

疫苗生产用细胞基质的技术审评一般原则

药品审评中心

2005年12月

目 录

一、概述	3
二、细胞基质的分类	4
三、细胞基质存在的潜在危险性	6
四、细胞基质的一般技术要求和评价	8
五、新细胞系/株的技术要求	13
六、参考文献	14
七、起草说明	15

一、概述

生产用细胞基质是指培养病毒时所需要的细胞，是生产病毒疫苗必不可少的原材料。任何微生物的生长、繁殖都有各自的最基本的条件，病毒的生长和繁殖必须在细胞内进行。病毒疫苗是以培养、收获足够量的病毒为基础。目前培养病毒的方法主要有二种，一种是通过病毒的细胞培养得到病毒，另一种是采用病毒感染动物（包括鸡胚）获得病毒。

生物制品的质量控制不仅仅是对终产品的质量的控制，而是对整个生产过程的质量控制，包括原材料、中间产品、终产品以及生产过程的质控等等。细胞基质作为主要原材料，其质量的优劣，直接影响疫苗的质量和产量，尤其是疫苗的安全性。一般认为，用细胞基质生产疫苗，主要关注的质量问题在于可能存在的外源因子污染和某些情况下细胞本身的特性，以及细胞培养中各个环节的操作，因此，只有妥善解决上述问题，才能达到对疫苗的质量控制。

本原则主要阐述细胞基质的分类、各类细胞基质的优缺点、力求从科学的角度分析和认识潜在的危险性，以及科学客观评价细胞基质安全性和有效性常用的方法等等。本原则仅为一般性技术要求和原则，非强制性。希望能够有助于疫苗类制品的审评工作，同时促进药品审评机构与疫苗生产企业、疫苗研制者之间的交流。此外，希望本原则对疫苗研制开发工作有所启示。

二、细胞基质的分类

本原则将细胞基质分为三类，即原代细胞、二倍体细胞和传代细胞。

（一）、原代细胞

原代细胞是指直接来源于动物组织的细胞，动物组织经胰酶消化培养成单

层细胞（通常贴壁生长），用于病毒的培养。如地鼠肾细胞、猴肾细胞、兔肾细胞、鸡胚细胞等。原代细胞在疫苗的生产中已使用了40多年，证明是安全有效的。我国已上市的疫苗中，乙型脑炎疫苗、肾综合征出血热疫苗、狂犬病疫苗使用地鼠肾细胞，麻疹、腮腺炎疫苗使用鸡胚细胞，风疹疫苗使用兔肾细胞，脊髓灰质炎疫苗使用猴肾细胞。原代细胞具备的优点有：使用的细胞培养液相对简单，很多病毒都可以在原代细胞上生长繁殖，具有广泛的敏感性；原代细胞的来源比较容易，尤其是地鼠，是哺乳动物中繁殖最快的动物之一；由于原代细胞属正常细胞，没有DNA突变，无致肿瘤性。原代细胞的缺点包括：存在潜在的病毒等外源因子污染问题；来自不同个体动物的细胞质量和敏感性有差异。鉴于原代细胞的上述缺点，生产减毒活疫苗的动物应尽可能达到SPF级，至少不应低于清洁级；生产灭活疫苗的动物应尽可能达到清洁级以上，至少应采用健康动物；采用等级动物的原代细胞或传代细胞以及二倍体细胞是将来生产灭活疫苗的发展方向。

（二）、传代细胞

传代细胞是可在体外连续传代的细胞系，理论上具有无限传代的寿命。传代细胞系可以通过以下方法衍生而来，（1）人或动物肿瘤细胞的原代细胞的系列培养，例如HeLa细胞、Namalva细胞等；（2）携带致癌基因的病毒，将致癌基因转化给正常细胞，成为肿瘤细胞，例如EB病毒转化的B淋巴细胞；（3）骨髓瘤细胞与B淋巴细胞融合，例如生产单克隆抗体的杂交瘤细胞株；（4）正常细胞群的连续传代，繁衍成一个新的具有无限寿命的细胞群，例如非洲绿猴肾细胞的传代细胞系Vero细胞、幼仔地鼠肾的传代细胞系BHK21细胞、中华仓鼠卵巢细胞的传代细胞系（CHO细胞）等。目前尚无用于疫苗生产的来源于

