検部位は, 肺原発巣/胸膜播種/骨/胸水: 21/1/2/

1 例, re-biopsy 時は原発巣/胸水/リンパ節: 9/15/1 例であった. Re-biopsy 時の EGFR 遺伝子変異は T790M 出現を 10 例 (40%) に認めたが, 気管支鏡下の生検において遺伝子変異の検査法や提出検体により結果が解離していたものを 4 例認めた. **結論.** 耐性遺伝子の有無は次治療の選択に影響を与えるが, 組織生検での検索には限界もあり, 液状検体など細胞診検体の利用も検討すべきである.

索引用語 — Re-biopsy, T790M, EGFR-TKI, コンパニオン診断薬

はじめに

上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異陽性肺癌において EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) は著効するが、無増悪生存期間 (progression free survival : PFS) 中央値は 10~12 ヶ月程度であり、ほぼ全ての症例で耐性を獲得する。¹⁻⁵ 現在 T790M 変異, MET 増幅, 小細胞肺癌への転化など複数の耐性機序が明らかになっており,^{6,7} 将来的には re-biopsy で知り得た耐性機序に応じた個別化医療が想定され, 耐性化時点での re-biopsy の重要性が指摘されている。最近では, T790M 陽性の進行・再発非小細胞肺癌患者に対して AZD9291 (Osimertinib, TAGRISSOTM) が 2015 年 11 月 13 日にアメリカ食品医薬品局 (US Food and Drug Administration : FDA) で承認され, 本邦でも 2016 年 3 月 28 日に承認された。第 3 世代の EGFR-TKI を使用するためには, re-biopsy を施行し組織検体で T790M を証明する必要がある。

目的

2013 年 1 月から 2015 年 3 月までに re-biopsy (胸水を含む) を行った EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌患者のうち, EGFR 遺伝子変異の解析が可能であった 25 例について, T790M の出現頻度を含む EGFR 遺伝子変異の変化について後方視的に解析し, EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の re-biopsy の現状と課題について検討を行った。

対象・方法

2013 年 1 月~2015 年 3 月までの間に, EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌患者に対して胸水穿刺を含む re-biopsy が 28 例に行われていた。そのうち 3 例は生検検体に腫瘍細

胞が含まれておらず, EGFR 遺伝子変異解析が可能であった 25 例について背景, 生検部位, 検査手技, EGFR 遺伝子変異の変化について後方視的に検討を行った。EGFR 遺伝子変異検査は PCR-Invader 法で行った。

結果

患者背景を Table 1 に示す。男性/女性 : 7/18 例, 喫煙歴あり/なし/不明 : 7/17/1 例, 初回化学療法時の年齢中央値 67 歳 (33~77 歳), EGFR 遺伝子変異は exon19 del/L858R/L858R + T790M/T751-I759 del ins N : 12/11/1/1 例であった。初回治療のレジメンは Gefitinib/Gefitinib + Pemetrexed / Erlotinib / Carboplatin + Pemetrexed + Bevacizumab/Docetaxel : 18/1/4/1/1 例と, 92% で EGFR-TKI を初回治療として用いていた。

Re-biopsy のタイミングに関しては, 2 次治療前が 12 例 (48%), 3 次治療前が 7 例 (28%), 3 次治療以降が 6 例 (24%) であった (Table 2)。Re-biopsy の目的は治験登録が 6 例 (24%), EGFR-TKI re-challenge の検討が 7 例 (28%), EGFR-TKI beyond PD (EGFR-TKI switch も含む) が 6 例 (24%), その他 6 例 (24%) であった。

生検部位について Table 3 に示す。診断時肺原発巣が 21 例 (84%) であったのに対して re-biopsy 時は原発巣 9 例 (36%), 胸水が 15 例 (60%) と原発巣が減少しており, 診断時と re-biopsy 時で同一部位から検査していたのは 8 例 (32%) であった。

