

## NK 増幅キット

目次 # RP03030 1 Kit (2 L)

### 製品概要

NK 増幅キットは、ヒトのナチュラルキラー細胞（NK 細胞）の増殖培養に使用される試薬キットであり、主流の免疫細胞培地と併用することで末梢血や臍帯血など様々な由来のヒト NK 細胞が効率的に増殖可能です。（11～13 日間培養すると NK 細胞は 6000～10000 倍増殖可能。PBMC に NK 細胞が 10% 含まれる場合を基準にした計算値）NK 細胞の純度は高い（CD3- CD56+ の発現率が 95% 以上）です。

### 製品情報

表 1：NK 増幅キット製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
NK 増幅キットの内容物：	RP03030	1 Kit	液体窒素で保存、 ドライアイス で輸送
NK 増幅試薬 A	RP03030-A	1 mL	
NK 増幅試薬 B	RP03030-B	4 mL	

## 試薬と材料

表 2：推奨併用試薬&amp;材料

試薬&材料	ブランド (e.g.)	品番 (e.g.)
NK 増幅キット	Shownin	RP03030
リンパ球無血清培地	CORNING	88-581-CM
注射用組換えヒトインターロイキン-2	双鹭药业	欣吉尔
ヒト血小板溶解液 (PLT)	NA	NA
T75 培養フラスコ	Thermo Fisher	156499
T175 培養フラスコ	Thermo Fisher	159910
リンパ球培養バッグ (0.2-1.8L)	Takara	GT-T610(A)

## 単核細胞の調製

1. 単核細胞の調製：単核細胞の供給源は一般的に**末梢血**と**臍帯血**の2種類であり、処理形態として

「**新鮮サンプルからの分離**」と「**凍結サンプルの解凍**」に分けられます。実際の状況に応じて

対応する操作手順を参照してください。

注：（1）抗凝固剤の割合が高すぎると自己血漿の使用に影響するため、臍帯血中の抗凝固剤の割合を 30%未満に保ってください。

（2）EDTA は NK 細胞の活性化と増殖に影響するため、採血時はヘパリンナトリウムで抗凝固処理した真空採血管を推奨し、EDTA で抗凝固処理した真空採血管は使用しないでください。

## 2. 新鮮サンプルからの分離(末梢血と臍帯血の分離方法は類似)

- 2.1. 自己血漿分離：新鮮血液を  $800 \times g$  で 25 分間遠心します（昇降速度は最遅に設定）。遠心後、上層の淡黄色血漿を吸引し 50mL 遠心管に入れ（残りの血球層は単核細胞分離に使用）、 $56^{\circ}\text{C}$  ウォーターバスで 30 分間不活化処理した後、 $1200 \times g$  で 10 分間遠心し沈殿を除去します。不活化血漿を新しい 50mL 遠心管に移し、 $4^{\circ}\text{C}$  冷蔵庫で保存します。
- 2.2. 単核細胞分離：2.1 での血漿除去後の残存血球層を生理食塩水で 1:1 に希釈し、均一に混和した後、Ficoll 液を入れた遠心管に加え（液体界面を乱さないよう注意）、 $900 \times g$  で 30 分間遠心し、中間の白膜層を吸引します。生理食塩水で 2 回洗浄後、細胞数を計測します。 $400 \times g$  で 10 分間遠心後、上清を吸引除去します。沈殿した PBMC は、適量を直接活性化培養（ステップ 5 参照）に使用するか、必要に応じて凍結保存します（リンパ球分離液の種類によって、対応する製品説明書に従って操作してください）。

