

博士論文

Droplet digital PCRによる

乳癌HER2遺伝子増幅の定量測定を試み

尾辻 和尊

<タイトル>

Droplet digital PCRによる乳癌HER2遺伝子増幅の定量測定の試み

<所属>

医学系研究科外科学専攻

<指導教員名>

瀬戸 泰之

<申請者名>

尾辻 和尊

## 目次

略語表.....	4
要旨.....	5
序文.....	6
方法.....	9
① 患者背景 .....	9
② デジタル PCR .....	11
③ 腫瘍細胞比率 (TCR).....	12
④ ddPCR-TCR チャート .....	15
⑤ 細胞株アッセイ .....	17
⑥ ddPCR-TCR value (DT value).....	17
⑦ PID を用いた HER2 タンパクの免疫染色、および HER2 タンパク発現の画像解析 .....	19
⑧ 統計解析.....	20
結果 .....	22
考察.....	45
引用文献.....	52
謝辞.....	56

## 略語表

ASCO/CAP	American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists
AUC	area under the curve
CEP17	chromosome 17 centromere
ddPCR	droplet digital PCR
DT value	ddPCR-TCR value
EGFR	epidermal growth factor receptor
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded
H522	H522 lung cancer cell line
HER2	human epithelial growth factor receptor 2
HSTT	high sensitive tissue tpfaesting
IHC	immunohistochemistry
ISH	<i>in situ</i> hybridization
LCL	GM18997 Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell line
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PID	phosphor integrated dot
ROC	receiver operating characteristic
ROI	region of interest
TAT	turn-around time
TCR	tumor content ratio

## 要旨

【背景】 Droplet digital PCR (ddPCR)により、核酸濃度を再現性をもって自動的に絶対定量化することが可能となった。本研究ではddPCRによる乳癌*HER2*遺伝子増幅の定量的な判定を試みた。

【方法】 対象は当院で2009～2011年に手術した乳癌患者41例で、手術標本のFFPE組織からDNAを抽出してddPCRで*HER2*とCEP17のcopy number ratio (ddPCR ratio)を算出した。また個々のサンプルの腫瘍細胞比率 (TCR)を計測し、ddPCR ratioと組み合わせて*HER2*遺伝子増幅の定量化 (DT valueの算出)を行った。

【結果】 DT valueを用いた判定は従来法による*HER2*ステータスの判定と極めて高い一致率を示した。

【結論】 乳癌*HER2*検査においてddPCRは*HER2*遺伝子増幅を再現性をもって低コストで自動定量計測できることから、現行の検査を代替しうると考える。

## 序文

ヒト上皮細胞成長因子受容体2 (Human epithelial growth factor receptor 2; *HER2*, または *ERBB2*)遺伝子は上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; *EGFR*)遺伝子と類似の構造を有する癌遺伝子である。*HER2*遺伝子がコードするHER2タンパクは細胞膜に局在する受容体で、チロシンキナーゼ活性を有し、上皮細胞の増殖と分化に関わっている。乳癌の15～25%でHER2の遺伝子増幅またはタンパク過剰発現が認められており、HER2の遺伝子増幅ないしタンパク過剰発現を有する乳癌患者は予後不良である [1]。また、HER2タンパクはトラスツズマブなどの分子標的治療薬による抗HER2療法の標的である [2]。HER2タンパクの過剰発現を確認する測定方法には免疫組織化学 (immunohistochemistry; IHC法)、ELISA法、ウェスタンブロット法などが、遺伝子増幅の測定方法には*in situ* hybridization (ISH)法、polymerase chain reaction (PCR)法などがある。これらのうち、世界的に最も頻用されているのがIHC法とISH法で [3]、両者は並列の関係に位置付けられ、ともに保険収載され併算定も認められている。わが国では簡便かつ安価なIHC法を第一選択としているが、近年欧米では精度・再現性・治療効果予測性および医療経済的観点から、初めからISH法を用いることも提唱されている [4]。IHC法では、細胞膜の染色強度と陽性細胞の割合をもとに0, 1+, 2+, 3+の4段階に分け、0/1+をHER2陰性、2+をHER2 equivocal, 3+をHER2陽性と判定する。2+の場合は遺伝子増幅がない症例にはトラスツズマブの効果は低いとされており [5]、この場合は同一標本をISH法で検索し、再判定を行う。

以上のような現行の方法によるHER2検査にはいくつかの問題が存在する。まずIHC法については、検査手法や判定基準に関して標準化されているものの、施設間や判定する医師間で

の不一致例が存在するという問題が挙げられる [6-8]。また、特にIHC法で2+ (HER2 equivocal)と判定されてからISH法による再判定結果が臨床医に報告されるまでにかかなりの時間を要することも問題となる。そしてIHC法、ISH法ともに病理医が標本を目視で観察して診断を下していることから、最終的な判定は主観的にならざるを得ず、また病理医の負担にもなっている。さらに、特にISH法については検査費用が高額であり、医療経済の圧迫にもつながっている。

近年、『第3のPCR』と言われるデジタルPCRが開発された。元来のPCRは電気泳動のバンドの濃さによって濃度を推測するものであり、タンパクやDNAの定性はできても定量することができなかった。第2世代のPCRであるリアルタイムPCRは、すでに濃度が分かっている標準品からの検量線とサンプルが示した検量線との差で数値を求めるというもので、ある程度の定量は可能であるものの、相対的な定量であるため精密さに欠けることが指摘されている。それに対してデジタルPCRは、限界希釈法、エンドポイントPCR、ポアソン解析を組み合わせることで核酸濃度を絶対定量し、リアルタイムPCRよりも精密な測定を行うことが可能な新しいデバイスである [9]。近年さらに改良されたドロップレットデジタルPCR (droplet digital PCR; ddPCR)は、核酸濃度を再現性をもって自動的により精密に定量化することが可能となった。ddPCRでは、試薬を20,000個のドロップレットに分画し、それぞれのドロップレットでPCRを行う。各ドロップレットの蛍光をポジティブまたはネガティブと直接カウントすることにより、絶対定量が実現される [10]。ddPCRでは核酸の正確・精密な絶対定量を可能にするだけでなく、作業工程のランニングコストを安価に抑えることができる [9]。この技術を応用すれば、これまで主観的に判定が行われていた乳癌HER2ステータスを、客観的に定量測定することができるのではないかと考えた。

一方、細胞膜に発現するタンパクの発現量の定量化についても最新の技術が誕生してい

る。ナノ粒子蛍光体 (Phosphor Integrated Dot nanoparticles; PID nanoparticles)を用いたIHC法、およびPIDとデジタル画像処理技術が組み合わさったデジタル病理技術 (High Sensitive Tissue Testing; HSTT)が近年本邦で開発され、腫瘍細胞でのタンパク発現を精密に観測することが可能になった [11-14]。特定のタンパク (抗原)に付着したPID (抗体)を測定することで、タンパクが発現している部位を可視化するだけでなく、細胞あたりのPIDを機械的に自動カウントすることで、これまでのIHCでは実現しえなかったタンパク発現の定量化が可能となった。

本研究では、乳癌手術標本のホルマリン固定・パラフィン包埋 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE)組織を用い、上記の最新技術を応用し、乳癌HER2ステータスの定量測定を試みた。そして従来のIHC法・ISH法による判定結果との比較検討を行うことで、ddPCRやPIDの乳癌HER2検査での有用性、そして臨床応用の可能性を検討した。



## 方法

### ① 患者背景

対象症例は2009年から2011年に東京大学医学部附属病院で手術を行った乳癌症例のうちの41例で、FFPEブロックからの切片を試料として用いた (Table 1; p. 10)。症例選択の際には、非浸潤性乳管癌症例、腫瘍径が1 cm未満の症例、手術以前に化学療法治療歴のある症例は除外した。対象患者の年齢の中央値は60.0歳 (28から85歳)で、腫瘍径は10から43 mmであった。全ての対象症例で予めAmerican Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP)ガイドライン2013 [15]に基づいてHER2ステータスの診断がなされており、腫瘍の浸潤部でのIHC法でスコア3+ (強い完全な全周性の膜染色が10%を超えて認められる)、またはスコア2+ (不完全および/または弱/中程度の全周性の膜染色が10%を超えて認められる、または強い完全な全周性の膜染色が10%以下に認められる)でかつ、FISH法またはDISH法で*HER2*遺伝子増幅あり (20細胞以上での平均として、*HER2*/CEP17 [17番染色体セントロメア、ch17centと同義]比が2.0以上、または*HER2*/CEP17比が2.0未満かつ*HER2*遺伝子コピー数の平均が1細胞あたり6.0以上)の場合をHER2陽性、IHC法でスコア0 (染色像が認められない、または不完全およびかすかな/かろうじて膜染色が認められるのが10%以下である)、1+ (かすかな/かろうじて部分的な膜染色が10%を超えて認められる)、または2+でかつISH法で*HER2*遺伝子増幅なし (*HER2*/CEP17比2.0未満かつ*HER2*遺伝子コピー数の平均が1細胞あたり4.0未満)の場合をHER2陰性と判定した。尚、本研究ではISH法でequivocal (*HER2*/CEP17比が2.0未満かつ*HER2*遺伝子コピー数の平均が1細胞あたり4.0以上6.0未満)と判定された症例は認めなかった。

上記判定法に基づきIHC法でHER2 3+と判定された10症例のうち4例は、IHC法で腫瘍細胞に強い完全な全周性の膜染色が10%を超えて認められるが30%未満であったため、術後診断時には旧版のASCO/CAPガイドライン2007 [16]に則ってHER2 2+と診断されていた。最終的に、本研究では15例がHER2陽性と判定された。

		(N)
Age (years) median 60.0 (range 28-85)	<50	10
	≥50	31
Tumor size (mm) (range 10-43)	<10	0
	10≤, <20	21
	20≤, <30	8
	30≤	12
HER2 score	0	4
	1+	4
	2+ (ISH - )	18
	2+ (ISH + )	5
	3+	10
Lymph Node metastasis	negative	25
	positive	16
pStage	1	17
	2A	14
	2B	9
	3A, B	0
	3C	1
	4	0

**Table 1** (参考文献 [17]より転載)

対象症例41例の患者背景

*ISH* -in situ hybridization; *pStage* -pathological stage

DNA抽出は、病理診断時にHER2タンパクの免疫染色やISHを行ったのと同じブロックから行った。各サンプルのFFPEブロックから5 µm厚のFFPE切片を3枚ずつ作成し、MagCore® Genomic DNA FFPE One-Step Kit (Cartridge Code: 405; running time: 2 h; elution volume: 60 µL)を用いて製品マニュアルに従ってDNAを自動的に抽出した。次いでNanoDrop 2000 spectrophotometerを用いて抽出したDNA量を測定し、結果的に各症例から0.6から12.0 µgのDNAを得た。

## ② デジタルPCR

過去の報告 [18]に倣ってデジタルPCRを施行した。装置はQX200 droplet digital PCR system (Bio-Rad)を用い、プライマーはリアルタイムPCRを用いた研究で既に汎用されている ERBB2 (ERBB2-13F: CCCTCCGTACTTCCTGATGCT, ERBB2-13R: GCCATGGAGAGCCTCACATT, ERBB2-13P: FAM/TGAGAGTCA/ZEN/AGATCTC/3IABkFQ)とch17cent (ch17cent-6F: CGCTCCTGCACTGTAACACGT, ch17cent-6R: TCATTCCTGCAGCCCTTGA, ch17cent-6P: VIC/AGCAGGTCC/ZEN/AGCCCA/3IABkFQ) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA)を使用した。陽性コントロールとしてはMDA-MB361 DNA (5.76 ng)を用いた。まず計20 µLの試薬 (10 µL Bio-Rad 2× ddPCR Supermix for Probes (No dUTP), ERBB2プライマー (500 nM ERBB2-13F, 500 nM ERBB2-13R, 250 nM ERBB2-13P), ch17centプライマー (500 nM ch17cent-6F, 500 nM ch17cent-6R, 250 nM ch17cent-6P), 10–260 ng DNA, 蒸留水)を作成した後、QX200 Droplet Generatorで約20,000個のドロップレット (油滴)にエマルジョン分画し、96ウェルのPCRプレートに移してヒートシールし、サーマルサイクラー (BioRad PX1)に設置して

PCRを行った。サーマルサイクラーの条件は95°C×10分→95°C×30秒と56°C×60秒 40サイクル→98°C×10分→4.0°Cホールドとした。PCR終了後、PCRプレートをBio-Rad QX200 droplet readerにロードし、Bio-Rad QuantaSoft version 1.6.6 softwareを用いてデータ解析を行った。データ解析では、*HER2*と*CEP17*のコピー数の比をポアソン分布を用いて計算した [19]。

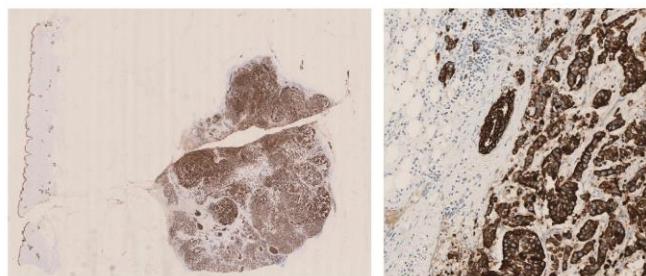
### ③ 腫瘍細胞比率 (TCR)

ddPCRで得られた結果を補正する目的で、サンプルに含まれる腫瘍細胞の比率である Tumor content ratio (TCR)の計算を行った。本研究ではDNA抽出に際してマクロダイセクションやマイクロダイセクションを行っておらず、抽出したDNAには腫瘍細胞由来のものと正常細胞由来のものが混合しているため、これをddPCRで解析した場合に得られた*HER2/CEP17*比は実際の腫瘍細胞の*HER2/CEP17*比よりも低く算出される。そこで、各サンプルに含まれる腫瘍細胞の割合 (TCR)を計算して、腫瘍細胞での*HER2/CEP17*比をより正確に評価することを試みた。

