

## 兽用生物制品生产用细胞系试验研究指导原则

**1 目的** 制定兽用生物制品生产用细胞系的试验指导原则，确保兽用生物制品生产用细胞系的纯净性和安全性。

**2 背景** 与哺乳动物原代细胞相比，细胞系具有突出的优势。在发达国家，已有部分细胞系应用于多种兽用生物制品的生产，但我国仅在部分灭活疫苗的生产中使用细胞系，活疫苗的生产中尚未使用过细胞系。按照国际惯例，在将特定细胞系用于疫苗生产前，必须按规定进行全面鉴定，并建立种子库。

### 3 基本管理要求

**3.1 细胞系的应用原则** 如果一种病毒能够在已经建立的、以种子批制度为基础的细胞系上有效地增殖，则不应使用任何哺乳动物原代细胞。

本原则中的细胞系泛指细胞系和细胞株。狭义的细胞系一般由人或动物肿瘤组织或发生突变的正常细胞传代转化而来。细胞株是通过选择或克隆培养，从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊遗传、生化性质或特异标记的细胞群。

细胞系可单层培养、悬浮培养或用载体培养，能大规模生产。这些细胞可以有限或无限传代，但有些细胞系传到一定代次后，会对动物产生致癌性；并且对病毒的适应性降低。同时，细胞系在建系和传代过程中可能污染细菌、霉菌、支原体和病毒。所以，对生产用细胞系应进行严格检验，并限定使用代次。

兽用生物制品生产中使用的任何细胞系，均需得到农业部的批准。

**3.2 细胞系种子库的建立** 生产中所用细胞系通常应根据种子批制度进行制备。

**3.2.1 原始细胞库的建立** 一旦选用某一细胞系作为生物制品生产的细胞基质，即应建立原始细胞库，以确保在制品的持续生产期内，能充分供应质量均质的细胞。原始细胞库应由来源清楚、一定数量、成分一致的细胞组成，按一定量均匀分装于安瓿，于液氮中冻存备用。对原始细胞库应做全面检验和鉴定，以保证没有其他细胞的交叉污染和细菌、霉菌、支原体、病毒污染。

**3.2.2 基础细胞库的建立** 取原始细胞库细胞，通过适当方式进行细胞传代，增殖到一定数量细胞，将相同代次水平的所有细胞均匀混合成一批，定量分装于安瓿，于液氮中冻存备用。必须根据特定的标准对这些细胞进行全面检验和鉴定，全部合格后即为基础细胞库，用于建立工作细胞库。

**3.2.3 工作细胞库的建立** 工作细胞库的细胞由基础细胞库细胞传代扩增而来。基础

细胞库细胞经传代增殖后，将相同代次水平的所有细胞全部合并成一批均质细胞群体，再按一定细胞数量分装于安瓿中，于液氮或-100℃以下冻存备用。工作细胞库应有足够的数量，以满足生产所需。必须根据特定的标准进行检验和鉴定，合格后方可用于生产用细胞的制备。

3.2.4 生产用细胞的培养 取出冻存的工作细胞库中一个或多个安瓿，混合后传代培养，传到一定代次后供生产制品使用。生产用细胞的传代水平必须限制在最高代次范围之内。从工作细胞库取出的细胞种子增殖出来的细胞，不再回冻保存和再用于生产。

3.3 细胞库的管理 对基础细胞库和工作细胞库，都应详细记录细胞的代次、安瓿的存放位置、识别标志、冻存日期和库存量；建议将基础细胞库和工作细胞库分别存放在生产区中相距较远的两处、多个容器中，以防意外，避免细胞系丢失。非生产用细胞与生产用细胞应严格分开存放。

为了容易区分，每种基础细胞库要有一个指定的代码。

#### 4 细胞系的检验

4.1 一般要求 应详细了解并书面记录细胞系的历史（如来源、代次、培养基以及保存条件）。应阐述细胞系的保存与使用方法，包括在生产过程中如何确保所用细胞系不超过批准的最高代次等详细情况。应保存有足够量的基础细胞库细胞和工作细胞库细胞，供有关部门可能进行的抽样检验。

应对细胞传代过程中使用的牛血清、胰蛋白酶等生物源性原材料的来源和质量加以说明，并证明这些原材料的使用不影响已经鉴定合格的细胞系质量。

4.2 细胞系的检验 对基础细胞库和工作细胞库细胞均应进行全面检验。

在下列检验中，必须用基础细胞库细胞、工作细胞库细胞以及来源于工作细胞库的最高生产代次的、具有代表性的同源细胞样品进行（见表1）。一般还应用超过最高限制代次10代以上的细胞进行试验。

4.2.1 显微镜检查 用显微镜检查细胞的形态、一致性等。

4.2.2 细菌和霉菌检验 按照《中国兽药典》进行检验。

4.2.3 支原体检验 按照《中国兽药典》进行检验。

表1 各种传代水平的细胞系应该进行的检验项目

检验项目	基础细胞库细胞	工作细胞库细胞	最高限制代次细胞	高于最高代次10代的细胞
显微镜检查	+	+	+	-
细菌和霉菌检验	+	+	+	-
支原体检验	+	+	+	-
病毒检验	+	+	+	-
细胞鉴别	+	-	+	+
胞核学检查	+	-	+	+
致瘤和致癌性检验	+	-	+	+
病毒培养适应性检验	+	+	+	-

