

T/SDSCA

团 体 标 准

T/SDSCA0001—2024

人脐带组织来源的间充质干细胞制备与质量 控制

Preparation and quality control of human umbilical cord tissue derived mesenchymal
stem cells

(报批稿)

2024-11-29 发布

2024-11-29 实施

山东省干细胞学会 发布

目 次

前言	II
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
4 基本要求	3
4.1 场地要求	3
4.2 物料、设备和仪器	4
4.3 人员管理	4
5 制备过程	4
5.1 样本采集	4
5.2 样本运输	5
5.3 分离与培养	5
5.4 冻存与复苏	5
5.5 关键质量控制	6
6 记录	6
附录 A（规范性） 细胞存活率检测 细胞计数法	8
附录 B（规范性） 细胞表面标记物检测 流式细胞法	10
附录 C（规范性） 成骨分化检测 茜素红 S 染色法	11
附录 D（规范性） 成脂分化检测 油红 O 染色法	12
附录 E（规范性） 成软骨分化检测 阿尔新蓝染色法	13
参考文献	14

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。

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。

本文件由山东博森医学信息技术有限公司提出。

本文件由山东省干细胞学会归口。

本文件起草单位：组织细胞与再生医学山东省工程研究中心、山东博森医学信息技术有限公司、山东卡森细胞治疗信息技术有限公司、山东大学第二医院、山东大学齐鲁医院、山东省第三医院、山东省立医院。

本文件主要起草人：陈义、孙明辉、滕滕、唐东起、程雷、单风平、葛汝村、刘瑜。

人脐带组织来源的间充质干细胞制备与质量控制

1 范围

本文件描述了人脐带组织来源的间充质干细胞制备中场地要求、物料、设备和仪器、人员管理、样本的采集运输、细胞制备过程、关键质量控制及记录。

本文件适用于人脐带组织来源的间充质干细胞的生产和检测。

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。

GB 50591 洁净室施工及验收规范

GB/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T37864 生物样本库质量和能力通用要求

T/CSCB0001 干细胞通用要求

中华人民共和国药典

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人脐带组织来源的间充质干细胞 Mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord tissue

存在于新生儿脐带组织中的一种多功能干细胞，贴壁培养后呈成纤维细胞样形态（纺锤形和梭形）、可在体外自我更新并具有成骨、成脂、成软骨等分化能力的干细胞。

3.2

洁净操作区 Clean operating area

需要对环境中悬浮粒子及微生物数量进行控制的区域，其建筑结构、装备及其使用应当能减少该区域内污染物的引入、产生和滞留，区域内温度、湿度、压力等其他参数按照要求受控。

4 基本要求

4.1 场地要求

人脐带组织来源的间充质干细胞制备机构实验室或厂房应由具有洁净实验室设计建设资质的工程公司设计与建造，并应符合 GB50591 的规定。建设完成后，各功能区域的洁净级别应由专业机构进行检测并出具合格证明。

4.2 物料、设备和仪器

4.2.1 物料

人脐带组织来源的间充质干细胞的制备机构应优先选用符合 T/CSCB0001《干细胞通用要求》的原材料及辅料。并对物料供应商进行审核，要求供应商提供产品质量报告和批次检验报告，并对物料进行质量抽检，避免不合格产品引入后续使用过程。在细胞制备过程中所用的培养基应具有足够的纯度并符合无菌、无致病微生物及内毒素的质量标准，若使用商业来源培养基，应尽量采用 GMP 级别的培养基并提供相关质量合格证明。

4.2.2 设备和仪器

人脐带组织来源的间充质干细胞制备机构的设备和仪器正式使用前应做安装确认，关键设备定期进行第三方校准，不应使用有安全隐患的仪器操作样本。制备机构应对设备和仪器应进行编号建档，并建立标准操作流程（SOP），确保使用、运行、保养、维修记录完整，及时对状态异常的设备进行校对和维修。

4.3 人员管理

4.3.1 人脐带组织来源的间充质干细胞制备机构应分别设立干细胞制备负责人、质量管理负责人和质量受权人岗位。由法人授权任命，并定期接受岗位专业培训，质量管理负责人和制备技术负责人不应互相兼任，质量管理负责人和质量受权人可以兼任。直接从事人脐带组织来源的间充质干细胞制备和质控技术人员、采集人员应具备的健康要求：HBsAg 和针对 HAV、HCV、HIV 及梅毒的抗体及必要的微生物筛查，检测结果应为阴性。

4.3.2 直接接触人脐带组织来源的间充质干细胞人员应每年接受体检一次，有呼吸道感染、发热或体表有伤口等疾病状态下不应进入洁净操作区，需完全康复后方可恢复岗位操作。