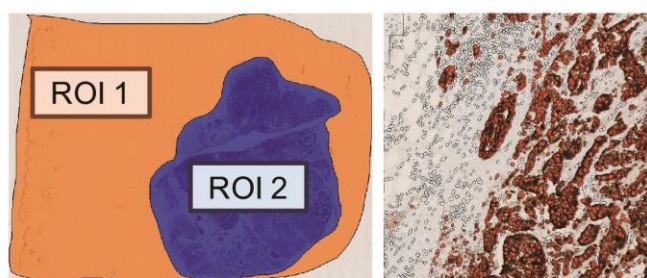
TCRを計算するにあたって、各標本を上皮系マーカーである抗ケラチン/サイトケラチンマウスモノクローナル抗体AE1/AE3 (1:200, Leica Biosystems)で免疫染色した。この免疫染色は病理診断時に*HER2*タンパクの免疫染色やISHを行ったのと同じブロックからの薄切切片で行っており、上記方法①でDNAをしたものとの連続切片である。その後、NanoZoomer 2.0-HT Digital slide scanner (Hamamatsu Photonics KK)で標本のデジタル画像を作成し、Definiens Tissue Studio (ver 3.6; Munich, Germany)でAE1/AE3陽性細胞、陰性細胞に分類して細胞数をカウントした [20-22]。Tissue Studioでは、腫瘍細胞はAE1/AE3 (IHC marker)で染色された細胞膜 (Membrane)をカウントの対象とし、非腫瘍細胞はヘマトキシリン染色された核 (Nuclear)をカウ

ントの対象とした。設定は、“Stain Threshold” のうちIHC thresholdを0.6、Hematoxylin Thresholdを0.06、Typical Nuclear Sizeを $45\text{ }\mu\text{m}^2$ 、Exclusion areaを<5、Cell Simulation SettingsのMaximum Cell Growthを $1\text{ }\mu\text{m}$ とした。なお、腫瘍細胞の核もヘマトキシリンで染色されるが、“IHC marker”で染色された細胞の核はカウントの対象とならないため、腫瘍細胞が二重にカウントされることはない。病変部分および切片全体をそれぞれフリーハンドでRegion of Interest (ROI)として設定し、TCRは (病変部でのAE1/AE3陽性細胞数) / (サンプル中の全細胞数)で計算した (Figure 1; p. 14)。

① AE1/AE3 による染色



② Tissue Studio ver 3.6 で細胞数カウント



③ TCR 算出

$$TCR \cong \frac{\text{Stained cells in ROI 2}}{\text{All cells in ROI 1 ROI 2}}$$

**Figure 1**

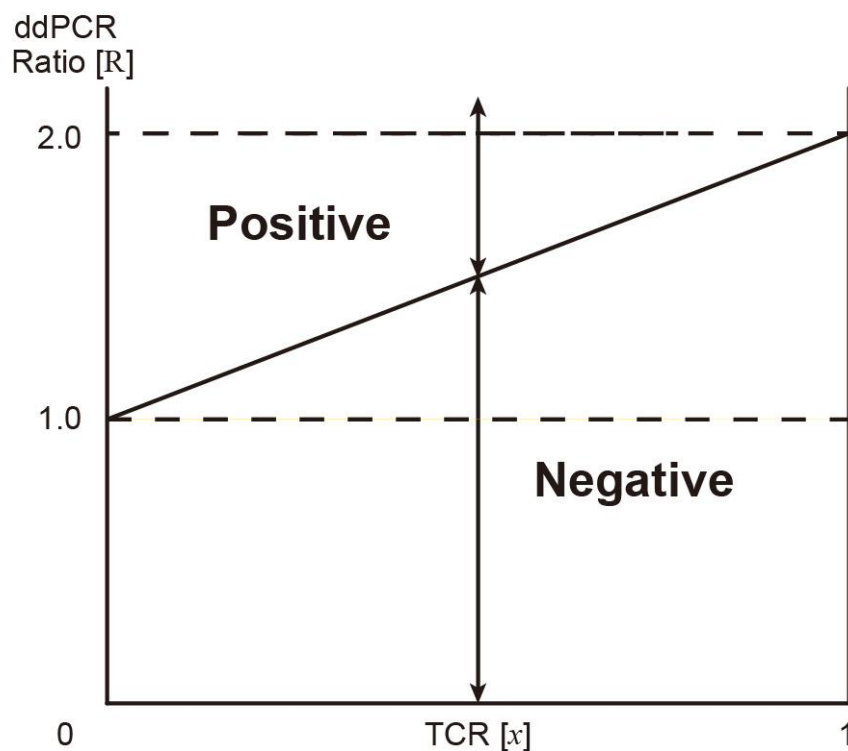
腫瘍細胞比率 (TCR)の算出

- ① 各標本を上皮系マーカーである AE1/AE3 (1:200, Leica Biosystems)で免疫染色した。
- ② NanoZoomer 2.0-HT Digital slide scanner で標本のデジタル画像を作成し、Definiens Tissue Studio (ver 3.6; Munich, Germany)で AE1/AE3 陽性の細胞、陰性の細胞に分類して細胞数をカウントした。
- ③ TCR は (病変部 [図中の ROI2]での AE1/AE3 陽性細胞数)/(サンプル中の全細胞数)で計算した。

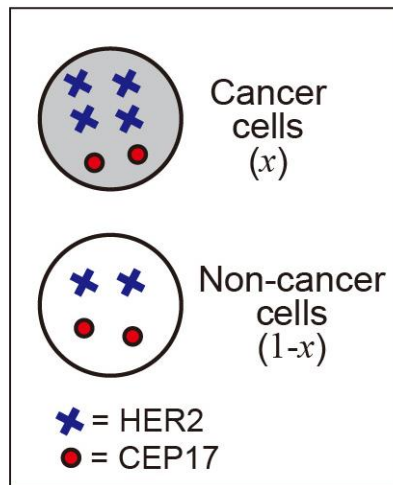
#### ④ ddPCR-TCRチャート

*HER2*遺伝子増幅の評価のため、私は先行の報告 [22]で用いられた2次元チャートを応用し、これをddPCR-TCRチャートと命名した (Figure 2a)。チャートの縦軸はddPCR ratio [R] ( $0 < R$ )を、横軸はTCR [x] ( $0 \leq x \leq 1$ )をそれぞれ表している。*HER2*遺伝子がCEP17のちょうど2倍増幅している腫瘍細胞を仮定した場合、腫瘍細胞内の遺伝子コピー数が均質でかつ非腫瘍細胞の染色体が2倍体のみであるという前提のもとでは、ddPCRによって得られるその腫瘍細胞での*HER2/CEP17*比 [R]は $x + 1$ で表される [23](Figure 2b; p. 16)。このことから、あるサンプルがチャート上の $R = x + 1$ のカットオフラインよりも上にプロットされればそのサンプルの腫瘍細胞の*HER2*遺伝子は増幅あり (*HER2/CEP17*比 $>2.0$ )と判定できると考えられる。

**a**



**b**



$$\begin{aligned}
 R &= \frac{\text{HER2 copy number}}{\text{CEP17 copy number}} \\
 &= \frac{4x + 2(1-x)}{2x + 2(1-x)} \\
 &= x + 1
 \end{aligned}$$

**Figure 2**

ddPCR-TCRチャートの概念 (参考文献 [17]より転載)

- a) チャートの縦軸はddPCR ratio  $[R]$  ( $0 < R$ )を、横軸はTCR  $[x]$  ( $0 \leq x \leq 1$ )をそれぞれ表している。
- b) *HER2*遺伝子がCEP17のちょうど2倍増幅している腫瘍細胞を仮定した場合、ddPCRによって得られるその腫瘍細胞での*HER2*/CEP17比  $[R]$ は $x + 1$ で表される。あるサンプルがチャート上の $R = x + 1$ のカットオフラインよりも上にプロットされればそのサンプルの腫瘍細胞の*HER2*遺伝子は増幅あり (*HER2*/CEP17比 $>2.0$ )と判定することができると考えられる。



## ⑤ 細胞株アッセイ

上記の理論をより強固なものにする目的で、細胞株を用いた検証を行った。すなわち、腫瘍細胞・非腫瘍細胞をある一定のTCRになるように混合し、それらをddPCRを用いて解析し、ddPCR-TCRチャート上にプロットした [23]。細胞株のうち一つは*HER2*遺伝子が2倍増幅した腫瘍細胞に見立てたthe American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)製のH522 lung cancer cell lineを、もう一つは*HER2*遺伝子増幅のない非腫瘍細胞に見立てたGM18997 Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell line (LCL) (Coriell Biorepository)を用いた。細胞株からのDNA抽出にはQIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いた。

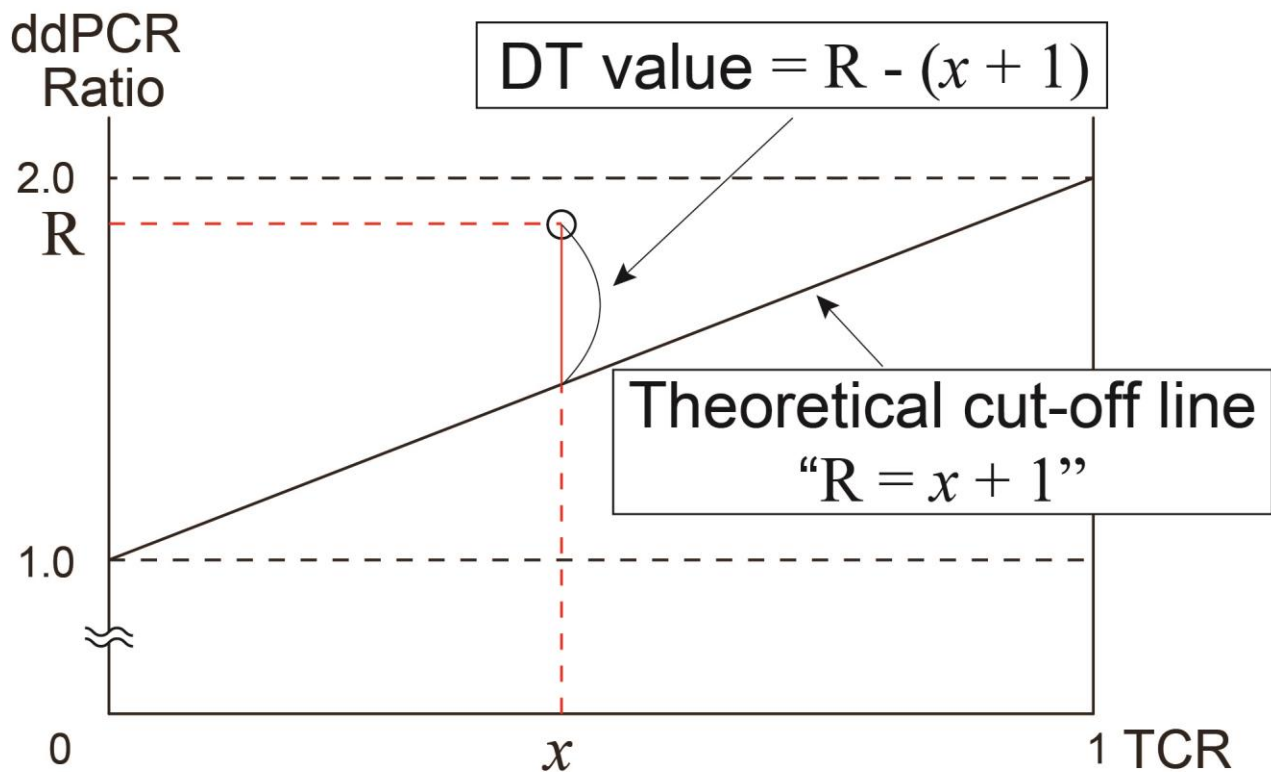
まず、上記細胞株から抽出されたDNAの1  $\mu$ Lあたりのコピー数を算出し、DNAコピー数換算で10%から90%になるように抽出DNAを混合して、10%間隔での仮想TCRを作成した。そしてそれをddPCRで3回ずつ解析し、結果をddPCR-TCRチャートにプロットした。TCRとddPCR ratioの関係を単回帰分析し、99%信頼区間を算出した。

臨床症例での*HER2*遺伝子増幅の判定では、この99%信頼区間を“equivocalエリア”として設定し、これよりも上を陽性エリア、下を陰性エリアとすることとした。このようにddPCRによる*HER2*/CEP17比とTCRをそれぞれ算出し、ddPCR-TCRチャート上にプロットして腫瘍細胞の*HER2*遺伝子増幅の有無を判定する手法を“ddPCR-TCR method”と命名した。

## ⑥ ddPCR-TCR value (DT value)

上記ddPCR-TCR methodは、サンプルのddPCR ratioとTCRをそれぞれ計測し、サンプルがチャート上のどのエリアにプロットされるかで*HER2*遺伝子増幅の有無を判定するというものである。

る。そのため、ddPCR ratioやTCRは定量的に測定されるものの、最終的な判定の部分は定性的なものとなった。今回、ddPCRによる絶対定量という特性を活かすため、各サンプルで“ $R - (x + 1)$ ”という値を算出し、DT valueと命名した。このDT valueが正の値であれば、そのサンプルはカットオフライン $R = x + 1$ よりも上にプロットされるということになり、逆に負の値であれば $R = x + 1$ よりも下にプロットされることになる (Figure 3)。さらにDT valueの計算によって、当該サンプルのHER2遺伝子増幅の有無を判定することができるだけでなく、DT valueの絶対値によってそのサンプルがカットオフラインからどの程度離れてプロットされるかを数値化し、これによってHER2遺伝子増幅を定量的に判定することができると考えた。



**Figure 3**

ddPCR-TCR value (DT value)の概念

各サンプルで $R - (x + 1)$ を算出し、ddPCR-TCRチャート上にプロットされた症例が理論的なカットオフラインである“ $R = x + 1$ ”からどの程度離れているかということを数値化した。

