

无偿献血者免疫细胞资源库专家共识

中国研究型医院学会临床数据与样本资源库专业委员会 白求恩公益基金会输血医学分会

中国输血协会细胞治疗专业委员会

关键词:免疫细胞资源库;无偿献血者;专家共识

中图分类号:R457.1⁺2 **文献标识码:**C **文章编号:**1004-549X(2019)6-0517-04

近年来,随着细胞学、免疫学、分子生物学等技术的快速发展,免疫细胞治疗作为 1 种安全有效的治疗手段应用于临床,在肿瘤综合治疗中的作用尤为突出,成为继手术、化疗和放疗之后的第 4 大治疗肿瘤较为有效方法。目前,用于治疗的免疫细胞主要来自于患者自体,这使得免疫细胞的质量和数量成为免疫细胞治疗产业化的瓶颈。

无偿献血者是 1 个健康志愿者群体,据报道 2017 年我国无偿献血人数达 1 459 万人(次),献血量达(200—400) mL/人(次)。按照当前安全输血相关技术要求,在红细胞、血小板、血浆等成分血的制备过程中,大量的免疫细胞通过“去白细胞”的方式被清除,并作为医疗废弃物处置,因而“浪费”了大量健康供者来源的免疫细胞资源。

中国研究型医院学会临床数据与样本资源库专业委员会、白求恩公益基金会输血医学分会和中国输血协会细胞治疗专业委员会联合全国部分血站专家,医院输血科专家,以及组织细胞存储、输血、生物治疗、伦理、生物样本库等学科的专家,经过反复调研、论证和讨论后,对当前无偿献血者的免疫细胞采集、运输、制备、存储、应用等过程中相关的技术流程、规范、标准及相关伦理、法规等问题达成初步共识(以下简称本共识),旨在推动以公益捐赠为导向的“无偿献血者免疫细胞资源库”的建立,为免疫细胞的技术研究、产品开发、临床应用提供良好的物质基础和技术支持,积极推进免疫治疗细胞制剂的标准化、规范化进程,促进无偿献血者免疫细胞在临床医学上的转化应用,服务全民健康,助力健康中国。

1 目标与范围

本共识以新鲜全血制备成分血过程中去除的“白膜层”为样本来源,以分离、冻存、复苏外周血单个核细胞(PBMC)为主要技术手段,目标是在全国建立公益性无偿献血者来源的免疫细胞资源库,推进其在我国细胞治疗技术研究和临床医学上的转化应用。本共识适用于具有血液采集、制备和样

本存储资质的医疗机构、采供血机构和医学研究机构。

2 规范性引用文件

本共识将下列文件作为引用的必需文件(表 1)。凡是注明时间的引用文件,仅有注时间的版本适用于本文件;凡是未注时间的引用文件,其最新版本(包括所有修改单)适用于本文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本共识。

3.1 血液(blood) 指用于临床的全血、成分血和用于血液制品生产的原料血浆。

3.2 成分血(blood components) 在一定的条件下,采用特定的方法将全血中 1 种或多种血液成分分离出而制成的血液组分及单采血液成分的统称。

3.3 成分血制备(component blood preparation) 指在一定条件下用物理方法分离出全血内的 1 种或几种血液成分。

3.4 白膜层(buffer coat) 指全血离心形成的介于红细胞和血浆层之间的乳白色细胞层,该层富含血小板和白细胞。

3.5 去白细胞(leukocyte removal) 指全血或血液成分通过白细胞滤器移去白细胞的工艺过程。

3.6 免疫细胞(immune cells) 指参与免疫应答或与免疫应答相关的所有类型细胞,主要包括但不限于:T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核-巨噬细胞、树突状细胞、粒细胞等。

3.7 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 指人外周血中具有单个核的细胞群体,包括淋巴细胞和单核细胞。淋巴细胞含 T 淋巴细胞和 B 淋巴细,分别承担人体免疫系统中的细胞免疫和体液免疫,可用于进一步的生物治疗;单核细胞经细胞因子诱导可分化为树突状细胞和巨噬细胞,是人体内最重要的抗原提呈细胞。

