

DB51

四川省地方标准

DB51/T 3216—2024

人牙来源间充质干细胞质量规范

地方标准信息服务平台

2024 - 12 - 03 发布

2024 - 12 - 29 实施

四川省市场监督管理局 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 缩略语 1

5 质量规范 2

6 检测方法 4

7 检验规则 6

8 废弃物处理 6

参考文献 7

地方标准信息服务平台

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。

本文件由四川省经济和信息化厅提出、归口、解释并组织实施。

本文件起草单位：成都世联康健生物科技有限公司、四川省干细胞技术与细胞治疗协会、四川大学华西口腔医院、电子科技大学医学院、四川省细胞库有限公司、四川省天府细胞质量检测与评价中心有限公司、中山大学光华口腔医院、首都医科大学附属北京口腔医院、西北工业大学、空军军医大学口腔医院、西南医科大学附属医院口腔医院、重庆医科大学口腔医院、四川大学生命科学学院、中国测试技术研究院、成都康景生物科技有限公司、南京医科大学附属口腔医院、昆明医科大学口腔医学院、四川省药品检验研究院、中南大学湘雅口腔医院、郑州大学第一附属医院、深圳市龙华区人民医院、浙江大学医学院附属口腔医院。

本文件主要起草人：田卫东、陈国庆、廖立、汤颖峰、张静怡、代施施、杨超、施松涛、金岩、范志明、江宏兵、肖金刚、李杰、李中瀚、郭淑娟、周李华、寇大莲、胡成虎、毛学理、陈甜、霍芳军、隋秉东、刘志、李蓓、徐永胜、胡磊、李炎、杜新雅、李昆、李锐、黄艳丽、幸倚帆、洪鹏宇、任家银、马晶、郭维华、杨波、李茂娇、谢利、于湄、张思远、何敏、陈金龙。

地方标准信息服务平台

人牙来源间充质干细胞质量规范

1 范围

本文件规定了人牙来源间充质干细胞的原辅料要求、细胞关键质量属性、细胞制备过程控制、细胞质量检验方法、检验规则和废弃物处理要求。

本文件适用于人牙来源间充质干细胞的制备、检测和质量控制。

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 40365-2021 细胞无菌检测通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人牙来源间充质干细胞 human dental-derived mesenchymal stem cells

从人不同发育阶段牙齿组织或其附属组织中分离的间充质干细胞，包括牙髓干细胞、牙周膜干细胞、牙囊干细胞、脱落乳牙干细胞、根尖牙乳头干细胞等，贴壁生长后呈成纤维细胞样形态，可自我更新，并具有成骨分化、成脂分化及成神经分化能力的干细胞。

3.2

原材料 raw and processed material

可用于分离人牙来源间充质干细胞的原材料，包括牙髓组织、牙囊组织、牙周膜组织、乳牙牙髓组织、根尖组织等。

3.3

辅助材料 accessory material

用于人牙来源间充质干细胞分离、培养、传代、冻存、运输、储存等过程中的采集器械、容器、清洗液、保存液、培养基、生长因子等。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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细胞病毒（Human T-lymphotropic Virus）

STR: 短串联重复序列 (Short Tandem Repeat)

TP: 梅毒螺旋体 (Treponema Pallidum)

SOP: 标准操作规程 (Standard Operating Procedure)

5 质量规范

5.1 原材料和辅助材料质量规范

5.1.1 原材料要求

5.1.1.1 用于人牙来源间充质干细胞分离的原材料来源应符合伦理规范和法律法规。

5.1.1.2 用于人牙来源间充质干细胞分离的原材料供者应签署书面的合法有效的知情同意书；如原材料供者属未成年人，知情同意书应由供者及其法定监护人共同签署；知情同意书应包括但不限于：人牙来源间充质干细胞在合适的条件下潜在的研究及治疗应用、研究成果潜在的商业应用、剩余材料的处置以及其他相关问题所适用的内容；应有明确的供者（如供者系未成年人，应包括其法定监护人）的个人隐私保护机制。