4.3.3 人脐带组织来源的间充质干细胞制备和质控技术人员应具备本科及以上学历，生物技术、生物工程、医学或药学相关专业，上岗前应经过专业培训，内容包括但不限于干细胞理论与实践、干细胞法律法规、细胞培养基础、生物安全、仪器设备使用与维护方法、物料管理与清洁卫生、岗位职责、操作规范等内容。

5 制备过程

5.1 样本采集

5.1.1 通则

5.1.1.1 样本采集与处理应符合 GB/T37864 的要求。

5.1.1.2 采集和处理程序可供样本采集人员使用。

5.1.1.3 应具备相关的资质和设施环境。

5.1.1.4 应符合国内认可的伦理和当地的法律法规。

5.1.1.5 应建立适当的质量管理体系确保符合用户需求并持续改进。

5.1.2 供者要求

对供者（新分娩产妇）的一般信息、既往病史、家族史等进行资料采集，要求供者无家族遗传病、无恶性肿瘤疾病史、无感染性疾病、无自身免疫性疾病、无特定病毒感染（乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病、巨细胞病毒、EB病毒等）。

5.1.3 采集场所及人员

采集场所应达到II级洁净手术室要求。采集人员应经过相应的技术培训。

5.1.4 采集过程

5.1.4.1 脐带标本采集严格按照国家执业医师实践技能规范化标本进行操作，采集的器具应保证无菌。

5.1.4.2 采集器具应具有唯一标识码、采集时间、采集医生、内容物等信息，放置 2℃~8℃冰箱保存，并联系运输人员及时运输至细胞制备中心或细胞制备实验室。

5.2 样本运输

5.2.1 运输容器应将温度维持在 2℃~8℃，在运输到实验室前确保其处于有效运行状态。

5.2.2 样本运输宜采用平稳、安全、快速的运输途径，宜采用冷藏运输车或专用标本冷藏运输箱运输。

5.2.3 运输过程中应防渗漏、防辐射、抗震动、耐压、耐热等，样本包装应贴上唯一标识码，且应标明样本的基本信息，至少包括采集日期、采集人等信息。

5.3 分离与培养

5.3.1 新生儿脐带剥离华通氏胶，以组织块贴壁法或胶原酶消化法分离人脐带组织来源的间充质干细胞。

5.3.2 为保证细胞生长所必需的营养水平以及消除代谢产生的毒害作用，应结合细胞所处环境稳定性综合考虑是否进行换液，并严格把控质量。一般首次换液需要镜下观察到原代细胞完全贴壁和延展后方可进行，一般在原代细胞培养的第 4 天左右进行。

5.3.3 人脐带组织来源的间充质干细胞融合度达到 80%~90%可进行传代操作。传代操作一般采用酶消化法将贴壁细胞消化吹散，再用终止剂终止消化，离心后用培养基重悬细胞，再根据密度传代。

5.3.4 分离与培养过程中应标识细胞的名称、代次、批次、操作日期、操作人员姓名等信息。

5.3.5 分离及传代过程中各批次细胞应进行必要的质量控制，质量控制项目至少应包括细胞形态、无菌、支原体、细胞数量及活率、细胞表面标记物等。

5.3.6 操作过程应严格控制细胞质量，确保无外源因子污染。

5.4 冻存与复苏

5.4.1 冻存与复苏过程应严格按照相应的操作规程操作，严格控制细胞质量，确保无外源因子污染。

5.4.2 冻存过程宜遵循梯度或程序降温原则。

5.4.3 复苏过程应根据细胞的使用目的进行冷冻保护液的洗涤。

5.4.4 冻存复苏过程中应标识细胞的名称、代次、批次、操作日期、操作人员姓名等信息。

5.5 关键质量控制

5.5.1 细胞形态

人脐带组织来源的间充质干细胞贴壁培养时细胞形态应呈纺锤形和梭形的成纤维细胞样。

5.5.2 无菌检测

按照《中华人民共和国药典》中 1101 无菌检测法执行，细菌和真菌检测结果都应为阴性。

5.5.3 支原体检测

按照《中华人民共和国药典》3301 支原体检查法执行，支原体检测结果应为阴性。

5.5.4 细胞存活率

按照附录 A 的方法检测，未冻存细胞存活率应大于或等于 90%。

5.5.5 内外源致病因子

采用 ELISA 检测法，HIV 抗体、HBsAg、HCV 抗体、TP 抗体、CMV-IgM、HTLV 抗体、HPV 抗体、HHV 抗体、EBV 抗体检测应为阴性；采用核酸检测法，HCV、HBV、HIV 病毒核酸检测应为阴性。