3.8 细胞制备(cell preparation) 指细胞样本经过一系列规范操作达到入库标准的过程。

3.9 细胞分离(cell isolation) 指血液中分离出特定细胞成分的过程。

3.10 细胞质量控制(cell quality control) 指为使细胞样本达到入库标准所采取的操作技术和管理活动。

3.11 细胞冻存液(cell freezing medium) 指由特殊配方制备而成,用于细胞冻存的无菌液体。

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2019.06.001

△ 共同通信作者:田亚平(1961.05-),男,医学博士,主任医师,教授,博士研究生导师,主要从事生物化学/转化医学相关研究,电话:010-66939374,Email:tianpy61@gmail.com;汪德清(1962.12-),男,医学博士,主任医师,教授,主要从事临床输血风险控制研究,电话:010-66936508,Email:deqingw@vip.sina.com;马峰(1961.11-),男,医学博士,研究员,教授,主要从事干细胞生物学/细胞治疗/免疫学/血液学研究,电话:028-61648510,Email:mafeng@hotmail.co.jp

表 1 《无偿献血者免疫细胞资源库专家共识》规范性引用文献

<p>《中华人民共和国献血法》</p> <p>《血站技术操作规程(2019版)》</p> <p>《医疗机构临床用血管理办法》</p> <p>《血站设置规划指导原则》</p> <p>《血站管理办法》(2018年修订)</p> <p>GB 18467—2011《献血者健康检查要求》</p> <p>GB 18469—2012《全血及成分血质量要求》</p> <p>《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》</p> <p>《人体生物医学研究国际伦理指南》</p> <p>WHO:《生物医学研究审查伦理委员会操作指南》</p> <p>《赫尔辛基宣言:涉及人类受试者的医学研究伦理原则》</p> <p>《ISBER 生物样本库最佳实践 2018》</p> <p>《生物标本采集技术规范及数据库建立指南》</p> <p>《中国医药生物技术协会生物样本库标准(试行)》</p> <p>《药品生产质量管理规范》</p> <p>WS 399—2012《血液储存要求》</p> <p>SZDB/Z 188—2016《细胞制备中心建设与管理规范》</p> <p>SZDB/Z 266—2017《综合细胞库设置和管理规范》</p> <p>GB50073—2013《洁净厂房设计规范》</p> <p>SZDB/Z 185—2016《人类血液来源免疫细胞库建设与管理规范》</p> <p>GB /T1.1—2009《标准化工作导则第 1 部分:标准的结构和编写》</p> <p>GB /T 20000《标准化工作指南》</p> <p>GB/T 20001《标准编写规则》</p> <p>GB /T12905—2000《条码术语》</p> <p>GB /T17172—1997《四一七条码》</p> <p>GB /T18347—2001《128 条码》</p> <p>GB/T 27025—2008《检测和校准实验室能力的通用要求》</p> <p>GB/T 20269—2006《信息安全技术信息系统安全管理要求》</p> <p>GB/T 20988—2007《信息安全技术信息系统灾难恢复规范》</p>	<p>GB/T 22239—2008《信息安全技术信息系统安全等级保护基本要求》</p> <p>GB19781—2005《医学实验室安全要求》</p> <p>GB 19489—2008《实验室生物安全通用要求》</p> <p>CNAS—CL05—2009《实验室生物安全认可准则》</p> <p>WHO Third Edition《实验室生物安全手册》</p> <p>GB 2894—2008《安全标志及其使用导则》</p> <p>GB 50034—2013《建筑照明设计标准》</p> <p>GB 50052—2009《供配电系统设计规范》</p> <p>GB 50140—2005《建筑灭火器配置设计规范》</p> <p>GB 50243—2016《通风与空调工程施工质量验收规范》</p> <p>GB 50351—2014《储罐区防火堤设计规范》</p> <p>GB/T 5458—2012《液氮生物容器》</p> <p>WS/T 224—2018《真空采血管的性能验证》</p> <p>GB/T 18442—2011《固定式真空绝热深冷压力容器》</p> <p>WS/T 400—2012《血液运输要求》</p> <p>MH/T 1019—2005《民用航空危险品运输文件》</p> <p>《民用航空危险品运输管理规定》</p> <p>《危险化学品安全管理条例》</p> <p>《固体废物污染环境防治法》</p> <p>《医疗废物分类目录》</p> <p>《医疗废物管理条例》</p> <p>《医疗卫生机构医疗废物管理办法》</p> <p>《医疗废物集中处置技术规范(试行)》</p> <p>DB12/597—2015《医疗卫生机构医疗废物处理规范》</p> <p>HJ421—2008《医疗废物专用包装袋、容器和警示标志标准》</p> <p>SZDB/Z 188—2016《细胞制备中心建设与管理规范》</p> <p>《免疫细胞制剂制备质量管理自律规范》</p> <p>GB50174—2017《数据中心设计规范》</p>
---	--

