

ncKnight™ NK 増殖因子キット

目次 # SN-03-0030 1 Kit (2 L)

製品概要

ncKnight™ NK 増殖因子キットは、ヒトナチュラルキラー（NK）細胞の増幅に特化して設計された、GMP 準拠の無血清培養システムです。本システムは、末梢血および臍帯血由来 NK 細胞の効率的な増殖を可能にし、14 日間で 3,000 倍から 8,000 倍の NK 細胞数の増加を実現します。本プロトコル下では高い細胞純度が維持され、CD3- CD56+ 細胞の発現率は 80~95%以上となります。

製品情報

表 1: ncKnight™ NK 増殖因子キット 製品説明

製品名	カタログ番号	容量	保存条件
ncKnight™ NK 増殖因子キット 内容物：	SN-03-0030*	1 Kit	-
ncKnight™ NK 培地 基礎培地	SN-03-0022	2 × 1000 mL	2-8 °C
ncKnight™ NK 培地 サプリメント	SN-03-0021	2 × 40 mL	-80 °Cから-20 °C
ncKnight™ NK 増殖因子 A	SN-03-0031	1 × 270 µL	
ncKnight™ NK 増殖因子 B	SN-03-0032	1 × 120 µL	

* ncKnight™ NK 増殖因子キットは完全キットとして販売されており、コンポーネントの個別販売はございません。

試薬と材料

表2：推奨試薬&材料

製品名	カタログ番号	容量	ブランド
ncKnight™ NK 増殖因子キット	SN-03-0030	1 Kit	Shownin
NK-MAX 精製因子	SN-03-0050	625 μL	Shownin
Lymphocyte Cryopreservation Medium	SN-06-1410	50 mL	Shownin
Ficoll-Paque PLUS	-	-	cytiva
Autologous Plasma / Human Platelet Lysate	-	-	-

血漿調整 (オプション)

新鮮血を 900 × g、20 分間 (加速設定: 最低) 遠心分離する。遠心後、上清の血漿層を 50 mL チューブに回収する (残存細胞層は PBMC 分離に供する)。血漿を 56 °C で 30 分間加熱非活化後、1,200 × g、10 分間の遠心分離により沈殿を除去する。調整済み血漿は 4 °C で保存する。

NK-MAX 精製因子による前処理 (NK 細胞純度向上)

血液サンプルを新しいチューブに取り、NK-MAX 精製因子を 12.5 μL/mL 血液の割合で添加し、穏やかに混ぜ室温で 20 分間インキュベートする。その後、Ficoll-Paque PLUS を用いて PBMCs を分離する。

末梢血単核球 (PBMCs) の調製

ヒト全血から、Ficoll-Paque PLUS を用いた密度勾配遠心法により PBMCs を分離する。この PBMCs は NK 細胞増殖に直ちに使用するか、免疫細胞高効率凍結保存液 (SN-06-1410, Shownin) で凍結保存し後日使用することができる。

NK 完全培地の調整

表 3: NK 完全培地 混合比率

製品名	カタログ番号	容量	混合比率
ncKnight™ NK 培地 基礎培地	SN-03-0022	1000 mL	基礎培地 1000 mL とサプリメント 40 mL を混合し、 <u>200</u>
ncKnight™ NK 培地 サプリメント	SN-03-0021	40 mL	<u>IU/mL IL-2</u> を添加して <u>NK完全培地</u> とする。

PBMCs からの NK 細胞増幅

(2L 培養システム) PBMCs を NK完全培地 に 1×10^6 cells/mL の濃度になるように懸濁し、総量 10 mL (総細胞数 1×10^7 PBMCs) とし、これに 5 % (v/v) の自己血漿またはヒト血小板ライセートを添加した後、T75 フラスコに移す。フラスコに ncKnight™ NK 増殖因子 A を 270 μL、ncKnight™ NK 増殖因子 B を 120 μL 添加し、5 % CO₂、37 °Cで 3 日間培養する。

(1L 培養システム) PBMCs を NK完全培地 に 1.0×10^6 cells/mL の濃度になるように懸濁し、総量 5 mL (総細胞数 5×10^6 PBMCs) とし、これに 5 % (v/v) の自己血漿またはヒト血小板ライセートを添加した後、T25 フラスコに移す。フラスコに ncKnight™ NK 増殖因子 A を 135 μL、ncKnight™ NK 増殖因子 B を 60 μL 添加し、5 % CO₂、37 °Cで 3 日間培養する。

3 日目から 7 日目は、細胞密度が 1.0×10^6 cells/mL となるように、5 % (v/v) の自己血漿またはヒト血小板ライセートを添加した NK 完全培地 を継ぎ足す。

8 日目から 15 日目は、細胞密度が 1.0×10^6 cells/mL となるように、1 % (v/v) の自己血漿またはヒト血小板ライセートを添加した NK 完全培地 を継ぎ足す。推奨される培地添加量は下記表を参照のこと。

NK 細胞の回収、14~16 日間培養後、細胞密度は $2-3 \times 10^6$ cells/mL になっている (2L システムでは総細胞数 $4-6 \times 10^{10}$ 個、1L システムでは $2-3 \times 10^{10}$ 個)。その後、 $200 \times g$ で 10 分間遠心し NK 細胞を回収する。

表 4: 培養スケジュールと推奨培養容器

	日	0	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1 5	
2 L シ ス テ ム	容量 (mL)	1 0	1 0	1 5	2 0	3 5	7 0	15 0	30 0	45 0	60 0	100 0	160 0	200 0	2000	
	容器	T75				T175/T225 フラス コ				培養バッグ						
1 L シ ス テ ム	容量 (mL)	5	5	7	1 0	1 7	3 5	70	15 0	22 5	30 0	500	800	100 0	1000	
	容器	T25			T175/T225 フラスコ							培養バッグ				