

团 体 标 准

T/CSCB 0004—2021

人造血干/祖细胞

Human hematopoietic stem/progenitor cell

2021-01-09 发布

2021-04-09 实施



中国细胞生物学学会 发布

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。

本文件由中国细胞生物学学会干细胞生物学分会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：华南生物医药研究院华南干细胞与再生医学研究中心、军事科学院军事医学研究院、国家干细胞资源库、中国科学院干细胞与再生医学创新研究院、北京干细胞与再生医学研究院、中国科学院动物研究所、国家干细胞资源库创新联盟、中国医学科学院血液学研究所、华南细胞与干细胞库、北京工商大学、中国计量科学研究院、南方医科大学南方医院。

本文件主要起草人：裴雪涛、赵同标、南雪、岳文、郝捷、马爱进、张博文、周家喜、傅博强、曲洛逸、张愚、房芳、李雪、冯晓静、杨舒、魏军、李启沅、胡士军、俞君英、高瀛岱、刘启发、曹佳妮、王磊、祝焕新。

人造血干/祖细胞

1 范围

本文件规定了人造血干/祖细胞的技术要求、检验方法、检验规则、使用说明、标签、包装、储存、运输要求和废弃物处理要求。

本文件适用于人造血干/祖细胞的生产 and 检测。

本文件不适用于《造血干细胞移植技术规范》《脐带血造血干细胞库技术规范(试行)》中所提及的适用于造血干细胞移植所涉及的造血干细胞。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

WS 213 丙型肝炎诊断

WS 273 梅毒诊断

WS 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准

T/CSCB 0001 干细胞通用要求

中华人民共和国药典

全国临床检验操作规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人造血干/祖细胞 human hematopoietic stem/progenitor cell

具有自我更新能力和产生所有谱系成熟血细胞潜能的未分化原始细胞称之为造血干细胞。

具备分化成部分或特定谱系成熟血细胞潜能的原始细胞称之为造血祖细胞。

3.2

造血集落 hematopoietic colony

由单一的造血干/祖细胞起源,在半固体培养基中形成的具有特定形态特征的细胞团簇。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BFU-E ——爆式红系细胞集落形成单位(Burst-forming Unit-erythroid)

CD ——分化簇(Cluster of Differentiation)

CFU-GEMM ——粒细胞-红系细胞-巨噬细胞-巨核细胞集落形成单位(Colony-forming Unit-gran-

	ulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte)
CFU-GM	——粒细胞-巨噬细胞集落形成单位 (Colony-forming Unit-granulocyte-macrophage)
EBV	——人类疱疹病毒 (Epstein Barr Virus)
HBV	——乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus)
HCMV	——人巨细胞病毒 (Human Cytomegalovirus)
HCV	——丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus)
HIV	——人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus)
HTLV	——人类嗜 T 淋巴细胞病毒 (Human T Cell Lymphotropic Virus)
NOD-SCID	——非肥胖糖尿病严重合并免疫缺陷 (Non Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficient)
STR	——短串联重复序列 (Short Tandem Repeat)
TP	——梅毒螺旋体 (Treponema Pallidum)