3.12 细胞复苏 (cell recovery) 指能使冻存的细胞恢复生长并保持原有特性的方法。

3.13 实验室生物安全 (laboratory biosafety) 指实验室的生物安全条件和状态不低于允许水平,并符合相关法规和标准对实验室生物安全责任的要求,避免实验室人员、来访人员、社区及环境受到不可接受的损害。

3.14 知情同意 (informed consent) 指具有完全民事行为能力的自然人,在充分获取信息并准确理解其内容后,形成全面和准确的认识,自愿做出是否同意的决定,并签署知情同意书。此决定不受恐吓、利诱或其他不当行为的影响。

3.15 伦理审查委员会 (institutional review board) 指专门负责对科学研究中涉及的伦理道德问题进行评估和审查的组织。

3.16 质量管理体系 (quality management system) 为实现质量管理的方针目标、有效开展各项质量管理活动,需建立相应的管理体系,这一体系即为质量管理体系。相关文件包括:质量手册、程序文件、标准操作规程和记录等。

3.17 无偿献血者免疫细胞资源库 (immune cell resource bank of volunteer blood donors) 通过收集自愿无偿献血者所捐献血液中的免疫细胞,建立免疫细胞实物库和相应的信息库,为科学研究、临床试验、自体或异体临床治疗提供各类免疫细胞。

4 无偿献血者免疫细胞资源库的设立

4.1 设立原则 本项目在获得中华人民共和国科技部中国

人类遗传资源管理办公室的行政许可,并符合相关法律法规和伦理规范的前提下,本着知情同意、技术安全规范、全程可追溯、体系可监控的原则设立。在制定免疫细胞采集、分离和存储的标准操作及管理程序的前提下,并在符合《药品生产质量管理规范》(GMP)要求的基础上严格执行。

4.2 伦理审查 无偿献血者的免疫细胞的法律属性是物,其所有权归原来的身体权人所享有,不归属于医疗机构或采供血机构等。按照国内外普遍的伦理规范,成分血制备后的白膜层的物权归无偿献血者。无偿献血者免疫细胞的采集、制备及应用,需符合国际公认的生命伦理准则和我国相关伦理规定,样本采集方案、样本使用及研究方案、知情同意书等材料,必须经过伦理委员会审核同意。此外,研究方案等任何文件如有更改,均须再次经过伦理委员会批准,同时按照我国相关法规和伦理委员会的要求及时递交其他跟踪审查文件。

4.3 招募与知情同意 无偿献血者免疫细胞资源的收集与存储需获得献血者的知情同意。确保无偿献血者对免疫细胞收集与存储的信息充分知情、理解相关风险、全面和准确地认识相关告知内容,如自愿参加需签署《知情同意书》一式 3 份,分别由无偿献血者、采供血机构和资源库三方保存;如未获得献血者的知情同意,不得收集与存储其血液中的免疫细胞。