検査手技としては診断時において気管支鏡検査 17 例 (68%), 手術 4 例 (16%), 胸腔鏡補助 (video-assisted thoracic surgery : VATS) 下生検 1 例 (4%), CT ガイド下生検 1 例 (4%), 骨生検 2 例 (8%), 胸水穿刺 1 例 (4%) であったが, re-biopsy 時は気管支鏡検査 9 例 (36%), 胸水穿刺 15 例 (60%), 超音波内視鏡下穿刺吸引法 (endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration : EUS-FNA) によるリンパ節生検 1 例 (4%) であり, 診断時と比べてより非侵襲的な検査法が選択されていた。同期間

Table 1. The Clinical and Molecular Characteristics

Patient characteristics		n = 25 (%)
Median age (range)		67 (33-77)
Gender	Male	7 (28)
	Female	18 (72)
Smoking history		
	Current + Former	7 (28)
	Never	17 (68)
	Unknown	1 (4)
Stage	IV	6 (24)
	Recurrence	19 (76)
Type of EGFR mutation		
	EX19 deletion	12 (48)
	L858R	11 (44)
	T751-I759 deletion insertion N	1 (4)
	L858R + T790M	1 (4)

Table 2. The Timing and Purpose of Re-biopsy

		n = 25 (%)
Timing	Just before 2nd line treatment	12 (48)
	Just before 3rd line treatment	7 (28)
	After 3rd line treatment (before 4th-10th line)	6 (24)
Purpose	Trial registration	6 (24)
	EGFR-TKI re-challenge	7 (28)
	EGFR-TKI beyond PD*	6 (24)
	Others	6 (24)

*includes treatment with another EGFR-TKI.

Table 3. The Biopsy Site

Biopsy site	Initial n (%)	Re-biopsy n (%)
Primary lesion	21 (84)*	9 (36)
Pleural	2 (8)	0
Bone	2 (8)	0
Lymph node	0	1 (4)
Fluid (pleural effusion)	1 (4)*	15 (60)

*An EGFR mutation analysis of the primary site and pleural effusion specimens was performed in one case.

中, EGFR 遺伝子変異検索目的での re-biopsy は 28 例で施行されていたが, 3 例 (2 例気管支鏡検査, 1 例気管支鏡検査・縦隔鏡検査両検査とも陰性) で腫瘍組織が採取できておらず, re-biopsy での EGFR 遺伝子変異の評価が可能であったのは 25 例 (89%) であった。

2013 年 1 月～2015 年 3 月において, 悪性腫瘍の診断, 除外目的で行われた気管支鏡検査及び CT ガイド下生検での良悪の鑑別を含めた診断率 (診断可能症例/全生検例) は, 気管支鏡検査 458/566 例で 81%, CT ガイド下生検 44/55 例で 80% であった。気管支鏡検査には EGFR 遺伝子変異検索目的での re-biopsy が 13 検含まれており, EGFR 遺伝子変異評価可能率は 9/13 例で 69% であった。

EGFR 遺伝子変異の変化について Table 4 に示す。診断時に検出されていた EGFR 遺伝子変異の消失を 6 例に認め (そのうち 1 例は T790M が消失), T790M は 10 例 (40%) に認めた。生検部位別の T790M 検出率は原発巣 56% (5/9 例), 胸水 33% (5/15 例), 縦隔リンパ節 0% (0/1 例) であったが有意差は認めなかった。また, re-biopsy のタイミング別の T790M 検出率は EGFR-TKI 治療直後の re-biopsy で 41% (7/17 例), 殺細胞性の化学療法後で 38% (3/8 例) と有意差を認めなかった。Re-biopsy 後の治療について活性型の EGFR 遺伝子変異 + T790M が検出された 8 例中 6 例で殺細胞性の化学療法が次治療として選択されており, EGFR-TKI が選択されたのは 1 例のみであった。T790M を認めなかった 12 例中 5 例 (42%) では EGFR-TKI の re-challenge または前治療とは異なる EGFR-TKI の投与が行われていた。

一方で本研究中, 6 例で治験登録目的での re-biopsy が行われている。そのうち 5 例は T790M 陽性肺癌患者を対象とした第 3 世代 EGFR-TKI の治験への参加を希望されており, 4 例で T790M が検出されていた。しかし, 当院で委託している BML 社の PCR-Invader 法では T790M が検出されていたが, 治験の中央判定 (主に Cobas®法) で陰性と判定されたものが 2 例, 治験ではホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE) 組織検体の提出を求められており,

