

脂肪间充质干细胞分离制备规范

1、范围

本文件规定了脂肪间充质干细胞的术语和定义、基本要求、样本采集、样本运输、样本接收、分离与培养、记录、质量控制以及质量评价与放行。

本文件适用于脂肪间充质干细胞的分离制备与质量控制。

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 3095 环境空气质量标准

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求

GB 50073 洁净厂房设计规范

GB 50346 生物安全实验室建筑技术规范

GB 50591 洁净室施工及验收规范

3、术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

脂肪间充质干细胞 (ADSCs) adipose-derived stem cells

是从脂肪组织中分离得到的一种具有多向分化潜能的干细胞。

3.1.2

供者 donor

提供用于细胞产品生产用细胞的个体，可以是健康人，也可以是患者。

3.1.3

样本 specimen

在特定时间从受试者或捐献者中采集的器官、组织等标本。

3.1.4

洁净区 clean zone

需要对环境中尘埃及微生物数量进行控制的房间（区域），其建筑结构、装备及其使用应当能够减少该区域内污染物的引入、产生和滞留。

3.1.5

干细胞质量控制 stem cell quality control

为达到临床级人间充质干细胞入库质量要求所采取的操作技术和管理程序。

3.1.6

细胞活率 cell viability

能够增值、保持正常代谢活性的细胞占全部细胞的百分比。

3.1.7

台盼蓝 trypan blue

细胞活性染料，常用于检测细胞膜的完整性，检测细胞是否存活。

注：活细胞因细胞膜结构完整会排斥台盼蓝，而丧失活性或者细胞膜结构不完整的细胞则会被台盼蓝染成淡蓝色。

3.1.8

丫啶橙 acridine orang

一种荧光染料，该染料具有膜通透性，能透过细胞膜，使核 DNA 和 RNA 染色。

3.1.9

碘化丙啶 propidium iodide

一种 DNA 结合性染料，无膜通透性，不能透过活细胞膜，只能染死细胞。

3.1.10

放行检验 release testing

在干细胞已完成质量检验的基础上，对每种类型的每批次干细胞，在冻存入库及出库前所进行的相对快速和简化的检验。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HAV: 甲型肝炎病毒 (Hepatitis A Virus)

HBV: 乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus)

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 Thymic Leukemia Virus)

EBV: 人类疱疹病毒 (Epstein-barr Virus)

CMV: 巨细胞病毒 (cytomegalo virus)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)

4、基本要求

4.1 场地与设施

4.1.1 脂肪间充质干细胞制备机构选址应符合《药品生产质量管理规范》要求，空气质量标准应符合 GB 3095 标准分级二级标准。

4.1.2 脂肪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 GB 19489、GB 50073、GB 50346 和 GB 50591 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。

4.1.3 干细胞制备功能区应按脂肪间充质干细胞制备工艺进行各区域设计，符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求。干细胞制备机构应配备独立质量检测实验室，并符合 GB 19489 和 GB 50346 的规定。

4.2 设备和耗材

4.2.1 脂肪间充质干细胞的制备机构应优先选用符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，获得国家资质认证的设备、仪器、耗材和试剂。

4.2.2 脂肪间充质干细胞的制备机构应对设备、仪器、耗材和试剂供应商进行资质审核认证，要求供应商提供产品质量报告和批次检验报告，并对耗材及试剂进行质量抽检，避免采购质量不合格的产品。

4.2.3 脂肪间充质干细胞的制备机构设备和仪器正式使用前应做安装确认(IQ)、运行确认(OQ)和性能确认(PQ)，并定期进行第三方校准，不得使用有安全隐患的仪器操作样本及细胞制品。

4.2.4 脂肪间充质干细胞的制备机构应对设备与仪器进行编号建档，并建立标准操作流程(SOP)，确保使用、运行、保养、维修记录完整可追溯，对于关键工艺相关设备参数应进行实时监测，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 脂肪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授权人岗位。由法人授权任命，任职资质应符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，定期接受岗位专业培训，制备技术负责人与质量管理负责人、质量授权人不得相互兼任。

