

国家干细胞转化资源库标准规范

K/NSCTRC0007-2023

人组织来源神经干细胞资源库建设技术规范 (试行)

Technical specifications for the construction of human tissue-derived neural stem cell
bank (trial implementation)

国家干细胞转化资源库 发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义以及缩略语	1
3.1 术语和定义	1
3.2 缩略语	2
4 一般要求	2
4.1 伦理要求	2
4.2 环境要求	2
4.3 质量要求	2
5 技术要求	3
5.1 总则	3
5.2 采集	3
5.3 制备	3
5.4 冻存	4
5.5 质量检验	4
附录 1：人组织来源神经干细胞资源库建设工艺流程图	8
附录 2：供者筛查标准	9
附录 3：组织采集记录表	10
附录 4：组织运输记录表	11
附录 5：组织接收与放行记录表	12
附录 6：人源神经干细胞 P3 代细胞检验报告书	13
附录 7：部分溶试液建议配方表	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。

本文件由上海市东方医院（同济大学附属东方医院）和国家干细胞转化资源库提出并归口。

本文件起草单位：上海市东方医院（同济大学附属东方医院）、国家干细胞转化资源库、上海干细胞临床转化研究院、中国整形美容协会干细胞研究与应用分会、中国中西医结合学会干细胞与再生医学专业委员会、上海安集协康生物技术股份有限公司、上海同金干细胞科技有限公司，湘江实验室。

本标准主要起草人：刘中民、康九红、王晓明、赵庆辉、孙希财、贾文文、汤红明、马慧、肖纯怡、黎李平、许啸、白志慧、张乃心、穆会玲、鲍贝耳，梁伟。



人组织来源神经干细胞资源库建设技术规范（试行）

1 范围

本规范规定了人组织来源的神经干细胞（以下称“神经干细胞”）资源库的建设技术要求，以确保人源神经干细胞的质量。

本规范适用于临床研究和/或临床试验的人源神经干细胞资源库的建设。

注1：适用于临床研究和/或临床试验是指符合《干细胞临床研究管理办法（试行）》（国卫科教发〔2015〕48号）规定的用于疾病预防或治疗的临床研究及《药物临床试验质量管理规范》（国家药监局 国家卫健委〔2020〕57号）规定的药物临床试验。

注2：本规范中神经干细胞是指从供者充分知情并同意，自愿捐赠的废弃胚胎组织中分离、制备获得；属于体内自然发育而来的神经干细胞，未进行任何基因编辑和/或体外诱导。

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。

《干细胞临床研究管理办法（试行）》（国卫科教发〔2015〕48号）

《药物临床试验质量管理规范》（国家药监局 国家卫健委〔2020〕57号）

《医疗废物分类目录（2021年版）》

《涉及人的生命科学和医学研究伦理审查办法》（2023年）

《细胞治疗产品生产质量管理指南（试行）》（2022年）

《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》（2023年）

《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》（2015年）

《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）》（2017年）

《中国药典》2020年版三部

3 术语和定义以及缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

人组织来源神经干细胞 human tissue-derived neural stem cell

人组织来源的能分化成神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞，并具有自我更新能力，为中枢神经系统和周围神经系统提供一定数量神经细胞的一类干细胞。

3.1.2

加液 add the culture medium

为保证悬浮培养的神经干细胞生长所必需的营养水平，在接种细胞后1天~5天内进行添加培养基的过程。

3.1.3

换液 change the culture medium

为保证悬浮培养的神经干细胞生长所必需的营养水平和降低代谢产生的毒害作用,在接种细胞后6天~14天内进行部分更换培养基的过程。

3.1.4

神经干细胞加液培养基 neural stem cell culture medium for addition

加液操作过程中使用的培养基,提供悬浮培养早期神经球生长所需要的营养。

3.1.5

神经干细胞换液培养基 neural stem cell culture medium for exchange

换液操作过程中使用的培养基,提供悬浮培养中、后期神经球生长所需要的营养。

3.1.6

神经干细胞完全培养基 neural stem cell complete culture medium

接种操作过程中使用的培养基,提供神经干细胞生长、增殖所需的营养。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

GMP: 药品生产质量管理规范 (Good Manufacturing Practice of Medical Products)

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)

EBV: 人类疱疹病毒 (Epstein-Barr Virus)

HTLV: 人类嗜T细胞病毒 (Human T-cell Lymphotropic Virus)

