



(10) 申请公布号 CN 114585746 A

(43) 申请公布日 2022.06.03

(21) 申请号 202080072620.X

(22) 申请日 2020.10.16

(30) 优先权数据

2019-189838 2019.10.17 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/039023 2020.10.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/075528 JA 2021.04.22

(71) 申请人 公立大学法人横滨市立大学

地址 日本神奈川县

申请人 武田药品工业株式会社

(72) 发明人 武部贵则 佐伯宪和

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 牛蔚然 周莎

(51) Int.Cl.

*C12Q 1/02* (2006.01)

*C12N 5/071* (2010.01)

*C12N 5/078* (2010.01)

权利要求书1页 说明书14页

(54) 发明名称

药物毒性评价方法

(57) 摘要

本发明提供能够针对药物导致的对肝脏及其他器官的损伤(DILI等)的发作可能性等进行详细分析的药物毒性评价平台(评价方法及用于其的试剂盒等)。本发明的药物毒性评价方法包括向类器官和血液细胞的共培养体系中添加药物的步骤、及评价该药物针对该类器官的毒性的步骤。

1. 药物毒性评价方法,其包括:  
向类器官和血液细胞的共培养体系中添加药物的步骤;及  
评价该药物针对该类器官的毒性的步骤。
2. 如权利要求1所述的药物毒性评价方法,其中,所述血液细胞为免疫活性细胞。
3. 生物标志物的推定方法,其包括下述步骤:针对多个类器官检体实施权利要求1或2所述的药物毒性评价方法,对比发生了药物毒性的检体和未发生药物毒性的检体的培养上清液中的物质,推定成为生物标志物的物质。
4. 药物的筛选方法,其包括下述步骤:使用来源于药物毒性发作的患者的类器官,针对多个药物实施权利要求1或2所述的药物毒性评价方法,选择药物毒性效果低的药物。
5. 试剂盒,其为药物毒性评价试剂盒,所述试剂盒包含类器官和血液细胞。
6. 如权利要求5所述的试剂盒,其还包含死细胞检测试剂。
7. 培养物,其包含类器官、血液细胞和药物。

## 药物毒性评价方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及能够预测药物导致的对肝脏及其他器官的损伤(例如,药物性肝损伤)的发作可能性等的评价体系。

### 背景技术

[0002] 药物性肝损伤(drug-induced liver injury:DILI)是可能在持续药物治疗的过程中显现的副作用。根据发生机制,药物性肝损伤可分为中毒性型、过敏性特异质型及代谢性特异质型。中毒性型是由于药物自身或药物的代谢产物的毒性引起的剂量依赖性肝损伤,可由乙酰氨基酚(acetaminophen)、甲氨蝶呤(methotrexate)等引起。过敏性特异质型是由于药物自身或药物的代谢产物成为抗原导致自身免疫从而引起的非剂量依赖性肝损伤,可由盐酸噻氯匹定、洛索洛芬钠、苯妥英、卡马西平、利福平、盐酸特比萘芬等引起。代谢性特异质型是由于代谢酶等遗传素质导致肝毒性代谢物的增加从而引起的服用期间依赖性肝损伤,可由双氯芬酸钠、异烟肼、阿卡波糖等引起。在药物施予前对每个患者的DILI的发作可能性进行预测、且能够从多个药物中选择出适合的药物是重要的,因此期望确立这样的评价体系。

[0003] 专利文献1中记载了包括“在含有检查对象药物的培养基中,将来源于被检者的免疫细胞在以不允许细胞通过且允许药物及其代谢物通过的膜隔开的状态下,与表达药物代谢酶的肝细胞共培养的步骤”及“分析上述步骤后的免疫细胞的步骤”的过敏型药物性肝损伤的评价方法。

[0004] 另外,非专利文献1中也记载了与专利文献1类似的肝脏细胞株(HepG2)和单核细胞/巨噬细胞株(THP-1)共培养的DILI的评价体系,并记载了发现在DILI药物(曲格列酮、曲伐沙星、双氯芬酸、酮康唑)和非DILI药物(罗格列酮、左氧氟沙星、乙酰水杨酸、氟康唑)之间、以及根据LPS、TNF等炎症诱发因子的有无而显示出肝细胞的反应性的差异等。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本特开2016-202032号公报(日本专利第6516255号)

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:A.Granitzny等,Toxicology Reports 4(2017)89-103

### 发明内容

[0010] 发明所要解决的课题

[0011] 作为关于DILI的评价体系,提出了如上述背景技术所举出的评价体系,但是,在例如能针对每位患者进行避开具有DILI发作可能性的药物而提出替代药物这样的详细分析的方面,仍有改善的余地。

[0012] 本发明的课题为提供能够针对药物导致的对肝脏及其他器官的损伤(DILI等)的发作可能性等进行详细分析的药物毒性评价平台(评价方法及用于其的试剂盒等)。

[0013] 用于解决课题的手段

[0014] 本申请发明人发现,将肝脏类器官与血液细胞(例如,单核细胞/巨噬细胞这样的免疫活性细胞)共培养而作为DILI评价体系使用的情况下,准确地反映了药物导致的DILI的发作可能性。具体而言,该肝脏类器官使用来源于DILI患者的细胞制备而成的情况下,即使添加少量的DILI药物(例如,作为抗生素的氨苄青霉素)也能够确认对肝脏类器官的毒性,能够以良好的灵敏度评价药物导致的DILI的发作可能性。此外,还发现了添加基于与上述DILI药物同样的目的而使用的其他药物(例如,阿莫西林、头孢氨苄)时,存在即使肝脏类器官是使用来源于DILI患者的细胞制备而成,也确认不到DILI的情况,可将这样的药物判别为可能成为DILI患者的替代药物。

[0015] 即,本发明为了解决上述课题,提供了以下的[1]~[7]。

[0016] [1]

[0017] 药物毒性评价方法,其包括:

[0018] 向类器官和血液细胞的共培养体系中添加药物的步骤;及

[0019] 评价对该类器官的该药物毒性的步骤。

[0020] [2]

[0021] 项1所述的药物毒性评价方法,其中,所述血液细胞为免疫活性细胞。

[0022] [3]

[0023] 生物标志物的推定方法,其包括下述步骤:针对多个类器官检体实施项1或2所述的药物毒性评价方法,对比发生了药物毒性的检体和未发生药物毒性的检体的培养上清液中的物质,推定成为生物标志物的物质。

[0024] [4]