人类组织的传代细胞系。

由于肿瘤细胞或携带肿瘤基因的细胞具有致肿瘤的危险，所以该类细胞不能作为细胞基质用于疫苗生产；因此用于病毒组织培养的细胞系采用非肿瘤细胞系，即正常细胞群的连续传代后繁衍的细胞系，在一定传代限度内使用，使用最多的是Vero细胞。例如，人用狂犬病纯化疫苗、脊髓灰质炎灭活（纯化）、肾综合征出血热纯化疫苗、乙型脑炎纯化疫苗均已使用Vero细胞生产。

传代细胞具备的优点包括：能够充分鉴定和标准化；使用细胞种子库系统生产，有利于质量控制；可用于微载体生物反应器，可大规模生产；对培养基及牛血清的营养成份要求不高。传代细胞的缺点有，理论上致肿瘤性的危险，但WHO认为Vero细胞在150代以内使用是安全的，无致肿瘤性。

（三）、人二倍体细胞

人二倍体细胞是采用人源细胞（通常为胚胎组织）建立的细胞株，可进行体外传代培养，但具有一定的传代寿命，超过一定代次，细胞衰老，如2BS细胞、KMB-17、MRC-5细胞等。上述细胞系在疫苗的生产中使用了30多年，证明是安全有效的，无致肿瘤性。我国已上市的疫苗中，甲型肝炎疫苗、脊髓灰质炎疫苗、风疹减毒活疫苗、水痘减毒活疫苗分别使用了2BS、KMB-17、MRC-5细胞。二倍体细胞与原代细胞相比，具有能够充分鉴定和标准化的优点，可实现细胞种子库系统，建立的细胞库可多年用于生产，有利于质量控制。二倍体细胞与传代细胞相比，理论上不存在致肿瘤的潜在危险性。二倍体细胞存在的缺点是，与传代细胞相比，难于大规模生产；对培养液及牛血清的营养成份要求较高。

三、细胞基质存在的潜在危险性

动物细胞用于疫苗生产，应考虑其带来的潜在危险。重点考虑病毒与其他可传播因子、细胞DNA和促生长蛋白等。

(一)、携带潜在病毒和其他可传播因子

细胞系/株本身有可能携带内源性病毒和外界污染的病毒。如果细胞基质被病毒污染，则生产出来的疫苗也会含有污染的病毒，直接影响疫苗的安全性；尤其是减毒活疫苗，由于没有灭活工艺，内源性或外源性病毒的污染可能会导致严重的后果。

人类或灵长目动物细胞系可能携带潜在的病毒，例如乙型肝炎病毒、逆转录病毒等；还有可能含有整合在细胞DNA上的病毒基因。虽然人二倍体细胞用于疫苗生产30多年，未见有病毒性污染的报道，但仍不能完全排除人类病毒潜在污染的风险。

禽类组织细胞隐藏着外源和内源性逆转录病毒，但目前没有证据表明这些细胞基质生产的疫苗可向人类传播疾病。例如多年前使用含有禽白血病病毒的鸡胚生产的黄热病疫苗、麻疹疫苗、流感疫苗。尽管如此，仍应防范禽类外源和内源性逆转录病毒给人类可能带来的危害。

啮齿类动物细胞隐藏着外源和内源性逆转录病毒及其他病毒，可能携带淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、出血热病毒等，其可以直接感染人类而致病。

(二)、细胞DNA

多年来，原代细胞和二倍体细胞已成功、安全地用于多种疫苗生产，已认为这类细胞的残余DNA无危险性。由于传代细胞调控生长的基因失调，使得传代细胞系具有无限的生命。因此，理论上认为传代细胞系的DNA具有使其他细胞生长失控和产生致肿瘤活性的潜在能力。

人类对传代细胞DNA的危险性有一个逐步认识的过程。1986年WHO根据动物致癌基因模型提出危险性评估，在体内暴露1ng的细胞DNA（该基因组中含有1个活化致癌基因的100个拷贝），可引起1/10⁹个受体发生转化。并认为疫苗中含有≤100pg/剂量的细胞DNA的危险性可忽略不计。在确定此界限时，考虑的不是DNA本身，而是编码活化致癌基因的特殊DNA序列减少到最少。

细胞DNA可导致瘤变的嵌入突变的危险性极小。有报告结果显示，通过嵌入诱变证明，10ugDNA可导致1/10⁷个受体的一个细胞的2个独立的肿瘤抑制基因失活。

1998年发表的文章表明，含有活化基因的mg级DNA注射灵长类动物，10年内未引起肿瘤。

目前认为，传代细胞系的DNA是一种细胞污染，而不是一种需要降低到极低水平的严重危险因素，但鉴于疫苗的使用者为健康人群，并且采用传代细胞生产的灭活疫苗逐渐增多，因此应尽量降低疫苗中残余DNA含量，最大限度地降低潜在的危险。生产工艺中必须有去除DNA的工艺，并进行工艺验证。此外，β-丙内酯既可以灭活病毒，也可以降解核酸。口服制剂的残余DNA含量的危险性可忽略不计。