HCMV: 人巨细胞病毒 (Human Cytomegalovirus)

TP: 梅毒螺旋体 (Treponema Pallidum)

HHV: 人疱疹病毒 (Human herpes virus)

HPV: 人乳头瘤病毒 (Human papilloma virus)

STR: 短串联重复序列 (Short Tandem Repeat)

SOX2: 性别决定区Y框蛋白2 (Sex Determining Region Y-box2)

NESTIN: 巢蛋白

4 一般要求

4.1 伦理要求

人组织来源神经干细胞资源库应制定相应的操作标准及管理规范,建库方案应符合《涉及人的生命科学和医学研究伦理审查办法》,并通过伦理委员会审查、批准、定期跟踪审查。建库过程应接受伦理委员会的监督。

4.2 环境要求

组织分离、细胞分离、细胞传代、细胞培养和细胞冻存过程应在符合GMP要求的洁净环境中完成。

4.3 质量要求

4.3.1 细胞分离后,应对原代细胞及分离过程中的细胞清洗上清进行检验;细胞在入合格库前应完成相应的质量检验,并对种子细胞定期进行抽检。

5 技术要求

5.1 总则

应符合《细胞治疗产品生产质量管理指南（试行）》《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》等要求，严格执行供者评估标准，通过筛查供者的既往病史、家族史、传染病报告等，并建立组织采集、制备、检验、冻存和入库等标准操作规程及管理规范，确保干细胞质量安全。

注3：人源神经干细胞资源库建设工艺流程图见附录1。

5.2 采集

5.2.1 采集应当符合伦理原则，并通过已在有关管理部门备案的伦理（审查）委员会的伦理审查，制定相应的采集方法及流程，由专业的医护人员或接受过样本采集专业培训并通过考核的人员进行采集。

5.2.2 应对供者进行筛查，选用检测合格的供者来源组织。

注4：《供者筛查标准》见附录2。

5.2.3 应采集供者充分知情同意并自愿捐赠的废弃胚胎组织，用生理盐水冲洗干净后放入装有生理盐水的无菌容器中，并密封包装贴上标识，2℃~8℃条件运输和暂存。

注5：本规范中所述的废弃胚胎组织应符合《医疗废物分类目录（2021年版）》中的规定，须小于16周胎龄，属于病理性医疗废物。

5.3 制备

应制定制备工艺的标准操作规程，并定期审核和修订，详细记录并追踪审查制备过程数据。对相应的工艺流程，包括组织分离、细胞分离及计数、P0代细胞获取（培养、加液、换液、消化及计数）、传代等操作，应进行全面的工艺验证，并制定合适的工艺参数和质量标准，确保对每个过程进行有效地控制。

5.3.1 组织分离

5.3.1.1 将完整的组织置于培养皿中，用生理盐水反复冲洗至无明显血丝；

5.3.1.2 在解剖镜下，用超细眼科镊和眼科剪，剥离出中枢神经组织，用弯头手术镊钝性分离中枢神经组织，用精细手术镊去除组织周围血管膜；

5.3.1.3 将分离出的中枢神经组织按照部位分割成约1mm×1mm×1mm大小的组织块。

5.3.2 细胞分离及计数

5.3.2.1 将分割后组织块置于50mL的离心管中，并加入适量消化液轻轻摇晃，将其置于35℃的恒温器中进行消化15分钟~20分钟，每5分钟轻轻摇晃一次；

5.3.2.2 在完成消化后，离心（500g，3分钟）收集细胞沉淀，并加入DMEM/F12培养基重悬沉淀，重复上述操作2次；

5.3.2.3 吸去上清，加入神经干细胞完全培养基，轻柔吹打，重悬成单细胞悬液进行计数，活细胞数量宜不低于 2×10^6 个。

注6：细胞数量过少不满足建库要求。

5.3.2.4 对清洗上清进行取样，参照5.5.3.1进行检验。

5.3.3 P0代细胞获取

5.3.3.1 接种：按照接种浓度 $1.0\sim 1.5\times 10^5$ 个/mL，将细胞接种至超低吸附培养容器中，轻轻晃动培养容器，使细胞均匀分布于完全培养基中。

5.3.3.2 培养：将接种好的细胞放入 35°C 、5% CO_2 浓度下的二氧化碳培养箱中培养，培养时间一般为 10 天~14 天(依据神经球大小判定收获时间，一般神经球直径不超过 $400\mu\text{m}$)，细胞应悬浮呈神经球状生长。