4.3.2 脂肪间充质干细胞制备和质控技术人员应具备的健康要求：HAV、HBV、HCV、HIV 及梅毒的抗体 检测应为阴性，并且(矫正)视力正常，无色盲、色弱。

4.3.3 脂肪间充质干细胞制备和质控技术人员应半年接受体检一次，有呼吸道感染或发热等疾病状态下不得进入洁净操作区，需完全康复后方可恢复岗位操作。

4.3.4 脂肪间充质干细胞制备和质控技术人员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、生命伦理、干细胞法律法规、GMP 管理、GCP 资质、制剂基本知识、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、样本采集

5.1 基本原则

5.1.1 脂肪样本采集与处理应符合 GB/T 37864 的要求。

5.1.2 采集和处理程序可供样本采集人员使用。

5.1.3 应具备相关的资质和设施环境。

5.1.4 应通过伦理审查批准并履行知情同意程序。

5.1.5 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。

5.2 供者健康

5.2.1 脂肪间充质干细胞采集制备方应对干细胞供者的基本信息与健康信息进行详细采集与记录，同时做好对供者的隐私保护，相关记录入档保留至少 30 年。

5.2.2 干细胞供者应无血液系统疾病、内分泌系统疾病、恶性肿瘤史、性传播疾病及高危人群史、吸毒史，不应具有包括但不限于以下疾病或健康状况：

- a) 一般传染性或其他遗传疾病：HIV、HBV、HCV、梅毒、HTLV、EBV 与 CMV 抗体与核酸检测应为阴性；
- b) 传染性皮肤病(未治愈的)；
- c) 大面积皮肤损伤(未治愈的)；
- d) 鼻/咽喉传染病(未治愈的)。