（三）、促生长蛋白及细胞残留蛋白

传代细胞可分泌生长因子（称促生长蛋白），该生长因子可以促进细胞生长，但作用通常是短暂的、可逆的，危险性有限。它们不能复制，而且大部分在体内迅速失活。在异常情况下有致肿瘤作用，但需要持续作用。一般认为，疫苗中含有微量的已知的促生长蛋白不构成严重危险，但仍需关注其带来的潜在危险。同时，疫苗当中的细胞残留蛋白属异源蛋白，有可能引起机

体的过敏反应。因此，使用传代细胞生产的疫苗，应进行纯化，尽可能去除细胞蛋白，并且要进行纯化工艺的验证。鉴于目前尚无特异性传代细胞蛋白（包括促生长蛋白）的检测手段，现仍以疫苗蛋白总量进行间接质控。目前，我国部分生产企业的工艺可将个别疫苗蛋白总量降至10 ug/剂量以下，其细胞蛋白残留量相对较少。

四、细胞基质的一般技术要求

本节所阐述的细胞基质的一般技术要求和评价，是针对国内外已研究成功并多年用于疫苗生产的细胞系/株，企业使用或引进该细胞系/株时，需要重点考虑的问题和需要进行验证性工作。不适用于新的细胞系。

（一）、鉴别试验

一般针对细胞的特点设计试验方法，以确定该细胞的正确性。一般可采用1~2种方法，例如可采用核型分析，生物化学法（如同功酶分析），免疫学方法，细胞遗传学实验（如染色体标记），基因标记试验（如DNA图谱）等。

（二）、细胞基质对病毒的敏感性：

细胞培养的目的是获得足够量的病毒，如果病毒不能在细胞上很好地适应和复制，就失去了细胞培养的目的；达不到规模化生产的能力，产品研制开发的前景不容乐观。因此，选择适宜的细胞基质是疫苗研制的基础。一般选择有充足来源的、对研发的目的病毒敏感的、能够大规模生产的、可以进行质量控制的细胞基质。有些病毒对一些细胞基质不够敏感，但可以通过在该细胞基质上适应传代的方式，使病毒逐步适应该细胞基质，最终在一定的代次后达到一定的滴度，满足生产疫苗的需求。由于每种病毒感染细胞的滴度不同，每种疫苗所需要的病毒量（免疫原）也不同，所以目前对于疫苗毒种

的滴度要求没有统一的尺度，不同的疫苗有不同的标准。例如目前已上市的疫苗中，麻疹减毒活疫苗毒株的滴度要求为 $\geq 4.5 \text{LgCCID}_{50}/\text{ml}$ ，乙型脑炎减毒活疫苗毒株的滴度要求为 $\geq 7.2 \text{LgPFU}/\text{ml}$ 。因此，对细胞基质敏感性的评价不仅仅是结果，同样重要的是病毒在细胞基质上适应的全过程。细胞基质的敏感性直接影响疫苗的产量，只有达到规模化生产，才有生产疫苗的可能，才能起到预防传染性疾病的作用。此外，应重点考虑在细胞培养中，接种尽可能少的病毒量，收获尽可能多的病毒量。

(三)、外源因子

一个合格的细胞系/株应无任何外源因子污染，所谓外源因子是指除细胞以外污染的细菌、真菌、支原体、病毒（包括细胞系/株本身携带的病毒和外界污染的病毒）。如果细胞基质被外源因子污染，则生产出来的疫苗也会含有被污染的外源因子，直接影响疫苗的安全性；另一方面，疫苗生产的目的病毒会被外源因子干扰，可严重影响疫苗的有效性。一般进行以下项目的外源因子检测：