5.3.3.3 加液：为保证神经干细胞生长所必需的营养水平，确保细胞能达到预期的增殖倍数和生长状态，应结合细胞生长状态综合考虑加液时间。

——一般加液操作宜在接种培养后 2 天~3 天和 4 天~5 天时进行，共加液 2 次；

——向培养容器中加入神经干细胞加液培养基，加液量为接种体积的 8%~12%，加液后，轻轻晃动培养容器，使细胞均匀分布于培养基中；

——将细胞置于 35°C 、5% CO_2 浓度下的二氧化碳培养箱中培养。

5.3.3.4 换液：为保证神经干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，确保细胞能达到预期的增殖倍数和生长状态，应结合细胞生长状态综合考虑换液时间。

——一般换液操作应在接种培养后 7 天~8 天和 10 天~12 天时进行，共换液 2 次；

——将培养容器静置 5 分钟~10 分钟，待神经球沉降于培养容器底部后，吸出部分上层培养基，体积为接种体积的 30%~40%；

——加入与吸出培养基等量的神经干细胞换液培养基。换液后，轻轻摇晃培养容器，使细胞均匀分布于培养基中；

——将细胞置于 35°C 、5% CO_2 浓度下的二氧化碳培养箱中培养。

5.3.3.5 细胞消化及计数

——离心 (300g , 1 分钟) 收集细胞沉淀并加入适量细胞消化液，将其置于 35°C 的恒温器中进行消化 12 分钟~15 分钟，每 3 分钟轻轻摇晃一次；

——消化结束后，离心 (500g , 3 分钟) 收集细胞沉淀加入适量 DMEM/F12 培养基重悬细胞，重复上述操作 2 次；

——清洗后细胞沉淀用适量神经干细胞完全培养基重悬，计数，收获细胞为 P0 代细胞。P0 代活细胞数量应不低于接种的细胞数量。

5.3.4 传代培养

P1至P3代传代培养工艺参照5.3.3。

5.4 冻存

培养结束后，应在冻存前准备好以下工作，以确保冻存、入库过程可控：

——数量确定：细胞冻存规格宜不低于 1×10^6 个/mL/支，根据细胞总数，计算冻存总体积与冻存支数；

——标签制作：制作冻存标签，应包含细胞类型、批号、代次等信息，并粘贴至冻存容器外壁；

——悬液制备：将待冻存细胞悬液离心 (500g , 4 分钟)，离心后吸去上清，向细胞沉淀中加入适量细胞冻存液，轻柔吹打，使细胞分散均匀。补加细胞冻存液至冻存总体积，轻柔吹打，使细胞分散均匀；

——样本分装：将制备好的神经干细胞冻存悬液，按照分装规格分装到贴有冻存标签的冻存容器中；

——程序降温：冻存过程应遵循程序降温原则，细胞宜在 -135°C 以下气相液氮罐进行保藏。

5.5 质量检验

5.5.1 总则

5.5.1.1 应符合《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）》等要求，制定人源神经干细胞质量检验标准和操作规程，并配备具备相关技术的专业人员和设备。

5.5.1.2 供体组织接收后，应对其进行检验；细胞分离后，应对原代细胞及分离过程中的细胞清洗上清进行检验；细胞在入合格库前应完成相应的质量检验；应定期对种子细胞进行抽检，确保细胞稳定性。

5.5.1.3 检验项目和方法应结合中国食品药品检定研究院及中国合格评定国家认可委员会相关标准进行选择。

5.5.1.4 质量检验标准优先采用现行《中国药典》收录方法，也可使用经过验证的自建方法。

5.5.2 准入检验

供体组织接收后应进行外观检查，同时应审核供者相关检验信息，包括但不限于人源特定病毒（HIV、HBV、HCV、TP、EBV、HCMV、HTLV等）检查和遗传病筛查以及供者健康状况调查，供体组织检验项目、检验方法及标准详见表1。

表1 供体组织检验项目、检验方法及标准

检验项目	检验方法	标准
外观	目检	组织边缘清晰、完整、无破损
【供者信息复核】		
孕期符合性	核对供者材料信息	小于16周
遗传病/家族病	核对供者材料信息	无异常
传染病	核对供者材料信息	符合要求

