



中华人民共和国国家标准

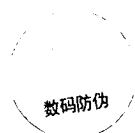
GB/T 22273—2008

良好实验室规范建议性文件 良好实验室 规范原则在体外研究中的应用

Advisory document for Good Laboratory Practice (GLP): The application of the principles of GLP to in vitro studies

2008-08-04 发布

2009-04-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)良好实验室规范(GLP)原则和符合性监督系列文件 No. 14:《体外研究中使用的 GLP 原则》[OECD ENV/JM/MONO(2004)26,英文版]。

本标准做了下列编辑性修改:

——删除了 OECD 的背景介绍和引言。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、中国石油和化学工业协会。

本标准起草人:陈会明、于文莲、王晓兵、梅建、孙鑫。

良好实验室规范建议性文件 良好实验室 规范原则在体外研究中的应用

1 序言

体外试验研究系统长久以来被用于获得与人类健康和环境有关的化学品安全数据。许多国家的法律要求,关于人类健康和环境方面的研究应按照良好实验室规范(GLP)的要求开展。体外方法传统上主要用于遗传毒性试验,主要参照来自体外试验研究获得的数据进行风险评估。鉴于现在强调减少在安全性试验中使用动物,体外方法的作用日益突出,已经成为体内安全试验的替代或补充。此外,随着毒理基因组学、毒理蛋白质组学、毒理代谢组学和其他如芯片等高通量筛选技术的发展,体外安全试验的重要性日益增加。

GLP 原则对安全研究的计划、管理、记录、报告和存档的要求,与其他类型的研究没有差异。因此, GLP 原则描述了所有非临床健康和环境安全研究、包括体外研究的要求,并提供了实施这些研究的指导原则。为了促进 GLP 原则在体外试验中的应用,有必要进行进一步的说明和指导。

2 目的

本标准目的是促进 GLP 原则在体外研究组织和管理上的正确应用和解释;同时就 GLP 原则在体外研究中的正确使用,为试验机构(包括管理、质量保证、项目负责人和研究人员)及国家 GLP 符合性监督部门提供指导。

本标准旨在对 GLP 原则在法规要求注册登记为目的的体外研究中的使用和指南提供指导。本标准按照 GLP 原则不同部分的次序组织,以便于参考和使用。

3 范围

本标准是 GLP 原则在非临床安全试验体外研究中的应用。这些非临床安全试验样品包含:医药、农药、化妆品、兽药以及食品添加剂、饲料添加剂和工业化学品。试验样品通常是合成化学品,不过也有天然或生物来源的物质,有时也可能是活体生物。实施这些试验的目的在于获得试验物质的特性和(或)人类健康和环境的安全数据。

除非法律豁免, GLP 原则适用于法规所要求的所有非临床健康和环境安全研究,包括:医药、农药、食品添加剂与饲料添加剂、化妆品、兽药和类似产品的注册或申请许可证,以及工业化学品管理。

4 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 22275.3—2008 良好实验室规范实施要求 第3部分:实验室供应商对良好实验室规范原则的符合情况

GB/T 22275.5—2008 良好实验室规范实施要求 第5部分:良好实验室规范原则在短期研究中的应用

GB/T 22278—2008 良好实验室规范原则

5 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

5.1

体外研究 **in vitro studies**

使用微生物或从完整生物体分离出的组分或模拟物,而不是以完整多细胞生物体作为试验系统的研究。

在 GLP 原则下,许多体外研究被界定为短期研究。对于这些体外研究,要参考并适当地使用 GB/T 22275.5—2008,以便运用相关规定促进项目负责人的工作和质量保证工作。

5.2

参照物 **reference item**

在很多情况下,体外研究的操作指南要求使用适当的阳性、阴性和(或)介质对照物。按照 GB/T 22278—2008 中对参照物的定义,这些对照物并不用于评判试验样品在试验系统中的反应,而是用来控制试验系统的正常运行。由于阳性、阴性和(或)介质对照物的目的可能与使用参照物的目的类似,那么参照物也应包括“阳性、阴性和(或)介质参照物”。但在某种程度上,阳性、阴性和(或)介质参照物的可分析特征化程度应不同于对参照物的要求。