5 无偿献血者白膜层的采集、运输、接收

5.1 无偿献血者筛查与白膜层采集 对同意捐赠免疫细胞

的无偿献血者,血站工作人员按照《血站技术操作规程(2015版)》和《献血者健康检查要求》(GB18467—2011)对献血者做健康检查和血液检测,并在对检查(测)结果进行综合分析和判断后,得出是否适合收集其免疫细胞的结论。将同意捐赠者的血液分离出白膜层,放入待检库中,4℃保存,同时需单独留取标本待需要时做HLA分型。在完成对HBsAg、抗-HCV、抗-HLV、抗-TP的2遍酶联免疫吸附试验(ELISA)初筛,以及HBV、HCV、HIV的核酸检测(NAT)后,合格的样本入库,不合格的则做报废处理。从全血采集到白膜层接收时间≤8h;白膜层分离可以在成分血制备的环境下操作。

5.2 白膜层的运输和接收 参照《血站技术操作规程(2015版)》相关规定,在规定的时间内由专人将白膜层冷链运输到免疫细胞资源库实验室。接收人员观察容器包装的外观,检查并记录有无破损,检查信息记录表上的信息是否与样本信息对应,确认无误后接收。

6 无偿献血者 PBMC 的分离、提纯、制备和储存

6.1 白膜层的接收与检测结果的核对 无偿献血者免疫细胞资源库接收白膜层后,在信息核对无误后,再做PBMC的分离。

6.2 PBMC的分离和纯化 所接收的白膜层须在达到GMP标准的实验室按照标准操作规程分离、纯化PBMC(B级背景下A级操作环境操作,PBMC的制备步骤见附录1)。先分离出PBMC,对NAT检测任一指标不合格的样本做报废处理。

6.3 PBMC质量检验、标识与入库 对入库的PBMC应做全面的细胞质量检验。应建立PBMC入库标准,包括但不限于:细胞数量与细胞活率检测,细胞鉴定(需氧菌、厌氧菌及真菌检测等),支原体检测,病毒(HAV、HBV、HCV、HIV、CMV、EBV等)检测,内毒素检测,细胞纯度检测以及免疫细胞特性检测(含特定细胞表面标志物群和表达产物等)^[1-5]。

6.4 PBMC编码与标识 每1份PBMC必须有唯一的ID,ID的编码规则遵循唯一性和统一性原则,且与无偿献血者、血袋和血液样本的编号有关联性,实现双向追溯。

6.5 PBMC储存 将符合入库标准的PBMC从细胞暂存库(-80℃)转移至细胞储存库(-196—-135℃)的液氮罐中长期储存,并有可靠的监控系统确保冷链系统运行正常。

6.6 PBMC报废或失效 规定各种原因导致的PBMC报废的原则和处理办法(包括实物和信息)。对在PBMC质量检测中出现的下列任何≥1项结果——分离细胞数量 $<10^7$,细胞活力 $<95\%$,细菌检测阳性,支原体检测阳性,病毒检测阳性,内毒素检测 ≥ 2 eu/mL等——的PBMC须做报废处理。

7 无偿献血者免疫细胞资源信息管理与数据共享平台建设

7.1 无偿献血者免疫细胞资源库应建立统一、完整的信息管理与数据共享平台,用于细胞样本信息的记录、储存、查询等。

7.2 细胞样本信息管理与数据共享平台宜与其他相关数据系统兼容或关联,以便共享样本信息和数据。

7.3 细胞样本信息管理与数据共享平台应根据不同工作人员的职责设置不同管理和访问权限,以确保信息安全。

7.4 细胞样本信息管理与数据共享平台应满足样本追踪和检索的需求。

7.5 细胞样本信息管理与数据共享平台应建立安全保障,防止黑客入侵、计算机病毒传播、数据损坏等意外情况。

7.6 细胞样本信息管理与数据共享平台应根据实际需求制订备份周期,按周期对样本信息和数据备份,以应对信息和数据的意外损坏,并及时做异地备份和历史备份。

7.7 细胞样本信息管理与数据共享平台应通过相应技术手段,将采集到的各类数据,进行识别化处理,去除姓名、电话、住址等涉及个人隐私的信息后,再经过加密算法存储到数据库中。