e) 采集前 12 个小时内用过酒精，镇静药等。

5.3 采集场所

脂肪的采集场所应达到Ⅲ级洁净手术室要求。

5.4 采集人员

采集人员应具有医师职业证，且经过相应的技术培训。

5.5 采集流程

5.5.1 信息填写

5.5.1.1 采集人员应按要求填写个人信息，个人信息表应包括但不限于：姓名、性别、有效身份证件、联系方式、紧急联络人、住址等。

5.5.1.2 采集人员在采集前填写健康调查表。

5.5.2 采集前准备

5.5.2.1 脂肪组织采集前应由医师制定抽脂方案和术前术后的防感染措施。

5.5.2.2 应确定供者身体健康，精神状态良好。

5.5.2.3 应保持供者的血压、血糖控制在较好的范围内。

5.5.2.4 采集前的三天内应停用抗凝药、激素、阿司匹林、维生素 E 等。

5.5.2.5 采集术前两天应清淡饮食，合理安排作息时间。

5.5.2.6 采集前应对客户进行身体检查，包括但不限于：病毒全套、血常规、凝血系列、心电图等。

5.5.3 耗材器械确认

采集人员应按照采集套装清单核查器材种类和数量，一次性使用物品在有效期内且包装完好。采脂肪前应对采集器材进行复核，复核内容主要包括：

——手术包：无破损、无渗漏、无污染，处于有效期内；

——消毒剂：

一般选用含碘消毒液，对碘过敏者可选用其他消毒剂；

应处于有效期内；

应标明启用日期；

——采集容器上均已粘贴供者识别码。

5.5.4 采集过程

由医师行脂肪抽吸术，抽取脂肪组织，置于无菌采集瓶中，密封保存，并粘贴条形码作为唯一标识。

5.5.5 采集后注意事项

5.5.5.1 采集后尽量平躺休息 30 分钟。

5.5.5.2 采集后一周建议温水擦浴，伤口不要碰水。

5.5.5.3 采集后三天内禁止饮酒，饮食以清淡为主。

5.5.5.4 建议使用收腹带，以利于手术区膨胀液的回收和皮肤回缩，根据局部情况随时调整腹带。

5.5.5.5 保持心情舒畅，合理饮食，作息规律。

5.5.5.6 特殊情况（如感染、血肿、疼痛等）及时复诊。

5.5 采集流程

5.5.1 信息填写

5.5.1.1 采集人员应按要求填写个人信息，个人信息表应包括但不限于：姓名、性别、有效身份证件、联系方式、紧急联络人、住址等。

5.5.1.2 采集人员在采集前填写健康调查表。

5.5.2 采集前准备

5.5.2.1

脂肪组织采集前应由医师制定抽脂方案和术前术后的防感染措施。

5.5.2.2

应确定供者身体健康，精神状态良好。

5.5.2.3

应保持供者的血压、血糖控制在较好的范围内。

5.5.2.4

采集前的三天内应停用抗凝药、激素、阿司匹林、维生素 E 等。

5.5.2.5

采集术前两天应清淡饮食，合理安排作息。

5.5.2.6

采集前应对客户进行身体检查，包括但不限于：病毒全套、血常规、凝血系列、心电

图等。

5.5.3 耗材器械确认

采集人员应按照采集套装清单核查器材种类和数量，一次性使用物品在有效期内且包装完好。采脂肪前应对采集器材进行复核，复核内容主要包括：

——手术包：无破损、无渗漏、无污染，处于有效期内；

——消毒剂：

一般选用含碘消毒液，对碘过敏者可选用其他消毒剂；

应处于有效期内；

应标明启用日期；

——采集容器上均已粘贴供者识别码。

5.5.4 采集过程

由医师行脂肪抽吸术，抽取脂肪组织，置于无菌采集瓶中，密封保存，并粘贴条形码作为唯一标识。

5.5.5 采集后注意事项

5.5.5.1

采集后尽量平躺休息 30 分钟。

5.5.5.2

采集后一周建议温水擦浴，伤口不要碰水。

5.5.5.3

采集后三天内禁止饮酒，饮食以清淡为主。

5.5.5.4

建议使用收腹带，以利于手术区膨胀液的回收和皮肤回缩，根据局部情况随时调整腹带。

5.5.5.5

保持心情舒畅，合理饮食，作息时间规律。

5.5.5.6

特殊情况（如感染、血肿、疼痛等）及时复诊。

6、样本运输

6.1 一般要求

6.1.1 样本运输人员应是经过专业培训合格的人员，对样本运输应制定规范及应急预案，并对样本运输全程做记录，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 30 年。

6.1.2 样本运输应采用平稳、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。

6.1.3 运输过程中应防渗漏、防辐射、抗震动、耐压、耐热等，样本包装应贴上条形码作为唯一标识。

6.1.4 样本运输温度应维持在 2℃~8℃，运输时间不超过 12 小时。

6.2 运输箱

运输箱应有相应的标识，标识内容应完整、清晰，标识至少包括以下内容：

- 采集机构名称及联系方式；
- 最大承重量；
- 放置方向、防摔、防晒、防雨标识；
- 最多叠放层数；
- 样本的品名、运输起始地和目的地、样本保存温度；
- 生物危害标识；
- 禁止辐射标识。

6.3 质量监控

6.3.1 样本运输过程中应有可供追溯的记录，记录应包括下列内容：

- 品名、数量、规格；
- 状态是否正常；
- 运输的始发地和目的地；
- 采集机构交接人、时间和日期；
- 运输承接人、时间和日期；
- 运输方式和运输箱编号及温度状态；
- 运输箱的外观和标识是否完整。

6.3.2 运输前应检查冷藏运输箱及控温设备的性能和运行状态是否符合要求。

6.3.3 运输设备应定期进行监控和评估：

- a) 温度：随机抽取运输箱进行腔体空载和满载条件下的测定，确认其满足性能要求；
- b) 微生物：对箱体的内壁进行取样开展微生物培养，不得检出致病性的微生物。