5.3

无菌条件 **aseptic conditions**

受潜在的细菌和(或)病菌污染程度最小的工作环境条件。

5.4

细胞系 **cell lines**

经过遗传改变成永生化的细胞。理论上,可长期体外增殖,并且经过增殖后作为细胞库冷冻储存。与原代细胞为不同种群的细胞系相比,永生化的细胞系通常更均匀、更稳定、增殖能力更强。

5.5

阴性对照 **control, negative**

试验系统中独立的部分,受试物在试验系统中无反应;阴性对照提供在试验条件下试验系统无反应的证据。

5.6

阳性对照 **control, positive**

试验系统中独立的部分,受试物在试验系统中有反应。阳性对照提供在试验条件下试验系统有反应的证据。

5.7

空白对照 **control, untreated**

保持原有培养条件的试验系统中独立的部分。空白对照试验提供试验系统的基线数据。

5.8

介质对照 **control, vehicle**

加入介质的独立的试验系统部分。介质对照提供在实际试验条件下,被选用的介质对试验系统没有影响的证据。

5.9

关键阶段 **critical phases**

研究的质量、有效性和可靠性所主要依赖的研究中的单个、或者确定的一系列过程或活动。

5.10

交叉污染 **cross-contamination**

因为疏忽,一个试验样品被另一个试验样品污染,一个试验系统被另一个试验样品或另一个试验系

统污染,导致试验样品污染或试验系统被破坏。

5.11

冷冻保藏 cryopreservation

在冷冻的条件下保存细胞和组织,保持其生命力。

5.12

冷冻瓶 cryovial

用于冷冻保藏的专用瓶。冷冻瓶应能满足特殊要求,即在冷冻和融化过程中遇到极低的温度和极端温度改变,都能牢固密闭。

5.13

离体 ex vivo

从完整动物获得的、用于进一步分析的细胞、组织或器官。

5.14

基因转染 gene transfection

引入外源性的、互补 DNA(单个或多个基因)到宿主细胞中。

5.15

高通量筛选 high through-put screening

使用微型化、机器人技术,根据特殊活性,从巨大的文库中筛选出单个目标基因、蛋白质、细胞、组织或化合物,供进一步开发使用。

5.16

微阵列 micro-arrays

成套的微化学反应区域有序排列,被点到固体矩阵如显微载玻片上。DNA 微阵列提供基于碱基配对规则的、匹配已知和未知 DNA 样品的方法。DNA 微阵列实现了鉴别未知 DNA 样品的过程的自动化,实现探测生物样品:确定基因表达、标记模式或 DNA/RNA 的核苷酸序列。

5.17

原代细胞 primary cells

从动物或植物中新分离出的细胞。新分离的原代细胞可能在培养中迅速逆向分化,并且通常具有有限的寿命。从动物或人体中分离出的原代细胞,或许代表不同的种群,例如由于所用纯化技术不同,细胞种类和分化状态存在差异。每次分离都将是唯一的且不能被严格复制。原代细胞培养,一般需要复杂的营养介质,需要补充血清和其他成分。因此,原代细胞培养系统非常难以标准化。

5.18

专有材料 proprietary material

受到(专利、著作权或商标)法律保护,以免非法使用的材料。

5.19

试剂盒 test kit

可以现成使用的试剂组合,包括了化验、测试或研究所需的所有试剂。

5.20

组织 tissues

作为生物体要素的、具有特定功能的、可分化细胞的多细胞集合体。

5.21

毒理基因组学 toxicogenomics

基因组对环境应激物和毒物如何反应的研究系统。毒理基因组学的目标,是发现毒物的毒性反应与暴露于毒物的机体遗传图谱改变之间的相关性。毒理基因组学结合了新兴的基因组学和生物信息技术,以识别和特征化已知的和可疑的毒物作用机理。现在,DNA 微阵列和 DNA 芯片是毒理基因组

