



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 医学实验室和体外诊断系统 实体肿瘤类器官药物敏感性检测通用技术要求

Medical laboratories and in vitro diagnostic systems — General technical requirements for solid tumor organoid drug sensitivity detection

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 操作方法和基本要求 .....	错误!未定义书签。
4.1 肿瘤样本的采集 .....	错误!未定义书签。
4.2 肿瘤类器官的构建 .....	错误!未定义书签。
4.3 肿瘤类器官的药敏检测 .....	3
4.4 肿瘤类器官的冻存与复苏 .....	4
5 数据处理 .....	4
5.1 检验结果解释 .....	4
5.1 药敏数据分析 .....	4
5.1 药敏检验结果的呈现 .....	5
6 数据管理 .....	5
7 废弃物处理 .....	5
参考文献 .....	6

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC 136）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

# 医学实验室和体外诊断系统 实体肿瘤类器官药物敏感性检测通用技术要求

## 1 范围

本文件规定了实体肿瘤类器官本文件规定了实体肿瘤类器官的药物敏感性检测的基本要求、数据处理和数据管理等。

本文件适用于医学实验室进行实体肿瘤活组织类器官的构建及其在化疗、靶向药物敏感性的检测。药品开发实验室亦可参考本文件。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 肿瘤类器官 tumor organoid

由肿瘤患者自体肿瘤组织或细胞样本中提取的肿瘤细胞，通过三维（3D）培养形成的，可以在体外扩增并重现原始肿瘤的关键组织病理学、遗传和表型特征。

### 3.2

#### 支架材料 scaffold

用于辅助或支撑类器官体外培养的生物材料，包括天然材料如基质胶和合成材料。

### 3.3

#### 类器官传代 passage

将培养至一定大小、状态良好的类器官制备为单细胞悬液或小细胞团，再进行培养形成新的类器官的过程。

### 3.4

#### 类器官冻存 cryopreservation

将类器官经低温冷冻处理后在低温环境下长期保存并保持类器官组成、形态和功能特征的低温冷冻过程。

### 3.5

#### 类器官复苏 recovery

将冻存的类器官解冻后进行培养，恢复类器官生长状态的过程。

### 3.6

#### 药物敏感性检测 drug sensitivity tests

测定药物在体外对细胞活性有无抑制作用的试验。

### 3.7

#### 半数抑制浓度 IC50

指在体外试验中（in vitro），在特定暴露时间后，药物抑制50%（细胞/靶点/特定蛋白等）所需的药物浓度。

### 3.8

#### 细胞活性 cell viability

测定细胞群总体活力的指标，指标的测定取决于试验终点和所用的设计方案，并与细胞总数和/或活性细胞数量相关。

## 4 操作方法和基本要求

### 4.1 肿瘤样本的采集

#### 4.1.1 采集样本的法律法规要求

肿瘤样本的采集、处理、使用应满足我国相关法律法规。

#### 4.1.2 采集样本的要求

依据采集肿瘤样本类型不同和实际药敏检测数量需求，进行样本的采集。如：

实体组织样本量建议 $\geq 0.005\text{g}$ ，约为1条穿刺物（1cm长）的重量；

恶性积液样本量建议 $\geq 10\text{mL}$ ；

应结合术中病理结果判断，采集肿瘤细胞含量高的肿瘤组织。样本中的坏死组织、纤维化组织、脂肪、血液附带占比尽量少。

#### 4.1.3 采集样本的保存和运输

样本采集后建议10分钟内保存于组织保存液中，保存容器应密封完全，不可外渗漏液；运输温度建议为2~8℃，不可低于0℃或高于25℃；组织样本应快速转运至实验室，转移时间最多不超过48h；采样后2~4h内构建类器官最佳。

#### 4.1.4 采集样本信息的保存和记录

应建立构建类器官前采集样本的完整信息记录。如：患者信息、肿瘤样本信息、医院信息、运输信息、拍照留存记录等。

### 4.2 肿瘤类器官的构建

#### 4.2.1 样本处理

对采集后的肿瘤样本应经过处理和消化。样本处理后获得的细胞，细胞活性一般应 $\geq 50\%$ ，肿瘤细胞含量应 $\geq 10\%$ 。对于坏死严重，活力不好的组织样本，可根据实际样本情况进行判断；是否进行肿瘤细胞含量的确定，可根据取材肿瘤组织的数量进行判断。如果取材样本过少，肿瘤细胞含量可在4.2.3中进行确认。

#### 4.2.2 样本接种

对消化后样本接种后进行3D类器官培养。接种密度应 $\geq 50\text{cells}/\mu\text{L}$ ，接种体积应 $\geq 5\mu\text{L}/\text{孔}$ ，培养基体积应 $\geq 50\mu\text{L}/\text{孔}$ 。