Table 4. The Change in the Mutation Status from the Initial Treatment to Re-biopsy

Type of EGFR mutation (initial → re-biopsy)	n = 25 n (%)
Initial mutation + T790M	8 (32)
Ex19 del → Ex19 del + T790M	3
L858R → L858R + T790M	4
T751-I759 del ins N → T751-I759 del ins N + T790M	1
Loss of initial mutation + T790M	2 (8)
Ex19 del → T790M	1
L858R → T790M	1
No change	11 (44)
Ex19 del → Ex19 del	6
L858R → L858R	5
Loss of EGFR mutation	3 (12)
Ex19 → wild type	2
L858R → wild type	1
Other	1 (4)
L858R + T790M → L858R	1

Acquired T790M; 40% (10/25 cases).

生検組織が小さいあるいは癌細胞が少ないため提出を断念した症例が 2 例あり, 4 例とも治験には登録できず, T790M 陽性例に対して効果が期待されている新薬投与の機会を得ることはできなかった。

考 察

耐性機序に応じた個別化治療を行うにあたり, 耐性化した時点での re-biopsy の重要性が指摘されている。一方で re-biopsy の成功率や安全性, biopsy 部位や生検方法, 遺伝子解析の検査法による結果の解離など課題も存在する。安全性と成功率に関する要因としては大きさ, 部位, 原発巣か転移巣かなどが考えられる。EGFR-TKI による治療後に EGFR-TKI 耐性となった患者に対する re-biopsy に関してはいくつか報告されている。日本国内においては, 第 56 回日本肺癌学会学術集会にて瀬戸らが報告した胸水を用いた re-biopsy を除く 395 例の検討では 314 例で re-biopsy が成功しており, 成功率 79.5% と報告されている。⁸ また, 海外では Arcila らが 153 例中 124 例で re-biopsy に成功したとしており成功率 81% と報告されている。⁹ 当院では症例を選択しているにもかかわらず気管支鏡検査での成功率が 69% とやや低い傾向があったが, 胸水を含めた全体では 89% であり, re-biopsy の成功率は 80% 前後であることが推察される。また, re-biopsy の部位に関しては当院では診断時原発巣が 84%, re-biopsy 時原発巣 36% であったが, 瀬戸ら

Table 5. The Present State of EGFR Mutation Analyses

Test	Dx Company/ Clin lab	NHI price (JPY)	LDT/IVD	Sensitivity ¹²⁻¹⁷ (% mutation DNA)
PCR-Invader	BML	21000	LDT	0.1%
Cycleave*	SRL	21000	LDT	5%
PNA-RNA Clamp	LSI	21000	LDT	0.1%
MBO-QP	Arkray	21000	LDT	0.4% (T790M)
Scorpion ARMS* (therascreen)	Qiagen	25000	IVD	0.1%
Cobas*	RDKK	25000	IVD	5%

*These tests require frozen tissue or formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue.

DX: diagnosis, Clin lab: clinical laboratory, NHI: national health insurance, JPY: Japanese yen, LDT: laboratory developed test, IVD: *in vitro* diagnostics.