7.8 细胞样本信息管理与数据共享平台中所有涉及人类遗传资源及信息数据的使用,必须严格按照《中国人类遗传资源管理条例》执行。

附录1 PBMC制备步骤

1 准备 将400 mL全血血袋中的白膜转移到灭菌消毒的离心管中,使用经灭菌消毒的剪刀剪断塑料管,小心将袋中的外周血移至离心管中,并将外周血袋热合封口。

2 1次离心 室温下(18—25℃),800 g离心10 min。

3 血浆分离 离心完毕后分层,吸取上层血浆层到离心管中,贴上血浆编码的标记,暂于4℃保存。

4 下层血细胞稀释 用生理盐水按1:1的比例稀释血细胞,混匀。

5 铺层加样 将稀释的血液样本缓慢匀速地加入到盛有室温的淋巴细胞分离液上方,两者比例约为1:1,铺层的整个过程都应注意不能打破淋巴分离液与血液样本的分界面。

6 2次离心 室温下,800 g离心20 min。

7 单个核细胞提取 离心完毕后,离心管内出现明显分层,由下到上分别为红细胞层、淋巴细胞分离液层、单个核细胞层、血浆生理盐土层;小心吸取单个核细胞层转移至无菌50 mL离心管中,补充生理盐水,细胞悬液与生理盐水比例大约1:3,混匀。

8 3次离心 室温下,800 g离心10 min。

9 细胞混悬液制备 离心完毕后弃上清,留细胞沉淀制成单细胞悬液,混匀。

10 细胞计数 取上述细胞悬液20 μL计算细胞数。

11 4次离心 对步骤9得到的细胞悬液在室温下,800 g离心10 min,留取细胞沉淀。

12 检测 细胞数量与细胞活率检测,细菌(需氧菌、厌氧菌及真菌检测等)检测,支原体检测,病毒(HAV、HBV、HCV、HIV、CMV、EBV等)检测,内毒素检测,细胞纯度检测,免疫细胞特性(含特定细胞表面标志物群、表达产物和细胞功能鉴定等)检测。

附录2 PBMC冻存步骤

1 PBMC悬液制备 见附录1。

2 冻存PBMC悬液制备 离心后获得细胞沉淀,弃掉上清;加入适量的低温冻存液,使最终的细胞冻存密度在 $8 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ /mL。

3 分装 将冻存终细胞悬液分装到冻存管或冻存袋中, 1 mL/管(袋)。

4 标签贴管(袋) 将分装后的冻存管(袋)贴上细胞编码标签,并再次检查冻存管/袋封存是否完好。

5 程序化冷冻 将封好的冻存管(袋)放入程序降温盒做梯度降温后,转移到-80℃冰箱中存放≥24 h。梯度降温操作最好利用程序降温仪。

6 细胞入库 <24 h,将 PBMC 转移到气相液氮罐中或者细胞库中,按照细胞上的编码依次排列入库并填写入库记录:将冻存细胞批号、编码、冻存日期、冻存数量及细胞入库的位置等信息填入冻存位置示意图中。

附录 3 PBMC 和免疫细胞冻存后的复苏和活力恢复数据

PBMC 和各种免疫细胞在冻存/复苏后仍可保持较高的活性^[6-7]。采用常规冻存/复苏方法,PBMC 在冻存后 1 周复苏存活率可保持在 80%—90%,1 年复苏存活率可保持在 60%—70%。通过优化冻存条件(如在冻存液中添加 Dextran-40)可提高复苏 PBMC 的活性。此外,冻存/复苏对免疫细胞活力的影响有限,有研究认为静息/记忆 B 细胞和 B 细胞亚群在冻存/复苏后保持分泌抗体的能力;但也有研究显示冻存/复苏 NK 细胞 CD16 表达约丧失 35%,细胞毒性丧失 50%,通过优化冻存/复苏条件可有效提高其活力。