⑦ PIDを用いたHER2タンパクの免疫染色、およびHER2タンパク発現の画像解析

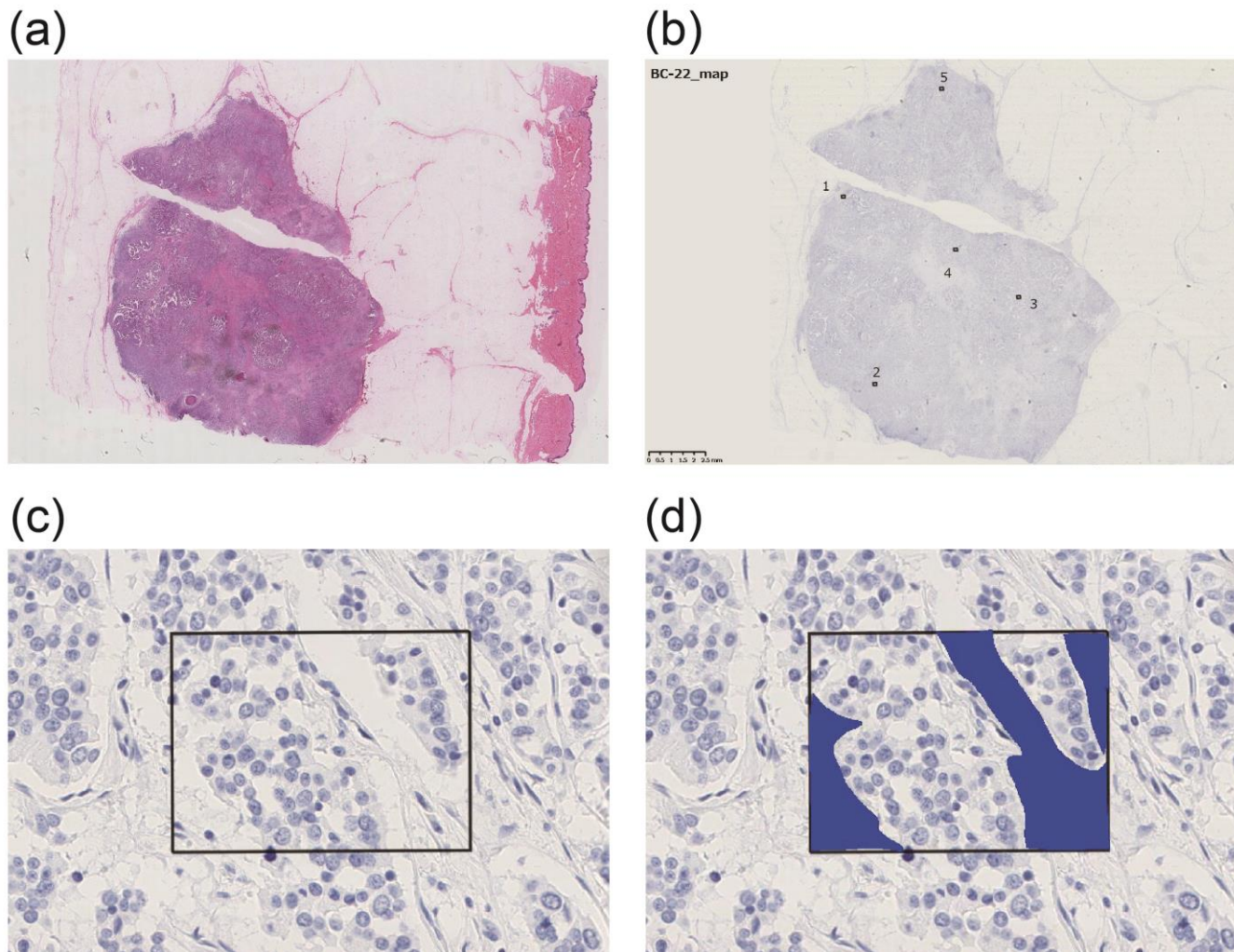
FFPEサンプルを3  $\mu\text{m}$ 厚に薄切し、スライドガラスに貼りつけ、キシレンで脱パラフィン化した。pH 6.0のクエン酸緩衝液によって95°C、40分間抗原賦活化処理を行い、その後40分間室温で放冷した。蒸留水で洗浄後phosphate-buffered saline (PBS)で5分間3回洗浄し、B-001 (KONICA MINOLTA, Tokyo, Japan)によって室温で15分間ブロッキング処理を行った。その後一次抗体である抗HER2 (4B5)ウサギモノクローナル抗体 (原液)で4°C下で一晩反応させた。PBSで5分間3回洗浄した後、二次抗体として抗アンチトリプシン $\alpha$ 1抗体であるSA-001 (KONICA MINOLTA, Tokyo, Japan) 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で25°C下で30分間反応させた。さらにPBSで5分間3回洗浄した後、二次抗体にPID-conjugated Streptavidin (0.03 a.u; KONICA MINOLTA, Tokyo, Japan)を25°C下で120分間かけて付着させた。PBSで5分間3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (PFA)で室温で10分間後固定し、蒸留水で5回洗浄した。Mayer's hematoxylin solution (Sakura Finetek, Tokyo, Japan)で室温で1分間核染色し、蒸留水で5回洗浄後、蒸留水で10分間色出しをして、脱水・透徹・封入をした。

PIDによるHER2タンパク発現の解析に先立って、各サンプルの腫瘍の浸潤部分から5つのスポットを選択した。各スポットでは174.4  $\mu\text{m}$   $\times$  130.8  $\mu\text{m}$ の範囲 (顕微鏡下で400倍の視野に相当)を関心領域 (Region of interest; ROI)として設定した (Figure 4; p. 21)。それぞれのROIに間質細胞や線維組織などの非腫瘍細胞が含まれている場合は、必要に応じてマニュアルでトリミングした。PIDの蛍光色素を観察するための光学システムとして蛍光顕微鏡 (BX53; Olympus, Tokyo, Japan)、顕微鏡用カラーカメラ (DP73; Olympus, Tokyo, Japan)そして撮影ソフト(cellSens standard version 1.12; Olympus, Tokyo, Japan)を用いた。レーザー励起蛍光検出や露光時間の設定は先行報告 [12]に準じた。画像解析ソフトはPidAnalyzer 2.14.1.1

(KONICA MINOLTA, Tokyo, Japan)、データ解析のための画像編集ソフトはImage J version 1.48 (KONICA MINOLTA, Tokyo, Japan)を用い、各細胞ごとのPID数 (PIDs/cell)を自動的にカウントした [12]。

#### ⑧ 統計解析

統計解析は全て統計ソフトJMP Pro (ver. 12.2.0, SAS Institute, Japan)を用いて行った。



**Figure 4**

PID算出のためのスポット決めとROI設定

各サンプルの腫瘍の浸潤部分から5つのスポットをし、 $174.4\ \mu\text{m} \times 130.8\ \mu\text{m}$ の範囲（顕微鏡下で400倍の視野に相当）を関心領域（ROI）として設定した。それぞれのROIでは、間質細胞や線維組織などの非腫瘍細胞を含んでいる場合は、必要に応じてマニュアルでトリミングした。

## 結果

従来法によるHER2ステータス (IHCスコアおよびISH ratio)、ddPCRによって得られた

HER2/CEP17比、TCR、DT value、細胞あたりのPID数をTable 2 (pp. 22-23)にまとめた。

Case Number	HER2 IHC score (ASCO 2013)	HER2 IHC score (ASCO 2007)	HER2 ISH ratio	ddPCR Ratio	TCR	DT value	PID Nano particles / cell
1	0		1.73	0.80	0.109	-0.309	0.6
2	0		1.49	0.92	0.343	-0.423	2.6
3	0		1.26	1.03	0.147	-0.117	1.8
4	0		1.12	1.22	0.172	0.048	3.2
5	1+		0.74	0.53	0.615	-1.083	6.6
6	1+		1.57	0.86	0.504	-0.644	2.8
7	1+		1.10	0.91	0.611	-0.701	1.0
8	1+		1.86	1.34	0.434	-0.094	14.3
9	2+		1.10	1.14	0.720	-0.580	1.2
10	2+		1.11	0.75	0.452	-0.702	2.9
11	2+		1.13	1.24	0.528	-0.288	6.9
12	2+		1.15	1.22	0.464	-0.244	2.3
13	2+		1.18	1.19	0.354	-0.164	1.5
14	2+		1.24	0.94	0.474	-0.531	4.9
15	2+		1.26	1.25	0.484	-0.234	2.4
16	2+		1.28	0.94	0.458	-0.518	0.8
17	2+		1.30	1.12	0.658	-0.538	5.5
18	2+		1.36	1.11	0.664	-0.555	5.2
19	2+		1.38	1.22	0.626	-0.406	6.3
20	2+		1.43	1.08	0.525	-0.445	2.0
21	2+		1.64	1.20	0.718	-0.518	3.2
22	2+		1.65	1.66	0.606	0.054	4.6
23	2+		1.69	1.20	0.371	-0.171	4.2
24	2+		1.69	1.31	0.570	-0.260	1.3
25	2+		1.72	1.24	0.529	-0.289	1.4
26	2+		1.74	1.22	0.505	-0.285	9.6

27	2+		2.09	1.33	0.274	0.056	4.2
28	2+		2.17	1.46	0.292	0.168	3.1
29	2+		2.74	1.97	0.568	0.402	6.8
30	2+		4.28	2.50	0.553	0.947	5.3
31	2+		4.83	2.23	0.306	0.924	3.9
32	3+	2+	1.28	1.23	0.341	-0.111	4.8
33	3+	2+	1.30	1.19	0.171	0.019	1.2
34	3+	2+	4.06	3.74	0.341	2.399	23.6
35	3+	2+	6.47	1.39	0.404	-0.014	1.6
36	3+		1.70	1.51	0.242	0.268	3.6
37	3+		6.84	2.25	0.595	0.655	15.3
38	3+		6.90	3.52	0.681	1.839	48.7
39	3+		9.11	4.77	0.300	3.470	83.5
40	3+		8.32	5.15	0.491	3.659	104.5
41	3+		10.0	13.8	0.629	12.171	153.7

**Table 2**

各症例の従来法のHER2ステータス、ddPCR ratio、TCR、DT value、PIDs/cell一覧

*IHC*, immunohistochemistry; *ISH*, *in situ* hybridization; *ASCO*, American Society of Clinical Oncology; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; TCR, tumor content ratio; *DT value*, ddPCR-TCR value [ddPCRratio - (TCR + 1)]; *PID*, phosphor-integrated dot

細胞株を用いて仮想TCRを作成し、各TCRごとにddPCRを行って得られた*HER2*/CEP17比の結果をTable 3 (p. 24)に、各々の結果をddPCR-TCRチャートにプロットしたものをFigure 5 (p. 25)に示す。プロットされたデータから求めた単回帰直線は $R = 1.0724x + 0.9862$ で表され、理論的なカットオフラインである $R = x + 1$  (Figure 2a; p. 15, Figure 3; p. 18)に極めて近いものであった。また、得られた結果から99%信頼区間を計算し、これをプロットエリアに描出した (Figure 5; p. 25)。

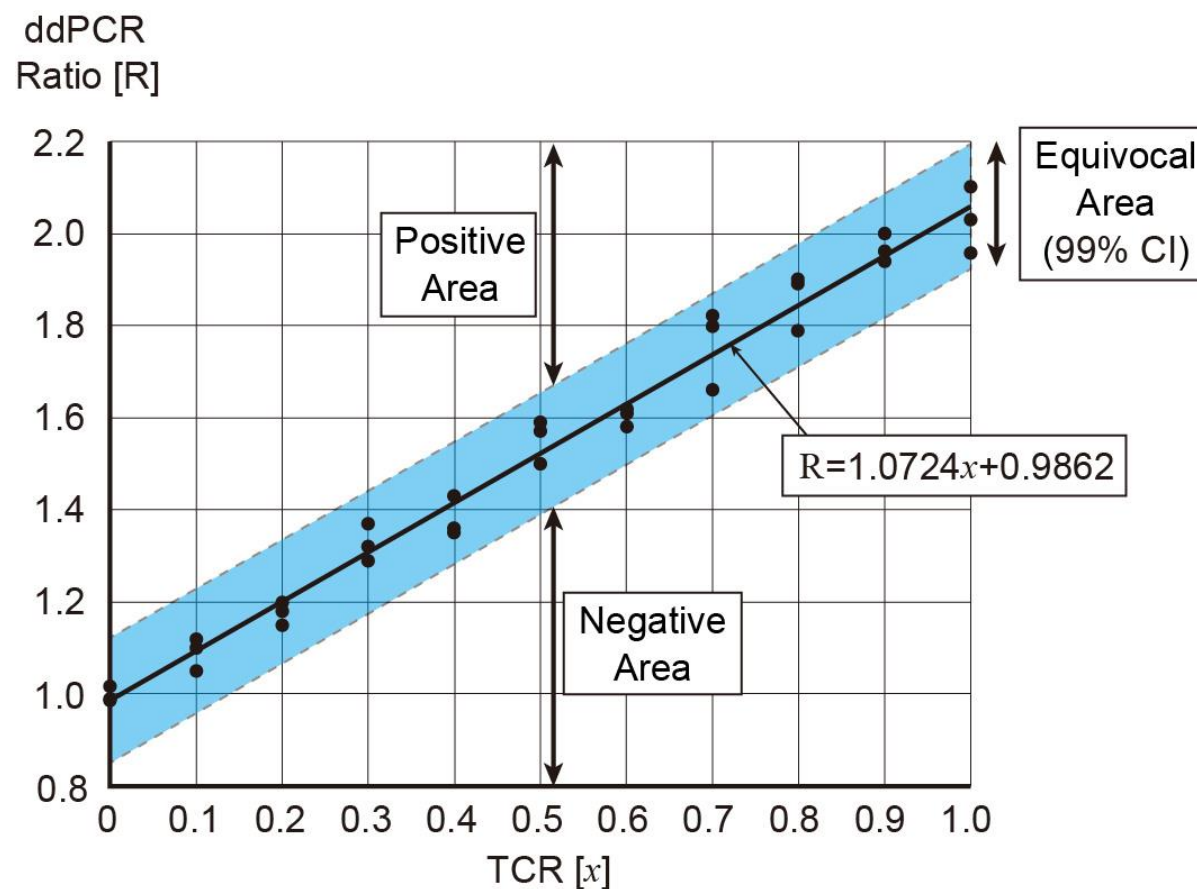
		Hypothetical TCR										
		0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
LCL (140 copies/ $\mu$ L)	[ $\mu$ L]	1.000	0.922	0.840	0.754	0.663	0.568	0.467	0.360	0.247	0.127	0
H522 (183.8 copies/ $\mu$ L)		0	0.078	0.160	0.246	0.337	0.432	0.533	0.640	0.753	0.873	1.000
ddPCR Ratio	1 回目	1.06	1.12	1.18	1.29	1.36	1.59	1.61	1.82	1.90	1.96	2.11
	2 回目	1.04	1.10	1.20	1.32	1.35	1.57	1.58	1.80	1.89	1.94	2.10
	3 回目	1.02	1.05	1.15	1.37	1.43	1.50	1.62	1.66	1.79	2.00	2.03