5.5.3 质量检验

5.5.3.1 组织分离的细胞及清洗上清

- 细胞应进行镜检，应呈单细胞状态，大小均一，形态完整；
- 细胞清洗上清应进行微生物安全性项目检验，包括无菌检查、细菌内毒素检查、支原体检查，详见表2。

表2 组织分离的细胞清洗上清检验项目、检验方法及合格标准

检验项目	检验方法	合格标准
无菌检查	薄膜过滤法	阴性
细菌内毒素检查	凝胶法	<0.5 EU/mL
支原体检查	核酸法	阴性

5.5.3.2 P3代细胞

P3代细胞在冻存前抽样，进行细胞特性分析、微生物安全性项目、遗传病检查、人源病毒检测，包括外观、细胞形态、细胞数量、细胞活率、细胞表型、染色体核型检测、遗传病检查、人源STR图谱分析、无菌检查、细菌内毒素检查、支原体检查、人源病毒检测（HAV、HBV、HCV、HIV、HCMV、EBV、HTLV、HHV、HPV、TP、人细小病毒B19、人多瘤病毒）等，详见表3。

表3 P3代细胞入库检验项目、检验方法及合格标准

检测项目		检验方法	合格标准
外观		目检	冻存容器完整，无裂痕，标签完整，信息完整、可识别
【细胞特性分析】			
细胞特性	细胞形态	显微镜观察法	呈单细胞状态，细胞大小均一，细胞形态完整
	细胞活率及数量	荧光计数法	细胞活率≥80.0%，且单位冻存容器中细胞数量为标示量±20%
细胞鉴别	细胞表型	流式细胞术	SOX2 阳性细胞比率不低于 90%； NESTIN 阳性细胞比率不低于 90%
	人源 STR 图谱分析	STR 分型检测技术	STR 图谱为单一细胞来源，无交叉污染
	染色体核型检测	G 显带法	染色体核型检测染色体数为 46 条，XX/XY；无染色体缺失、异位、倒位等结构畸变
【微生物学安全性检查】			
无菌检查		薄膜过滤法	阴性
细菌内毒素检查		凝胶法	<0.5 EU/mL
支原体检查		核酸法	阴性
【遗传病检查】			
遗传病检查		全外显子组测序	无显性遗传致病基因突变，无纯合隐性遗传致病基因突变。
【人源病毒检测】			
HAV、HBV、HCV、HIV-1/2、HCMV、EBV、HTLV-1/2、HHV-6/7/8、HPV、TP、人细小病毒 B19、人多瘤病毒等		核酸法/ELISA 法	阴性