の報告では診断時 72.2%, re-biopsy 時 55.7% といずれも原発巣からの生検が減り、転移巣からの生検が増加している。Yu らの報告では、EGFR-TKI による治療後耐性となり re-biopsy を行った 155 例・162 検査中、生検部位は肺/胸壁 62.9%, リンパ節 8.0%, 肝臓 8.0%, 骨 5.6%, 副腎が 1.9%, 脳 6.2%, 胸水が 8.6% と報告されている。⁷ また、生検手技としては手術が 22 例 (13.6%), 生検が 122 例 (75.3%), 胸水を含む液性検体が 16 例 (9.9%) と報告されている。⁷ Chouaid らは EGFR-TKI 治療後に PD となった 100 例について報告しており、そのうち 18% は re-biopsy ができず、主な理由は抗凝固療法中など、主治医による生検は危険との判断によるものであり、患者拒否によるものは 1 例であった。Re-biopsy が行われた 82 例では生検手技として肺原発巣あるいは肺転移巣の切除術、副腎転移やリンパ節転移の切除術などの手術が 5 例 (6.1%), 超音波気管支鏡 (endobronchial ultrasonography: E-BUS) 併用下を含めた気管支鏡検査 43 例 (52.4%), CT ガイド下肺生検 19 例 (23.2%), 肝転移・骨転移・皮膚転移などの生検が 10 例 (12.2%), リンパ節・胸膜の細胞診が 5 例 (6.1%) であった。一方 25.6% で検体が小さすぎるか、悪性細胞が含まれておらず遺伝子変異検索ができていない。合併症に関しては 1 例でドレーナージが必要な気胸、2 例で入院による経過観察が必要な血痰が出現している。¹⁰ また Arcila らは手技別の re-biopsy における EGFR 遺伝子変異検索の成功率に関しても報告しており、脱灰処理を行わない骨生検検体を含む生検での成功率は 89%, 脱灰処理をした骨生検検体では 40%, FNA では 79%, 胸水などの液性検体では 71% と報告している。⁹ 当院においては、胸水以外の転移巣からの re-biopsy はほとんど行われていなかったが、国内外の報告をまとめると生検部位は原発巣以外に骨、リンパ節、肺転移巣、肝、脳、副腎、胸水、腹水、心嚢液と多岐にわたり、re-biopsy 時は診断時と比べて転移巣から

の生検が増加している。また、検査手技も手術を含めた外科的生検が 1.8~18% と侵襲的な手技も行われている。当院において re-biopsy 時に原発巣からの生検が減少している理由については、より非侵襲的な部位、手技で検査を行いたいという意識が医師に働いていること、原発巣自体は EGFR-TKI による治療で診断時より縮小しており手技的にも困難になっていたことが挙げられる。一方で本研究では、re-biopsy 時に EGFR 遺伝子変異の消失を 6/25 例に認めている。EGFR 遺伝子変異が消失した 6 例の初回診断時の生検部位は原発巣が 5 例、胸膜播種が 1 例であったが、re-biopsy 時は、5 例が胸水で行われており、原発巣からが 1 例で、同一部位から生検が行われていたのは 1 例のみであった。よって EGFR 遺伝子変異の消失に関しては、真の消失だけでなく空間的な genetic heterogeneity を見ている可能性や、組織検体と液状検体間での検出感度の違いが影響している可能性が考えられる。実臨床において現時点では第 3 世代の EGFR-TKI の使用を見据えて re-biopsy を実施することが予想されるが、EGFR-TKI 耐性後の re-biopsy の成功率は 80% 前後であること、生検手技間で成功率が異なること、合併症の出現率は 0~14%,^{7,8,10,11} T790M の検出率は 47~70%^{6-9,11}であることを考慮して症例を選択する必要がある。

もう一つの課題として、検査法による遺伝子変異解析結果の解離が挙げられる。当院の検討で、EGFR 遺伝子変異において PCR-Invader 法と Cobas[®]法 (Real-time PCR 法) とで結果が解離しているものが見受けられた。原因としては検査法毎の感度の違いが挙げられる。Table 5 に示す通り PCR-Invader 法、PNA-RNA Clamp 法、Scorpion ARMS 法 (therascreen[®]) では感度 0.1%, すなわち検査に用いられた DNA の 0.1% 以上に EGFR 遺伝子変異が含まれる場合に陽性と判定されるのに対して、Cobas[®]法、Cycleave 法では遺伝子変異陽性と判定する