**Table 3**

細胞株アッセイ結果 (各TCRごとにddPCRを行って得られた*HER2*/CEP17比)

LCL, GM18997 Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell line; H522, H522 lung cancer cell line; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; TCR, tumor content ratio



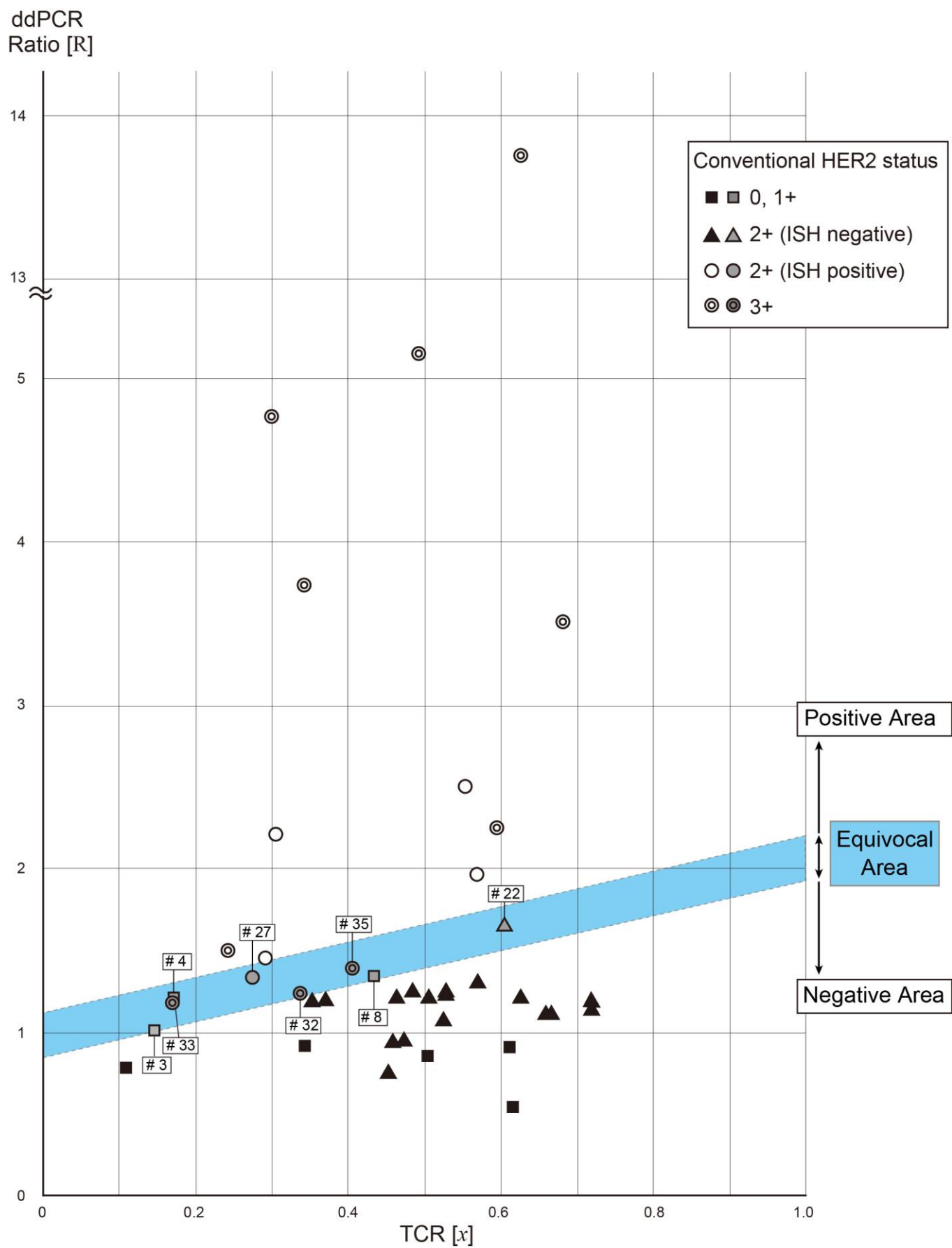


**Figure 5**

細胞株アッセイの結果 (参考文献 [17]より転載)

腫瘍細胞・非腫瘍細胞に見立てた細胞株からDNAを抽出し、10～90%の10%刻みの仮想TCRになるように混合し、それらをddPCRを用いて3回ずつ解析し、ddPCR-TCRチャート上にプロットした。TCRとddPCR ratioの関係を単回帰分析した結果は $R = 1.0724x + 0.9862$ で表され、理論的なカットオフラインである $R = x + 1$ に極めて近いものであった。また、得られた結果から99%信頼区間を計算し、これをプロットエリアに描出した。

臨床検体を用いたddPCRでの*HER2*/CEP17比およびTCRの結果をFigure 6 (pp. 27-28)のddPCR-TCRチャートに示す。このチャートには細胞株を用いた解析から得られた99%信頼区間を“equivocal area”として採用している。11症例が*HER2*陽性エリアにプロットされ、そのうち7例は従来法で*HER2* 3+の症例、4例は従来法のIHCで2+の判定で、いずれもISHで*HER*遺伝子増幅ありと診断された症例である。*HER2*陰性のエリアにプロットされた症例は22例で、うち5例は従来法のIHCで0または1+の判定であったもの、17例はIHCで2+の判定で、ISHで*HER*遺伝子増幅なしと診断された症例である。Equivocal areaには8例がプロットされ、そのうち1例は*HER2* 3+の症例 (Table 2の症例33; p. 23)、1例はIHCで2+、ISHで遺伝子増幅ありの症例 (Table 2の症例27)、1例はIHCで2+、ISHで遺伝子増幅なしの症例 (Table 2の症例22; p. 22)、そして残りの3例はIHCスコアが0または1+の症例 (Table 2の症例3, 4, 8)であった。ddPCR-TCRチャートを用いた*HER2*ステータス判定としては、感度100% (15/15: 陽性エリアおよびequivocal areaにプロットされた症例)、特異度は84.6% (22/26)であり、従来法による判定結果と高い一致率を示した (Fisher正確検定  $P < 0.0001$ )。



ddPCR-TCRチャート（臨床検体41例での解析結果）（参考文献 [17]より転載）

各症例のDT valueを従来法のHER2ステータスごとに並べたグラフをFigure 7 (pp.28-30)に示す。なお、従来法の判定を、現在汎用されているASCO/CAP 2013の判定基準に基づいた場合、旧版のASCO/CAP 2007の判定基準に基づいた場合、およびIHCの結果は考慮せずISHによる遺伝子増幅の有無のみで判定した場合の3パターンに分けて図を作成した。



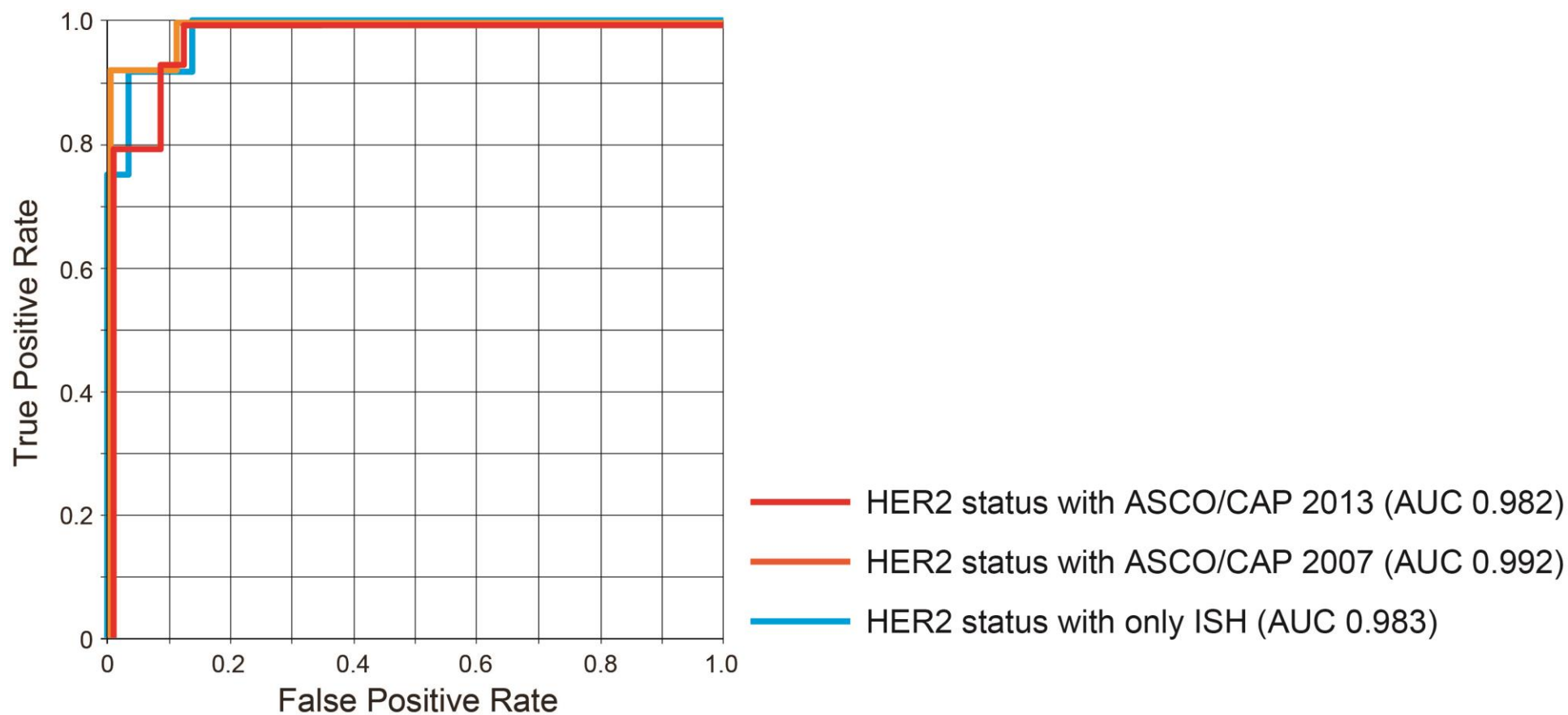


## Figure 7

### DT valueと従来法によるHER2判定の関係

HER2ステータスを(a) ASCO/CAP 2013に基づいて判定をした場合、(b) ASCO/CAP 2007に基づいて判定をした場合、(c) ISHのみで判定をした場合の3パターンに分けて解析を行った。

DT valueを用いた*HER2*遺伝子増幅定量によって*HER2*陽性症例を予測することが可能かどうか、receiver operating characteristic (ROC)による解析を行った (Figure 8; p. 31, Table 4; pp. 32-35)。HER2陽性の判定については、Figure 7 (pp. 28-30)と同様にASCO/CAP 2013の判定基準に基づいたもの、ASCO/CAP 2007の判定基準に基づいたもの、およびIHCの結果は考慮せずISHによる遺伝子増幅の有無のみで判定した場合の3パターンに分けて解析した。結果は、area under the curve (AUC)は0.982～0.992と極めて高値であり、従来法での*HER2*の判定を上記のいずれの方法で行った場合でも感度が90%を超えており、高い一致率を示した。



**Figure 8**

ROC解析結果 (DT valueを用いたHER2遺伝子増幅定量)

HER2ステータスを①ASCO/CAP 2013の判定基準に基づいて判定をした場合、②ASCO/CAP 2007の判定基準に基づいて判定をした場合、③ISHのみで判定をした場合の3パターンに分けて解析を行った。