5 技术要求

5.1 原材料与辅料

5.1.1 应符合 T/CSCB 0001 的要求。

5.1.2 应建立供者细胞采集的供者评估与筛选标准、采集方法、运输标准和交接标准,保证供者和细胞的安全。

5.1.3 供者应筛查 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP,并记录结果。

5.2 关键质量属性

5.2.1 细胞形态

悬浮生长,细胞呈圆球形,大小均一,瑞氏-吉姆萨复合 (Wright-Giemsa) 染色观察胞体呈圆形,核质比高,胞质呈浅蓝色,无颗粒结构。

5.2.2 染色体核型

正常核型应为 46,XY 或 46,XX。

5.2.3 细胞存活率

未冻存细胞存活率 $\geq 85\%$,冻存复苏后细胞存活率 $\geq 70\%$ 。

5.2.4 细胞标志蛋白

CD34 阳性率 $\geq 80\%$ 。

5.2.5 造血集落培养

1×10^3 细胞可形成造血集落总数 ≥ 10 个,其中 CFU-GEMM 数量 ≥ 1 个。

5.2.6 体内造血重建

移植 NOD-SCID Il2rg^{null} 小鼠体内 16 周后,在外周血中可检测到人源 CD45⁺ 细胞 $\geq 5\%$,能够同时检测到人源 CD45⁺ CD19⁺ 细胞、CD45⁺ CD3⁺ 细胞、CD45⁺ CD33⁺ 细胞和 CD45⁻ CD235a⁺ 细胞。

5.2.7 微生物

真菌、细菌、支原体、HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP 应为阴性。

5.3 过程控制

5.3.1 扩增、冻存、复苏等过程控制应符合 T/CSCB 0001 要求。

5.3.2 细胞 STR 检测结果应与供者细胞保持一致。

6 检验方法

6.1 细胞形态

采用显微镜对细胞形态进行观察。细胞染色按照《全国临床检验操作规程》进行检验。

6.2 染色体核型

按照《中华人民共和国药典》进行检验。

6.3 细胞存活率

按照附录 A 的方法检验。

6.4 细胞标志蛋白

按照附录 B 的方法检验。

6.5 造血集落培养

按照附录 C 的方法检验。

6.6 体内造血重建

按照附录 D 的方法检验。

6.7 微生物

6.7.1 真菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”项检测。

6.7.2 细菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”项检测。

6.7.3 支原体

按照《中华人民共和国药典》中“3301 支原体检查法”项检测。

6.7.4 HIV

按照 WS 293 核酸法检验。

6.7.5 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.6 HCV

按照 WS 213 核酸法检验。

6.7.7 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.8 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.9 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.10 TP

按照 WS 273 核酸法检验。

7 检验规则

7.1 抽样方法和数量

7.1.1 在一个生产周期中,同一生产线、同一来源、同一代次、同一方法制备出来的产品为一批。

7.1.2 在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

7.2 出厂检验

每批产品应进行出厂检验,检验项目包括 5.2 规定的所有项目,并附检验报告。

7.3 复核检验

根据需要,应由专业细胞检验机构/实验室进行复核检验。

7.4 判定规则

出厂检验项目全部符合 5.2 规定,判为合格品;有 1 项及以上不符合本文件规定,则判为不合格品。

复核检验项目全部符合 5.2 规定,判为合格品;有 1 项及以上不符合本文件规定,则判为不合格品。

8 使用说明

应至少包括以下内容:

- a) 产品名称;
- b) 细胞代次;
- c) 细胞数量;
- d) 生产日期;
- e) 生产批号;
- f) 生产组织;
- g) 储存条件;
- h) 运输条件;

- i) 使用方法；
- j) 执行标准号；
- k) 生产地址；
- l) 联系方式；
- m) 邮政编码；
- n) 注意事项。

注：根据用户需求，可标注内毒素含量。

9 标签

应至少包括以下内容：

- a) 产品名称；
- b) 细胞代次；
- c) 细胞数量；
- d) 生产批号；
- e) 生产组织；
- f) 生产日期。

10 包装、储存及运输

10.1 包装

应选择对人造血干/祖细胞关键质量属性无影响的材料和容器。

10.2 储存

- 10.2.1 应符合 T/CSCB 0001 要求。
- 10.2.2 应在低于 -130°C 环境下储存。

10.3 运输

- 10.3.1 应符合 T/CSCB 0001 要求。
- 10.3.2 冻存的细胞应在干冰或 -130°C 条件下运输，非冻存细胞建议在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下运输。

11 废弃物处理

人造血干/祖细胞生产和检测过程中产生的废弃物应按照 T/CSCB 0001 中的规定处理。

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 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。