学的首要研究工具,被用以对成百上千的基因表达水平同时进行检测。

5.22

毒理代谢组学 toxicometabonomics

为了将靶器官毒性和 NMR 光谱模式联系起来,为了鉴别新的毒性替代标记物,使用 NMR 模式识别技术对生物体液组分进行系统探测,定量测定活生物系统对病理生理刺激或遗传修饰的、与时间相关的多参数新陈代谢反应。

5.23

毒理蛋白质组学 toxicoproteomics

细胞或组织中的整体蛋白质表达如何对环境应激物或毒物作出反应的研究。毒理蛋白质组学的目的是发现毒物的毒性反应与机体暴露于毒物后蛋白质图谱补体改变之间的相关性。

5.24

转基因细胞 transgenic cells

转入一个或多个外源性基因的细胞,这些外源性基因在母细胞中特征和功能不表达或者低表达。

6 职责

6.1 试验机构管理者

试验机构管理者的主要责任是常规责任,同时适用于体内和体外研究。例如,试验机构管理者要求确保人员的资质、随时开展研究所需的试验设施与仪器设备的能力认定。试验机构管理者应当注意,体外试验可能会影响某些责任的执行,例如:试验机构管理者应保证试验人员明确地知道他们的职责。对于体外研究应为试验人员提供无菌化处理和生物危险物质处理过程的专门培训。体外研究可能需要在专门的试验空间开展,试验过程应避免试验系统的污染。另外应保证试验设备的供应要符合研究工作的要求。某些体外研究可能需要使用专有物质和试剂盒。按照 GB/T 22275.3—2008 的要求,用于 GLP 符合性研究的材料,其适宜性应当使用合适的质量体系进行生产和验证,因此产品的适应性对生产商和供应商是最大的责任。试验机构管理者的责任是通过通过对供应商所采用的生产、经营和政策的评估来确认这些要求是否被充分执行。

6.2 项目负责人

项目负责人的责任与研究工作的类型无关,GB/T 22278—2008 中所列的责任也同样适用于体外研究。项目负责人是研究工作控制的中心环节,应对整个研究工作和报告负责。

6.2.1 体外研究的项目负责人应特别注意对试验系统的判定和鉴别的记录,这对于体外研究更为困难。参考下文试验系统章节中有关使用试验系统的判定和鉴别记录的要求。对于体内研究来说,这些活动就相当简单。如使用某种特定物种,要解释其合理性只要记录这些生物的特征,使之成为合适的模型以利于评估所感兴趣的效果就可以。表征某一动物,只需简单地记录动物的以下信息:物种、类、亚类、供应源、数量、体重范围、性别和年龄。

6.2.2 下列要求可能对体外研究更难以实现:

6.2.2.1 试验系统合理性的判定要求项目负责人提供详细资料,以证明试验方法已得到验证,或该方法在结构、功能和(或)机理方面与一个已经确证的参照试验方法相类似。使用这些类似新方法之前,项目负责人应提供文件证明该方法对适当的参照物具有预期的表现和结果。

6.2.2.2 记录对体外试验系统特征的描述可能有一定困难。虽然项目负责人在供应商的协助下,能描述试验系统的某些特征(如细胞系、年龄/传代、起源),但是项目负责人也应记录试验系统在试验相应参照物[包括阳性、阴性、空白的和(或)介质参照物]时有所要求的表现结果。举一个在体外研究中使用专有材料或试剂盒的特殊例子:专有材料和试剂盒的质量应由供应商、生产商或专利持有人保证;试验机构管理者负责确保供应商符合上述的质量标准要求。项目负责人的责任是通过审查供应商的生产、经营和政策,确保使用的材料或试剂盒符合研究要求,并确保试剂盒经过了充分验证且满足使用要求。由

于研究结果的质量和可靠性直接受试验材料或试剂盒质量和性能的影响,因此供应商提供的质量控制文件的完整性和可接受性特别重要,项目负责人应做彻底审查和严格的评估。项目负责人至少应能判定制造商所采用的质量体系是否适当,并应有一切必需的文件来评估试验系统的适应性,如演示试验的结果。