6.3.4 运输过程的记录应放入样本档案，保存至样本使用或销毁后 10 年以上。

7、样本接收

7.1 样本接收人员应是经过专业培训合格的人，应遵从安全与准确的原则对样本接收制定规范及应急预案，并对样本接收过程进行记录，相关记录入档保留至少 30 年。

7.2 样本接收时，接收人员应做好自我防护工作，接触样本之前应佩戴手套与口罩，并对接收场所进行消毒。

7.3 接收样本后应先观察样本容器外包装的外观，检查有无破损。

7.4 检查外观后，工作人员应检查样本采集信息记录表是否齐全，同时确认记录表上信息是否填写完整，检查信息记录表信息是否与样本信息一一对应，样本及记录表上应贴有一致对应的条形码，做到样本与供者信息相对应，确认无误后进行接收。

7.5 样本接收后，使用 75% 医用酒精消毒清理容器外表面，如不能及时对样本进行处理，需把样本保存在 2℃~8℃ 条件下，最长时间不超过 12 小时。

7.6 样本量应能够满足制备和检测的最低要求。

7.7 样本接收后应及时将信息反馈给样本发送方。

7.8 间充质干细胞制备方应制定样本拒收标准，按照样本拒收标准处理样本，并及时通知有关部门或负责人，同时做好相应记录。

8、分离与培养

8.1 基本要求

8.1.1 脂肪间充质干细胞分离与培养应符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求的车间内进行。

8.1.2 所有操作应事先制定标准规范，由经专业培训的技术人员严格遵照执行，并进行记录登记，相关记录入档保留至少 30 年。

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

8.1.4 所使用试剂应采用符合《药品生产质量管理规范》、《中华人民共和国药典》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求的药品辅料或已获批的药品，应出具产品质检合格报告，并对各批次试剂进行质量抽检。

8.1.5 应避免人源或动物源性血清及蛋白，不得使用同种异体人血清或血浆。如必须使用动物血清，应确保其无特定动物源性病毒污染。严禁使用海绵体状脑病流行区来源的牛血清。

8.2 分离前准备工作

8.2.1 环境确认：洁净室和洁净工作台或生物安全柜应使用紫外灯灭菌 30 分钟，并启动净化风机和空调系统自净 20 分钟以上。

8.2.2 工作人员核对样本与采集信息内容一致性，用 75%的乙醇对采集瓶外表面自下而上进行清洁消毒，并放置传递窗自净 15 分钟后，传入分离、处理区域。

8.2.3 物料准备：取出所需的试剂及耗材放置物料推车上，放置于洁净化工作台或生物安全柜旁边，待用。核查确认所用试剂及耗材的批号是否在有效期内。

8.2.4 培养液准备：自配培养液使用前确认微生物培养 72 小时以上，结果为阴性；商品化的细胞培养液使用前应核查确认合格证和有效期。

8.3 分离与培养方法

成人脂肪组织剪碎至糜状，以胶原酶消化法分离脂肪间充质干细胞。采用贴壁法进行人脂肪间充质干细胞原代培养。

8.4 细胞换液

8.4.1 脂肪间充质干细胞换液操作应严格遵照《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，保证无外源微生物污染，相关操作均进行记录并存档保存至少 30 年。

8.4.2 换液时间及频次应根据脂肪间充质干细胞生长情况及培养基状态进行判断，以保障脂肪间充质干组胞生长所需营养物质水平，并消除代谢物毒害作用。

8.4.3 换液操作时吸弃培养瓶中原有的部分或全部培养液，再加入新鲜培养液。首次换液需要在镜下观察到原代细胞完全贴壁和延展后方可进行。

8.4.4 培养基成分应符合脂肪间充质干细胞分离与培养基本要求，尽量采用已获国家批准的临床级产品或药品辅料。

8.5 细胞传代

8.5.1 脂肪间充质干细胞传代操作应严格遵照《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，保证无外源微生物污染，相关操作均进行记录并存档保存至少 30 年。

8.5.2 脂肪间充质干细胞一般在达到 80%~90%融合度可进行传代操作，传代操作应密度适宜、及时、迅速。

8.5.3 传代所使用消化酶应符合脂肪间充质干细胞分离与培养的基本要求，尽量采用国家已批准的临床级产品。如必须使用动物源性消化酶，应确保其无特定动物源性病毒污染。