### 4.2.3 肿瘤类器官的培养

接种物经过3D类器官培养1~14天后，镜下观察，应形成囊性、致密性、空泡性等不同多细胞团簇等形态的类器官，类器官边缘光滑透亮；培养期间，可观察到类器官的生长；培养期间无肉眼或显微镜可见的细菌/真菌污染。如：培养基混浊、混浊物漂起、黑色细沙状、背景黑点、细胞形态改变或漂浮等。当3D培养后的肿瘤类器官，满足药敏检测需求后，可进入药敏检测用肿瘤类器官的接种或铺板以及传代实验。

药敏检测肿瘤类器官铺板要求：肿瘤细胞含量应 $\geq 50\%$ 、细胞活性应 $\geq 50\%$ （对于铺板前细胞活性比率达不到50%的类器官，应调整接种密度，使接种活细胞数量满足药敏检测要求）、直径大于30  $\mu\text{m}$ 以上的类器官比率大于20%。

### 4.2.4 肿瘤类器官培养基培养性能的要求

根据不同癌种，采用相应的肿瘤类器官质控株或标准株，使用类器官培养基进行3D培养。培养1~7天内，应形成既往的类器官形态。类器官数量倍增应 $\geq 2$ 倍、可持续倍增时间应 $\geq 4$ 周、类器官比率应 $\geq 40\%$ 。

应在器官培养基的出厂检验中对检类器官培养基的理化性能进行检验：如，培养基渗透压、培养基细菌内毒素、培养基无菌检查等应满足培养基的质控要求。

应在器官培养基的出厂检验中（或研发阶段），对类器官培养基对培养后培养物与原组织的一致性进行鉴定：检测经培养基培养后的肿瘤类器官与来源样本在全基因组序列上的一致性；或通过肿瘤类器官质控株或标准株，检定经类器官培养基培养后，培养物之间在全基因组序列上的一致性。全基因组序列的一致性应 $\geq 90\%$ 。

## 4.3 肿瘤类器官的药敏检测

选择满足药敏检测需求的肿瘤类器官进行铺板及后续药物敏感性检测实验。铺板、加药、换液等操作可手动或利用自动化设备进行。药敏实验可采用细胞活性测试、类器官图像分析等方法，利用酶标仪或化学发光分析系统、光学显微镜或高内涵成像分析等设备完成药物敏感性判读。

### 4.3.1 药敏检测用肿瘤类器官的接种和铺板

根据药敏检测的方法不同，接种或铺板的类器官应满足4.2.3 中的要求；接种密度应 $\geq 100$  cells/ $\mu\text{L}$ ；接种方式可以根据实验技术方法进行选择。如：

单细胞接种：接种以单细胞或3~5细胞形成的细胞簇为最佳，不宜有50  $\mu\text{m}$ 以上的大细胞团存在；类器官接种：宜选择直径为20~200  $\mu\text{m}$ 的类器官进行接种，接种数量应 $\geq 3$ 个类器官/孔。

接种复孔设置：建议根据检测实验技术方法，以满足数据质量和稳定性要求为依据，进行复孔的设置。

### 4.3.2 药敏检测用类器官的质控

类器官药敏检测过程中，应设置类器官质控株。如：

体系类器官质控株：应观察到质控株生长，应设置相应的技术指标：直径/数量/增值率

药敏类器官质控株：应设置包含试剂盒检测范围内的药物的敏感株/耐药株，每次药敏实验的药敏结果应一致。

### 4.3.3 药敏检测用类器官的加药与检测

根据不同药敏检测方法的要求，药敏实验所用药物应使用适宜的溶剂（DMSO、无菌水、PBS等）配置成一定浓度的溶液进行保存，可根据需要稀释至使用浓度进行药敏检测实验；

检测药物的浓度点设置：应 $\geq 1$ 个（曲线建议5个），并设置阴性对照1组、阳性对照1组、空白对照1组；

根据不同药敏检测技术体系进行铺板后培养及药物接触，类器官铺板后培养时间应 $\geq 1$ 天，类器官加药接触时间应 $\geq 1$ 天，后检测细胞活性。

#### 4.4 肿瘤类器官的冻存与复苏

复苏要求：需要先对冻存的肿瘤类器官在适宜的升温条件（一般为37℃水浴）下进行快速解冻处理，去除冻存液后进行类器官的再次培养或其他处理。

冻存要求：类器官生长至100–500  $\mu\text{m}$ 时，可进行冻存。

### 5 数据处理

#### 5.1 检验结果解释

肿瘤细胞抑制率用于体现采用药物或理化方式对肿瘤细胞活性的杀伤效果。肿瘤细胞抑制率越高，表示药物对肿瘤细胞生长抑制的效果越强。该结果基于患者类器官模型的药物生理浓度计算得到，未考虑药物不良反应、药物相互作用等风险，应仅供临床参考使用。

#### 5.2 药敏数据分析

数据分析和结果判定应基于药敏检测实验的具体实验技术方法，以下以细胞活力分析法和图像分析法进行举例，不限于以下两种方法。

##### 5.2.1 细胞活力分析法

细胞活性可通过多种方法检测，例如离子膜渗透率、细胞代谢活性和ATP水平。常见的细胞活性检测方法有MTT法、WST-1法、CCK-8法、CTG法、BrdU法和Live/Dead法等。分析过程应设置阴性对照组（为未加药对照组的吸收值）及空白组（为培养基的背景吸收值），计算细胞活力值和抑制率。