6.3 研究人员

研究人员要认真观察,当要求无菌条件时,应按照相关程序进行体外研究,避免试验系统受到病原菌的污染。同样,研究人员应严格按照操作步骤(参见参考文献[1]),以避免试验系统之间的交叉污染和确保研究的完整性。研究人员应认识并严格遵守有关隔离试验系统和涉及到生物危险物质研究的要求。另外,在体外研究中使用危险化学品时,也应采用适当的预防措施将危害减到最低。

7 质量保证

体外研究和体内研究的质量保证(QA)没有很大差异。在某些情况下,体外研究局限于短期研究范围。在这种情况下,GB/T 22275.5—2008 适用于体外研究。若主管部门许可,质量保证(QA)可以对体外研究进行以试验程序为基础的检查。因为GLP原则要求运用QA检查研究的关键阶段,所以对于体外研究,QA应很好地掌握研究的关键阶段(和关键方面)。质量保证检查的导则应通过与项目负责人、项目代表和研究人员的合作,共同制定。QA的检查涵盖了体外试验的各个具体方面,因此QA人员的教育和培训也应明确方向,使QA人员具备识别体外研究具体领域潜在问题的能力。

检查的具体领域可能包括但不限于以下程序和措施:

- a) 监测试验系统(如小牛胎盘血清等)运行中关键的细胞和组织培养液的组成,以及其他对试验系统有影响的试验材料的批号;
- b) 评估并确保细胞、组织和其他指示性材料的功能和(或)形态状况(和完整性);
- c) 监测来自外界细胞、支原体、其他病原菌或其他偶发性有害物质引起的潜在污染;
- d) 设施和设备的清洗和消毒,最大限度地减少对试验样品和试验系统的污染;
- e) 确保专用设备得到合理的使用和维护;
- f) 确保细胞和组织被正确地冷冻保存、复苏;
- g) 确保对取出的冷存材料维持适当的条件 and 环境;
- h) 确保用于细胞和组织培养用材料和用品的无菌消毒;
- i) 对不同研究和试验系统保持适当的隔离。

8 设施

8.1 概要

GLP原则规定试验设施应符合研究的要求,并保持不同研究活动之间有足够程度的隔离,以确保每项研究能适当地、不受干扰地进行。通常体外研究一般只占用有限的工作空间,而且通常使用不排除其他试验运行的专用设备,所以应采取措施,以确保在同一物理环境中共存的体外研究有适当的隔离。

8.2 试验系统设施

GLP原则要求有足够数量的房间或空间以确保不同试验系统的隔离,而且这些空间应确保使试验系统受污染的概率降到最低程度。但是词语“空间”没有专门的界定和解释,因此适应于各种不同的体外研究情况。重要的是每一个试验系统和研究的完整性不应受到潜在污染、交叉污染或混合污染的危害。

8.2.1 只要进行足够程度的隔离(如适当的标识、标签或分开放置以在研究之间进行区分等),可以在同一培养箱中培养不同项目的细胞或组织,很少有被测物能挥发以至污染在同一培养器中的其他细胞或组织。

8.2.2 对关键研究阶段的隔离不仅在空间上可能,而且在时间上也可能。细胞和组织培养,如传代培

养、试验物质的加入等,通常是在垂直层流通风柜中进行,以保证无菌环境,保护试验系统、研究人员和环境。在这种情况下,通过在单个研究中所用试验系统的有序操作,以达到足够的隔离以便避免不同研究之间的交叉污染。这些操作包括在试验之间对通风橱和相关实验室设施表面进行认真的清洁和净化/消毒。

8.2.3 另一个重要的方面是为长期储存试验系统而提供配有特殊设备的专门场所或空间。特殊设施包括储存容器,应为维持试验系统长期的完整性提供足够的条件。

8.3 处理试验物质和参照物的设施

GLP 原则对处理试验物质和参照物的要求同样适用于体外试验,试验物质和参照物的交叉污染也是需要考虑的一个方面。另外,无菌操作应是体外研究的一个重要考虑因素,因此应确保制备和混合试验物质和参照物的场所或空间的无菌状态,从而保护试验系统和研究以使试验物质和参照物制备过程受到污染的概率最小。