8.6 细胞冻存

8.6.1 脂肪间充质干细胞冻存操作应严格遵照《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，保证无外源微生物污染，相关操作均进行记录并存档保存至少 30 年。

8.6.2 经制备数量达到冻存要求的脂肪间充质干细胞系可进行冻存操作，冻存细胞应加入适当的冻存保护液，遵循程序降温原则，并在液氮中进行保存。

8.6.3 冻存液成分应符合脂肪间充质干细胞分离与培养的基本要求，尽量采用国家已批准的临床级产品或药品辅料，二甲基亚砷含量不得超过 10%，如必须使用动物源性血清，应确保其无特定动物源性病毒污染，严禁使用海绵状脑病流行区来源的牛血清。

8.6.4 冻存细胞应标明干细胞名称、培养条件、代次、批次、操作人员、冻存日期等信息，并具有唯一标识。

8.6.5 液氮冻存应使用符合要求的液氮容器，气相冻存，由专人负责，保证液氮充足，温度恒定。

8.7 稳定性考察

8.7.1 细胞库应依据储存的干细胞产品的特性，制定年度的储存细胞质量稳定性考察方案和计划，并制定稳定性考察的相关质量标准。

8.7.2 稳定性考察的相关质量标准包括但不限于以下内容：

- a) 冻存容器完整性和密闭性；
- b) 细胞活率；
- c) 微生物培养；
- d) 细胞冻存复苏回收率；
- e) 细胞表面标记物表达；
- f) 细胞生物学效力。

8.7.3 脂肪干细胞在冻存后 1 周复苏存活率不应低于 80%，1 年复苏存活率不应低于 60%。

8.7.4 常规每年至少执行一次稳定性考察计划，如遇特殊情况（例如液相液氮罐故障）可临时性增加稳定性考察计划。

8.7.5 应对年度性的稳定性考察结果进行趋势分析，便于监测细胞储存的连续稳定性并改进细胞储存工艺。

9、记录

9.1 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) 供者身份号码；
- b) 产品描述码、采集类型和分类码；
- c) 产品名称和组分；
- d) 供者唯一身份标识符，如果适用；
- e) 采集日期和时间；
- f) 生产制备机构的名称和地址；
- g) 制备、保存、冻存中关键步骤的细节及结果；
- h) 关键步骤的日期和时间，如果适用；
- i) 每一步骤的操作人员姓名；
- j) 在分离、处理、冻存、储存过程中使用的关键物料的名称、生产商、批号、有效期限；
- k) 使用试剂的数量；
- l) 使用设备编码。

9.2 记录的审核：应对记录的准确性和完整性以及标准、法律法规的符合性进行审核。

9.3 记录的保存：记录应归档于受控区域进行保存，确保整个保存期间记录的清晰和完整性，并应避免意外或非授权的调阅、丢失、损坏、破坏、混淆或篡改。

9.4 记录的修改：机构应建立并保持合适的记录修改程序。记录修改人的签名及日期应记录下来；修改前的记录内容应清晰可辨认。

9.5 隐私保护：应建立保密机制，确保供者、员工信息的保密性。

9.6 记录保存期限：文件记录是要保存至细胞应用或处理后 20 年。

10 质量控制

10.1 质控内容

10.1.1 脂肪间充质干细胞安全性

10.1.1.1 无菌检测

参照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则 1101 无菌检测法执行，对脂肪间充质干细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样（保存液、清洗液、培养基上清、冻存液等）检测。细菌和真菌检测结果都应为阴性。

10.1.1.2 支原体检测

参照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则 3301 支原体检测法执行，对脂肪间充质干细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样（保存液、清洗液、培养基上清、冻存液等）检测。支原体检测结果都应为阴性。