① ASCO/CAP 2013 に基づいて HER2 判定をした場合

DT value	確率	1-特異度	感度	感度-(1-特異度)		真陽性 [N]	真陰性 [N]	偽陽性 [N]	偽陰性 [N]
.	.	0	0	0		0	26	0	15
1.839	1	0	0.3333	0.3333		5	26	0	10
0.947	1	0	0.4	0.4		6	26	0	9
0.924	1	0	0.4667	0.4667		7	26	0	8
0.655	0.9999	0	0.5333	0.5333		8	26	0	7
0.402	0.9968	0	0.6	0.6		9	26	0	6
0.268	0.9793	0	0.6667	0.6667		10	26	0	5
0.168	0.9205	0	0.7333	0.7333		11	26	0	4
0.056	0.7056	0	0.8	0.8		12	26	0	3
0.054	0.6998	0.0385	0.8	0.7615		12	25	1	3
0.048	0.6817	0.0769	0.8	0.7231		12	24	2	3
0.019	0.5876	0.0769	0.8667	0.7897		13	24	2	2
-0.014	0.4725	0.0769	0.9333	0.8564		14	24	2	1
-0.094	0.2253	0.1154	0.9333	0.8179		14	23	3	1
-0.111	0.1863	0.1154	1	0.8846	*	15	23	3	0
-0.117	0.1739	0.1538	1	0.8462		15	22	4	0
-0.164	0.098	0.1923	1	0.8077		15	21	5	0
-0.171	0.0897	0.2308	1	0.7692		15	20	6	0
-0.234	0.039	0.2692	1	0.7308		15	19	7	0
-0.244	0.0341	0.3077	1	0.6923		15	18	8	0
-0.26	0.0274	0.3462	1	0.6538		15	17	9	0
-0.285	0.0194	0.3846	1	0.6154		15	16	10	0
-0.288	0.0187	0.4231	1	0.5769		15	15	11	0
-0.289	0.0184	0.4615	1	0.5385		15	14	12	0
-0.309	0.0139	0.5	1	0.5		15	13	13	0
-0.406	0.0036	0.5385	1	0.4615		15	12	14	0
-0.423	0.0028	0.5769	1	0.4231		15	11	15	0
-0.445	0.0021	0.6154	1	0.3846		15	10	16	0
-0.518	0.0007	0.6923	1	0.3077		15	8	18	0
-0.531	0.0006	0.7308	1	0.2692		15	7	19	0
-0.538	0.0006	0.7692	1	0.2308		15	6	20	0
-0.555	0.0004	0.8077	1	0.1923		15	5	21	0
-0.58	0.0003	0.8462	1	0.1538		15	4	22	0
-0.644	0.0001	0.8846	1	0.1154		15	3	23	0
-0.701	0.0001	0.9231	1	0.0769		15	2	24	0
-0.702	0.0001	0.9615	1	0.0385		15	1	25	0
-1.083	0	1	1	0		15	0	26	0
-1.083	0	1	1	0		15	0	26	0



② ASCO/CAP 2007 に基づいて HER2 判定をした場合

DT value	確率	1-特異度	感度	感度-(1-特異度)		真陽性 [N]	真陰性 [N]	偽陽性 [N]	偽陰性 [N]
.	.	0	0	0		0	28	0	13
0.924	1	0	0.5385	0.5385		7	28	0	6
0.655	1	0	0.6154	0.6154		8	28	0	5
0.402	0.9991	0	0.6923	0.6923		9	28	0	4
0.268	0.9863	0	0.7692	0.7692		10	28	0	3
0.168	0.9055	0	0.8462	0.8462		11	28	0	2
0.056	0.5001	0	0.9231	0.9231	*	12	28	0	1
0.054	0.49	0.0357	0.9231	0.8874		12	27	1	1
0.048	0.4598	0.0714	0.9231	0.8516		12	26	2	1
0.019	0.3216	0.1071	0.9231	0.8159		12	25	3	1
-0.014	0.1959	0.1071	1	0.8929		13	25	3	0
-0.094	0.0463	0.1429	1	0.8571		13	24	4	0
-0.111	0.0333	0.1786	1	0.8214		13	23	5	0
-0.117	0.0296	0.2143	1	0.7857		13	22	6	0
-0.164	0.0117	0.25	1	0.75		13	21	7	0
-0.171	0.0102	0.2857	1	0.7143		13	20	8	0
-0.234	0.0029	0.3214	1	0.6786		13	19	9	0
-0.244	0.0023	0.3571	1	0.6429		13	18	10	0
-0.26	0.0017	0.3929	1	0.6071		13	17	11	0
-0.285	0.001	0.4286	1	0.5714		13	16	12	0
-0.288	0.001	0.4643	1	0.5357		13	15	13	0
-0.289	0.0009	0.5	1	0.5		13	14	14	0
-0.309	0.0006	0.5357	1	0.4643		13	13	15	0
-0.406	0.0001	0.5714	1	0.4286		13	12	16	0
-0.423	0.0001	0.6071	1	0.3929		13	11	17	0
-0.445	0	0.6429	1	0.3571		13	10	18	0
-0.518	0	0.7143	1	0.2857		13	8	20	0
-0.531	0	0.75	1	0.25		13	7	21	0
-0.538	0	0.7857	1	0.2143		13	6	22	0
-0.555	0	0.8214	1	0.1786		13	5	23	0
-0.58	0	0.8571	1	0.1429		13	4	24	0
-0.644	0	0.8929	1	0.1071		13	3	25	0
-0.702	0	0.9643	1	0.0357		13	1	27	0
-1.083	0	1	1	0		13	0	28	0
-1.083	0	1	1	0		13	0	28	0

③ISH のみで HER2 判定をした場合

DT value	確率	1-特異度	感度	感度-(1-特異度)		真陽性 [N]	真陰性 [N]	偽陽性 [N]	偽陰性 [N]
.	.	0	0	0		0	29	0	12
2.399	1	0	0.3333	0.3333		4	29	0	8
1.839	1	0	0.4167	0.4167		5	29	0	7
0.947	0.9994	0	0.5	0.5		6	29	0	6
0.924	0.9993	0	0.5833	0.5833		7	29	0	5
0.655	0.9915	0	0.6667	0.6667		8	29	0	4
0.402	0.9157	0	0.75	0.75		9	29	0	3
0.268	0.7554	0.0345	0.75	0.7155		9	28	1	3
0.168	0.5471	0.0345	0.8333	0.7989		10	28	1	2
0.056	0.2969	0.0345	0.9167	0.8822	*	11	28	1	1
0.054	0.293	0.069	0.9167	0.8477		11	27	2	1
0.048	0.2814	0.1034	0.9167	0.8132		11	26	3	1
0.019	0.2298	0.1379	0.9167	0.7787		11	25	4	1
-0.014	0.1796	0.1379	1	0.8621		12	25	4	0
-0.094	0.0936	0.1724	1	0.8276		12	24	5	0
-0.111	0.0809	0.2069	1	0.7931		12	23	6	0
-0.117	0.0768	0.2414	1	0.7586		12	22	7	0
-0.164	0.0508	0.2759	1	0.7241		12	21	8	0
-0.171	0.0478	0.3103	1	0.6897		12	20	9	0
-0.234	0.027	0.3448	1	0.6552		12	19	10	0
-0.244	0.0247	0.3793	1	0.6207		12	18	11	0
-0.26	0.0213	0.4138	1	0.5862		12	17	12	0
-0.285	0.0169	0.4483	1	0.5517		12	16	13	0
-0.288	0.0164	0.4828	1	0.5172		12	15	14	0
-0.289	0.0163	0.5172	1	0.4828		12	14	15	0
-0.309	0.0135	0.5517	1	0.4483		12	13	16	0
-0.406	0.0055	0.5862	1	0.4138		12	12	17	0
-0.423	0.0047	0.6207	1	0.3793		12	11	18	0
-0.445	0.0038	0.6552	1	0.3448		12	10	19	0
-0.518	0.0019	0.7241	1	0.2759		12	8	21	0
-0.531	0.0017	0.7586	1	0.2414		12	7	22	0
-0.538	0.0016	0.7931	1	0.2069		12	6	23	0
-0.555	0.0014	0.8276	1	0.1724		12	5	24	0
-0.58	0.0011	0.8621	1	0.1379		12	4	25	0
-0.644	0.0006	0.8966	1	0.1034		12	3	26	0
-0.701	0.0003	0.931	1	0.069		12	2	27	0
-0.702	0.0003	0.9655	1	0.0345		12	1	28	0
-1.083	0	1	1	0		12	0	29	0
-1.083	0	1	1	0		12	0	29	0

**Table 4**

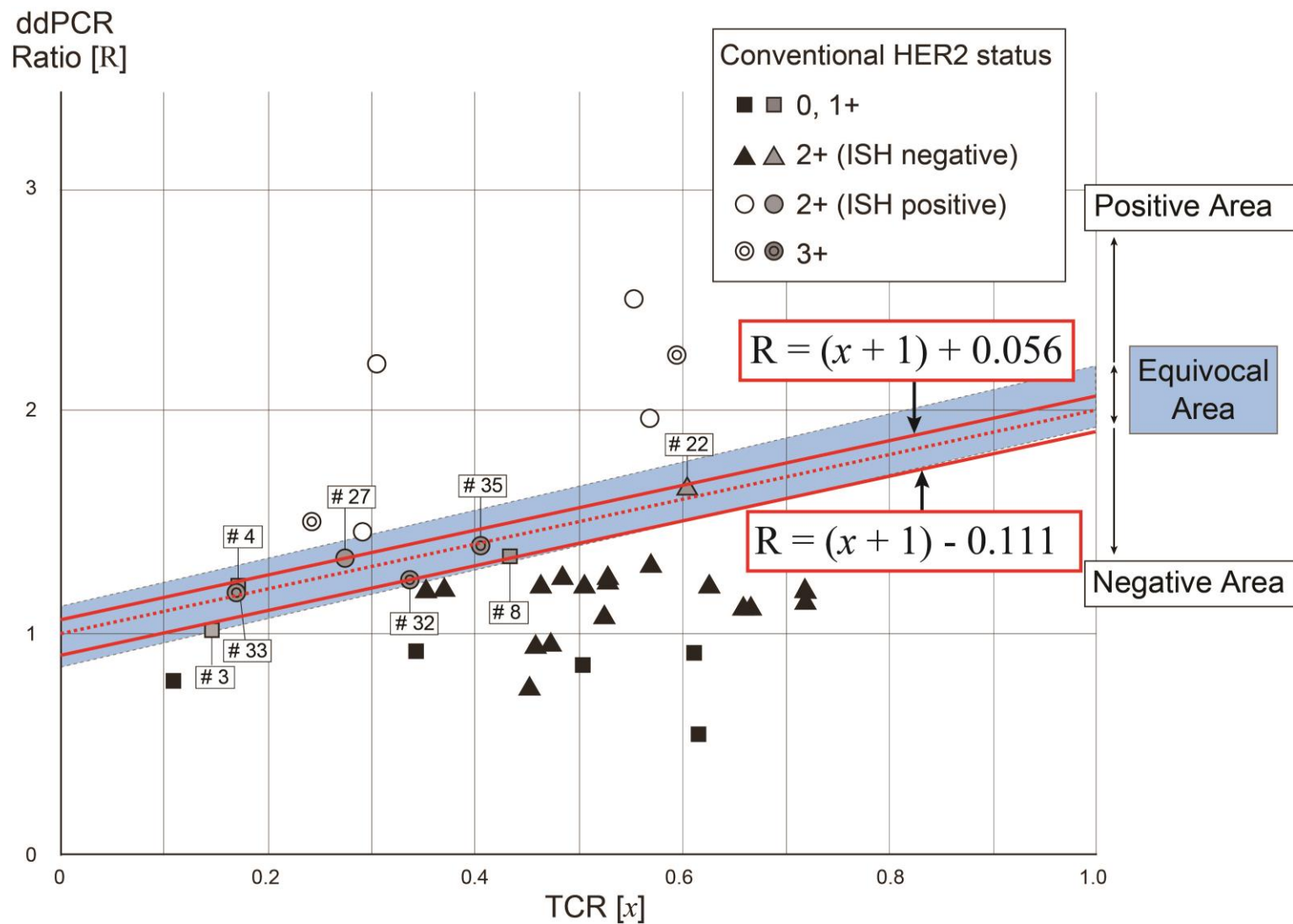
DT valueのROC解析結果

HER2ステータスを①ASCO/CAP 2013の判定基準に基づいて判定をした場合、②ASCO/CAP 2007の判定基準に基づいて判定をした場合、③ISHのみで判定をした場合の3パターンに分けて解析を行った。

灰色はカットオフ値である。

*IHC*, immunohistochemistry; *ISH*, *in situ* hybridization; *ASCO*, American Society of Clinical Oncology; *DT value*, ddPCR-TCR value [ddPCRratio - (TCR + 1)]

DT valueを用いたROC analysisによって得られたカットオフ値のrange ( $-0.111 \leq \text{DT value} \leq 0.056$ ) (Table 4; pp. 32-35)を新たに“equivocal range”として、ddPCR-TCR chartに追記したものをFigure 9 (p. 36)に示す。この“equivocal range”は細胞株を用いた仮想TCRとddPCR ratioによって得られた“equivocal area” (Figure 5; p. 25, Figure 6; pp. 27-28)と一致した。