[0025] 药物的筛选方法,其包括下述步骤:使用来源于药物毒性发作的患者的类器官,针对多个药物实施项1或2所述的药物毒性评价方法,选择药物毒性效果低的药物。

[0026] [5]

[0027] 试剂盒,其为药物毒性评价试剂盒,所述试剂盒包含类器官和血液细胞。

[0028] [6]

[0029] 项5所述的试剂盒,其还包含死细胞检测试剂。

[0030] [7]

[0031] 培养物,其包含类器官、血液细胞和药物。

[0032] 发明效果

[0033] 通过使用本发明提供的药物毒性评价平台(评价方法及用于其的试剂盒等),能够正确判别各个药物对患者器官的毒性从而选择毒性低的药物,或能够发现用于缓解药物毒性的作用机制(生物标志物等)、比以往毒性更低的新颖药物。

[0034] 需要说明的是,作为将类器官与血液细胞共同使用的本发明的药物毒性评价方法优异的理由,可推测如下:例如,含有血管内皮细胞的立体的器官结构更接近生物体内,且能够高精度地重现药物的毒性与血液细胞的相互作用;起因于细胞间相互作用的细胞成熟的因素等使得对于评价而言重要的代谢酶的活性高,等等。另外,本发明的药物毒性评价方法中,使用了血液细胞、优选免疫活性细胞,因此,特别是在这些细胞(免疫系统)与药物毒性相关的情况下,能够提高以往评价方法中存在困难的体外(in vitro)毒性的重现性,更

正确地(以高S/N比)重现毒性。

## 具体实施方式

[0035] -药物毒性评价方法-

[0036] 本发明的药物毒性评价方法至少包含下述步骤,根据需要也可以包含其他步骤。

[0037] 步骤1(药物添加步骤):向类器官和血液细胞的共培养体系中添加药物的步骤。

[0038] 步骤2(毒性评价步骤):评价该药物对该类器官的毒性的步骤。

[0039] <类器官>

[0040] 本发明使用的“类器官”包含器官或组织类器官(本说明书中统称“器官·组织类器官”)、癌类器官等。需要说明的是,类器官不仅包含处于作为类器官结构已成熟的阶段的器官、组织、癌等,也包含单纯的细胞聚集体(细胞球(spheroid))。

[0041] 类器官可以是来源于人,也可以是来源于人以外的动物,例如,小鼠、大鼠、犬、猪、猴等哺乳动物。即,用于制备类器官的规定细胞(详细内容参见以下的记载)可以是来源于人的细胞,也可以是来源于人以外的动物的细胞。从在人的医药开发中对以往的动物实验、人细胞试验等中难以发现的引起药物中毒的药物进行检测的观点考虑,类器官优选为来源于人。另外,用于制备类器官的规定细胞可以是原代培养细胞,也可以是传代培养细胞(株系化细胞)。

[0042] 本发明优选的一个实施方式中,类器官来源于药物毒性发作的患者(人)。此实施方式中,用于制备类器官的规定细胞为例如从药物毒性发作的患者采集的细胞(原代培养细胞)或使用该细胞制备的iPS细胞、或者它们的传代培养细胞(株系化细胞)。例如,在以本发明的药物毒性评价方法为标准的前提下,使用从药物毒性发作的患者采集的细胞制备的iPS细胞株适合用于制备类器官、即用于诱导分化成作为类器官原料的规定的各种细胞。

[0043] “器官·组织类器官”是被人为创造出的与器官或组织类似的组织体(三维结构体)。已知有各种种类的器官的类器官,例如,肝脏、胰脏、肾脏、心脏、肺、脾脏、食道、胃、甲状腺、甲状旁腺、胸腺、生殖腺、脑、脊髓、皮肤、内耳等的类器官(例如,参见<https://www.nature.com/articles/s41568-018-0007-6>、<http://www.amsbio.com/brochures/organoid-culture-handbook.pdf>)。需要说明的是,“器官·组织类器官”中也包含最终形成具有复杂结构的器官的早期阶段的结构体,即“器官芽”(例如,肝芽、胰芽)。

[0044] 器官·组织类器官(器官芽(organ bud))的制备方法为已知的方法,对于本发明使用的器官·组织类器官的制备方法没有特别的限制。作为器官·组织类器官(器官芽)的制备方法的优选例如W02015/129822中所记载的,可通过将构成器官·组织的细胞、间充质细胞及血管内皮细胞进行共培养来制备肝芽。

[0045] 对于使用何种器官·组织类器官(器官芽),可以根据药物毒性评价方法的目的进行选择。例如,实施针对肝脏毒性的药物毒性评价方法的情况下,可以使用实际会发生损伤(肝细胞伤害等)的器官即肝脏的类器官,另外也可以使用在过敏性特异质型的药物性肝损伤的情况下容易发生过敏反应的器官、即皮肤、内耳等的类器官。

[0046] 作为本发明中的器官的类器官的代表例,可举出“肝脏类器官”。肝脏类器官优选为“肝芽”。肝脏类器官(肝芽)的制备方法为已知的方法,作为优选例,可举出基于W02015/

129822中记载的器官的类器官(器官芽)的制备方法对肝脏内胚层细胞、间充质细胞及血管内皮细胞进行共培养的方法。

[0047] “癌类器官”是由癌细胞和其他细胞构成的细胞聚集体,重现了癌的微环境。癌类器官的制备方法为已知的方法,例如,可如日本特开2018-110575号公报中所记载的那样,通过将癌细胞、间充质细胞及血管内皮细胞进行共培养来制备癌类器官。

[0048] 癌细胞可以是已存在的癌细胞株,也可以是使用从人癌原发灶分离的癌组织建立的原代癌细胞株。对于癌的种类没有特别的限制,例如可以是肝癌、肾癌、恶性脑肿瘤、胰腺癌、胃癌、肺癌等。

[0049] 需要说明的是,使用癌类器官的情况下,根据本发明的典型实施方式,能够对下述形式的药物毒性进行评价:例如,在被施予了药物的癌细胞(癌变的组织)中产生与通常不同的代谢产物,从而导致癌症的症状恶化或对其他器官产生不良影响,并且,能够推定与这样的药物毒性相关的生物标志物。另一方面,使用癌类器官的情况下,也可将本发明的药物毒性评价方法变更为从毒性以外的观点评价药物的方法,例如,“药物耐受性的评价方法”。据报道,对于癌(胰癌等)的治疗抵抗性(药物耐受性、放射线敏感性、免疫疗法敏感性、营养疗法敏感性等),通过癌细胞与存在于癌细胞周围的各种细胞(肿瘤相关成纤维细胞和血管内皮细胞等间充质细胞、巨噬细胞等炎症细胞等)的相互作用构建的肿瘤微环境起着重要的作用。因此,也可实施包括下述步骤的药物敏感性评价方法:向癌类器官和血液细胞(免疫活性细胞等)的共培养体系中添加药物的步骤、及评价该癌类器官对该药物的药物敏感性的步骤。