5.5.6 表面标记物

按照附录B的方法检测，CD105、CD73、CD90 阳性率均应大于或等于95%；CD11b、CD19、CD31、CD34、CD45、HLA-DR阳性率均应小于或等于2%。

5.5.7 多向分化潜能

5.5.7.1 成骨分化

按照附录C的方法检测，人脐带组织来源的间充质干细胞应具有成骨分化潜能。

5.5.7.2 成脂分化

按照附录D的方法检测，人脐带组织来源的间充质干细胞应具有成脂分化潜能。

5.5.7.3 成软骨分化

按照附录E的方法检测，人脐带组织来源的间充质干细胞应具有成软骨分化潜能。

6 记录

原始记录应确保其可追溯细胞分离、处理和储存操作所有环节，记录内容包含但不限于以下信息：

- a) 供者唯一身份标识符，如果适用；
- b) 产品描述码、采集类型和分类码；
- c) 产品名称和组分；
- d) 采集日期和时间；
- e) 生产制备机构的名称和地址；
- f) 制备过程中关键步骤的细节及结果；
- g) 关键步骤的日期和时间，如果适用；

- h) 每一步骤的操作人员姓名及复核人；
- i) 在分离、处理、制备过程中使用的关键物料的名称、生产商、批号、有效期限；
- j) 使用试剂的数量；
- k) 使用设备编码。

全国团体标准信息平台

附 录 A
(规范性)
细胞存活率检测 细胞计数法

A.1 仪器和设备

A.1.1 明视场显微镜。

A.1.2 血球计数板。

A.2 试剂

除特别说明外,所用试剂均为分析纯,检测用水均为 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ (电阻率单位)去离子水。

A.2.1 磷酸盐缓冲液: pH 为 7.4。

A.2.2 台盼蓝染液: 使用时,用磷酸盐缓冲液(A.2.1)稀释至 0.4%(质量浓度)。

A.3 检测步骤

A.3.1 细胞悬液制备

收集待检测细胞,用磷酸盐缓冲液(A.2.1)配制细胞悬液,稀释至合适的浓度。每个血球计数板(A.1.2)的 1mm^2 的方格中的细胞的数量应为 20 个~50 个细胞。如果高于 200 个细胞,则需要进行稀释。

A.3.2 细胞染色

按 1:1 的体积比将台盼蓝染液(A.2.2)与细胞悬液(A.3.1)混合均匀。

A.3.3 细胞计数

将盖玻片盖在血球计数板(A.1.2)计数槽上,取 $10\mu\text{L}$ 混合液(A.3.2)滴在一侧计数室的盖玻片边缘,另取 $10\mu\text{L}$ 混合液,滴在另一侧计数室的盖玻片边缘,使混合液充满盖玻片和计数板之间,静置 30s,将计数板置于明视场显微镜(A.1.1)下对被染色的细胞和细胞总数分别进行计数。

对 16×25 规格的计数室,按对角线位,取左上、右上、左下、右下 4 个 1mm^2 的中格(即 100 个小格)计数。对 25×16 规格的计数室,按对角线位,取左上、右上、左下、右下和中央 5 个中格(即 80 个小格)计数。当遇到位于大格线上的细胞,一般只计数大方格的上方和左线上的细胞(或只计数下方和右方线上的细胞)。

按照步骤 A.3.2~A.3.3 再重复测定一个样品。

A.3.4 细胞存活率计算

细胞存活率计算公式如下:

$$X = \frac{M-S}{M} \times 100\%$$

式中:

X ——细胞存活率;

M ——细胞总数;

S ——染色的细胞数。

计算两次计数细胞存活率结果的平均值,记为细胞平均存活率。

A.4 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的10%。

附录 B
(规范性)
细胞表面标记物检测 流式细胞法

B.1 仪器和设备

B.1.1 流式细胞仪。

B.1.2 水平离心机。

B.1.3 电子天平。

B.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

B.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

B.2.2 牛血清白蛋白(BSA)：纯度 $\geq 98\%$ 。

B.2.3 叠氮钠(NaN_3)。

B.2.4 抗人CD105、CD73、CD90、CD11b、CD19、CD31、CD34、CD45、HLA-DR 抗体及同型对照抗体。

B.2.5 按照相应要求使用电子天平(B.1.3)配制流式检测所需的液体：洗涤液、抗体稀释液。

B.3 样品保存

洗涤液和标记后的样品于2~8℃保存。相关抗体遵照说明书保存。

B.4 检测步骤**B.4.1 样品准备**

收集细胞，使用水平离心机(B.1.2)300g离心4min，弃上清。然后用洗涤液清洗一遍，使用水平离心机(B.1.2)300g离心4 min，弃上清。

B.4.2 抗体孵育

按照抗体说明书进行稀释使用。抗体孵育结束后用洗涤液清洗两遍，使用水平离心机(B.1.2)300g离心4min，弃上清。

B.4.3 过滤上机

用洗涤液重悬细胞，然后通过40 μm 滤网转移到流式管中，按流式细胞仪(B.1.1)应用手册上机检测。

B.4.4 圈门设定原则

首先根据细胞大小和颗粒度设门圈出目标细胞分群1，排除死细胞和其他杂细胞，然后根据Isotype对照组荧光强度，在分群1的基础上画出阳性细胞群2，排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。抗体Isotype作为阴性对照。