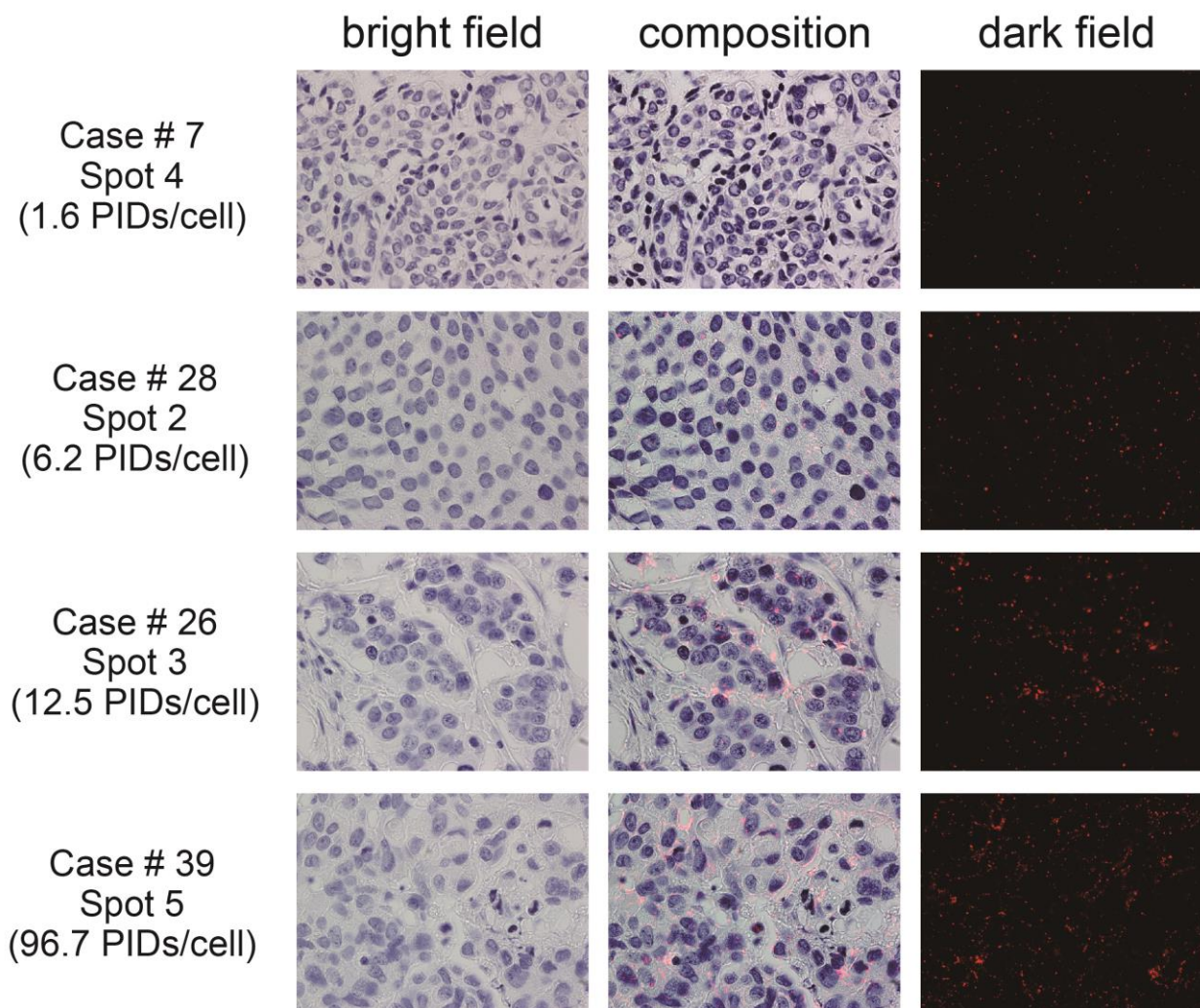


**Figure 9**

DT valueのROC解析によって得られた新たなequivocal range

DT valueを用いたROC analysisによって得られたカットオフ値のrange ( $-0.111 \leq \text{DT value} \leq 0.056$ )をddPCR-TCR chartに追記した。

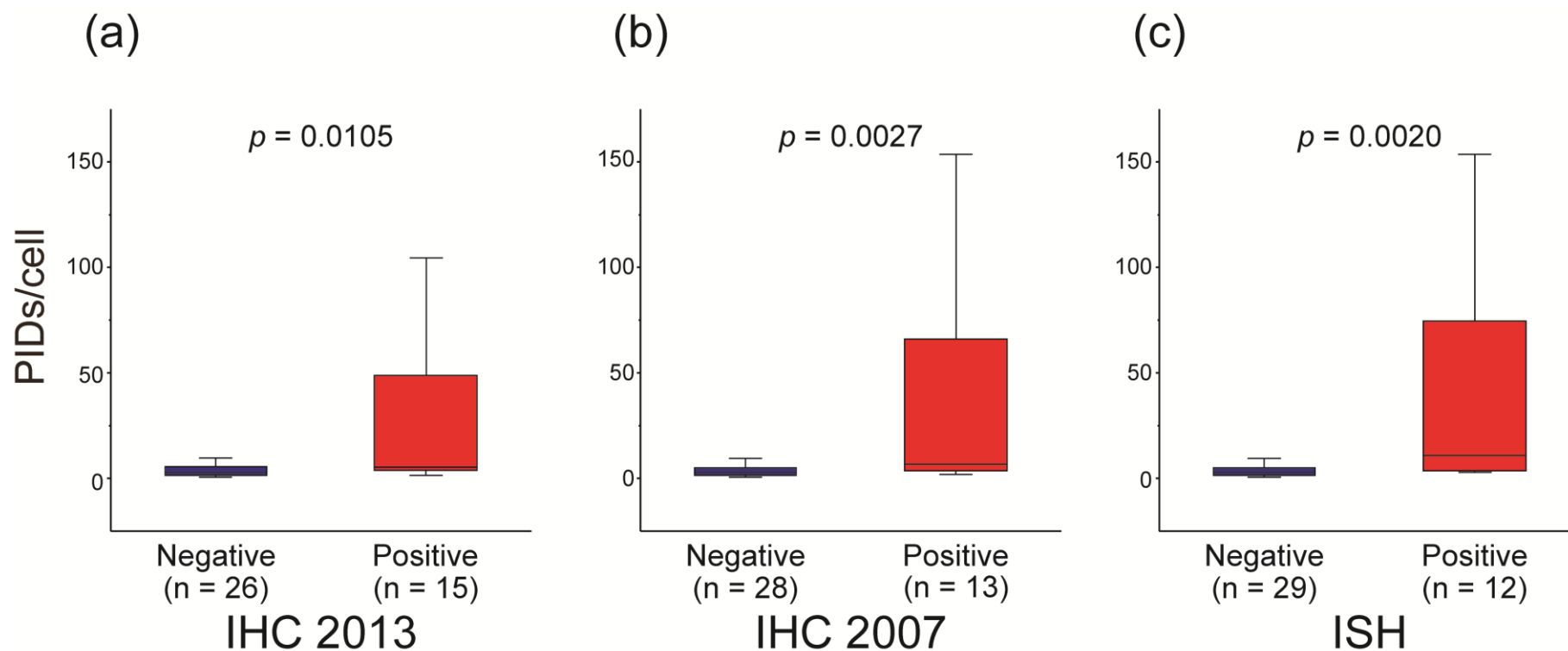
PID nanoparticlesによるHER2タンパク免疫染色の実例をFigure 10に示す。また、PIDによるHER2タンパク発現の定量評価と、従来法によるHER2判定の関係を、箱ひげ図 (Figure 11; p. 38)で表した。従来法の判定はASCO/CAP 2013の判定基準に基づいた場合、旧版のASCO/CAP 2007の判定基準に基づいた場合、およびIHCの結果は考慮せずISHによる遺伝子増幅の有無のみで判定した場合の3パターンに分けて図を作成した。結果は、上記いずれの判定方法を用いてもHER2陽性例では統計学的に有意にPIDs/cellは高値を示した ( $P < 0.05$ , Wilcoxon順位和検定)。



**Figure 10**

PID nanoparticlesによるHER2タンパク免疫染色の実例

各症例、各スポットの明視野での撮影画像、暗視野での撮影画像、およびそれらの合成画像を掲載する。



**Figure 11**

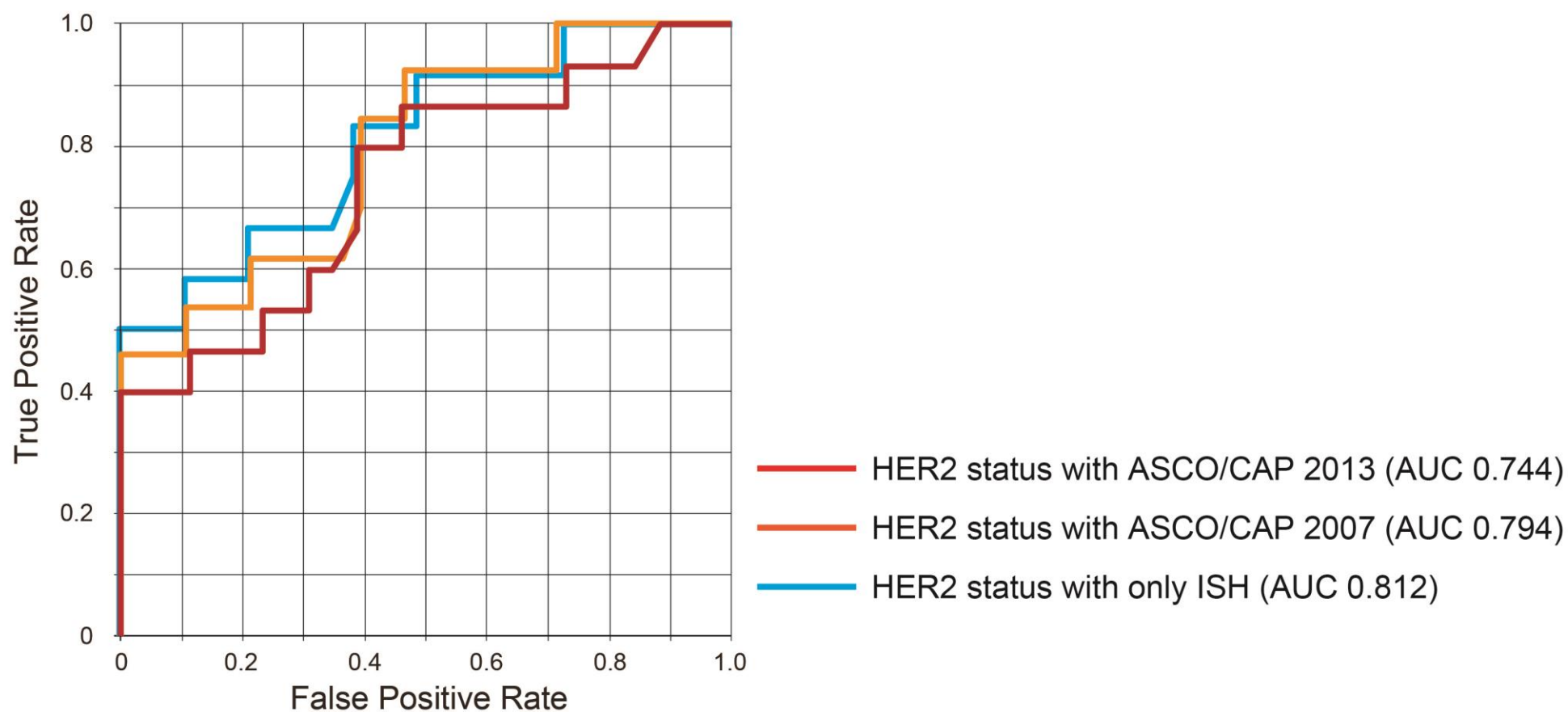
PIDによるHER2タンパク発現の定量評価と、従来法によるHER2判定の関係

HER2ステータスを(a) ASCO/CAP 2013に基づいて判定をした場合、(b) ASCO/CAP 2007に基づいて判定をした場合、(c) ISHのみで判定をした場合の3パターンに分けて解析を行った。

箱ひげ図の線は、上から最大値、四分位点、中央値、四分位点、最小値を表している。

P 値は Wilcoxon 順位和検定による。

PIDによるHER2タンパク定量によってHER2陽性症例を予測することが可能かどうかについてもROC解析を行った (Figure 12; pp. 40, Table 5; pp. 41-44)。HER2陽性の判定については、ASCO/CAP 2013の判定基準に基づいたもの、ASCO/CAP 2007の判定基準に基づいたもの、およびIHCの結果は考慮せずISHによる遺伝子増幅の有無のみで判定した場合の3パターンに分けて解析した。結果は、AUCは0.744～0.812と、比較的高値ではあるもののDT valueによる解析結果には及ばなかった。



**Figure 12**

ROC解析結果 ((a) PIDによるHER2タンパク定量、(b) DT valueを用いたHER2遺伝子増幅定量)

HER2ステータスを①ASCO/CAP 2013の判定基準に基づいて判定をした場合、②ASCO/CAP 2007の判定基準に基づいて判定をした場合、③ISHのみで判定をした場合の3パターンに分けて解析を行った。



①ASCO/CAP 2013 に基づいて HER2 判定をした場合

PIDs/cell	確率	1-特異度	感度	感度-(1-特異度)		真陽性 [N]	真陰性 [N]	偽陽性 [N]	偽陰性 [N]
.	.	0	0	0		0	26	0	15
153.7	1	0	0.0667	0.0667		1	26	0	14
104.5	1	0	0.1333	0.1333		2	26	0	13
83.5	0.9999	0	0.2	0.2		3	26	0	12
48.7	0.9939	0	0.2667	0.2667		4	26	0	11
23.6	0.8433	0	0.3333	0.3333		5	26	0	10
15.3	0.6349	0	0.4	0.4		6	26	0	9
14.3	0.6028	0.0385	0.4	0.3615		6	25	1	9
9.6	0.4445	0.0769	0.4	0.3231		6	24	2	9
6.9	0.3566	0.1154	0.4	0.2846		6	23	3	9
6.8	0.3535	0.1154	0.4667	0.3513		7	23	3	8
6.6	0.3473	0.1538	0.4667	0.3128		7	22	4	8
6.3	0.3381	0.1923	0.4667	0.2744		7	21	5	8
5.5	0.3141	0.2308	0.4667	0.2359		7	20	6	8
5.3	0.3083	0.2308	0.5333	0.3026		8	20	6	7
5.2	0.3054	0.2692	0.5333	0.2641		8	19	7	7
4.9	0.2968	0.3077	0.5333	0.2256		8	18	8	7
4.8	0.294	0.3077	0.6	0.2923		9	18	8	6
4.6	0.2884	0.3462	0.6	0.2538		9	17	9	6
4.2	0.2773	0.3846	0.6667	0.2821		10	16	10	5
3.9	0.2692	0.3846	0.7333	0.3487		11	16	10	4
3.6	0.2612	0.3846	0.8	0.4154	*	12	16	10	3
3.2	0.2509	0.4615	0.8	0.3385		12	14	12	3
3.1	0.2483	0.4615	0.8667	0.4051		13	14	12	2
2.9	0.2433	0.5	0.8667	0.3667		13	13	13	2
2.8	0.2408	0.5385	0.8667	0.3282		13	12	14	2
2.6	0.2358	0.5769	0.8667	0.2897		13	11	15	2
2.4	0.231	0.6154	0.8667	0.2513		13	10	16	2
2.3	0.2286	0.6538	0.8667	0.2128		13	9	17	2
2	0.2214	0.6923	0.8667	0.1744		13	8	18	2
1.8	0.2168	0.7308	0.8667	0.1359		13	7	19	2
1.6	0.2122	0.7308	0.9333	0.2026		14	7	19	1
1.5	0.2099	0.7692	0.9333	0.1641		14	6	20	1
1.4	0.2077	0.8077	0.9333	0.1256		14	5	21	1
1.3	0.2054	0.8462	0.9333	0.0872		14	4	22	1
1.2	0.2032	0.8846	1	0.1154		15	3	23	0
1	0.1989	0.9231	1	0.0769		15	2	24	0
0.8	0.1946	0.9615	1	0.0385		15	1	25	0
0.6	0.1903	1	1	0		15	0	26	0
0.6	0.1903	1	1	0		15	0	26	0