本共识制定专家委员会名单(以姓氏笔划为序):于洋(解放军总医院)、马峰(中国科学院输血医学研究所)、王山(解放军总医院)、王从容(上海市第六人民医院)、王建信(上海原能细胞医学科技有限公司)、王秋实(沈阳盛京医院)、王雪琦(上海长征医院)、王淑芳(解放军总医院)、文爱清(陆军军医大学大坪医院)、尹文(空军军医大学西京医院)、田亚平(解放军总医院)、田芬芬(解放军总医院)、兰炯采(南方医科大学南方医院)、庄远(解放军总医院)、邢颜超(新疆军区总医院)、朱发明(浙江省血液中心)、刘志伟(浙江大学附属邵逸夫医院)、刘劫(上海市同济医院)、江婧婧(解放军总医院)、李志强(上海市第六人民医院)、李忠俊(陆军军医大学新桥医院)、李剑平(辽宁省血液中心)、李萌(成都市血液中心)、李晶(解放军总医院)、杨焕凤(上海原能细胞医学科技有限公司)、吴伟忠(复旦大学附属中山医院)、何晓文(上海原能细胞医学科技有限公司)、汪德清(解放军总医院)、沈鸣(解放军总医院)、周伟标(上海市浦东新区血站)、周红梅(上海市东方医院)、赵庆辉(上海市东方医院)、赵秀梅

(解放军总医院)、郝一文(中国医科大学第一附属医院)、郝建秀(解放军总医院)、胡伟(浙江省血液中心)、贾文文(上海市东方医院)、夏荣(复旦大学附属华山医院)、徐蕾(上海市胸科医院)、栾建凤(解放军东部战区总医院)、高飞(上海原能细胞医学科技有限公司)、唐晓峰(上海长征医院)、黄远帅(西南医科大学附属医院)、曹毓林(北京臻溪谷医学研究中心)、傅雪梅(成都市血液中心)、雷颖(上海市东方医院)、臧爱萍(上海原能细胞医学科技有限公司)、潘纪春(解放军总医院)、魏亚明(广州市第一人民医院)

执笔人:田亚平[△] 汪德清[△] 赵秀梅 周红梅

审校者:马峰[△] 尹文 田亚平 李志强 李剑平 李萌 汪德清 沈鸣 李晶 王淑芳 郝一文 郝建秀 胡伟 曹毓林

参考文献

- [1] Sacchi A, Tumino N, Grassi G, et al. A new procedure to analyze polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells in cryopreserved samples cells by flow cytometry. PLoS ONE, 2018, 13: e0202920.
- [2] Fecher P, Caspell R, Naem V, et al. B cells and B cell blasts withstand cryopreservation while retaining their functionality for producing antibody. Cells, 2018, 7: (6). pii: E50. doi: 10.3390/cells7060050.
- [3] Sanchez-Martinez Di, Allende-Vega N, Orecchioni S, et al. Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors. Theranostics, 2018, 8 (14): 3856-3869.
- [4] Schiller A, Zhang T, Li R, et al. A positive control for detection of functional CD4 T cells in PBMC: the CPI pool. Cells, 2017, 6: (4). pii: E47. doi: 10.3390/cells6040047.
- [5] Bo LHe, Petersen MS, Olesen R, et al. Optimizing recovery of frozen human peripheral blood mononuclear cells for flow cytometry. Plos One, 2017, 12(11): e0187440.
- [6] 王桂喜,董磊,李春红.不同冻存保护剂对外周血单个核细胞的影响.中国输血杂志,2010,23(05):384-386.
- [7] 吴瑜,张春涛,赵晨燕,等.淋巴细胞免疫表型质控品的初步研究.临床输血与检验,2008(3):201-206.

(2019-04-24 收稿,06-14 修回)

本文编辑:蔡辉

欢迎赐稿 欢迎订阅