9 仪器、材料和试剂

GLP 原则对仪器的常规要求,同样适用于体外研究的仪器。但还有一些具体的要点和特定的问题需要说明,例如确保实验设备的性能和良好的状态对某些体外研究的完整性和可靠性很重要,如微量天平、微量移液管、层流通风柜或培养箱需要定期维修,并在使用时进行监测和校准。对于特殊的仪器,需要确定关键参数并持续监测、或设定阈值范围并配备报警装置。

在 GLP 原则中对试剂的标签和有效日期的要求同样适用于体外研究。

10 试验系统

体外试验系统主要是生物系统,虽然替代常规体内试验的方法在近期得到发展(如毒理基因组学的基因阵列),也表现出一些物理-化学试验系统的属性,但还有如毒理代谢组学,可能以分析方法为主。试剂盒(包括专利试剂盒)应被视为是试验系统。

10.1 试验系统条件

与任何生物试验系统一样,对其应确定适当的条件,并在储存和研究过程中加以维护和监测,以确保试验系统的质量和完整性。这包括文件说明、维护、试验系统稳定性和反应的监控,包括细胞传代数量和细胞群体倍增次数的记录。环境条件也应予以记录(如在液氮冻存系统中液氮、温度、湿度和培养器中 CO₂ 的浓度等),还要记录保持维护试验系统质量和完整性的操作(如使用抗生素或杀菌、传代培养、选择性培养以降低自然事件的频率)。因为对试验系统在存储过程中所需适宜环境条件的维护,对数据质量的影响要比其他生物系统会更大,因此保持记录数据的质量和可靠性尤其重要。

10.2 新接受的试验系统

对供应商为体外试验系统提供详细的资料(如来源、年龄/传代数、细胞倍增次数和其他能帮助识别试验系统的相关特性)应予以检查,并保留在研究记录中。按照预先确定的标准评估试验系统的稳定性、适宜性[如细胞和组织的功能和(或)形态、试验已知或可疑的微生物或病毒污染物]和反应性。这些评估结果应记录并保留在研究记录中。如果没有做评估的可能性,比如原代细胞培养或“再造器官”,在供应商和使用者之间应有一种机制来确定并记录试验系统的适宜性。测定和记录其对阴性和阳性对照物的反应,将提供特定试验系统反应性的充分证据。任何试验系统中可能影响研究质量、正确性和可靠性的问题,都应在最后的报告中予以记录并讨论。如供应商供应的试验系统有问题,应与供应商沟通,并采取纠正措施。

10.3 试验系统的记录

10.3.1 GLP 原则要求对试验系统的来源、到达日期和到达时的状态应有完整的记录。对于细胞和组织,记录不仅应包括直接来源(如供应商),而且还应包括细胞或组织的原代来源(如具有供体性质的原代细胞或组织,从确切来源建立的细胞系等)。其他信息应包含但不限于最初获得细胞或组织的方法

(如来自于组织外植体产生的正常或癌组织的活组织切片、通过质粒转染或病毒转导的基因转移等)、转运和保管的年代、细胞系的转代数、培养条件和传代培养间隔、冻存/解冻条件等。此外,对于转基因试验系统,需要确定转基因的性状,并监测其在适当的条件下的表达水平。

10.3.2 在储存和使用过程中,需要特别注意试验系统的正确标记,并采取规范以确保标签的耐久性。尤其是容器的尺寸和储存条件(如速冻、储存在一个液氮容器中的多个试验系统)等标签关键因素,应采取措施确保任何时候都可正确识别试验系统。

10.3.3 GLP 原则对于试验物质和试剂在标签和有效期的规定和要求,同样适用于体外试验系统中所用试剂盒。试剂盒无论是用于试验系统,还是用于其他方面如分析目的,都应当有明确的有效期。只有具备书面的评估(和分析),有效期才可延长。对于用在试验系统的试剂盒,评估记录应包括:多批试剂盒对阳性、阴性和(或)介质参照物的测试的历史记录和证据;且即使在有效期后其测定结果并未偏离历史记录对照值,项目负责人如要做出延长有效期的决定,应提供评估过程的证据。