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 μL细胞/台盼蓝染液(A.2.2)滴在一侧计数室的盖玻片边缘,另取10 μL混合液,滴在另一侧计数室的盖玻片边缘,使悬液充满盖玻片和计数板之间,静置30 s。将计数板置于显微镜(A.1.1)下,对被染色的细胞和细胞总数进行计数。

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1 mm²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.4 结果分析

细胞存活率按式(A.1)进行计算:

$$S = (M - D) / M \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

- S——细胞存活率;
- M——细胞总数;
- D——染色的细胞数。

细胞存活率为2个样品的平均值。计算两次计数活细胞比率结果的平均值,记为细胞平均存活率。

A.5 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得超过算术平均值的10%。

附录 B

(规范性)

细胞标志蛋白检测 流式细胞分析法

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/T 6682 规定的一级水。

- B.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 7.4。
- B.2.2 牛血清白蛋白(BSA):纯度 $\geq 98\%$ 。
- B.2.3 抗人 CD34 抗体及同型对照抗体。
- B.2.4 使用电子天平(B.1.3)按照相应要求配制流式细胞分析法所需的液体:洗涤液、抗体稀释液。

B.3 检测步骤

B.3.1 样品准备

收集细胞,用水平离心机(B.1.2)300g,离心 5 min,弃上清。用洗涤液使用水平离心机(B.1.2)清洗细胞 2 次,每次 300g,离心 5 min,弃上清。

B.3.2 抗体孵育

用抗体稀释液重悬细胞,将细胞悬液分为两等份,分别向两份细胞悬液中加入抗人 CD34 荧光偶联抗体(标记为样品组)和同型对照抗体(标记为阴性对照组)。抗体稀释比例及孵育条件按照抗体说明书操作。抗体孵育结束后,用洗涤液使用水平离心机(B.1.2)清洗细胞 2 次,每次 300g,离心 5 min,弃上清。

B.3.3 过滤上机

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

B.3.4 圈门设定原则

首先根据前向角散射和侧向角散射圈出目标细胞分群 1,排除死细胞、血小板、红细胞及细胞碎片等,根据阴性对照组荧光强度划定阳性界限,并在分群 1 的基础上圈出阳性细胞群 2。

B.4 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)
造血集落形成能力测定

C.1 仪器和设备

- C.1.1 显微镜。
- C.1.2 血球计数板。

C.2 试剂

- C.2.1 造血集落形成培养基,其主要成分为伊思柯夫改良培养液(IMDM)培养基、甲基纤维素、牛血清白蛋白、胎牛血清、 β -巯基乙醇、L-谷氨酰胺等,并添加干细胞因子(SCF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素 3(IL-3)、促红细胞生成素(EPO)等细胞因子。造血集落形成培养基置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,使用前置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜融化并在一周内使用。
- C.2.2 IMDM 培养基:置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。
- C.2.3 乙酸亚甲蓝溶液:3%。
- C.2.4 台盼蓝染液:0.4%。

C.3 检测步骤

C.3.1 有核细胞计数

收集细胞并重悬至 IMDM 培养基中,将细胞悬液与乙酸亚甲蓝溶液以 1 : 50(体积比)混合均匀。吸取 $10\ \mu\text{L}$ 稀释后的细胞样本,根据附录 A 方法检测有核细胞的密度,并按以下公式计算出细胞悬液中的有核细胞浓度:每毫升有核细胞浓度=每个方格的平均计数 $\times 50$ (稀释系数) $\times 10^4$ 。

C.3.2 活细胞计数

吸取 $10\ \mu\text{L}$ 细胞悬液,根据附录 A 方法检测,使用血球计数板(C.1.2)和显微镜(C.1.1)计算细胞悬液中活细胞浓度。

C.3.3 细胞接种

将细胞悬液密度调整至 1×10^4 个/mL,吸取 0.5 mL 细胞悬液,将其加入 5 mL 造血集落形成培养基中,涡旋振荡使细胞与培养基充分混合,静置片刻使培养基内气泡消除。使用注射器和钝端针头吸取含细胞的培养基,将其分装至 4 个 35 mm 培养皿中,每皿 1.1 mL,旋转培养皿使培养基均匀铺于皿底。