## NK細胞の増殖（表3参照）

1. NK細胞無血清培地の調製：リンパ球無血清培地+IL-2（終濃度200 IU/mL）。
2. 凍結単核細胞の前処理：凍結保存した単核細胞は、24時間前に解凍・平衡化を行い、凍結細胞を  $37^{\circ}\text{C}$  のウォーターバスで解凍後、バイオセーフティキャビネット内に移します。細胞懸濁液を滅菌済み遠心管に移し、予温したNK細胞無血清培地 10 mLを滴下しながら混和します。全量添加後、緩やかに振り混ぜ、 $300 \times g$  で5分間遠心し、上清を除去します。その後、NK細胞無血清培地を加え、細胞を再懸濁して播種し、 $37^{\circ}\text{C}$  インキュベーターで一晩保管します。
3. NK増幅試薬Aの解凍：解凍手順はステップ2を参照。遠心後、上清を除去し、NK細胞無血清培地 +5%自己血漿（自己血漿が不足する場合はヒト血小板溶解物（PLT）で代替可）で細胞を再懸濁します。（NK増幅試薬は浸透圧に敏感なため、解凍プロトコルを厳密に遵守すること）

表 3：培養プロセスにおける培地量の目安\*

時間	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12- D14
量 (mL)	10	10	10	15	25	50	100	200	400	800	1000	1200	—
操作	A添加	—	—	培地追 加	培地追 加	培地 追加 フラ スコ 移行	培地追 加	B 添 加・ 培地 追加	培地 追加 バッ グ移 行	培地追 加	培地追 加	培地追 加	計数 回収
容器	T75 フラスコ					T175 フラスコ			リンパ球培養バッグ				

\*本表はあくまで参考であり、サンプル個体差により培地量は変動する可能性があるため、NK 細胞の成長状態を観察・計数分析し、最適な細胞密度を維持するよう培地追加操作を行う必要です。

4. Day0-NK細胞活性化：生きた単核細胞を採取し（新鮮分離PBMCの場合は直接 $5 \times 10^6$ 生細胞を採取、ステップ5.2の凍結保存PBMCの場合は24時間解凍平衡化後に $5 \times 10^6$ 生細胞を計数採取）、解凍したNK増幅試薬A+NK細胞無血清培地（総量10mLに調整）+5%自己血漿/PLT（0.5mL）と共にT75フラスコで混和し、37℃・5% CO<sub>2</sub>のインキュベーター内で3日間静置培養します。
5. Day3-培地追加：NK細胞無血清培地（5mL）+5%自己血漿/PLTを（0.25mL）添加します。
6. Day4-6-毎日培地追加：細胞懸濁液の色または細胞密度に基づき、NK細胞無血清培地+5%自己血漿/PLTを添加します。培地追加後の細胞密度を $0.7 \times 10^6$  cells/mL～ $1.5 \times 10^6$  cells/mL（推奨密度 $1.0 \times 10^6$  cells/mL）に維持します。以降の培地追加も同様に計算し、追加後の総量が50mLを超えた場合はT175フラスコに移して継続培養します。
7. Day7-NK細胞増幅：NK増幅試薬Bを解凍します（ステップ2.参照：NK増幅試薬Bを解凍して50mL無菌遠心管に移し、復温したNK細胞無血清培地27mLをゆっくりと滴下添加）。解凍後、NK細胞

胞無血清培地（1%自己血漿/PLT添加）でNK増幅試薬Bを再懸濁し、サンプリングして細胞数を  
計数後にフラスコに入れ、総量200mLまで培地を追加します。

8. Day8-10-毎日培地追加：培地を追加して1%自己血漿/PLTを添加します。Day8/9時点で**総量が  
200mLを超える場合は細胞培養バッグに移行します。**
9. Day11-14-培地追加/細胞回収：毎日培地を追加し、通常はDay11-14が細胞回収の最適時期です。