注意：带“+”号的为必检项目。

#### 4.2.4 病毒检验

4.2.4.1 致细胞病变病毒和红细胞吸附病毒的检验 检验用细胞单层的面积应不低于70cm<sup>2</sup>，其制备方法、培养基、添加物和生长条件等，应与其在生物制品生产过程中的条件相同。

将单层细胞在培养基中至少维持28日，每隔7日进行一次传代，如果细胞不能存活这么长时间，则在尽可能长的培养时间后进行传代。为了进行下列检验，最后一次传代时，应在适当容器中培养足量细胞。

在整个培养期内，定期对细胞单层进行检查，观察是否出现细胞病变（CPE）。在进行CPE检查的末期，按照下列方法进行检验。

致细胞病变病毒的检验 取2个细胞单层，每个单层至少6cm<sup>2</sup>，用适宜的细胞染色液进行染色。观察每个单层的全部区域，检查有无细胞异常如包涵体、巨细胞数目异常以及能够表明存在污染物的其他任何病变。

红细胞吸附病毒的检验 取总面积不低于70cm<sup>2</sup>的细胞单层，用适宜缓冲液洗涤数次，加入足量的适宜红细胞悬液均匀覆盖细胞单层表面。观察细胞上是否出现红细胞吸附现象。

4.2.4.2 特定病毒的检验 应针对细胞系的来源动物和疫苗使用对象动物的常见病毒对细胞系进行检验。

应在适宜支持物上制备足量细胞进行特定病原检验。每次试验中应设立适宜的阳性对照。用免疫荧光抗体或其他检验方法对细胞进行检验。

4.2.4.3 用其他细胞培养物进行的检验 取面积不低于140cm<sup>2</sup>的细胞单层，反复冻融至少3次，离心，去除细胞碎片；在下列细胞的单层覆盖率达到70%前等量接种上述冻融提取物：细胞系来源动物的原代细胞；

对疫苗使用对象动物致病性病毒敏感的细胞；

对相应瘟病毒敏感的细胞。

将接种后的细胞维持培养 4 日以上，按上述方法制备冻融提取物，再接种到上述细胞的足量新鲜培养物上，继续培养 4 日以上。培养期间定期观察所有培养物，检查 CPE。

在培养期末，对接种的细胞进行下列检验：

检验有无致细胞病变和红细胞吸附性病毒存在。

用免疫荧光法等检验有无瘟病毒和其他特定污染物。

4. 2. 5 细胞鉴别 应用适宜方法证明：基础细胞库细胞和最高代次生产用细胞来源于指定的动物种类。

用针对细胞系来源动物的血清进行荧光试验时，如果所有被检细胞都出现荧光，就没有必要用有关试剂进行其他试验检测是否有其他动物种类的细胞污染。

4. 2. 6 胞核学检查 对不同传代水平的细胞，取 50 个处于有丝分裂中期的细胞进行检查。在基础细胞库细胞中存在的染色体标志，在最高代次细胞中也应存在。与基础细胞库的细胞相比，所有细胞的染色体模式数不得高出 15%。核型必须相同。如果模式数超过所述标准，最高代次细胞中发现染色体标志或发现核型不同，则该细胞系不得用于生产生物制品。

4. 2. 7 致瘤性检验 某些细胞系在一定代次范围内具有致瘤性和致癌性。如果将这些细胞系用于疫苗生产，应就细胞系对靶动物的潜在致瘤性和致癌性进行检验。

下列方法任择其一。

4. 2. 7. 1 用无胸腺小鼠至少 10 只，各皮下或肌肉注射  $10^7$  个待检细胞，同时用 HeLa 细胞或 Hep-2 细胞或其他适宜细胞系皮下或肌肉注射无胸腺小鼠，每只  $10^6$  个细胞，用适宜细胞作为阴性对照。

4. 2. 7. 2 取 3~5 日龄乳鼠或体重 8~10g 小鼠 6 只，用抗胸腺血清处理后，每只皮下接种  $10^7$  个待检细胞，并按 4. 2. 7. 1 设立对照。

逐日观察 14 日，检查有无结节或肿瘤形成。如有结节或可疑病灶，应在观察至少 1~2 周后剖检，进行病理组织学检查。对未发现结节的动物，对其中的一半动物观察 21 日后剖检，对另外一半动物观察 12 周后剖检，观察各个淋巴结和器官中是否形成结节，如有怀疑，应进行病理组织学检查。不应有移植瘤形成。

阳性对照组观察 21 日后，应出现明显的肿瘤。阴性对照组观察 21 日，应为阴性。

4. 2. 8 病毒培养适应性检验 病毒能否在细胞系中高水平地稳定繁殖，且保持其免疫原性和毒力，是生产生物制品的关键。因此，应用基础细胞库细胞、工作细胞库细胞和最高限定代次细胞对病毒培养的适应性进行检验。检验项目包括病毒含量测定、免疫原性鉴定、毒力测定等；对一些特殊制品（如猪囊尾蚴细胞疫苗），应视情况确定检验项目。