[0050] 用于制备类器官(器官·组织类器官)的“构成器官·组织的细胞”中包含(I)构成器官·组织的实质细胞及(II)构成器官·组织的非实质细胞。另外,(I)实质细胞及(II)非实质细胞中,分别包含(i)分化成熟的或达到终末分化的、具有作为实质细胞或非实质细胞的规定功能性的细胞(本说明书中简称为“分化细胞”),及(ii)具有分化为实质细胞或非实质细胞的能力、或确定了分化的命运(已定向)但尚未分化、或处于干细胞或祖细胞阶段的、尚未充分具备作为实质细胞或非实质细胞的规定功能性的细胞(本说明书中简称为“未分化细胞”)。

[0051] 作为构成器官·组织的细胞,可以使用选自由实质细胞的分化细胞、实质细胞的未分化细胞、非实质细胞的分化细胞及非实质细胞的未分化细胞组成的组中的至少1种细胞,优选能够形成“器官·组织类器官”(例如器官芽)的2种以上细胞的组合。

[0052] 作为构成器官·组织的“实质细胞”,可举出例如肝脏的肝细胞、胰脏的内分泌细胞(例如, $\alpha$ 细胞、 $\beta$ 细胞、 $\delta$ 细胞、 $\epsilon$ 细胞、PP细胞)及胰管上皮细胞、肾脏的肾小管上皮细胞及肾小球上皮细胞、肺的肺泡上皮细胞、心脏的心肌细胞、肠道的上皮细胞、脑的神经细胞及神经胶质细胞、脊髓的神经细胞及雪旺细胞(Schwann cell)等。

[0053] 作为构成器官·组织的“非实质细胞”,可举出例如肝脏的肝窦内皮细胞、肝星状细胞及枯否细胞(Kupffer cell),胰脏的胰星状细胞及胰微血管内皮细胞,肾脏的肾小球内皮细胞,肺的肺动脉内皮细胞及肺成纤维细胞,心脏的心脏微血管内皮细胞、大动脉内皮细胞、冠状动脉内皮细胞及心成纤维细胞,肠道的肠道微血管内皮细胞,脑的脑微血管内皮细胞、血管周细胞、脉络丛内皮细胞及脑血管外膜成纤维细胞等。

[0054] 作为具有分化为构成器官·组织的实质细胞或非实质细胞的能力的“未分化器官

细胞”，可举出例如能够分化为脑、脊髓、肾上腺髓质、表皮、毛发·指甲·皮肤腺、感觉系统、末梢神经、晶状体等外胚层器官的细胞；能够分化为肾脏、输尿管、心脏、血液、生殖腺、肾上腺皮质、肌肉、骨骼、真皮、结缔组织、间皮等中胚层器官的细胞；能够分化为肝脏、胰脏、肠道、肺、甲状腺、甲状旁腺、尿道等内胚层器官的细胞；等等。

[0055] 制备肝脏类器官(肝芽)使用的“肝细胞”这一术语是指，作为肝脏的实质细胞，包含已分化的肝细胞(分化肝细胞)、和确定了分化为肝细胞的命运但尚未分化为肝细胞的细胞(未分化肝细胞)、所谓肝祖细胞(例如，肝脏内胚层细胞)这两方面的概念。分化肝细胞可以从生物体采集(从生物体内的肝脏分离)的细胞，也可以是使ES细胞和iPS细胞等多能干细胞、肝祖细胞、其他具有分化为肝细胞的能力的细胞分化而获得的细胞。未分化肝细胞可以从生物体采集的，也可以是使ES细胞和iPS细胞等多能干细胞、其他干细胞或祖细胞分化而获得的细胞。能够分化为肝细胞的细胞可以根据例如K.Si-Taiyeb等，*Hepatology*, 51(1):297-305(2010)、T.Touboul等，*Hepatology*.51(5):1754-65.(2010)进行制备。使ES细胞和iPS细胞等多能干细胞、肝祖细胞、其他具有分化为肝细胞的能力的细胞分化为肝细胞的方法是已知的，例如，可以由iPS细胞根据*Hepatology*,2010;51(1):297-305、*Cell Rep*.2017;21(10):2661-2670等记载的方法实施。对于从生物体采集的细胞群、通过ES细胞和iPS细胞等的诱导分化制备的细胞群中任一者(特别是后者)可以使用分化肝细胞的纯度高的细胞群或未分化肝细胞的纯度高的细胞群，也可以使用以任意比例包含分化肝细胞及未分化肝细胞的细胞混合物。

[0056] 关于某细胞是否为分化肝脏细胞，可通过成熟肝细胞标志物、例如去唾液酸糖蛋白受体1(ASGR1)、作为未成熟肝细胞标志物(早期肝分化标志物)的甲胎蛋白(AFP)、作为早期肝分化标志物的白蛋白(ALB)、视黄醇结合蛋白(RBP4)、转甲状腺素蛋白(TTR)、葡萄糖-6-磷酸酶(G6PC)等中的1种或2种以上的表达是否为阳性来进行判别。另一方面，关于某细胞是否为未分化肝脏细胞，可通过HHEX、SOX2、HNF4 $\alpha$ 、AFP、ALB等中的1种或2种以上的细胞标志物的表达是否为阳性(就ALB而言，为弱阳性)来判别。

[0057] 制备类器官(器官·组织类器官、癌类器官等)使用的“血管内皮细胞”这一术语包含造血性血管内皮细胞(hemogenic endothelial cell;HEC)及非造血性血管内皮细胞(non-hemogenic endothelial cell;non-HEC)这两个方面的概念。HEC是能够产生造血干细胞(具有造血能力)的血管内皮细胞，也被称为血液细胞生产型血管内皮细胞。另一方面，non-HEC是不具有这样的造血能力的血管内皮细胞。

[0058] 血管内皮细胞可以从生物体采集的血管内皮细胞(例如，微血管内皮细胞(microvessel endothelial cells:MVEC)、肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells:LSEC)、脐带静脉内皮细胞(umbilical-vein endothelial cells:UVEC)等)的纯度高的细胞群，也可以是使ES细胞、iPS细胞等多能干细胞、其他具有分化为血管内皮细胞的能力的细胞分化而获得的血管内皮细胞的纯度高的细胞群。