5.5.4 放行入库

P3代细胞入库检验合格，经审核放行后由待检库移入种子细胞库。

5.5.5 稳定性检验

应定期对种子细胞进行抽样检验，检验项目包括但不限于细胞特性分析、微生物安全性等，确保其质量稳定，符合质量标准。

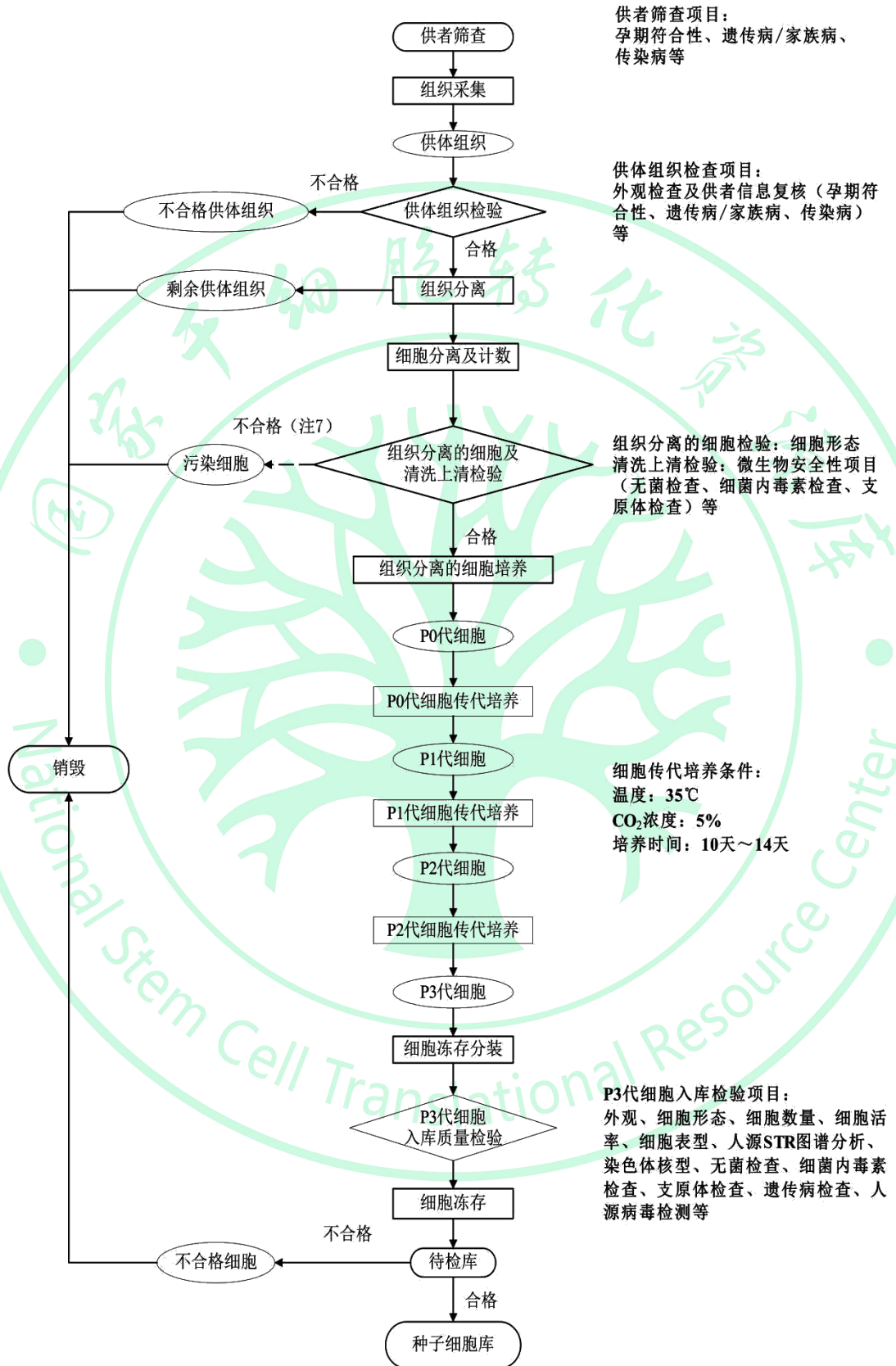
5.5.6 关键检验项目方法及依据

应根据相关法律法规以及现行检测指南等要求进行检验，神经干细胞关键检验项目如细胞活率、表型、核型以及微生物安全性以及方法学依据等详见表4。

表4 关键检测项目方法及依据

检验项目	检验方法/依据
细胞形态	显微镜观察
细胞活率及数量检验	AO/PI 染色法，参照《美国药典》（USP-NF）
细胞表型	参照《人神经干细胞》（T/CSCB 0012-2022）附录 C 细胞标志蛋白检测 流式细胞术
染色体核型检测	G 显带法，按照现行《中国药典》中的“染色体检查”检验
无菌检查	按照现行《中国药典》三部通则“1101 无菌检查法”检验
细菌内毒素检查	按照现行《中国药典》三部通则“1143 细菌内毒素检查法中的凝胶法”检验
支原体检查	核酸法
遗传病检查	全外显子组测序，检索数据库为“在线人类孟德尔遗传学(OMIM)数据库”“人类基因突变数据库 (HGMD)”
人源 STR 图谱分析	STR 分型检测技术，方法依据 ANSI/ATCC ASN-0002-2022

附录1：人组织来源神经干细胞资源库建设工艺流程图



注7：清洗上清无菌检查不合格时，应结合组织分离的细胞培养过程中无菌情况进行判断

附录2：供者筛查标准

供者筛查标准	
筛查项目	筛查标准
孕期符合性	小于 16 周
遗传病/家族病	无异常
传染病	
乙型肝炎病毒 (HBV)	乙肝表面抗原 (HBsAg) : 阴性; 乙肝表面抗体 (HBsAb) : 需检测, 不要求必须为阴性; 乙肝 e 抗原 (HBeAg) : 阴性; 乙肝 e 抗体 (HBeAb) : 阴性; 乙肝核心抗体 (HBcAb) : 需检测, 不要求必须为阴性。
丙型肝炎病毒 (HCV)	阴性
梅毒螺旋体 (TP)	阴性
人类免疫缺陷病毒 (HIV1/2)	阴性
人巨细胞病毒 (HCMV)	阴性
EB 病毒 (EBV)	阴性
人类嗜 T 细胞病毒 (HTLV)	阴性