10.1.1.3 细胞内外源致病因子检测

采用血清 ELISA 检测法或核酸检测法，对脂肪间充质干细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样（保存液、清洗液、培养基上清、冻存液、细胞等）检测。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；HCV、HBV、HIV 病毒核酸检测应为阴性。

10.1.1.4 内毒素检测

参照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则 1143 细菌内毒素检测法执行，对脂肪间充质干细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样（保存液、清洗液、培养基上清、冻存液等）检测。各类样本中的内毒素检测值应 $\leq 0.5\text{EU/mL}$ 。

10.1.1.5 异常免疫学反应检测

采用流式细胞术以及 ELISA 技术测定脂肪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，以及对淋巴细胞相关细胞因子分泌的影响。淋巴细胞亚群应无异常增殖，细胞因子表达水平应无异常增加。

10.1.1.6 致瘤性检测

采用免疫缺陷动物（裸鼠或 SCID 鼠），通过局部或静脉方式接种脂肪间充质干细胞，评价脂肪间充质干细胞致瘤性。体内致瘤试验严格遵照动物伦理要求执行，单只小鼠接种脂肪间充质干细胞数量 $\geq 10^6$ 细胞/kg，观察期 ≥ 12 周。脂肪间充质干细胞应无致瘤性。

10.1.2 脂肪间充质干细胞稳定性

10.1.2.1 细胞数量和活率检测

选用血球细胞计数板或细胞计数仪进行细胞计数，将待检测细胞使用台盼蓝或 AO/PI

荧光染料染色，读取细胞数并计算活率。各代数及批次脂肪间充质干细胞活细胞比例 $\geq 90\%$ 。

10.1.2.2 生长活性检测

通过检测细胞倍增时间、细胞周期、克隆形成率以及端粒酶活性对脂肪间充质干细胞生长活性进行测定，各代数及批次脂肪间充质干细胞应处于指数生长期，G₀期细胞数 $\leq 10\%$ ，具有端粒酶活性。

10.1.2.3 细胞纯度和均一性检测

采用脂肪间充质干细胞表面标志物流式检测以及人基因组 DNA 短片段重复序列(STR)测序进行检定。各代数及批次脂肪间充质干细胞表面标志物表达应符合流式检测比例要求，单一细胞系的脂肪间充质干细胞各代次及批次细胞 STR 检测结果应保持一致。

10.1.3 脂肪间充质干细胞生物学特征

10.1.3.1 细胞形态检测

显微镜下观察，脂肪间充质干细胞贴壁生长，呈梭形或星状外观，形态均一。

10.1.3.2 细胞表面标志物检测

采用流式细胞术进行测定，脂肪间充质干细胞表面标志物 CD73、CD90、CD105 阳性率不低于 95%；CD14、CD31、CD34、CD45、HLA-DR 阳性率不高于 5%。

10.1.3.3 分化能力检测

采用体外条件培养基诱导培养下，脂肪间充质干细胞应能够分化为成脂肪、骨、软骨细胞。成脂分化经油 O 染色法鉴定，成骨分化经茜素红染色法鉴定，成软骨分化经阿尔辛蓝染色法鉴定。

10.1.3.4 染色体核型检测

采用 G 带分析法进行测定，脂肪间充质干细胞染色体数量为 46(含 XX/XY)，无染色体缺失、异位和重排现象。

10.1.3.5 免疫调节功能检测

采用 ELISA 技术和流式细胞术测定经炎症因子(IFN- γ 与 TNF- α)诱导后脂肪间充质干细胞中吲哚胺 2, 3-双加氧酶(IDO)的表达和功能，以及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。脂肪间充质干细胞经诱导应表达 IDO，并可抑制人淋巴细胞增殖。

10.2 质控分类

10.2.1 批次质量检验

脂肪间充质干细胞制备机构应对由同一供体、同一时间、使用同一工艺采集和分离获得的干细胞进行例行批次质量检验。当制备工艺、耗材、试剂、场地或规模等条件发生时，制备机构应对多批次干细胞制剂进行质量检验，确保工艺和质量稳定合格，记录入档保存至少 30 年。质量控制检测表参见附录 A。