[0059] 制备类器官(器官·组织类器官、癌类器官等)使用的“间充质细胞”这一术语是指主要存在于来源于中胚层的结缔组织、形成组织中发挥功能的细胞的支持结构的结缔组织细胞，包含分化的细胞(分化间充质细胞)、和确定了分化为间充质细胞的命运但还未分化为间充质细胞的细胞(未分化间充质细胞)、所谓的间充质干细胞这两个方面的概念。需要说明的是，“血管内皮细胞”虽然属于由未分化间充质细胞分化而来的细胞中的一种，但是

被排除在本说明书中对“间充质细胞”的定义之外。

[0060] 关于某细胞是未分化间充质细胞还是分化间充质细胞,可通过例如作为未分化间充质细胞标志物的Stro-1、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD133、CD271、巢蛋白(Nestin)等中的1种或2种以上是否为阳性(阳性则为未分化间充质细胞、阴性则为分化间充质细胞)来进行判别。

[0061] 间充质细胞还可以是根据本发明中作为目标的器官的类器官、组合使用的“构成器官·组织的细胞”而表达与特定的器官(组织)具有特异性的细胞标志物的细胞。作为这样的细胞标志物,可举出例如作为原始横隔(septum transversum mesenchyme)(STM)的细胞标志物的FOXF1、COL4A及ALCAM。

[0062] <血液细胞>

[0063] 本发明使用的“血液细胞”包含红细胞、白细胞(单个核细胞(mononuclear cell)及粒细胞)及血小板。“单个核细胞”包含淋巴细胞及单核细胞(monocyte)。“淋巴细胞”包含NK细胞、T细胞( $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、肿瘤浸润T细胞、记忆T细胞、幼稚T细胞、NKT细胞)及B细胞。“粒细胞”包含嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞。

[0064] 本发明中的血液细胞优选为免疫活性细胞。“免疫活性细胞”几乎相当于上述“单个核细胞”,包含担负获得性免疫的T细胞及B细胞、以及担负自然免疫的中性粒细胞、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等。例如,T细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞、巨噬细胞等作为在药物添加步骤中与类器官共培养的血液细胞(免疫活性细胞)是优选的。

[0065] 血液细胞、优选免疫活性细胞可以从生物体采集的细胞(例如,从未梢血液分离的单个核细胞),也可以是使ES细胞、iPS细胞等多能干细胞、其他具有分化为血液细胞的能力的细胞分化而获得的细胞。另外,血液细胞可以是原代培养细胞,也可以是传代培养细胞(株系化细胞)。

[0066] 血液细胞可以是来源于人,也可以是来源于人以外的动物,例如,小鼠、大鼠、犬、猪、猴等哺乳动物。从在人的医药开发中对以往的药物实验、人细胞试验等中难以发现的引起药物中毒的药物进行检测的观点考虑,血液细胞优选为来源于人。需要说明的是,血液细胞的动物种类通常与类器官(用于制备其的规定细胞)的动物种类是相同。

[0067] 本发明的优选的一个实施方式中,血液细胞来源于药物毒性发作的患者(人)。即,本发明的优选的一个实施方式中,用于制备类器官的规定细胞是例如从药物毒性发作的患者采集的细胞(原代培养细胞)、或使用该细胞制备的iPS细胞、或者它们的传代培养细胞(株系化细胞)。

[0068] <药物>

[0069] 本发明使用的“药物”只要是适用于作为类器官制备的对象的器官、组织等(包含癌变的器官、组织)的药物,则没有特别的限制,可以根据毒性评价的目的而使用各种药物。

[0070] 需要说明的是,药物引起的“毒性”中,不仅包含如以下示例的对于肝脏等器官的毒性,也包含“药疹”(特别是过敏性药疹)。药疹中包含中毒性表皮坏死症、Stevens-Johnson综合征、以及与病毒相关的药物过敏综合征等。

[0071] 本发明中的药物毒性不仅限于肝脏毒性,也可以是例如心脏毒性、血液·骨髓毒性等对肝脏以外的器官或组织的毒性。本发明的药物毒性评价方法可以使用有药物毒性发作可能性(或待验证是否有可能性)的器官或组织的类器官实施。

[0072] 本发明的一个实施方式中,药物是待评价对于施予对象是否有肝脏毒性的药物。一般而言,肝脏毒性导致的肝损伤被分类为肝细胞损伤型、胆汁淤积型及它们的混合型、或者急性重型肝炎。

[0073] 肝脏毒性(药物性肝损伤)的发生机制被分类为中毒性型及特异质型,特异质型进一步被分类为代谢性特异质型及过敏性特异质型。作为与这些作用机制有关的药物已有多件报道,例如,FDA(食品药品监督管理局,Food and Drug Administration)的“Drug Induced Liver Injury Rank (DILIrank) Dataset”公开了与药物性肝损伤有关的药物和严重程度等级(Severity Class)。本发明的药物毒性评价方法中,也可以使用被报道药物毒性的各种药物或者作为它们的替代(候选)的各种药物。需要说明的是,即使是同一种药物,也存在确认到与多种作用机制(例如,过敏性特异质型和代谢性特异质型这两者)有关的情况。

[0074] 对于具有中毒性型药物性肝损伤发作可能性的药物而言,药物自身或其代谢产物具有肝毒性,剂量依赖性地在几乎全部对象(人)中发生肝损伤。中毒性型的药物在动物实验等中也相对容易重现,也可以作为本发明的药物毒性评价方法中的药物使用。作为中毒性型的药物,可举出例如乙酰氨基酚(阿司匹林)、甲氨蝶呤。

[0075] 另一方面,对于具有特异质型药物性肝损伤发作可能性的药物而言,在毒物实验等中的重现比较困难,可以说作为本发明的药物毒性评价方法中的药物是优选的。认为过敏性特异质型的情况下,药物自身或其反应性中间代谢物成为半抗原,与肝细胞的各种构成成分结合后获得抗原性,从而引起过敏反应,多数在服用药物后1~8周发作。作为过敏性特异质型的药物,可举出例如盐酸噻氯匹定、洛索洛芬钠、苯妥英、卡马西平、利福平、盐酸特比萘芬。另外,认为代谢性特异质型的情况下,由于肝脏中代谢酶活性的个体差异等而导致发作,经1周(特别是8周后)~1年甚至更长时间的长期服药而发作。作为代谢性特异质型的药物,可举出例如阿卡波糖、胺碘酮、异烟肼、伊曲康唑、口服避孕药、扎鲁司特、双氯芬酸钠、双硫仑、他莫昔芬、蛋白同化甾类、丹曲林钠、替加氟·尿嘧啶、盐酸特比萘芬、曲格列酮(停止售卖)、丙戊酸钠、盐酸胍屈嗪、氟康唑、氟他胺、匹莫林、盐酸拉贝洛尔。