C.3.4 集落培养

将细胞培养皿置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、湿度 $>95\%$ 的培养箱内培养 14 d~16 d。

C.4 结果分析

用显微镜和栅格计数皿计数和评判包括 BFU-E、CFU-GM 和 CFU-GEMM 在内的三种主要集落类型。

附 录 D
(规范性)
体内造血重建移植实验

D.1 仪器和设备

- D.1.1 显微镜。
- D.1.2 离心机。
- D.1.3 流式细胞分析仪。
- D.1.4 血球计数板。

D.2 试剂

- D.2.1 磷酸盐缓冲液。
- D.2.2 乙二胺四乙酸二钠溶液:1%。
- D.2.3 红细胞裂解液。
- D.2.4 检测抗体及相应的同型对照抗体。抗体保存条件参考其产品使用说明。

D.3 检测步骤**D.3.1 细胞样品准备**

收集细胞,使用离心机(D.1.2)300g,离心 5 min,弃上清。根据附录 A 方法测定,使用血球计数板(D.1.4)及显微镜(D.1.1)计算细胞悬液中活细胞浓度。用磷酸盐缓冲液将细胞悬液密度调整至 5×10^6 /mL。

D.3.2 细胞移植

将 5×10^5 个细胞通过尾静脉注射到 6 周龄~8 周龄的受亚致死剂量辐照(200 cGy~300 cGy)的 NOD-SCID Il2rg^{ml} 小鼠体内,设置空白对照组,注射与细胞悬液等体积的磷酸盐缓冲液。每组小鼠数量 ≥ 8 。

D.3.3 小鼠外周血细胞采集及抗体标记

细胞注射 16 周后,采集移植小鼠抗凝外周血,裂解红细胞后,根据附录 B 方法标记及检测方法,标记人 CD45 抗体、CD19 抗体、CD3 抗体、CD33 抗体、CD235a 抗体或相对应的同型对照抗体,孵育洗涤后使用流式细胞分析仪(D.1.3)进行流式检测,分析人源 CD45⁺ 细胞、人源 CD45⁺ CD19⁺ 细胞、人源 CD45⁺ CD3⁺ 细胞、人源 CD45⁺ CD33⁺ 细胞、人源 CD45⁻ CD235a⁺ 细胞的比例。

D.4 结果分析

利用流式分析软件对流式细胞结果进行分析,外周血中有核细胞中人源 CD45⁺ 细胞比例不低于 5%。

以移植细胞后小鼠外周血有核细胞(未标记检测抗体)为阴性对照 1,以未移植细胞小鼠外周血有核细胞(标记检测抗体)为生物学对照 2。

首先根据前向角散射和侧向角散射圈出目标细胞分群 1,排除死细胞、血小板、红细胞及细胞碎片

等,根据阴性对照 1 的荧光强度划定阳性门界限,并在分群 1 的基础上圈出阳性细胞群 2。

依照以上圈门设定原则,检测到人源 CD45⁺ CD19⁺ 细胞、人源 CD45⁺ CD3⁺ 细胞、人源 CD45⁺ CD33⁺ 细胞和人源 CD45⁻ CD235a⁺ 细胞。样品管检测阳性率减去相对应的生物学对照 2 检测阳性率即为该管检测实际阳性率。该数值大于 1%判定为阳性。

中国细胞生物学学会
团体标准
人造血干/祖细胞
T/CSCB 0004—2021

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

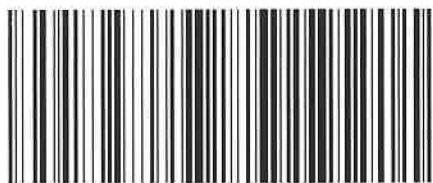
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 22 千字
2021年1月第一版 2021年1月第一次印刷

*

书号: 155066·5-2724 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



T/CSCB 0004-2021



码上扫一扫 正版服务到