5.1.1.3 用于人牙来源间充质干细胞分离的原材料具有相关临床资料，包括但不限于供者一般信息、既往病史及家族史等。既往病史和家族史应对遗传性疾病相关信息进行详细采集。

5.1.2 辅助材料要求

5.1.2.1 用于人牙来源间充质干细胞分离的采集器械、容器、清洗液、保存液、培养基、生长因子等辅料应符合相关的质量要求，包括但不限于供应商进行资质审核认证、产品质量报告和批次检验报告、质量抽检报告等。

5.1.2.2 用于人牙来源间充质干细胞培养的培养基，应采用无动物源成分的培养基。

5.1.2.3 用于人牙来源间充质干细胞培养的培养基中如含有人源血液成分，应明确其来源、批号及质量检定合格报告，原则上采用国家批准的相关产品，如使用未经批准的人源血液相关制剂，则应提供相应的检验检测合格报告。

5.1.2.4 用于人牙来源间充质干细胞培养的培养基，在样本来源于无菌条件的前提下，原则上不添加抗生素。如样本来源无法严格满足无菌条件，可在原代扩增阶段使用的培养基中添加抗生素，并在质量检测中增加相应的抗生素残留检测。在成品制剂中检测抗生素残留，检测方法可选用药典收录的培养法或酶联免疫法，残留量应低于试剂盒检出限。

5.1.3 供者要求

供者应筛查HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP，并记录保存结果。

5.2 人牙来源间充质干细胞关键质量指标

5.2.1 细胞形态

人牙来源间充质干细胞在二维培养条件下，细胞贴壁生长，细胞形态以梭形或纺锤形为主，细胞形态随细胞密度可略有改变。

5.2.2 细胞表面标志蛋白

人牙来源间充质干细胞高表达CD105、CD73、CD90，阳性率 $\geq 90\%$ ；表达CD146，阳性率 $\geq 30\%$ ；低表达CD11b、CD19、CD31、CD34、CD45、HLA-DR，阳性率 $\leq 2\%$ 。

5.2.3 细胞存活率

未经冻存的细胞存活率 $\geq 90\%$ ，冻存后复苏的细胞存活率 $\geq 80\%$ 。

5.2.4 免疫调节功能

人牙来源间充质干细胞经炎症因子($\text{IFN-}\gamma$ 或者 $\text{TNF-}\alpha$) 诱导后可表达吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO); 与T淋巴细胞共培养, 能抑制T淋巴细胞增殖及 $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 分泌。

5.2.5 多向分化能力

人牙来源间充质干细胞具有成骨、成脂、成神经分化能力。

5.2.6 成瘤性

人牙来源间充质干细胞在免疫缺陷小鼠体内成瘤试验结果应为阴性。

5.2.7 染色体核型

人牙来源间充质干细胞染色体数量为46 XX或46 XY, 染色体结构无缺失、重复、断裂、倒位、异位。

5.2.8 短串联重复序列

单一供者来源的细胞各代次及批次细胞短串联重复序列 (STR) 检测结果应保持一致。

5.2.9 异常淋巴细胞增殖

人牙来源间充质干细胞与人总淋巴细胞共培养, 不会导致淋巴细胞异常增殖和细胞因子的异常释放。

5.2.10 微生物

真菌、细菌、支原体、HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP应为阴性。各类样本中的内毒素检测值应 ≤ 0.5 EU/mL。

5.3 质量控制

5.3.1 原材料采集

原材料采集应制定完整的采集操作规范。原材料相关的牙体组织、牙胚组织应由具有口腔执业医师资格并接受相关培训合格的医师, 在具有口腔医疗资质的机构采集完成; 供牙应无牙体、牙髓及牙周病变, 并制定相应原材料的纳入及排除标准。样品采集后, 应置于无菌采集容器中密闭保存, 并赋予唯一识别码。保存温度为 $2^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 。