[0076] 另外,近年来,有时也将药物诱发性肝损伤(drug-induced liver injury)分类为直接肝毒性(direct hepatotoxicity)、特异性肝毒性(idiosyncratic hepatotoxicity)及间接肝毒性(indirect hepatotoxicity)(N Engl J Med 2019;381:264-273)。作为“直接肝毒性”型的药物,可举出例如高施予量的乙酰氨基酚、烟酸、阿司匹林(乙酰水杨酸)、可卡因、IV胺碘酮、IV甲氨蝶呤、癌化学疗法中使用的药物等。作为“特异性肝毒性”型的药物,可举出例如阿莫西林·克拉维酸、头孢菌素、异烟肼、呋喃妥因、米诺环素、氟喹诺酮类、大环内酯类、抗体等。作为“间接肝毒性”型的药物,可举出例如抗肿瘤药、糖皮质激素类、单克隆抗体(针对TNF、CD20、检查点蛋白(checkpoint protein)等的抗体(抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体等))、蛋白激酶抑制剂等。

[0077] 作为本发明的更具体的实施方式的一个示例,可举出化学治疗药(包含抗真菌药)或抗生素导致的肝脏毒性的评价方法。作为化学治疗药,例如,针对利福平、异烟肼(异烟酰胺:INH)、柳氮磺胺吡啶(柳氮磺吡啶)、氧氟沙星、左氧氟沙星、诺氟沙星、盐酸环丙沙星、磺胺甲噁唑·甲氧苄啶、灰黄霉素等,报道了肝细胞损伤型、混合型、胆汁淤积型、急性重型肝炎等肝损伤。另外,作为抗生素,例如,针对头孢烯类(头孢替安、头孢克洛、头孢唑啉钠、

头孢美唑钠、头孢氨苄等)、碳青霉烯类(亚胺培南-西司他丁钠等)、青霉素类(哌拉西林钠、氨苄青霉素、阿莫西林、舒巴坦钠·氨苄青霉素钠复方药、氧基青霉素(oxympenicillin)、克拉维酸钾·阿莫西林复方剂、他唑巴坦钠·哌拉西林钠复方剂等)、大环内酯类(依托红霉素、罗红霉素、克拉霉素、阿奇霉素等)、四环素类(盐酸四环素等)、盐酸米诺环素、磷霉素、头孢特伦新戊酯(cefterampivoxil)、头孢泊肟酯、氟氧头孢钠、盐酸特比萘芬、吡嗪酰胺、氟康唑、伊曲康唑等,报道了肝炎型、混合型、胆汁淤积型、急性重型肝炎等肝损伤。

[0078] 作为化学治疗药及抗生素以外的、具有药物性肝损伤发作可能性的药物,可举出例如以下药物:

[0079] 解热抗炎镇痛药…双氯芬酸钠、乙酰氨基酚、洛索洛芬钠、乙酰水杨酸、甲芬那酸、布洛芬、吲哚美辛、普拉洛芬、舒林酸等;

[0080] 精神·神经用药…苯妥英、卡马西平、丙戊酸钠、盐酸氯丙嗪、氟哌啶醇、丹曲林钠、氟烷、苯妥英(二苯乙内酰脲)、匹莫林等);

[0081] 循环系统用药(包含抗凝血药)…盐酸阿普林定、阿义马林、曲匹地尔、硝苯地平、盐酸尼卡地平、甲基多巴、胺碘酮、盐酸噻氯匹定、盐酸胍屈嗪、盐酸拉贝洛尔等;

[0082] 消化系统用药…硫普罗宁、法莫替丁、兰索拉唑、西咪替丁、舒必利、奥美拉唑、盐酸雷尼替丁等;

[0083] 抗癌药…替加氟·尿嘧啶复方剂、环磷酰胺、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、他莫昔芬、氟他胺、甲氨蝶呤等;

[0084] 日本汉方药…小柴胡汤、柴苓汤、葛根汤等;

[0085] 代谢性疾病用药(糖尿病·高脂血症用药)…曲格列酮、阿卡波糖、伏格列波糖、格列本脲、依帕司他等;

[0086] 其他…痛风·高尿酸血症用药、呼吸系统用药(例如,扎鲁司特)、免疫抑制药(例如,硫唑嘌呤)、泌尿·生殖系统用药、骨代谢改善药、激素药(例如,雌激素制剂和黄体酮制剂的复方剂、蛋白同化甾类)、抗过敏药、维生素药、一般用途医药品(例如,维生素A(视黄醇棕榈酸酯)、乙醛抑制药(抗酒精疗法药,例如,双硫仑)、抗甲状腺药(例如,丙硫氧嘧啶)等。

[0087] 本发明的一个实施方式中,需评价药物对于施予对象是否具有心脏毒性。对于心脏毒性而言,已知其作为例如导致心脏猝死的致死性心律失常、即尖端扭转型室性心动过速(Torsade de Pointes:TdP)而呈现。以往,药物导致的TdP发生的可能性(TdP风险)是根据有无发生其前阶段的心肌QT延长(动作电位持续时间延长)、有无hERG通道抑制作用等来进行评价的。本发明的药物毒性评价方法中,例如,能够根据使药物作用于心脏类器官时发生的细胞外电位的波形是否适合规定的标准、或根据其他方法来评价该药物是否具有心脏毒性(TdP风险)。已知有各种可能使心脏毒性发作的药物,可用于本发明中。作为具有心脏毒性的药物,可举出例如蒽环素(anthracycline)类、环磷酰胺、5-氟尿嘧啶、紫杉醇等抗肿瘤药物;曲妥珠单抗、贝伐珠单抗、纳武单抗(nivolumab)等单克隆抗体;舒尼替尼、尼洛替尼等酪氨酸激酶抑制剂;齐多夫定等抗逆转录病毒药;罗格列酮等抗糖尿病药等。