附录 3：组织采集记录表

组织编码：

组织采集记录表	
采集机构名称	
采集机构科室	
供者资料核实	《知情同意书》： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 《供者信息表》： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 《检测报告》： <input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格
采集时间	
采集方式	
组织名称	
组织完整性	组织是否完整： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
采集操作人	
采集复核人	

附录 4：组织运输记录表

组织编码：

组织运输记录表			
组织名称			
组织数量			
供者资料核实	《知情同意书》： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无 《供者信息表》： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无 《采集记录表》： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无 《检测报告》： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
采集机构信息	采集机构名称： _____ 采集时间： _____ 交接人： _____		
承运机构信息	承运机构名称： _____ 承运人： _____ 运单号（若有）： _____		
运输日期			
起运时间		入箱温度	
送达时间		出箱温度	
接收人			

注8：运输过程中温控记录应打印作为附件提供。

附录 5：组织接收与放行记录表

组织编码：

组织接收与放行记录表			
组织接收			
组织信息	组织名称		
	组织数量		
	采集机构		
	采集日期		
	组织是否完整	<input type="checkbox"/> 是	<input type="checkbox"/> 否
	容器是否完整	<input type="checkbox"/> 是	<input type="checkbox"/> 否
	接收时温度		
供者资料核实	《知情同意书》： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无 《供者信息表》： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无 《采集记录表》： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无 《检测报告》： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无 其他：		
承运人/日期		接收人/日期	
组织检验			
组织检验	组织边缘清晰、完整、无破损： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 供者孕期符合要求： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 供者遗传病： <input type="checkbox"/> 无异常 <input type="checkbox"/> 异常 供者传染病检查： <input type="checkbox"/> 符合要求 <input type="checkbox"/> 不符合要求		
检验结果	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格		
检验人/日期		复核人/日期	
组织放行			
组织处理意见			
放行人/日期		接收人/日期	

附录 6：人源神经干细胞 P3 代细胞检验报告书

报告编号：

人源神经干细胞 P3 代细胞检验报告书					
名称		批号			
规格		数量			
制备机构					
收检日期	年	月	日	报告日期	年 月 日
检验依据					
检测项目	合格标准			检测结果	
外观（目检）	冻存管完整，无裂痕，标签完整，信息完整、可识别。				
细胞特性分析					
细胞活率及数量 （荧光计数法）	细胞活率 $\geq 80.0\%$ ，且单位冻存容器中细胞数量应为标示量 $\pm 20\%$				
细胞形态（显微镜观察）	呈单细胞状态，细胞大小均一，细胞形态完整				
细胞表型（流式细胞术）	SOX2 阳性细胞比率不低于 90%； NESTIN 阳性细胞比率不低于 90%				
染色体核型检测 （G 显带法）	染色体数为 46 条，XX/XY；无染色体缺失、异位、倒位等结构畸变				
人源 STR 图谱分析 （STR 分型检测技术）	为单一细胞来源，无交叉污染				
检查					
细菌内毒素（凝胶法）	< 0.5 EU/mL				
无菌（薄膜过滤法）	阴性				
支原体（核酸法）	阴性				
遗传病检查 （全外显子组测序）	无显性遗传致病基因突变，无纯合隐性遗传致病基因突变。				
人源病毒检测 （核酸法/ELISA 法）	HAV、HBV、HCV、HIV-1/2、HCMV、EBV、HTLV-1/2、HHV-6/7/8、HPV、TP、人细小病毒 B19、人多瘤病毒等为阴性				
结论					
报告人/日期		审核人/日期		批准人/日期	

附录 7：部分溶试液建议配方表

序号	溶液名称	配方（成分）		用途
1	组织消化液	L-半胱氨酸	86mg	组织消化
		DMEM/F12 培养基	100mL	
		木瓜蛋白酶	2000U	
		DNase 储液	300μl	
2	（细胞）消化液	Tryple (TM) Express		组织消化、细胞消化

注9：DNase储液浓度为4mg/mL。