②ASCO/CAP 2007 に基づいて HER2 判定をした場合

PIDs/cell	確率	1-特異度	感度	感度-(1-特異度)		真陽性 [N]	真陰性 [N]	偽陽性 [N]	偽陰性 [N]
		0	0	0		0	28	0	13
153.7	1	0	0.0769	0.0769		1	28	0	12
104.5	1	0	0.1538	0.1538		2	28	0	11
83.5	1	0	0.2308	0.2308		3	28	0	10
48.7	0.9979	0	0.3077	0.3077		4	28	0	9
23.6	0.8759	0	0.3846	0.3846		5	28	0	8
15.3	0.6378	0	0.4615	0.4615	*	6	28	0	7
14.3	0.5984	0.0357	0.4615	0.4258		6	27	1	7
9.6	0.4043	0.0714	0.4615	0.3901		6	26	2	7
6.9	0.3017	0.1071	0.4615	0.3544		6	25	3	7
6.8	0.2982	0.1071	0.5385	0.4313		7	25	3	6
6.6	0.2912	0.1429	0.5385	0.3956		7	24	4	6
6.3	0.281	0.1786	0.5385	0.3599		7	23	5	6
5.5	0.2548	0.2143	0.5385	0.3242		7	22	6	6
5.3	0.2485	0.2143	0.6154	0.4011		8	22	6	5
5.2	0.2454	0.25	0.6154	0.3654		8	21	7	5
4.9	0.2362	0.2857	0.6154	0.3297		8	20	8	5
4.8	0.2332	0.3214	0.6154	0.294		8	19	9	5
4.6	0.2272	0.3571	0.6154	0.2582		8	18	10	5
4.2	0.2157	0.3929	0.6923	0.2995		9	17	11	4
3.9	0.2073	0.3929	0.7692	0.3764		10	17	11	3
3.6	0.1992	0.3929	0.8462	0.4533		11	17	11	2
3.2	0.1888	0.4643	0.8462	0.3819		11	15	13	2
3.1	0.1862	0.4643	0.9231	0.4588		12	15	13	1
2.9	0.1812	0.5	0.9231	0.4231		12	14	14	1
2.8	0.1787	0.5357	0.9231	0.3874		12	13	15	1
2.6	0.1739	0.5714	0.9231	0.3516		12	12	16	1
2.4	0.1691	0.6071	0.9231	0.3159		12	11	17	1
2.3	0.1668	0.6429	0.9231	0.2802		12	10	18	1
2	0.1599	0.6786	0.9231	0.2445		12	9	19	1
1.8	0.1555	0.7143	0.9231	0.2088		12	8	20	1
1.6	0.1511	0.7143	1	0.2857		13	8	20	0
1.5	0.149	0.75	1	0.25		13	7	21	0
1.4	0.1469	0.7857	1	0.2143		13	6	22	0
1.3	0.1448	0.8214	1	0.1786		13	5	23	0
1.2	0.1427	0.8929	1	0.1071		13	3	25	0
1	0.1387	0.9286	1	0.0714		13	2	26	0
0.8	0.1347	0.9643	1	0.0357		13	1	27	0
0.6	0.1309	1	1	0		13	0	28	0
0.6	0.1309	1	1	0		13	0	28	0

③ISH のみで HER2 判定をした場合

PIDs/cell	確率	1-特異度	感度	感度-(1-特異度)		真陽性 [N]	真陰性 [N]	偽陽性 [N]	偽陰性 [N]
.	.	0	0	0		0	29	0	12
104.5	1	0	0.1667	0.1667		2	29	0	10
83.5	1	0	0.25	0.25		3	29	0	9
48.7	0.9986	0	0.3333	0.3333		4	29	0	8
23.6	0.8852	0	0.4167	0.4167		5	29	0	7
15.3	0.6304	0	0.5	0.5	*	6	29	0	6
14.3	0.5872	0.0345	0.5	0.4655		6	28	1	6
9.6	0.3771	0.069	0.5	0.431		6	27	2	6
6.9	0.2703	0.1034	0.5	0.3966		6	26	3	6
6.8	0.2668	0.1034	0.5833	0.4799		7	26	3	5
6.6	0.2597	0.1379	0.5833	0.4454		7	25	4	5
6.3	0.2494	0.1724	0.5833	0.4109		7	24	5	5
5.5	0.2232	0.2069	0.5833	0.3764		7	23	6	5
5.3	0.2169	0.2069	0.6667	0.4598		8	23	6	4
5.2	0.2138	0.2414	0.6667	0.4253		8	22	7	4
4.9	0.2048	0.2759	0.6667	0.3908		8	21	8	4
4.8	0.2019	0.3103	0.6667	0.3563		8	20	9	4
4.6	0.1961	0.3448	0.6667	0.3218		8	19	10	4
4.2	0.1849	0.3793	0.75	0.3707		9	18	11	3
3.9	0.1768	0.3793	0.8333	0.454		10	18	11	2
3.6	0.169	0.4138	0.8333	0.4195		10	17	12	2
3.2	0.159	0.4828	0.8333	0.3506		10	15	14	2
3.1	0.1566	0.4828	0.9167	0.4339		11	15	14	1
2.9	0.1519	0.5172	0.9167	0.3994		11	14	15	1
2.8	0.1495	0.5517	0.9167	0.3649		11	13	16	1
2.6	0.145	0.5862	0.9167	0.3305		11	12	17	1
2.4	0.1405	0.6207	0.9167	0.296		11	11	18	1
2.3	0.1384	0.6552	0.9167	0.2615		11	10	19	1
2	0.132	0.6897	0.9167	0.227		11	9	20	1
1.8	0.1279	0.7241	0.9167	0.1925		11	8	21	1
1.6	0.1239	0.7241	1	0.2759		12	8	21	0
1.5	0.1219	0.7586	1	0.2414		12	7	22	0
1.4	0.12	0.7931	1	0.2069		12	6	23	0
1.3	0.1181	0.8276	1	0.1724		12	5	24	0
1.2	0.1162	0.8966	1	0.1034		12	3	26	0
1	0.1125	0.931	1	0.069		12	2	27	0
0.8	0.1089	0.9655	1	0.0345		12	1	28	0
0.6	0.1055	1	1	0		12	0	29	0
0.6	0.1055	1	1	0		12	0	29	0

**Table 5****PIDのROC解析結果**

HER2ステータスを① ASCO/CAP 2013の判定基準に基づいて判定をした場合、② ASCO/CAP 2007の判定基準に基づいて判定をした場合、③ISHのみで判定をした場合の3パターンに分けて解析を行った。

灰色はカットオフ値である。

*IHC*, immunohistochemistry; *ISH*, *in situ* hybridization; *ASCO*, American Society of Clinical Oncology; *PID*, phosphor-integrated dot

ISHによる*HER2*/CEP17比、PIDを用いた*HER2*タンパク発現の定量測定結果およびDT valueの3つのデータを用いてSpearman順位相関分析を行った (Table 6)。PIDs / cellとISHによる*HER2*/CEP17比の間には、比較的弱い正の相関を認めるのみであった ( $r = 0.4833$ ,  $P = 0.0014$ )。これに対してDT valueとISHによる*HER2*/CEP17比の間には極めて強い相関が認められた ( $r = 0.7485$ ,  $P < 0.0001$ )。そしてPIDとDT valueの間の相関が最も弱い結果であった ( $r = 0.4780$ ,  $P = 0.0016$ )。

	Spearman rank correlation [r]	P
DT value vs. ISH	0.7485	< 0.0001
PIDs / cell vs. ISH	0.4833	0.0014
PIDs / cell vs. DT value	0.4780	0.0016

**Table 6****Spearman順位相関解析結果**

*ISH*, *in situ* hybridization; *DT value*, ddPCR-TCR value [ddPCRratio - (TCR + 1)]; *PID*, phosphor-integrated dot

## 考察

本研究では乳癌HER2検査において現在広く行われているIHCやISHに代わりうる方法として、ddPCRによるHER2遺伝子増幅の絶対定量による新たなHER2検査法の開発を試みた。また近年本邦で開発されたばかりのPIDを用いてHER2タンパク発現の定量測定も行い、ddPCRとの有用性の比較検討を行った。現行のHER2検査は病理医が目視で判定を行っており、判定結果が観察者間で異なる、あるいは同一観察者でも判定が異なることがあるなど、問題点が指摘されている [6-8]。この問題を解決するため、DNA増幅の定量測定を行うddPCRを用いて、客観的で簡便および低コストであるHER2検査法を開発した。さらに臨床応用を見込んで、DNA抽出から最終的なHER2ステータスの判定までの工程を可能な限り自動化するよう試みた。

今回は乳癌手術検体のFFPE標本の切片からDNAを抽出したが、切片内には非腫瘍の細胞も含まれており、腫瘍細胞比率が小さい場合、非腫瘍細胞から得られたDNAがddPCRの測定結果に少なからず影響を与えることになる。Garcia-MurillasらはデジタルPCRを用いた乳癌HER2遺伝子増幅測定を行っており [18]、旧版のASCO/CAPガイドライン2007 [16]に基づいた判定結果と比較して、感度100% (18/18)、特異度98% (57/58)という極めて高い一致率であったと報告している。論文中では抽出したDNAのうち、腫瘍由来のものが占める割合を70%以上とするため、マイクロダイセクション法を行ったとしている。マイクロダイセクション法は腫瘍部分のDNAのみを効率的に採取するのに優れた方法ではあるが、操作が煩雑であり、日常診療や検査にルーチンで使用するのは困難である。

これらの課題を克服するため、各切片の腫瘍細胞比率TCRを算出し、ddPCRで得られた

*HER2*/CEP17比とTCRという2つのパラメーターを用い、2次元チャート上にプロットして*HER2*遺伝子増幅を評価するという方法 (ddPCR-TCR method)を用いた。Definiens Tissue Studio®はTCR算出のためにとても有用なソフトウェアであり、わずか2～3時間のうちに数十万個の細胞を自動的カウントすることができる。各症例のTCRを算出し加味することによって、腫瘍径が比較的小さいサンプルでも、マイクロダイセクションやマクロダイセクションといった手間のかかる手法を行わなくても、ddPCRから得られた結果をより正確に評価することができるようになった。

本研究に先立ってMatsusakaら [23]は胃癌の生検検体を用い、digital PCRとTCRによる2次元チャートで胃癌の*HER2*遺伝子増幅を判定する方法を報告している。乳癌の術後標本を用いてddPCR-TCR methodによって*HER2*遺伝子増幅の測定を行った研究は、本研究が世界初となる。

本研究ではTCRを算出するために細胞数をカウントするという方法をとった。TCRについてもDigital PCRを用いて測定することができればさらに作業工程を簡略化することができると思われるが、現時点では腫瘍・非腫瘍細胞を直接数えるという方法が最も確実であると考えた。腫瘍細胞や腫瘍遺伝子、もしくはその代謝産物を明確に標識するバイオマーカーを見つけてDigital PCRでTCRを算出する方法については、今後の検討課題である。

今回用いたddPCR-TCRチャートでは、“ $R = x + 1$ ”で表される直線上にプロットされたサンプルでは、*HER2*遺伝子はCEP17と比較して理論的にはちょうど2倍増幅していると考えることができ、これを細胞株を用いて解析で実証した。一方で、細胞株を用いた検証ではddPCRによる一定レベルの測定誤差を認めたため、細胞株を用いた仮想TCRごとのddPCR ratioの結果から99%信頼区間を算出し、これを臨床検体での結果をプロットしたチャート上に当てはめ、*HER2*陽性エリアと陰性エリアの間の“equivocal area”とすることとした。これにより、ddPCR ratioが比較

的低い症例も含め、従来法でHER2陽性とされた症例はチャート上の陽性エリアもしくは equivocal areaに全て含まれる結果となった。また、今回対象としたHER2 2+の症例23例のうち21例が陽性エリアまたは陰性エリアのいずれかにプロットされたが、このような症例は従来法ではまずIHCを行い、2+と判定された症例に関しては、さらにISHによる再評価も行って最終診断に至るという2段階の過程を経なければ結果が得られなかった。しかし、ddPCR-TCRを用いればほとんどすべての症例が一度の検査で済むことになり、医療経済面でも検査時間短縮の面でも本法は優れていると考える。

Equivocal areaに含まれた症例のうち3例 (Table 2の症例32, 33, 35; p. 23)は新基準であるASCO/CAPガイドライン2013 [15]ではHER2 3+と判定されるが、これらは診断当時の基準であるASCO/CAPガイドライン2007 [16]ではHER2 2+と判定されていたもの、すなわちIHCで腫瘍細胞に強い完全な全周性の膜染色が10%を超えて認められるが30%未満のものであった。このうちの症例35は、ddPCR ratioが比較的低い値であったが、その原因はHER2タンパクの不均質な発現 (heterogeneity)によると思われる。残りの症例32,33については、ASCO/CAPガイドライン2013に基づいたIHCの診断基準ではHER2陽性となるが、ISHのみの診断ではHER2陰性と診断されるような症例であった。これら3症例についてはddPCR-TCR methodによる結果はIHCよりはISHによる判定に近かった。また、これらとは逆に、従来法でHER2陰性と判定され、ddPCR-TCRチャートのequivocal areaに含まれた症例が3例 (Table 2の症例3, 4, 8; p. 22)認められた。症例3と4についてはddPCRは低い値であったが、それ以上にTCRが小さな値となったためequivocal areaにプロットされた。TCRの低い症例、例えば0.2未満の症例についてはddPCR-TCRチャートを用いても正確な評価は困難な可能性がある。一方、症例8についてはIHCでは1+の判定であるものの、ISHは1.86と、旧基準であるASCO/CAPガイドライン2007 [16]