[0088] 本发明的一个实施方式中,需评价药物对于施予对象是否具有血液·骨髓毒性。作为药物诱发的血液·骨髓毒性,可举出例如红细胞减少症、白细胞(粒细胞)减少症、血小板减少症、凝血异常、骨髓异常增殖、白血病、伴随3系统(红细胞系统、粒细胞系统及巨核细胞系统)造血功能障碍的全血细胞减少症等。血液·骨髓毒性是由造血器官(主要为骨髓)

的造血障碍和末梢的血液细胞破坏造成的。造血障碍是由于药物作用于骨髓谱系干细胞、造血祖细胞、抑制其分化增殖而发生的。血液细胞破坏多起因于免疫学机制,被分类为药物吸附型、免疫复合型及自身免疫型。已知有各种可能使血液·骨髓毒性发作的药物,可用于本发明中。伊立替康、甲氨蝶呤等是引起骨髓(及附属的血液细胞)毒性的代表性药物。另外,作为引起嗜中性粒细胞等的减少的粒细胞减少症(药物性粒细胞缺乏症)的药物,可举出例如阿司匹林、安乃近(sulpyrine)、双氯芬酸、吲哚美辛等退烧镇痛药(非甾体抗炎药);氯丙嗪、左美丙嗪(levomepromazine)、氯二氮平(chlordiazepoxide)、甲丙氨酯(meprobamate)、氯氮平等抗精神病药(抗抑郁药);甲硫氧嘧啶(methylthiouracil)、丙硫氧嘧啶、甲巯咪唑等抗甲状腺激素药;氯噻酮、氯噻嗪、依他尼酸等利尿药;苯妥英、三甲双酮、卡马西平等抗痉挛药(抗癫痫药);氯磺丙脲、甲苯磺丁脲等口服降血糖药;氯霉素、青霉素、甲砒霉素、链霉素、甲氧苄啶·磺胺甲噁唑等抗生素·抗菌药;对氨基水杨酸(PAS)、异烟肼(INH)等抗结核药;赛庚啶、氯苯那敏等抗组胺药;保泰松、吲哚美辛、金制剂等抗风湿药;普鲁卡因胺、阿义马林、奎尼丁等抗心律失常药;噻氯匹定等抗血小板药;法莫替丁、兰索拉唑等消化性溃疡治疗药;抗癌剂、青霉胺、磺胺(磺胺药)等。

[0089] “药物”不限于上文中所示例的低分子医药,也可以是抗体医药、多肽医药、核酸医药等能够作为医药品的有效成分使用的各种低分子医药以外的药物。

[0090] “药物”不限于实际上作为医药品市售的药物,也可以是临床试验或非临床试验中使用的药物、其前阶段的正在开发的药物(医药品的有效成分的候选化合物等)。

[0091] <药物添加步骤>

[0092] 本发明的药物毒性评价方法中的第1步骤、即药物添加步骤是向类器官和血液细胞的共培养体系中添加药物的步骤。

[0093] 药物添加步骤中,用于培养类器官的培养基可以根据类器官的种类选择适合的培养基。类器官用培养基是已知的,一般而言,使用将用于培养制备类器官所使用的各种规定细胞的培养基混合而得的培养基,例如,可以将用于构成器官·组织的细胞的培养基、间充质细胞用培养基及血管内皮细胞用培养基(也有培养基可以通用的情况)的混合培养基作为类器官用培养基。

[0094] 可以向如上所述的类器官用培养基中以适合药物毒性评价的所希望的浓度添加药物。药物的添加浓度可以根据共培养体系(类器官、血液细胞及药物各自的种类和比例、培养基的组成等)、毒性评价步骤中采用的评价方法、或作为用于制备类器官的细胞来源的患者的属性(例如,与药物毒性有关的基因)等而进行适合的调节。另外,可以参考使用了以往的各种细胞、类器官等的培养系的评价方法中的药物添加量,对本发明中的使用了“类器官和血液细胞的共培养体系”的评价方法中的药物的添加量进行调节(例如,鉴于本发明的评价精度的提高等,根据需要改变数值范围(上限值及下限值))。例如,使用肝脏类器官评价肝脏毒性的情况下,可以按氨苄青霉素为20mg/mL以下(例如,0~20mg/mL的范围内所含的几个点值的浓度,对于以下其他药物的数值范围也同样)、阿莫西林为1.0mg/mL以下、头孢氨苄为2.0mg/mL以下、左氧氟沙星为4.0mg/mL以下的浓度添加至肝脏类器官用培养基。

[0095] <毒性评价步骤>

[0096] 本发明的药物毒性评价方法中的第2步骤、即毒性评价步骤是评价药物对类器官的毒性的步骤。

[0097] 毒性评价步骤中,可以根据使用的类器官、血液细胞及药物的种类、药物毒性的种类等而采用适合的评价方法和标准。所谓药物毒性的种类,例如,若为肝脏毒性,则包含肝细胞损伤型、混合型、胆汁淤积型、急性重型肝炎等。

[0098] 本发明的一个实施方式中,对于毒性评价而言,在经过药物添加步骤的细胞之中,使用试剂(例如,碘化丙啶;PI)检测死细胞从而求出细胞中死细胞的比率(细胞死亡率),与对照进行比较,由此,可以对药物有无毒性、药物毒性的强度进行评价。药物添加步骤导致的细胞死亡可以说是反映了肝细胞损伤型的肝脏毒性。例如,若细胞死亡率为规定的标准以下,则可评价为进行试验的药物对患者具有药物毒性的可能性低(低毒性)。或者,例如,针对进行试验的药物,对使用来源于药物毒性发作的患者的类器官的情况、和使用来源于已确认了药物毒性不发作的对象(健康人)的类器官的情况就细胞死亡率的结果进行比较,没有统计学上的显著差异时(优选任一方的细胞死亡率均为规定的标准值以下的情况),进行试验的药物也可评价为对患者具有药物毒性的可能性低(低毒性)。需要说明的是,上述细胞死亡率可以置换为例如“细胞死亡增加率”,所述“细胞死亡增加率”是以不向培养基中添加药物而实施的对照中的细胞死亡率为基准,换算为相对于其的比率而得到的。

[0099] -生物标志物的推定方法-

[0100] 本发明的生物标志物的推定方法包括下述步骤:针对多个类器官的检体实施本发明的药物毒性评价方法(药物添加步骤、毒性评价步骤等),对比发生了药物毒性(表示药物毒性的指标高于规定标准,确认具有药物毒性)的检体和未发生药物毒性(表示药物毒性的指标低于规定标准,确认不到具有药物毒性)的检体的培养上清液中的物质(例如,细胞因子),推定成为生物标志物的物质(例如,细胞因子)。