10.2.2 放行质量检验

每一批次脂肪间充质干细胞制剂在临床使用前应在完成例行质量检验的基础上，由干细胞临床研究机构质检平台进行快速和简化的质量检测，应包括但不限于活率、细胞表型、细菌、病毒、支原体和内毒素含量等，确认细胞合格后方可申请临床放行使用。相关记录报告应入档保存至少 30 年。

10.2.3 复核质量检验

脂肪间充质干细胞制备机构应对每一批次干细胞制剂单独留样保存，详细记录批号、代次、生产日期、来源等信息。定期由国家或地方相关部门授权的专业细胞检验机构或实验室进行脂肪间充质干细胞制剂的质量复核检验，并出具检验报告，入档保存至少 30 年。复核质量检验报告出具时间应在该批次脂肪间充质干细胞制剂提出放行申请之前，并作为放行检验参考。

11 质量评价与放行

11.1 质量评价内容

11.1.1 供者健康筛查结果应符合合格供者要求并签署了知情同意书。

11.1.2 脂肪及检测标本的采集和运输符合标准要求。

11.1.3 脂肪及检测标本的接收、标识以及暂存符合标准要求。

11.1.4 细胞分离、处理、检测区域应满足操作要求，有洁净要求的操作环境应满足相应级别环境要求，应有定期环境监控；细胞分离、处理各工序完毕后均应及时清场；现场应无污染及交叉污染，如有传染病原体或污染物，应得到有效隔离或清除。

11.1.5 细胞在分离、处理及检测等过程中所涉及的人员均已通过考核合格后上岗。

11.1.6 细胞分离、处理、检测等所使用的设备应符合设备管理要求（标识清晰正确，在合格计量校验期内定期维护保养等）；与细胞接触的器械应经消毒灭菌并在有效期内。

11.1.7 细胞制备、检测所用物料应经确认来自合格供应商，关键物料均应经抽样检测并确认其质量合格。试剂及耗材的有效期应在规定期限内，批号应按照要求记录下来以便具有可追溯性。

11.1.8 应核对供者检测报告，其内容至少包括：乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）、丙型肝炎病毒抗体（HCVAb）、梅毒螺旋体特异性抗体（Anti-TP）、人类免疫缺陷病毒

I/II 型抗体 (HIV-I/II Ab) 和丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 等, 其余检测项目全部符合质量标准要求。采集时间距制备时间在要求时限以内, 无凝血现象, 病原体检测及筛查标准按照产品质量标准执行。

11.1.9 细胞分离、处理、检测和过程监控程序应与机构批准的管理文件内容一致。记录填写应真实、完整、正确, 关键计算结果应进行确认。

11.1.10 样本在采集、运输、制备、分离、冻存、发放过程中不存在任何重大偏差; 若有偏差发生, 均应通过合适的评价, 并采取了有效的纠正措施。

11.1.11 数量及包装: 装量细胞数量与临床需求一致; 细胞包装满足运输要求, 细胞的内、外包装标签内容与公司规定内容相符, 经双人复核确认其准确性和完整性。

11.1.12 异常事件调查: 过程中若出现异常, 应进行调查处理, 按调查处理意见执行。异常处理的有关记录应归入对应批次细胞制备档案中。

11.1.13 其他需要考虑的因素。

11.2 评价结论

11.2.1 如果细胞质量评价各项都符合第 10 章的要求, 则视为合格品, 可转为长期储存。

11.2.2 如果细胞质量评价未能满足第 10 章的要求, 则应视为不合格品, 不可使用。不合格品的处理应符合医疗废弃物处理管理的相关规定, 涉及传染性病原体阳性、致病性微生物阳性的不合格品应进行灭活处理。

参 考 文 献

[1] T/CSCB 0001—2020 干细胞通用要求

[2] 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)

[3] WHO 实验室生物安全手册(第三版)

[4] 药品生产质量管理规范 (卫生部令第 79 号)

[5] 中华人民共和国药典 (2020 年版)