1. 无菌试验（细菌、真菌、支原体）：按照国家规定的方法进行。

2. 细胞法检测病毒外源因子：至少用 10^7 细胞和培养上清液转种人二倍体细胞、本细胞系的其他批次、其他种属的细胞系，应无细胞病变产生和血无吸附现象。

3. 用动物和鸡胚检测病毒因子：

采用动物体内接种法检测外源病毒因子，对动物的要求、接种途径、接种剂量、观察时间、结果判定见表1。

表 1 动物体内接种法检测外源病毒因子

动物组	要求	数量	接种途经	细胞浓度(活细胞数量/ml)	接种量(ml/只)	观察天数	结果判定
乳鼠	24h 内	10 (2 窝)	脑内 腹腔	$>10^7$	0.01 0.1	21	应健存
成鼠	15 ~ 20g	10	脑内 腹腔	$>2 \times 10^6$	0.03 0.5	21	应健存
鸡胚*	9 ~ 11 日龄	10	尿囊腔	$>5 \times 10^6$	0.2	3 ~ 4	尿液血凝试验阴性
鸡胚	5 ~ 6 日龄	10	卵黄囊	$>2 \times 10^6$	0.5	5	应存活
豚鼠	350 ~ 500g	5	腹腔	$>4 \times 10^5$	5.0	42	应健存, 解剖无结核病变
家兔	1.5 ~ 2.5kg	5	皮下 皮内#	$>2 \times 10^5$	9.0 0.1×10	21	无异常 健存

*经尿囊腔接种的鸡胚, 在观察末期, 应用豚鼠红细胞和鸡红细胞混合悬液进行直接活细胞凝集试验。

每只家兔于皮内注射 10 处, 每处 0.1ml。

。乳鼠和成鼠脑内、腹腔注射, 系检测嗜神经病毒; 豚鼠腹腔注射, 系检测结核杆菌; 家兔皮下注射, 系检测猴源性B病毒; 鸡胚是检测正粘病毒和副粘病毒, 如流感病毒、呼吸道合胞病毒等。

4. 逆转录病毒的检测: 一般用高敏感性的细胞扩增待检细胞培养物中的逆转录病毒, 以扩增浓度可能很低的任何逆转录病毒污染物, 然后进行检测。

4.1 逆转录酶分析: 可考虑采用最新的高敏感逆转录酶分析方法。对逆转录酶阳性结果判定应谨慎, 因为逆转录酶不是逆转录病毒独有的, 也有其他来源, 例如不能编码完整基因的类逆转录病毒因子或细胞DNA聚合酶。因此, 对逆转录酶阳性的样本应进一步进行联合培养, 验证是否存在逆转录病毒。

4.2 透射电镜检测。

4.3 感染性检测: 主要用于鼠源性逆转录病毒的检查。

二倍体细胞和传代细胞应采用上述方法进行外源因子检定, 原代细胞因不能建立种子库, 其外源因子的检测只能在生产的同时, 进行对照细胞的检测,

一般采用细胞病变法和血吸附法，检测结果阴性，相应的疫苗外源因子合格。

由于目前的认识和检验方法存在的局限性，可能还有未知的微生物因子没有被发现。当这些因子能够被确认时，需要重新检测细胞系/株中是否有这些因子。

(四)、致肿瘤性

原代细胞和二倍体细胞的残余DNA无致肿瘤性。理论上传代细胞具有无限的生命，低于一定传代水平时，可以表现出无致肿瘤性，但随着代次的增加，其出现致肿瘤性的可能性也会增加，因此确定一个体外培养代次的界限非常重要，细胞超过该界限不能使用。该界限应模拟生产条件并超过实际生产代次。检测方法包括动物法和软琼脂法。

1. 动物法：

裸鼠，经抗胸腺血清处理的新生小鼠或大鼠均可用于试验。可选用其中一种动物。

方法和判定： 每只动物皮下注射 10^7 细胞/0.2ml，以HeLa细胞（ 10^6 细胞/0.2ml）作阳性对照，有结节的观察1~2周，解剖做病理检查。无结节的，一般观察21天，另一半观察12周，解剖做病理检查，阴性者为合格，阳性对照应为阳性。

2. 软琼脂法。

(五)、二倍体细胞染色体分析。

为了证实二倍体细胞系的一般特性，对于主细胞库的细胞，经连续传代至衰老，设立不同传代代次组，8-12代测定一次，至少进行4次染色体检测。一个好的细胞系，应在细胞有限的生命期内，染色体分析符合国家的相关要

求，而且不同代次的结果基本相近。目前我国规定检测1000个或500个分裂中期的细胞，计算染色体数目。染色单体和染色体断裂数量分别不得超过47/1000或26/500；结构异常者不得超过17/1000或10/500；超二倍体不得超过8/1000或5/500；亚二倍体不得超过180/1000或90/500；多倍体不得超过30/1000或17/500。