[0101] 本发明的一个实施方式中,所对比的培养上清液中的物质、即成为生物标志物的物质为细胞因子。药物毒性(例如,肝损伤)的作用机制中,免疫系统的参与(例如,由T细胞释放炎症细胞因子)可能是原因之一。但是,既未阐明免疫系统是否与全部药物均相关,也存在免疫系统的相关性未知、但不清楚是否真的与其无关的药物。另外,也有免疫系统以外的原因与作用机制相关的可能性。通过应用本发明的药物毒性评价方法,能够对药物毒性中的免疫系统的参与、其他的原因进行分析。

[0102] 例如,可以认为如来源于患者的类器官这样的、由于进行试验的药物而发生了细胞毒性的检体的培养上清液中,以一定水平的浓度含有由类器官释放的细胞因子(炎症细胞因子等)。因此,针对各种细胞因子,就培养上清液中的浓度对发生了细胞毒性的检体(患者来源的类器官等)和未发生细胞毒性的检体(健康人来源的类器官等)进行比较,由此,能够检测有无在前者的检体中浓度显著高于后者的细胞因子。可以推定在发生了细胞毒性的检体的培养上清液中的浓度显著较高的细胞因子为药物毒性的生物标志物。

[0103] 就这种生物标志物的推定方法而言,只要能够成为培养上清液中可能含有的生物标志物,则对细胞因子以外的物质、例如细胞因子以外的蛋白质、miRNA等核酸分子及含有其的外泌体、代谢物质(脂质介质,特别是来源于花生四烯酸的脂氧素、来源于 $\omega$ 3脂肪酸(DHA·EPA)的消退素(resolvins)·保护素(protectin)等)等也是可适用的。也有免疫系统以外的原因与药物毒性的作用机制相关的可能性,可以根据分析的目的而选择培养上清液中应对比的物质。

[0104] -药物的筛选方法-

[0105] 本发明的药物的筛选方法包含下述步骤:使用来源于药物毒性发作的患者的类器官,针对多个药物实施本发明的药物毒性评价方法(药物添加步骤、毒性评价步骤等),选择药物毒性效果低的药物。

[0106] “药物毒性效果低的药物”是指,更具体而言,在药物毒性评价方法的毒性评价步骤中,毒性(表示其的指标)为规定标准以下、或与对象相比无显著差异等,从而被评价为确认不到药物毒性的药物。

[0107] 对于本发明的药物的筛选方法而言,例如,可判定能够对药物毒性发作的患者施予的药物(可以是市售医药品,也可以是试验阶段的药物),基于同时实现提高治疗效果和降低危险性的目的而利用。例如,针对具有药物毒性(肝脏毒性等)发作可能性的药物(抗菌药等),选择多个作为向类器官来源患者施予的候选的药物,针对它们实施本发明的药物毒性评价方法,由此,能够选择药物毒性效果低、也即能施予至该患者的药物。

[0108] 此外,本发明的药物的筛选方法也可以基于下述目的使用:准备多个来源于药物毒性发作的患者的类器官(例如,具有彼此不同的肝毒性相关基因的种类器官),针对各类器官药物选择毒性效果低的药物,将结果进行整合,选择对于各种属性的患者而言发生细胞毒性的可能性低、毒性更低的药物。

[0109] 另外,类器官也可以是来源于不清楚药物毒性是否发作的对象的类器官,也可实现确认向该对象施予时药物毒性效果低的药物、从中选择适合的药物这样的用途。

[0110] -试剂盒-

[0111] 本发明的试剂盒至少包含类器官和血液细胞。这样的试剂盒能够用于实施上述的本发明的药物毒性评价方法等。关于试剂盒使用的类器官及血液细胞的技术事项,与本说明书中关于药物毒性评价方法等所记载的相同。

[0112] 对于本发明的试剂盒而言,作为类器官,至少包含来源于药物毒性患者的类器官,也可以包含来源于健康人(药物毒性未发作的对象)作为对象。另外,来源于药物毒性患者的类器官可以是1种,也可以是2种以上(例如,药物毒性相关基因彼此不同的类器官)。

[0113] 本发明的试剂盒优选还包含死细胞检测试剂。作为死细胞检测试剂,可举出例如碘化丙啶(PI)。根据试剂盒的用途,特别是根据本发明的药物毒性评价方法的毒性评价步骤中采用的评价方法、本发明的生物标志物的推定方法或药物的筛选方法中采用的方法,也可以代替细胞检测试剂、或在其基础上追加使用其他试剂。

[0114] -培养物-

[0115] 本发明的培养物包含类器官、血液细胞和药物。这样的培养物相当于根据本发明的药物毒性评价方法中的药物添加步骤制备的、以及供于毒性评价步骤的培养物。培养物可以被容纳于皿(培养皿)这样的培养容器中,也可以被容纳于孔板上形成的多个孔中(各孔内的容纳物,或这样的容纳物的集合体)。

[0116] 实施例

[0117] [实施例1]利用抗菌药的肝脏类器官毒性试验

[0118] [实验方法]

[0119] (1)人血管内皮细胞(EC)的制备

[0120] 分别将来源于健康人的iPS细胞(1383D2;京都大学iPS研究所)及来源于药物性肝损伤患者的iPS细胞(16-24;横浜市立大学)在向DMEM/F-12(Gibco)(10ml)中添加1%B-

27 Supplements (GIBCO)、BMP4 (25ng/ml) 及CHIR99021 (8 $\mu$ M) 而得的培养基中于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养3天,以诱导中胚层谱系祖细胞。将获得的中胚层谱系祖细胞进一步在向Stempro-34 SFM (Gibco) (10ml) 中添加VEGF (200ng/ml) 及Folksolin (2 $\mu$ M) 而得的培养基中于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养7天,以获得CD31阳性、CD73阳性及CD144阳性的人血管内皮细胞群。

[0121] (2) 人肝脏内胚层细胞 (HE) 的制备

[0122] 分别将来源于健康人的iPS细胞 (1383D2; 京都大学iPS研究所) 及来源于药物性肝损伤患者的iPS细胞 (16-24; 横浜市立大学) 在向基础培养基RPMI (Fujifilm) (2ml) 中添加Wnt3a (50ng/mL)、激活素A (100ng/ml) 而得的培养基中于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养5天,以诱导内胚层谱系祖细胞。将获得的内胚层谱系祖细胞在向上述基础培养基中添加1%B27 Supplements (GIBCO) 及FGF2 (10ng/ml) 而得的培养基中于5%CO<sub>2</sub>、37℃进一步培养5天,以获得AFP、ALB及HNF4 $\alpha$ 为阳性的人肝脏内胚层细胞群。