10.3.4 为避免混淆,试验系统的术语应当明确定义,试验系统的标签和来自于个体研究的所有记录,应具有试验系统正式认可的名称。

10.4 试验物质和参照物(包括阴性和阴性对照物)

10.4.1 除了 GLP 原则中的规定之外,通常对用于体外试验系统的试验物质和参照物的接收、处理、取样、保存和鉴别没有特殊的要求。然而,在样品处理过程中要求严格的无菌操作环境,以避免试验系统受到微生物污染。

10.4.2 对阴性、介质和阳性对照物,如果可提供其在试验系统中获得预期的正常结果的证据。可能需要也可能不需要测定其浓度和均匀性。

10.4.3 通过记录资料的评估和分析,对照物的有效期可被延长。这种评估由以下文件证据组成:阴性、介质和阳性对照物在各试验系统中的反应并没有偏离记录的试验设备的历史对照值,与文献的参照值也具有可比性。

10.5 标准操作程序(SOPs)

除了 GB/T 22278—2008 中 3.7.4.1~3.7.4.5 之外,对体外试验的一些专门步骤和过程应在标准操作程序中予以描述。因此 SOPs 应有附加要求,但不限于以下与体外试验相关的试验设施活动。

10.5.1 设施

对空气和实验台表面病原菌的环境监测、清洗和消毒,以及对污染的试验设备或空间应采取的相关措施。

10.5.2 仪器

细胞和组织培养仪器和设备的使用、维护、即时监测、清洗和消毒(如层流通风橱和培养箱);储存箱的液氮水平监测仪;培养箱的温度、湿度和 CO₂ 浓度的校准和监测。

10.5.3 材料、试剂和溶液

对其适宜性的评估、有效期的延长、无菌状态的评估和维护、常见病原菌的筛查、介质选择和使用的程序、介质与试验系统可匹配性的检验程序。

10.5.4 试验系统

细胞与组织的储存条件及冷冻和融化程序、常见病原菌的试验、污染的目测检查;对新到达和使用期间(无论刚到达及在随后储存中)试验系统的验证程序,并定有相应的合格指标以确保其性能和状态符合要求;形态学评估、表型或染色体组稳定性的控制、转基因稳定性的控制;培养起始模式、培养条件以及传代间隔;生物危害物质和试验系统的处理、试验系统的处理程序。

10.5.5 研究的实施

无菌化技术、研究有效性判定标准、重复测定的标准。

10.5.6 质量保证

试验关键阶段的定义、检查频率。

10.6 研究的实施和研究结果的报告

10.6.1 GLP 原则对体外研究实施的要求与对常规安全研究的要求相同。在许多情况下,应使体外研究以符合 GLP 原则的方式运行,应将 GB/T 22275.5—2008 和 GB/T 22278—2008 结合参照进行。

10.6.2 在体外试验中,有一系列特殊的问题需要在研究计划和最后的研究报告中阐述清楚。这些问题主要是科学和技术方面的问题,如为控制偏差和评估试验系统的运行状况而设置的内标物[合适的阳性、阴性、空白和(或)介质对照]应与试验物质同时进行的要求。关于在研究计划和最终报告中什么问题应加以阐述,可以参照 OECD 的相关试验指南或其他相关参考文献。

10.7 记录和材料的存储和保存

10.7.1 GLP 原则中对记录和试验材料的存储和保存的常规要求,也适用于体外研究。此外,体外研究需要考虑可长期保存的试验系统的样品,特别应考虑非常有限或较难获得的试验系统(如细胞系的特殊亚克隆、转基因细胞等)的保存,以便能确认试验系统的特征和(或)重现。

10.7.2 对于可归为短期研究的体外研究,尤其是安全性试验主要以体外研究的方式开展时,需要考虑保存试验样品。

10.7.3 用于建立试验系统可接受反应范围的阳性、阴性、空白和(或)介质对照结果的历史记录,应予以保存。

参 考 文 献

- [1] 良好细胞培养规范. <http://ecvam.jrc.it/publication/index5007.html>.
 - [2] MIAME 指南. <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>.
 - [3] ECVAM. <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
 - [4] ICCVAM <http://iccvam.niehs.nih.gov/>.
-