（六）、种子库的建立和检定

为了保证用于生产的细胞系及生产出的疫苗没有外源因子污染，避免因传代过多引起遗传变异，需建立细胞库。一般由发明者或权威机构保存一定代次细胞种子（原始细胞库），分发或出售给生产企业，生产企业利用细胞种子制备主细胞库和工作细胞库。分发或出售者应提供细胞的分离历史、传代、检定等背景资料，及分发或出售给企业的证明文件。

主细胞库是由原始细胞种子经传代、扩增后得到均一的细胞，分装于多个容器中并在深低温保存。主细胞库应具备一定的量并经过严格、全面的检定。主细胞库的一支或多支种子可用于制备工作细胞库。

工作细胞库是由主细胞库的种子经传代、扩增后得到均一的细胞，分装于多个容器中并在深低温保存；工作细胞库只能为一个代次，应具备一定的量并经过严格的、全面检定。工作细胞库的一支或多支种子可用于同一批疫苗生产。

主细胞库代次、工作细胞库代次及主细胞库与工作细胞库之间相隔的代次应该有明确的限定，保证用于生产的细胞代次保持恒定或在相对早期。建议将主细胞库、工作细胞库各自分别保存在至少两个不同的远离的区域，以防意外丢失细胞系。

为了避免交叉污染，在进行一种细胞开放操作的同时，不要进行其他细胞系的开放操作。工作人员在进行细胞培养的当天，不得进行动物或感染性微生物的操作。有关人员应身体健康并定期进行健康检查。

(七)、传代稳定性

在疫苗的实际生产过程中，从工作细胞库取出一支或多支种子，细胞种子经复苏后扩增，经多次传代才可以扩增到生产所需要的细胞量，然后感染病毒，培养收获病毒。因此，需要控制从工作种子库毒种至生产收获之间细胞的质量。细胞扩增往往通过多次细胞倍增的传代而实现，所以细胞代次的研究显得极为重要，需要进行细胞传代稳定性研究。一般采用模拟疫苗生产中细胞传代、扩增的方式进行细胞连续传代。每隔一定代次测定细胞的生长特性、对病毒的敏感性、外源因子检测等，均应符合有关要求。最末代次的检测，还应增加致肿瘤试验。建议传代稳定性研究的最末代次应超过实际生产代次的10代以上。

五、新细胞系/株的技术要求

建立一个生产疫苗的新细胞系/株，属于创新性研究。研制者除按照细胞基质一般要求进行基础研究外，还要增加其他工作。

(一)、历史来源及基本资料

建立一个新的细胞系/株，必须详细记录历史。例如建立二倍体细胞株，所用的胎儿的胎龄和性别，终止妊娠的原因。胎儿父母的年龄、职业及健康状况，胎儿父母系三代应无明显遗传缺陷疾病和恶性肿瘤历史。原始组织的类型、数量、生长情况，细胞的培养方法、传代历史、生长特征、寿命的代次等等。

(二)、细胞株的检定

1. **鉴别试验:** 新细胞系/株需要自己建立鉴别试验方法, 并进行方法学认证。对原始种子库、主种子库和工作种子库均进行鉴别试验检测, 在传代稳定性研究中, 每 8-12 代进行一次鉴别试验。

2. **外源因子检查:** 一个新的细胞系/株, 还应选择性进行病毒检测。例如, 鼠细胞系可采用大鼠、小鼠、仓鼠的抗体产生试验, 以检测特异性病毒。人类细胞系可采用适当的技术进行对人类致病病毒的检测, 如 EB 病毒、巨细胞病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类逆转录病毒、乳头瘤病毒、腺病毒、VI 和 VII 型疱疹病毒等。

可以考虑采用基因探针、PCR 方法检测特异性病毒序列及病毒标志物, 以提供附加信息。

3. **致肿瘤性试验:** 按照常规的方法, 每 8-12 代进行一次致肿瘤试验检测。

六、参考文献

1. WHO /TRS8781998: Requirements for use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals

2. ICH/ Q5d: Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/ biological product

3. 《中华人民共和国药典》/2005年版 三部: 生物制品生产用动物细胞基质制备及检定规程

七、起草说明

1. 关于起草背景（含技术背景）的介绍：

细胞基质是生产疫苗必不可少的原材料，WHO、ICH和《中华人民共和国药典》记载了有关生产用细胞基质的规程，阐述了有关质量要求。但多年来国内始终没有相关指导原则，导致部分研制者对实验的目的、意义不清楚，在试验设计方面不清晰、不科学、不规范，以至于延误了新药开发的进度。希望通过本文阐述的原则和依据，对注册申请人开发疫苗的工作有所提示，提高研发水平。