[0123] (3) 人间充质细胞 (MC) 的制备

[0124] 分别将来源于健康人的人iPS细胞 (1383D2; 京都大学iPS研究所) 及来源于药物性肝损伤患者的iPS细胞 (16-24; 横浜市立大学) 在向基础混合培养基DMEM/F-12 (Gibco) (10ml) 中添加1%B-27 Supplements (GIBCO)、BMP4 (25ng/ml) 及CHIR99021 (8 $\mu$ M) 而得的培养基中于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养3天,以诱导中胚层谱系祖细胞。针对获得的中胚层谱系祖细胞,向同培养基中添加PDGFBB及激活素A,于5%CO<sub>2</sub>、37℃进一步培养3天。回收培养后的细胞,再次接种于新的明胶包被培养板,在向上述基础混合培养基中添加bFGF及BMP4而得的培养基中于5%CO<sub>2</sub>、37℃进一步培养4天,由此获得FOXF1、COL4A、ALCAM及CD73为阳性的人间充质细胞群。

[0125] (4) 类器官 (三维结构体) 的制备

[0126] 将制备的人肝脏内胚层细胞 (HE)、人血管内皮细胞 (EC) 及人间充质细胞 (MC) 以10:7:1的比例的细胞数 (总数18 $\times$ 10<sup>5</sup>个) 进行混合,在三维培养容器Elplasia (Kuraray) 中,于5%CO<sub>2</sub>、37℃共培养1天,制备凝集体。该共培养中,作为培养用培养基,使用将向HCM (Lonza) 中添加FBS (5%)、HGF (10ng/ml)、OSM (20ng/ml) 及Dex (100nM) 而得的肝脏细胞用培养基 (A)、和向Stempro-34 SFM (Gibco) 中添加VEGF (50ng/ml) 及FGF2 (10ng/ml) 而得的血管内皮细胞用培养基 (A) 以1:1的体积比混合的培养基 (本说明书中称为“类器官用培养基”) 2ml。

[0127] (5) 类器官和末梢血液单个核细胞 (PBMC) 的共培养、及添加抗菌药

[0128] 将所制备的类器官利用类器官用培养基于5%CO<sub>2</sub>、37℃进一步培养114~15天。回收培养后的类器官,以每孔50~70个接种于96孔U形底低吸附培养容器 (Corning, Sumitomo Bakelite等)。将在液氮罐内冷冻保存的来源于多人的PBMC (HEM) 融化,悬浮于分别添加了适合浓度的抗菌药 (氨苄青霉素钠、阿莫西林三水合物、头孢氨苄、左氧氟沙星0.5水合物) 的类器官培养基中。将获得的PBMC悬浮液以成为每1孔为2 $\times$ 10<sup>5</sup>个PBMC的方式添加至接种有类器官的孔中,进行混合。

[0129] (6) 使用细胞死亡检测试剂 (碘化丙啶) 的抗菌药毒性试验

[0130] 在含有抗菌药的培养基中,于5%CO<sub>2</sub>、37℃对类器官及PBMC实施24小时共培养,向培养基中添加碘化丙啶 (PI, 同仁化学研究所), 于5%CO<sub>2</sub>、37℃反应30分钟。反应结束后,去除培养上清液100 $\mu$ L, 添加100 $\mu$ L的PBS (-) 后静置1分钟,由此仅使类器官沉淀,再次去除上

清液100 $\mu$ L。通过重复此步骤2次,进行PBMC的去除和PI溶液的洗涤。再次添加100 $\mu$ L的PBS(-)后,使用荧光显微镜(KEYENCE BZ-X系列等)取得明视野图像及荧光图像(激发波长:530nm、荧光波长:620nm)。使用图像分析软件Fiji对取得的图像进行荧光强度和类器官面积的定量,并计算出类器官每单位面积的PI染色率(PI染色率=PI荧光强度/类器官面积)。通过计算以未添加药物时作为对照的PI染色率的倍率,定量死细胞增加率。

[0131] [结果]

[0132] (1) 在含有PBMC的本试验体系中,来源于药物性肝损伤发作患者株(16-24)的肝类器官中,氨苄青霉素以浓度依存性的方式引起细胞死亡显著增加(表1)。

[0133] [表1]

	PBMC	药物(氨苄青霉素钠) 的浓度 (mg/ml)	死细胞增加率 (未添加药物时=1) (平均值 $\pm$ SE)
[0134] 来源于DILI 患者的类器官	有	16.6	4.43 $\pm$ 0.88*
	无	16.6	1.36 $\pm$ 0.61
来源于健康人的类器官	有	16.6	0.68 $\pm$ 0.17
	无	16.6	0.47 $\pm$ 0.09

[0135] \* $p < 0.05$

[0136] (2) 实施了利用多种抗菌药的毒性试验,结果,分类为显示毒性的化合物(氨苄青霉素、左氧氟沙星0.5水合物)和未显示毒性的化合物(阿莫西林三水合物、头孢氨苄)(表2)。

[0137] [表2]

	PBMC	药物(阿莫西林三水合物) 的浓度 (mg/ml)	死细胞增加率 (未添加药物时=1) (平均值 $\pm$ SE)
[0138] 来源于DILI 患者的类器官	有	0.83	0.81 $\pm$ 0.15
	无	0.83	1.66 $\pm$ 0.24
来源于健康人的类器官	有	0.83	2.28 $\pm$ 0.71
	无	0.83	1.45 $\pm$ 0.04

	PBMC	药物(头孢氨苄) 的浓度 (mg/ml)	死细胞增加率 (未添加药物时=1) (平均值 $\pm$ SE)
[0139] 来源于DILI 患者的类器官	有	1.67	0.83 $\pm$ 0.19
	无	1.67	2.16 $\pm$ 0.35
来源于健康人的类器官	有	1.67	1.34 $\pm$ 0.41
	无	1.67	1.44 $\pm$ 0.27

	PBMC	药物(左氧氟沙星0.5水合物)的浓度 (mg/ml)	死细胞增加率 (未添加药物时=1) (平均值±SE)
[0140] 来源于DILI患者的类器官	有	3.33	3.64±0.25*
	无	3.33	11.06±0.43*
来源于健康人的类器官	有	3.33	3.19±0.93
	无	3.33	4.29±1.45

[0141] \*p<0.05。