にあたり変異 DNA は 5% 以上含まれていることが必要とされている。¹²⁻¹⁷ また Cobas[®]法, Cycleave 法, Scorpion ARMS 法では凍結組織または FFPE 組織が必要であり, これらが耐性遺伝子を有する癌患者に対する新薬のコンパニオン診断薬となった場合, 十分な組織が採取できない症例は治療の選択肢を失う危険性がある。事実, 米国 FDA では EGFR-TKI 治療後に病勢増悪を来した T790M を有する進行・再発非小細胞肺癌患者に対して Osimertinib を承認したが, 同時にコンパニオン診断薬として Cobas[®] EGFR Mutation Test v2 を承認している。本邦でも Osimertinib の承認対象は EGFR-TKI に抵抗性の EGFR T790M 変異陽性の手術不能または再発非小細胞肺癌であり, EGFR 遺伝子検査にあたっては承認された体外新薬を用いて測定することとされている。本邦で承認されている体外診断薬は Cobas[®]法, Scorpion ARMS 法であるが, 前述の通り凍結組織または FFPE 組織が必要である。Re-biopsy では診断時と比べて転移巣からの針生検や胸水細胞診などの液性検体での検査が増加することが, すでに学会報告も含めて多数報告されている。本邦でも米国 FDA に準じた対応がなされた場合, T790M を有しながら治療の機会を逸する可能性がある患者が頻出することが危惧される。しかし, Osimertinib の有効性は組織検体かつ Cobas[®]法で検出された T790M 陽性非小細胞肺癌患者に対する結果であり, 他の検査法あるいは細胞診検体で T790M が検出された患者にも同様に有効性が示されるかどうかについて現時点で不明であることは, 念頭に置かなければならない。

結 論

T790M をターゲットとした第 3 世代の EGFR-TKI が実臨床で使用できるようになり, 今後ますます re-biopsy の重要性が増し, 実施頻度も増加することが予想される。一方で EGFR 遺伝子変異を含めたバイオマーカー検索に関しては, 検査法による結果の解離や病理組織検体での検索の限界を課題として考慮する必要がある。第 3 世代の EGFR-TKI の使用にあたり組織検体による T790M の証明だけではなく, 胸水や気管支擦過細胞などの液状検体の結果も利用できる体制が望ましい。

本論文内容に関連する著者の利益相反: 武田晃司 [委受託研究 (治験等)] 中外製薬 (株), アストラゼネカ (株)

REFERENCES

1. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010;362:2380-2388.
2. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I,

- Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:121-128.
3. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13:239-246.
4. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol*. 2013;31:3327-3334.
5. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:213-222.
6. Kuiper JL, Heideman DA, Thunnissen E, Paul MA, van Wijk AW, Postmus PE, et al. Incidence of T790M mutation in (sequential) rebiopsies in EGFR-mutated NSCLC-patients. *Lung Cancer*. 2014;85:19-24.
7. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2013;19:2240-2247.
8. 瀬戸貴司, 里内美弥子, 倉田宝保. 非小細胞肺癌患者に対する Re-biopsy の実態調査. 第 56 回日本肺癌学会学術集会. 2015:P-720.
9. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res*. 2011;17:1169-1180.
10. Chouaid C, Dujon C, Do P, Monnet I, Madroszyk A, Le Caer H, et al. Feasibility and clinical impact of re-biopsy in advanced non small-cell lung cancer: a prospective multicenter study in a real-world setting (GFPC study 12-01). *Lung Cancer*. 2014;86:170-173.
11. Bosc C, Ferretti GR, Cadranel J, Audigier-Valette C, Besse B, Barlesi F, et al. Rebiopsy during disease progression in patients treated by TKI for oncogene-addicted NSCLC. *Target Oncol*. 2015;10:247-253.
12. Naoki K, Soejima K, Okamoto H, Hamamoto J, Hida N, Nakachi I, et al. The PCR-invader method (structure-specific 5' nuclease-based method), a sensitive method for detecting EGFR gene mutations in lung cancer specimens; comparison with direct sequencing. *Int J Clin Oncol*. 2011;16:335-344.
13. Yatabe Y, Hida T, Horio Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. A rapid, sensitive assay to detect EGFR mutation in small biopsy specimens from lung cancer. *J Mol Diagn*. 2006;8:335-341.

14. Nagai Y, Miyazawa H, Huqun, Tanaka T, Udagawa K, Kato M, et al. Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res.* 2005;65:7276-7282.
15. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Abe T, et al. A noninvasive system for monitoring resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol.* 2011;6:1639-1648.
16. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, et al. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci.* 2006;97:642-648.
17. Kimura H, Ohira T, Uchida O, Matsubayashi J, Shimizu S, Nagao T, et al. Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2014;83:329-333.