

NkVita 免疫細胞無血清培地-取扱説明書

一、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公司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。

二、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	-20℃または-80℃
NkVita 免疫細胞無血清培地 Supplement-02	SN-03-0062	40mL/ボトル	1	-20℃または-80℃
NkVita 免疫細胞無血清培地 Basal Medium	SN-03-0063	1L/ボトル	1	2-8℃

三、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	NA	NA
T75細胞培養フラスコ	NA	NA
T175細胞培養フラスコ	NA	NA
リンパ球培養バッグ (0.2-1.8L)	Takara	GT-T610(A)

四、単核細胞の調製

- 4.1. **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。
- 4.2. **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)**
- 4.2.1. **自己血漿分離**：新鮮血液を900×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℃ウォーターバスで30分間不活化処理した後、1200×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℃冷蔵庫で保存します。
- 4.2.2. **単核細胞分離**：4.2.1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）、800×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×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。

4.3. 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℃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×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℃インキュベーターで一晩保管します。

五、NK細胞の増幅（表3参照）

- 5.1. **NK 増幅培地**の調製：NkVita Basal Medium（**1L**）+ NkVita Supplement-02（40mL）+IL2（200IU/mL）。
- 5.2. 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、ピペティング（2～3回）により均一に混和します。
- 5.3. **（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 2×10^7 生細胞を採取、ステップ4.3の凍結保存PBMCの場合は24時間解凍平衡化後に 2×10^7 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4.3参照）、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℃・5%CO₂のインキュベーターで3日間静置培養します。
- 5.4. **（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℃・5% CO₂インキュベーターで継続培養します。
- 5.5. **（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 **$1.0 - 1.5 \times 10^6 \text{ Cells/mL}$** 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。

5.6. **(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4.3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℃・5% CO₂-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。

5.7. **(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 -1.5x10⁶ 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。

5.8. **(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*

時間	D0-D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12-D14
总体積 (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です。