ではISHで“equivocal”と判定される症例であった。ddPCR-TCRチャートでequivocal areaを設定することにより、このようなHER2の判定結果がcontroversialな症例も網羅的に拾い上げることができる。

Figure 2a (p. 15)やFigure 3 (p. 18)に示したような “ $R = x + 1$ ”をカットオフラインと考えるための重要な前提条件として、腫瘍細胞内でのHER2遺伝子増幅が均質であることと、HER2遺伝子がコードされている17番染色体に異数体が存在しないことが挙げられる。胃癌においてもHER2遺伝子増幅が認められることがあるが、胃癌の場合は高頻度でheterogeneityやCEP17ポリソミーが観察される [23]。一方で乳癌の場合は腫瘍のheterogeneityは胃癌と比較すると頻度はかなり低いとされてるとされているものの [24]、今回の対象症例のうちTable 2の症例22, 31, 35 (pp. 22-23)については、IHCにおいて強陽性を示す細胞と陰性細胞が混在する、いわゆるheterogeneityを示す腫瘍であった。特に症例35については、ISHが高い値であったのに対してddPCR ratioは比較的低く算出されるという乖離が生じた。ddPCR-TCRチャートでequivocal areaを設定することによって、このようなheterogeneityを示す症例の拾い上げも可能であると考え。これに対して、CEP17ポリソミーは乳癌にもおいてしばしば観察される [25, 26]。本研究の対象症例のうちDISHが行われたもので、一つの核にCEP17が3つ以上存在するポリソミー症例 [26]の有無の評価を行ったところ、Table 2の症例37と38 (p. 23)の2症例がHER2 3+に該当した。これらについてはCEP17以上にHER2遺伝子に高度の増幅を認めており、チャートでも陽性エリアにプロットされていることから、ddPCR-TCR methodを乳癌に適応する際、CEP17ポリソミーはほとんど影響しないと考えられた。興味深いことにddPCR ratioが1を下回る症例があり、特に症例5ではratioが0.532と極めて低値であった。症例5のDISH標本ではHER2遺伝子のモノソミーや完全欠損を示す腫瘍細胞が観察された。Tubbsらは乳癌のHER2ステータスをFISHで評価し



た研究で、*HER2*モノソミーを2% (742例中12例)に認めたと報告している [27]。このように*HER2*遺伝子の欠損は稀な現象なため、その臨床的な意義や腫瘍増殖のシグナリング経路についてはほとんど知られていない。

ddPCR-TCRチャートを用いた*HER2*遺伝子増幅の判定は従来法による*HER2*ステータスの判定と極めて高い一致率を示したが、最終的な判定の段階で「定量化」ができていないことが課題として採り上げられた。これに関しては、ddPCR-TCRチャート上にプロットされた症例が理論的なカットオフラインである“ $R = x + 1$ ”からどの程度離れているかということを数値化するため、各症例において“ $R - (x + 1)$ ”を計算した。この “ $R - (x + 1)$ ” (DT valueと命名)が0より大きければ*HER2*陽性、0より小さければ*HER2*陰性となり、判定結果を極めて明快に表すことができる。ddPCRによるRatioとTCRを用いて*HER2*遺伝子増幅の有無を判定し、さらに遺伝子増幅の程度を定量化するという方法は過去に報告がない。

Spearman順位相関分析でDT valueは従来法による*HER2*ステータスととても強い相関を示した。またROC解析では、従来法での*HER2*の判定を上記のいずれの方法で行った場合でも、DT valueを用いた*HER2*遺伝子増幅の判定結果は感度が90%を超えており、またAUCはいずれも0.98以上と極めて高値であることから、DT valueによる*HER2*検査の精度の高さを示すことができた。

DT valueにおけるROC解析をもとに、私は“ $-0.111 \leq \text{DT value} \leq 0.056$ ” という新たなequivocal rangeを設定した。このrangeはddPCR-TCRチャートのequivocal areaとよく一致した (Figure 9; p. 36)。本研究では検討症例数がまだ少なく、今後症例数を増やして、より厳密で精度の高い基準値を設ける必要があると考える。

DT valueについては、DT valueをddPCR Ratio / TCRとして、ある点にプロットされた症例と

原点を結んだ直線の傾きで遺伝子増幅の程度を評価するなど、他の方法も考察した。ただしこの場合はチャート上の $(x, R) = (0.2, 1.0)$  (Negative areaにプロット)と $(x, R) = (0.4, 2.0)$  (Positive areaにプロット)が同じ値になってしまうという問題が発生する。また、DT valueを  $(\text{ddPCR Ratio} - 1) / \text{TCR}$ として、ある点にプロットされた症例と $(x, R) = (0, 1.0)$ を結んだ直線の傾きで遺伝子増幅の程度を評価する方法も考察した。この場合、(傾き)  $\geq 1$ なら「HER2遺伝子増幅あり」、(傾き)  $< 1$ なら「HER2遺伝子増幅なし」と判定することができ、一見よさそうに思われるが、 $(x, R) = (0.2, 1.3)$  (Equivocal areaにプロット)と $(x, R) = (0.6, 1.9)$  (Positive areaにプロット)が同じ値となってしまう、こちらも精密さを欠いてしまうと判断した。私の考えた“DT value =  $R - (x + 1)$ ”は、なるべく計算式を簡便化しようと試みた結果導き出したもので、 $R - (x + 1) \geq 0$ なら「HER2遺伝子増幅あり」、 $R - (x + 1) < 0$ なら「HER2遺伝子増幅なし」と一見して直感的に評価ができるという点で優れた指標であると考え。ただし、腫瘍細胞内でのHER2遺伝子増幅をより正確に表現するにはどのような方法や計算式を用いるのがよいのか、今後ともさらに検討を重ねる必要があると考える。

本研究におけるddPCR-TCR methodでは、作業工程の多くを自動化した。まず、DNA抽出の工程にはMagCore® Genomic DNA FFPE One-Step Kitを用いた。この装置を用いれば、ごくわずかな手作業を加えるだけで一度に16検体から、3時間程度でDNA抽出を完了することができる。MagCore®とddPCRを組み合わせることで、精密かつ客観的なHER2遺伝子増幅のデータを得ることは勿論、検査工程で起こりうるヒューマンエラーを減らし、技術者や病理医の負担を軽減し、ランニングコストも抑えることができる (1検体あたり1,000円前後)。また迅速に診断結果を得ることは、病理医のみならず乳腺外科医の助けにもなる可能性がある。Gagliatoらは後方視的な研究で、特にHER2陽性乳癌に対する術後抗HER2薬の投与開始の遅れが患者の

予後を悪化させるということを報告した [28]。ddPCR-TCR methodを用いれば、特にこれまで IHCでHER2 2+と判定され、その後追加のISHを行って最終診断が必要であった症例においては、本法により結果報告までのTurn-around time (TAT)が著しく短縮されることになる。ただし、組織からDNAを抽出して測定を行うということで、個人情報の扱いや患者取り違い防止などの管理については他の検査同様に徹底して行う必要がある。

本研究で「定量化」に重点を置いたのは、乳癌のHER2発現を数値化することで、将来的にHER2陽性乳癌の抗HER2療法による治療効果や予後についての解析をより精密に行うことができる考えたからである。近年のメタアナリシスによると、HER2遺伝子増幅は乳癌の予後因子ではない [29]とされる一方、HER2/CEP17比が2以上かつHER2遺伝子コピー数が4個以上の場合は、トラスツズマブによる治療効果を有意に認めた [30]と報告されている。抗HER2薬は分子標的薬であり、副作用のリスクや治療コストの点からも適応症例を慎重に選別する必要がある。本研究は対象の規模が小さく、治療効果や予後といった長期成績についての評価はまだ行えていないが、これは今後研究を発展させ臨床応用を実現させるために最重要の検討課題であると考ええる。

今回私は、乳癌手術症例においてddPCRを用いてHER2遺伝子増幅の評価を行い、ddPCR-TCR methodを開発し、さらにそこから新たなHER2検査の基準になりうるDT valueを提唱した。ddPCR-TCR methodによって得られた結果やDT valueによるHER2の判定結果は従来法によるHER2ステータスと極めて高い一致率を示した。ddPCRを用いたHER2検査は現行の乳癌HER2検査を補完するだけでなく、将来的に代替しうる可能性が十分にあると考える。今後より症例数を増やした検討や前向き試験などを行って、本法の精度を高めていくとともに、医療現場への実装と企業との調整を行う予定である。

## 引用文献

- 1) 日本乳癌学会. 全国乳がん患者登録調査報告 - 確定版. 第 42 号. 2011 年次症例. 日本乳癌学会ホームページ <http://www.jbcs.gr.jp/>より
- 2) Cobleigh MA et al. (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. J Clin Oncol. 17(9):2639-48.
- 3) Bast RC Jr et al. (2001) 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol. 15;19(6):1865-78.
- 4) Blank PR et al. (2010) Human epidermal growth factor receptor 2 expression in early breast cancer patients: a Swiss cost-effectiveness analysis of different predictive assay strategies. Breast Cancer Res Treat. 124(2):497-507.
- 5) Vogel CL et al. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 1;20(3):719-26.
- 6) Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E et al. (2002) Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. J Natl Cancer Inst. 5;94(11):852-4.
- 7) Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB et al. (2002) Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. J Natl Cancer Inst. 5;94(11):855-7.
- 8) Hoang MP, Sahin AA, Ordóñez NG, Sneige N. (2000) HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. Am J Clin Pathol. 113(6):852-9.
- 9) Vogelstein B, Kinzler KW (1999) Digital PCR. Proceedings of the National Academy of

Sciences 96:9236-41.

10) Taylor SC, Carbonneau J, Shelton DN et al (2015) Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *Journal of Virological Methods* 224:58-66.

11) KONIKA MINOLTA. FLUORESCENT NANOIMAGING.

<https://www.konicaminolta.com/about/research/future/hstt/index.html>. Accessed 29 Sept 2017

12) Miyashita M, Gonda K, Tada H et al (2016) Quantitative diagnosis of HER2 protein expressing breast cancer by single-particle quantum dot imaging. *Cancer Med* 5:2813-2824.

13) Gonda K, Miyashita M, Higuchi H et al (2015) Predictive diagnosis of the risk of breast cancer recurrence after surgery by single-particle quantum dot imaging. *Sci Rep* 5:14322.

14) Yamaki S, Yanagimoto H, Tsuta K et al (2017) PD-L1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is a poor prognostic factor in patients with high CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes: highly sensitive detection using phosphor-integrated dot staining. *Int J Clin Oncol* 65:5-8.

15) Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG et al (2013) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology* 31:3997-4013.

16) Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25:118-45.

17) Otsuji K, Sasaki T, Tanaka A et al (2017) Use of droplet digital PCR for quantitative and

automatic analysis of the HER2 status in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 162:11-18.

18) Gevensleben H, Garcia-Murillas I, Graeser MK et al (2013) Noninvasive Detection of HER2 Amplification with Plasma DNA Digital PCR. *Clinical Cancer Research* 19:3276.

19) Garcia-Murillas I, Lambros M, Turner NC (2013) Determination of HER2 amplification status on tumour DNA by digital PCR. *PLOS ONE* 8:e83409.

20) Braun M, Kirsten R, Rupp NJ et al (2013) Quantification of protein expression in cells and cellular subcompartments on immunohistochemical sections using a computer supported image analysis system. *Histology and histopathology* 28:605-610.

21) Nikolaishvilli-Feinberg N, Cohen SM, Midkiff B et al (2013) Development of DNA damage response signaling biomarkers using automated, quantitative image analysis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 62:185-196.

22) Fisel P, Stühler V, Bedke J et al (2015) MCT4 surpasses the prognostic relevance of the ancillary protein CD147 in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 6:30615-30627.

23) Matsusaka K, Ishikawa S, Nakayama A (2016) Tumor Content Chart-Assisted HER2/CEP17 Digital PCR Analysis of Gastric Cancer Biopsy Specimens. *PLOS ONE* 11:e0154430.

24) Hofmann M, Stoss O, Shi D et al (2008) Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 52:797-805.

25) Vranic S, Teruya B, Repertinger S et al (2010) Assessment of HER2 gene status in breast carcinomas with polysomy of chromosome 17. *Cancer* 117:48.

26) Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M et al (2013) HER2 *in situ* hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Modern Pathology* 27:4.

27) Tubbs RR, Hicks DG, Cook J et al (2007) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) as

primary methodology for the assessment of HER2 Status in adenocarcinoma of the breast: a single institution experience. *Diagnostic Molecular Pathology* 16:207-210.

28) de Melo Gagliato D, Gonzalez-Angulo AM, Lei X et al (2014) Clinical impact of delaying initiation of adjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 32:735-44.

29) Xu QQ, Pan B, Wang CJ et al (2016) HER2 amplification level is not a prognostic factor for HER2-positive breast cancer with trastuzumab-based adjuvant treatment: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 27:63571-63582.

30) Press MF, Sauter G, Buyse M et al (2016) HER2 Gene Amplification Testing by Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH): Comparison of the ASCO-College of American Pathologists Guidelines With FISH Scores Used for Enrollment in Breast Cancer International Research Group Clinical Trials. *J Clin Oncol*. 10:3518-3528.

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文まとめるにあたり、ご指導いただいた東京大学医学部附属病院  
地域連携推進・遠隔病理診断センター センター長 佐々木毅先生に深く感謝致します。

また、本研究に関し貴重なお時間を割いてご教授、ご協力いただいた東京大学医学部附属  
病院病理部の深山正久教授および医局員の先生方、そして人体病理学教室のスタッフの  
方々、私の所属する東京大学医学部附属病院胃食道・乳腺内分泌外科の瀬戸泰之教授およ  
び医局員の先生方、その他多くの皆様方に厚く御礼申し上げます。