2. 指导原则起草的指导思想和一般原则：

在遵循药品研发规律的基础上，讨论药品评价者的关注点，试图减少药品研究中研究者与评价者关注点的剪刀差。阐述国际上对细胞基质研究的认识和要求，并结合中国国情，力求具有可操作性。本指导原则仅为一般性技术要求 and 原则，非强制性。

3. 与其他指导原则的关联性及适用范围：

本文主要针对各类细胞基质本身的安全性和有效性，以及保证安全性和有效性所需要进行的研究和验证。没有涉及到培养细胞的要求，如GMP要求、牛血清的要求、胰酶的要求。此外，本文不包括对重组DNA的传代细胞、治疗用单克隆抗体的技术要求，有关技术指导原则另行撰写。

4. 内容设置的说明：

本原则主要阐述细胞基质的分类、各类细胞基质的优缺点、力求从科学的角度分析和认识潜在的危险性，以及科学客观评价细胞基质安全性和有效性常用的方法等等。但是，目前我国在细胞基质研究的方法学方面存在不足，

尚未建立部分检测方法，例如逆转录病毒的联合培养法、致肿瘤试验的软琼脂法等。因此本指导原则只提出需要采用上述方法检测，没有对方法进行描述，待我国建立方法并成熟后再具体写入本指导原则。

5. 有关数据和资料来源的说明：

主要技术数据和资料来源于《WHO /TRS8781998: Requirements for use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals》和《中华人民共和国药典》2005版 三部。

6. 有关重要问题的讨论过程及结果：

有关逆转录病毒的检测，我国目前积累的经验不多，疫苗生产企业尚未进行逆转录病毒的检测，中国药品生物制品检定所已建立逆转录酶的检定方法，疫苗生产企业掌握有关方法，是加强质量控制的重要环节。

关于细胞系/株的鉴别试验，WHO 有相关要求，因我国疫苗生产企业均使用常规的细胞系，如 2BS、Vero 细胞等，企业未对细胞系进行鉴别试验的检测。中国药品生物制品检定所已建立 Vero 细胞的鉴别试验（同功酶试验），疫苗生产企业掌握有关方法（至少进行核型鉴别），是加强质量控制的重要环节。

目前，采用 Vero 细胞生产灭活疫苗逐渐增多，Vero 细胞残余蛋白（包括促生长蛋白）可能对人体有潜在的危害，特异性检测 Vero 细胞蛋白的方法的研究，是今后制定相关质量控制标准的基础。此外，目前阶段应尽量降低疫苗总蛋白含量，间接控制细胞残留蛋白。

WHO 提出有的国家采用探针法或 PCR 法测定细胞基质中的特定潜在病毒，因我国尚未开展该方面的检测及方法学认证，所以本文仅对新细胞系/株提出

相关要求。

有关 Vero 细胞的使用代次问题，WHO 推荐 134~150 代，认为在该代次内未发现致肿瘤性。国外疫苗生产企业通常将 Vero 细胞的使用代次限定在 150 代之内，使用 150 代或更低代次的 Vero 细胞生产疫苗，相对降低了 Vero 细胞致肿瘤性的潜在风险。

关于 Vero 细胞残余 DNA 问题，目前认为 Vero 细胞残余 DNA 的潜在危害除了与残余 DNA 含量的多少有关外，还与残余 DNA 片断的大小有关，残余 DNA 含量越高、片断越大，其潜在的致肿瘤性越大。因此，强化纯化工艺是尽量降低残余 DNA 含量的有效措施；此外，研究并建立检测 Vero 细胞残余 DNA 片断大小的方法，可为今后制定相关质量控制标准奠定基础。关于 Vero 细胞残余 DNA 含量的要求，不同国家和地区有所不同，美国 FDA 要求 $\leq 10\text{pg}/\text{剂量}$ ，欧盟 EMEA 要求 $\leq 100\text{pg}/\text{剂量}$ ，我国要求 $\leq 100\text{pg}/\text{剂量}$ ，WHO 要求 $\leq 10\text{ng}/\text{剂量}$ 。此外，我国已开始研制采用 Vero 细胞生产的脊髓灰质炎灭活（纯化）疫苗和乙型脑炎纯化疫苗，这些疫苗是实施计划免疫的产品，用于婴幼儿的免疫接种，因此对其质量要求应相对严格，需考虑 Vero 细胞 DNA 残余量 $\leq 10\text{pg}/\text{剂量的标准}$ 。