

## NkVita 免疫細胞無血清培地

目次 # SN-03-0060 1 Kit (2 L)

### 製品概要

NkVita 免疫細胞無血清培地は、Shownin バイオテクノロジー有限会社が独自に開発したヒトナチュラルキラー細胞（NK）の増殖培養用培地です。Shownin の NK 増幅キット（RP03030）と併用することで、ヒト末梢血および臍帯血由来NK細胞の高効率な増殖（14～15日間培養すると5000～10000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）が可能です。NK細胞の純度が高い（CD3-CD56+発現率90%以上）です。

### 製品情報

表 1： NkVita 免疫細胞無血清培地-製品詳細

製品情報	品番	規格	数量	保存条件
NkVita 免疫細胞無血清培地の内容物：	SN-03-0060	1Kit (1000mL)	1	
NkVita 免疫細胞無血清培地 Supplement-01	SN-03-0061	100uL/本	1	-80 °Cまたは -20 °C
NkVita 免疫細胞無血清培地 Supplement-02	SN-03-0062	40mL/ボトル	1	-80 °Cまたは -20 °C
NkVita 免疫細胞無血清培地 Basal Medium	SN-03-0063	1L/ボトル	1	2-8 °C

### 試薬と材料

表 2：試薬&材料

試薬&材料	ブランド (e.g.)	品番 (e.g.)
NkVita 免疫細胞無血清培地	Shownin	SN-03-0060
NK 増幅キット	Shownin	RP03030

注射用組換えヒトインターロイキン-2	N/A	N/A
T75 細胞培養フラスコ	N/A	N/A
T175 細胞培養フラスコ	N/A	N/A
リンパ球培養バッグ (0.2-1.8L)	Takara	GT-T610(A)

## 単核細胞の調製

(一) 単核細胞の調製：推奨する単核細胞の供給源は一般的に末梢血であり、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。

(二) 新鮮末梢血サンプルからの分離(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)

1. **自己血漿分離**：新鮮血液を $900 \times g$ で20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. **単核細胞分離**：(二).1での血漿除去後の残存血球層を生理食塩水で1:1に希釀し、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）、 $800 \times g$ で25分間遠心し、中間の白膜層を吸引します。生理食塩水またはDPBS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。

(三) 凍結保存サンプルの処理（末梢血と臍帯血の分離方法は類似）

1 日目（凍結単核細胞の前処理）：凍結保存した単核細胞は、使用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、復温したNkVita Basal Medium 20mLをゆっくり滴下しながら混和します。全量添加後、穏やかに振り混ぜ、 $300 \times g$ で5分間遠心し、上清を除去します。その後、NkVita 免疫細胞無血清培地（ステップ5.1に従って調製）を加えて細胞を再懸濁し（細胞密度は $2 \times 10^6 / \text{mL}$ に維持）、フラスコに播種します。 $37^{\circ}\text{C}$ インキュベーターで一晩保管します。

## NK細胞の増幅（表3参照）

1. NK増幅培地の調製： NkVita Basal Medium (1L) + NkVita Supplement-02 (40mL) +IL2 (200IU/mL)。
  2. 50mL遠心管にNK増幅培地（5.1で調製済み）20mLを入れ、解凍したNkVita Supplement-01 (100μL × 2) を添加後、ピペットティング（2～3回）により均一に混和します。
  3. (Day0) NK細胞の活性化（第1回活性化）：生きた単核細胞を採取し（新鮮分離 PBMCの場合は $2 \times 10^7$ 生細胞を採取、ステップ(三).3の凍結保存PBMCの場合は24時間解凍平衡化後に $2 \times 10^7$ 生細胞を計数採取）、NK増幅試薬A1本を解凍・遠心し、上清を除去後（ステップ(三).3参照）、ステップ5.2で調製した培地20mLを加えてよく混和します。その後、細胞懸濁液をT75フラスコに移し、37 °C・5%CO<sub>2</sub>のインキュベーターで3日間静置培養します。
  4. (Day3) 培地追加：T75フラスコを取り出し、NK増幅培地 10mLを追加した後、37 °C・5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで継続培養します。
  5. (Day4-Day7) 毎日の培地追加：細胞懸濁液の色または細胞密度に基づき、NK増幅培地を添加します。培地追加後の細胞密度を $1.0 - 1.5 \times 10^6$  Cells/mLの間に維持します。以降の培地追加量も同様に計算し、追加後の総量が35mLを超えた場合はT175フラスコに移して継続培養します。
  6. (Day7) NK細胞の活性化（第2回活性化）\*：NK増幅試薬Bを解凍する（解凍はステップ(三).3を参照し、NK増幅試薬Bを解凍して50mL無菌遠心管に移した後、復温したNK細胞無血清培地27mLをゆっくり滴下します。他のステップは同じ）。解凍後、NK増幅試薬BをNK増幅培地で再懸濁し、サンプリングして細胞数を計測した後、フラスコに入れ、総液量を200mLに追加します。細胞懸濁液をよく混和した後、適切な培養容器に移し、37 °C・5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで3日間静置します。
- \*Day7での第2回活性化はあくまで参考であり、サンプル個体差により、第1回活性化後の増殖率にばらつきが生じるため、NK細胞の増殖状態を観察・計数する必要があります。総細胞数が20倍（Day7-Day9）に増殖した場合、第2回活性化を実施可能です。
7. (Day8-Day13) 培地追加：細胞懸濁液の色または細胞密度に基づき、NK増幅培地を添加します。培地追加後の細胞密度を $1.0 - 1.5 \times 10^6$  Cells/mLの間に維持します。以降の培地追加量も同様に計算し、追加後の総量が200mLを超えた場合は細胞培養バッグに移して継続培養します。培養バッグ移行後の翌日に培地を追加します。
  8. (Day14-Day15) 細胞回収：通常はDay14-15が細胞回収の最適時期です。

表3：培養プロセスにおける培地量の目安\*

时间	D0-D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12-D14
总体积 (mL)	20	30	50	100	200	400	1000	2000	2500	3000	4000
操作	加A	补液	补液	补液 转瓶	补液	转袋 加B 补液	补液	补液	补液	补液	补液/ 计数收获
容器	T75			T175			淋巴细胞培养袋				

\*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があります。