5.3.2 原材料运输

原材料运输应制定完整的操作规范及应急预案, 运输人员应是经过培训合格的人员; 样本运输全程应有详细的记录, 内容包括但不限于运输的方式、条件、路径、时间、人员、地址及样本信息, 相关记录入档保留至少20年; 运输温度为 $2^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$, 运输时间不得超过12小时。

5.3.3 原材料接收

原材料接收应制定完整的接收操作规范, 原材料样本接收人员应是经过培训合格的人员; 应制定原材料接收信息记录表及明确的原材料样品接收标准, 遵从安全与准确的原则对样本接收制定规范及应急

预案，并填写相关记录，相关记录入档保留至少20年；原材料样本接收后应及时处理，对不能及时处理的样本，应保存在2℃～10℃条件下，最长时间不得超过12小时。

5.3.4 细胞分离与培养

5.3.4.1 细胞分离与培养应制定完整的操作规范；细胞分离与培养过程中应避免不同供体之间的交叉污染；同一供体牙体或牙胚组织分离多种细胞的，应有完整的操作规范，避免同一供体不同类型细胞之间的混淆或交叉污染。

5.3.4.2 细胞分离后扩增培养过程中应明确细胞的名称、培养代次、操作时间、培养条件等详细的操作记录，相关记录入档保留至少20年。

5.3.4.3 细胞冻存应制定完整的操作规范，冻存的细胞应标明细胞名称、培养代次、细胞量、冻存体积、操作时间等信息；冻存细胞应具有唯一识别码，且可与供体、采集、分离、扩增培养等信息相对应；细胞冻存液应采用国家已批准的临床级产品或药品辅料，冻存应使用符合要求的液氮容器气相冻存；细胞冻存库由专人负责，保证液氮充足，温度恒定，并定期巡检并记录。

5.3.4.4 细胞复苏应制定完整的操作规范，复苏的细胞应标明细胞名称、代次、批次、培养条件、操作人员、复苏时间等信息。

5.3.5 细胞运输

5.3.5.1 细胞运输应制定完整的操作规范及应急预案，运输人员应是经过培训合格的人员；根据干细胞的使用要求，选择合适的承载细胞的容器、运输方式、运输条件、运输设备和运输路线，保证细胞的稳定性和生物活性。