B.5 结果分析

得到的检测结果用软件综合分析，具体参考其软件使用说明。

附录 C
(规范性)
成骨分化检测 茜素红 S 染色法

C.1 仪器和设备

C.1.1 血球计数板。

C.1.2 明视场显微镜。

C.1.3 水平离心机。

C.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

C.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

C.2.2 消化酶。

C.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液(C.2.1)稀释至0.4%(质量浓度)。

C.2.4 成骨诱导液。

C.2.5 茜素红S染色试剂盒。

C.3 检测步骤

C.3.1 细胞样品的准备

C.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机(C.1.3)离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

C.3.1.2 细胞计数

根据附录A方法测定，使用血球计数板(C.1.1)及明视场显微镜(C.1.2)计算细胞悬液活细胞浓度。

C.3.2 细胞接种并诱导

细胞接种方式、密度及诱导步骤均遵循成骨诱导液产品说明书。诱导14d~21d。

C.3.3 钙结节染色

钙结节染色根据茜素红S染色试剂盒说明书进行。

C.4 结果分析

显微镜下可见散在大量橘红色的钙结节。

附 录 D
(规范性)
成脂分化检测 油红 O 染色法

D.1 仪器和设备

D.1.1 血球计数板。

D.1.2 明视场显微镜。

D.1.3 水平离心机。

D.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为 GB/T 6682 规定的一级水。

D.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 为 7.4。

D.2.2 消化酶。

D.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液(D.2.1) 稀释至 0.4%(质量浓度)。

D.2.4 成脂诱导液。

D.2.5 油红 O 染色试剂盒。

D.3 检测步骤

D.3.1 细胞样品的准备

D.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机(D.1.3) 离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

D.3.1.2 细胞计数

根据附录 A 方法测定，使用血球计数板(D.1.1) 及明视场显微镜(D.1.2)计算细胞悬液活细胞浓度。

D.3.2 细胞接种并诱导

细胞接种方式、密度及诱导步骤均遵循成脂诱导液产品说明书，诱导 14d~21d。

D.3.3 脂滴染色

脂滴染色根据油红 O 染色试剂盒说明书进行。

D.4 结果分析

显微镜下可见橙红色的脂滴，脂肪细胞中含大小不等的脂滴。

附 录 E
(规范性)
成软骨分化检测 阿尔新蓝染色法

E.1 仪器和设备

E.1.1 血球计数板。

E.1.2 明视场显微镜。

E.1.3 水平离心机。

E.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

E.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

E.2.2 消化酶。

E.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液(E.2.1)稀释至0.4%(质量浓度)。

E.2.4 成软骨诱导液。

E.2.5 阿尔新蓝染色试剂盒。

E.3 检测步骤

E.3.1 细胞样品的准备

E.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机(E.1.3)离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

E.3.1.2 细胞计数

根据附录A方法测定，使用血球计数板(E.1.1)及明视场显微镜(E.1.2)计算细胞悬液活细胞浓度。

E.3.2 细胞接种并诱导

细胞接种方式、密度及诱导步骤均遵循成软骨诱导液产品说明书。诱导14d~21d。

E.3.3 软骨细胞胞外基质染色

软骨细胞胞外基质染色根据阿尔新蓝试剂盒说明书进行。

E.4 结果分析

显微镜下可见深蓝色的软骨细胞胞外基质。

参 考 文 献

- [1]DB22/T3574-2023 间充质干细胞储存服务规范
- [2]SZTT/SSCT002-2018 临床研究用人脐带来源间充质干细胞制剂规范
- [3]T/CRHA062-2024 适用于临床研究的间充质干细胞资源库建设与管理规范
- [4]T/CSCB0003-2021 人间充质干细胞
- [5]干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）（中国卫生计生委及食品药品监督管理总局（2015）46号）
- [6]干细胞临床研究管理办法（试行）（国卫科教发（2015）48号）
- [7]细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）（中国食品药品监督管理总局（2017）216号）
- [8]人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（试行）（国家药品监督管理局（2023）33号）