

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、 200 IU/mL IL-2 を添加して NK 完全培地 とする。
ncKnight™ NK 培地 サプリメント	SN-03-0021	40 mL	

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 μ L**、ncKnight™ NK 増殖因子 B を **120 μ L** 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 μ L**、ncKnight™ NK 増殖因子 B を **60 μ L** 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 × 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	15
2 L シ ス テ ム	容量 (mL)	10	10	15	20	30	70	150	300	450	600	1000	1600	2000	2000
	容器	T75				T175/T225 フラスコ			培養バッグ						
1 L シ ス テ ム	容量 (mL)	50	50	70	100	100	300	700	1500	2200	3000	5000	8000	10000	10000
	容器	T25		T175/T225 フラスコ					培養バッグ						