5.3.5.2 运输条件的控制应包括但不限于温度控制、运输时间、无污染、运输设备性能和外包装等。

5.3.5.3 细胞的运输应全程记录，包括但不限于细胞运输的方式、条件、路径、时间、人员、地址及干细胞信息等，记录入档保存至少20年。

5.3.5.4 冻存细胞应采用-150℃至-196℃的低温条件下运输，复苏的细胞或新鲜细胞制剂应在2℃～10℃条件下运输。

6 检测方法

6.1 细胞形态检测

采用倒置显微镜进行细胞形态检测。

6.2 细胞表面标志蛋白检测

采用流式细胞术检测人牙来源间充质干细胞表面标志蛋白。

6.3 细胞活率检测

采用台盼蓝拒染法或活/死细胞染色（Calcein AM, PI 法）进行细胞存活率测定。

6.4 免疫调节功能检测

6.4.1 免疫调节因子检测

人牙来源间充质干细胞经炎症因子（IFN- γ 或者TNF- α ）诱导后，通过酶联免疫吸附法检测细胞培养基中吲哚胺2,3-双加氧酶（IDO）的水平；

6.4.2 T 淋巴细胞抑制作用检测

人牙来源间充质干细胞与T淋巴细胞共培养，采用细胞计数检测对于T淋巴细胞增殖的作用，采用酶联免疫吸附法检测培养基中IFN- γ 、TNF- α 分泌水平。

6.5 多向分化能力检测

6.5.1 成骨分化

体外利用成骨分化定向诱导培养条件培养14至28天后，采用茜素红S染色法鉴定细胞成骨分化能力。

6.5.2 成脂分化

体外利用成脂分化定向诱导培养条件培养14至28天后，采用油红O染色法鉴定细胞成脂分化能力。

6.5.3 成神经分化

体外利用成神经分化定向诱导培养条件培养5至10天后，采用免疫荧光法检测细胞内神经元标志蛋白的表达，鉴定细胞成神经分化能力。

6.6 成瘤性检测

采用免疫缺陷动物（裸鼠或SCID鼠），通过局部皮下接种人牙来源间充质干细胞，评价人牙来源间充质干细胞成瘤性。体内成瘤试验严格遵照动物伦理要求执行，单只小鼠接种人牙来源间充质干细胞数量 $\geq 10^6$ 个细胞，观察期 ≥ 12 周。

6.7 染色体核型检测

染色体核型采用G带分析法进行测定。

6.8 短串联重复序列检测

采用基于PCR的STR指纹图谱检测法进行短串联重复序列检测。

6.9 淋巴细胞异常增殖检测

采用流式细胞术测定牙源性间充质干细胞对于活化的人总淋巴细胞的增殖和对不同淋巴细胞亚群增殖能力的影响；采用ELISA技术对淋巴细胞相关细胞因子（TNF- α ）分泌的影响。

6.10 微生物检测

6.10.1 细菌及真菌检测

对样本采集、运输、培养、冻存、复苏等制备环节进行留样（至少包括保存液、清洗液、培养基、培养基上清、细胞悬液、冻存液等）检测。对于具有足够样本量和观察时间的样本，参照《中华人民共和国药典》无菌检测法（通则1101）执行，对于效期短、批量小，采用现行无菌检查法（通则1101）无法保证在产品使用前完成放行检查的细胞类制品，可采用快速微生物检查法，推荐方法为呼吸信号法。

6.10.2 支原体检测

参照《中华人民共和国药典》支原体检测法执行，对样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样（至少包括保存液、清洗液、培养基、培养基上清、细胞悬液、冻存液等）检测。

6.10.3 病毒检测

采用核酸检测法，对样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等制备环节进行留样（至少包括保存液、清洗液、培养基上清、细胞悬液、冻存液等）中HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV进行检测。

6.10.4 螺旋体检测

采用核酸检测法，对样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等制备环节进行留样（至少包括保存液、清洗液、培养基上清、细胞悬液、冻存液等）对TP进行检测。

6.10.5 内毒素检测

参照中国药品检验标准操作规程中细菌内毒素检查法执行，对样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样（至少包括保存液、清洗液、培养基上清、细胞悬液、冻存液等）检测。

7 检验规则

7.1 抽样方法和数量

在一个细胞制备周期中，同一生产线、同一来源、同一工艺、同一代次制备的细胞规定为一批；在同一批次制备的细胞中，随机抽取3个最小包装单元用于相关检测检验。

7.2 出库检验

每批次细胞进行出库检验，检验项目包括5.2中规定的所有项目，并附签字盖章的检验报告。

7.3 复核检验

根据实际使用情况需要，细胞由具有相关资质的细胞质量复核检验机构/实验室进行独立复核检验。

8 废弃物处理

8.1 应在符合伦理规范的前提下，建立剩余原材料、不合格原材料以及废弃组织的处理操作规范、管理制度及废弃物处理记录表。

8.2 人牙来源间充质干细胞制备过程中产生的不合格细胞、检验检测过程中剩余的细胞，应制定符合伦理规范的处理操作规范、管理制度及处理记录表。

参 考 文 献

- [1] T/CSCB 0001 干细胞通用要求
 - [2] T/CSCB 0003 人间充质干细胞
 - [3] 中华人民共和国药典
 - [4] 细胞治疗产品生产质量管理指南（试行） 2022.10
 - [5] 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）（国卫办科教发〔2015〕46号）
 - [6] 基因治疗产品快速无菌检查法的验证技术要求（T/SHPPA 012—2022）团体标准
-

地方标准信息服务平台