- 1) 分别计算阴性对照组和空白组的发光值（或均值）；
- 2) 细胞活力值 = (加药组 OD - 空白组 OD) / (阴性对照组 OD - 空白组 OD)  $\times 100\%$ ；
- 3) 抑制率 =  $[1 - (\text{加药组 OD} - \text{空白组 OD}) / (\text{阴性对照组 OD} - \text{空白组 OD})] \times 100\%$ 。
- 4) IC<sub>50</sub> 的计算：根据药物浓度及对应的细胞活力值，对下面公式进行非线性最小二乘法的拟合，拟合出的参数为 IC<sub>50</sub> 值以及 slope 值。

$$\text{细胞活力值} = \frac{100}{\left(1 + \left(\frac{\text{IC}_{50}}{\text{drug concentration}}\right)^{\text{slope}}\right)} \dots\dots\dots (1)$$

式中：IC<sub>50</sub> 代表药物半抑制浓度值，Slope 代表坡度值，drug concentration 代表每个孔的不同的药物浓度。

- 5) 数据质控：计算 Z factor（应 $\geq 0.5$ ）， $Z = 1 - [3 \times (\sigma_{\text{对照}} + \sigma_{\text{空白}}) / | \text{对照} - \text{空白} |]$

式中：

- Z — 实验 Z factor；
- 对照 — 阴性对照发光值的平均值；
- 空白 — 空白对照发光值的平均值；
- $\sigma_{\text{对照}}$  — 阴性对照发光值的标准方差；
- $\sigma_{\text{空白}}$  — 空白对照发光值的标准方差。

### 5.2.2 图像分析法

可使用类器官类器官培养过程中及铺板当天的显微镜下的类器官图片、利用分析软件统计类器官的数量、直径、面积等判断类器官的生长情况。

可使用类器官用药前显微镜下图片、用药后显微镜下图片,利用分析软件统计类器官的数量、直径、面积、灰度等判断类器官对药物的反应。

注: 图像收集可使用光学显微镜或高内涵成像分析等仪器设备。

### 5.3 药敏检测结果的呈现

药物敏感性检测结果可以不同方式呈现,如,以半数抑制浓度(IC50)、药物最大血药浓度下(Cmax)肿瘤生长抑制(tumor growth inhibition, TGI)、几分类法(如,二分类法分出的敏感和耐药;三分类法分出的敏感、一般、耐药)等形式呈现,但不限于以上方式。

## 6 数据管理

结合肿瘤类器官的使用目的,制订数据管理规范,利用人工记录或数字化软件实施数据管理,包括但不限于数据内容及保存时间、数据管理与使用的权限及责任。详细的临床样本数据管理可参照国家药品监督管理局颁布的《药物临床试验质量管理规范》(GCP)中的数据管理部分内容。

## 7 废弃物处理

在组织样本采集、保存和运输,肿瘤类器官制备、传代、冻存、复苏,肿瘤类器官鉴定,肿瘤类器官药物敏感性测试等操作过程中产生的废弃物,应按照 GB 19489—2008 中7.19 和 GB/T 38736—2020 中 3.1 的要求,遵循《医疗废物管理条例》丢弃到指定地点妥善处置。对于使用过的肿瘤类器官或不合格的肿瘤类器官须严格按照生物样本处置与管理规范操作。

## 参 考 文 献

1. 中国抗癌协会肿瘤多学科诊疗专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤内分泌专业委员会. 肿瘤类器官诊治平台的质量控制标准中国专家共识(2022年版). 中国癌症杂志, 2022, 32(7):657-668.
2. 中国抗癌协会肿瘤多学科诊疗专业委员会. 类器官药物敏感性检测指导肿瘤精准治疗临床应用专家共识(2022年版). 中国癌症防治杂志, 2022, 6(14):234-239.
3. Sato, T., et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009. 459(7244): p. 262-5.
4. Cristobal, A., et al. Personalized Proteome Profiles of Healthy and Tumor Human Colon Organoids Reveal Both Individual Diversity and Basic Features of Colorectal Cancer. *Cell Rep*, 2017. 18(1): p. 263-274.
5. Vlachogiannis, G., et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 2018. 359(6378): p. 920-926.
6. Ooft, S.N., et al. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci Transl Med*, 2019. 11(513).
7. Park, S.E., A. Georgescu, and D. Huh, Organoids-on-a-chip. *Science*, 2019. 364(6444): p. 960-965.
8. Shi, R., et al. Organoid Cultures as Preclinical Models of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 2020. 26(5): p. 1162-1174.
9. Wang, H.M., et al. Using patient-derived organoids to predict locally advanced or metastatic lung cancer tumor response: A real-world study. *Cell Rep Med*, 2023. 4(2): p. 100911.
10. Hu, Y., et al. Lung cancer organoids analyzed on microwell arrays predict drug responses of patients within a week. *Nat Commun*, 2021. 12(1): p. 258