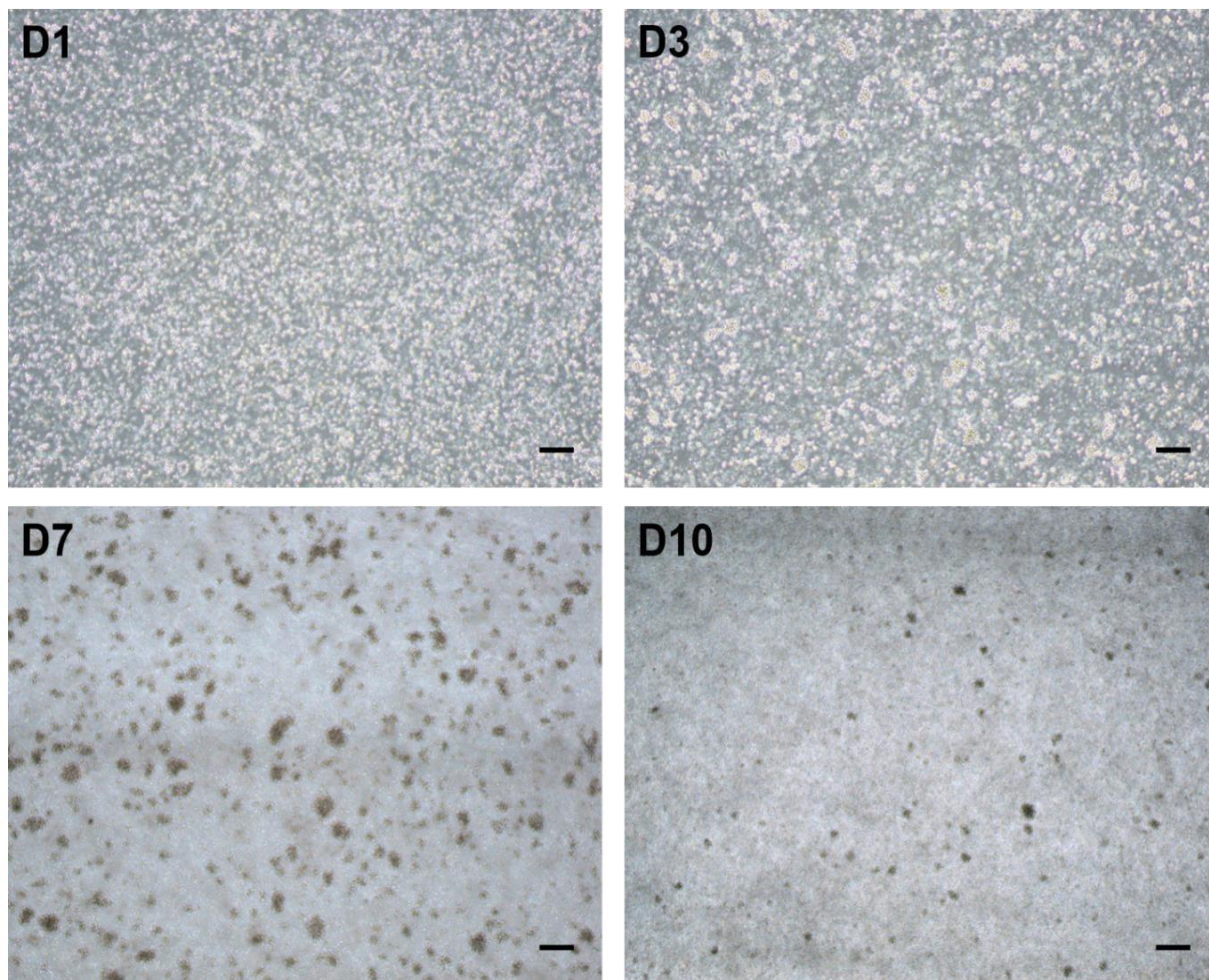


図1：PBMC由来NK細胞の増殖D1、D3、D7、D10における細胞形態 スケールバー：200μm



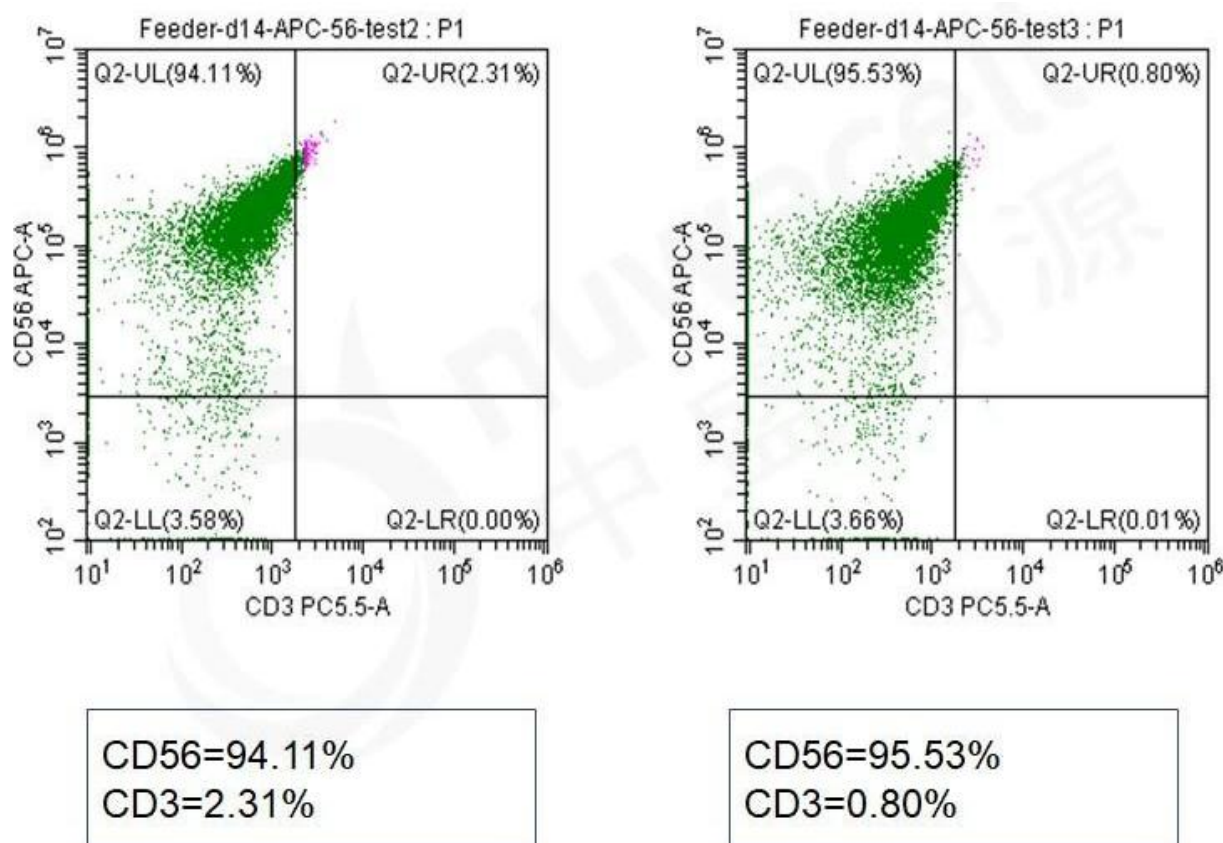


図2：培養14日後のPBNC細胞の純度測定結果（CD3-CD56+細胞比は90%を超えた）

## NK 細胞培養における問題と解決策

問題1：Day3で顕著な細胞凝集が確認されました。これは正常ですか？対処すべきですか。

回答：NK細胞はNK細胞増幅試薬と特異的に結合し活性化されます。巨視的には細胞の凝集成長として見えますが、これは正常な現象であり、活性化の成功を示しています。通常、Day7頃から凝集が緩和され、小規模な細胞塊として成長し始めます。培養全プロセスにおいて、細胞をピペッティングする必要はなく、毎日の培地追加のみで問題ありません。

問題2：細胞数計測に適した方法を教えてください。

回答：優先的に推奨するのは血球計算盤です。次に、Vicell 細胞計数器（Beckman社製）およびCountstarが挙げられます。各種計数機器間には一定の誤差が生じるため、実際の状況に応じて選択することをお勧めします。