

ncKnight® NK増幅因子キット-取扱説明書

一、製品概要

ncKnight® NK増幅因子キットは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）の増殖培養に使用される**純粋因子培養システム**です。本キットを用いることで、ヒト**末梢血由来NK細胞**の効率的な増殖が可能であり、**13～15日間培養すると3000～6000倍増殖可能（PBMNCにNK細胞が10%含まれる場合を基準にした計算値）**です。NK細胞の純度が高い（CD3-CD56+は80%～95%以上の**発現率を達成可能**）です。

二、製品情報

表 1：ncKnight® NK 増幅因子キット製品詳細

製品情報	品番	規格	数量	保存条件
ncKnight® NK増幅因子キットの内容物	SN-03-0030	1Kit(2L)	1	
ncKnight® NK 増幅因子 A	SN-03-0031	270 µL	1	-20-80℃で保存、ドライアイスで輸送
ncKnight® NK 増幅因子 B	SN-03-0032	120 µL	1	
ncKnight® NK 増幅培地	SN-03-0020	1L /ボトル	2	4℃で保存、2-8℃で輸送

三、試薬と材料

表2：推奨関連試薬&材料

試薬&材料	ブランド (e.g.)	品番 (e.g.)
ncKnight® NK増幅因子キット	Shownin	SN-03-0030
注射用組換えヒトインターロイキン-2	金絲利	国薬准字 S10970058
ヒト血小板分解液 (PLT)	NA	NA
DPBS	Gibco	C14190500BT
生理食塩水	安徽双鶴薬業	国薬准字 H34023608
6ウェルプレート	Nunc	140675
T182細胞培養フラスコ	広州潔特	TCF102600
リンパ球培養バッグ (0.2-1.8L)	Takara	GT-T610(A)

注：国薬准字は中国国家医薬品监督管理局承認医薬品（番号）です。

四、単核細胞の調製

4.1 単核細胞の調製：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 末梢血新鮮サンプルの分離

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（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）。

4.3 凍結末梢血サンプルの処理

DAY -1：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、少なくとも3,000万のPBMCを解凍します。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NK増幅完全培地20mLをゆっくり滴下しながら均一に振り混ぜる。全量添加後、緩やかに振り混ぜ、300×gで5分間遠心し、上清を除去します。その後、NK増幅完全培地を加えて細胞を再懸濁し(PBMCの密度は $2 \times 10^6/\text{mL}$ に維持)、T75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、活性化・増殖培養

5.1 **NK 増幅完全培地の調製**：NK 増幅培地+IL-2（200 IU/mL）。

- 5.2 活性化培地の調製：10mLのNK増幅完全培地+5%自己血漿/PLTを50mL遠心管に入れます。解凍したNK増幅因子A、Bを添加し、ピペッティング（2～3回）で十分に混和します。
- 5.3 **DAY0 -NK** 細胞の活性化：単核細胞を採取します（新鮮分離PBMCの場合は $5-10 \times 10^6$ 生細胞を採取、ステップ4.3の凍結解凍PBMCの場合は24時間解凍平衡化後に $5-10 \times 10^6$ 生細胞を計数採取）。 5×10^6 細胞の場合は5mLの活性化培地を添加し、 10×10^6 細胞の場合は10mLの活性化培地を添加します。よく混和した後、細胞懸濁液をT25/T75フラスコに移し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ のインキュベーターで3日間静置します。
- 5.4 **DAY3 -培地追加**： 5×10^6 PBMCを開始点とした場合は、5mLのNK増幅完全培地+5%自己血漿/PLTを追加し、 10×10^6 PBMCを開始点とした場合は、10mLのNK増幅完全培地+5%自己血漿/PLTを追加し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ インキュベーターで培養します。
- 5.5 **DAY4-7 -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 増幅完全培地+5%自己血漿/PLTを添加します。培地追加後の細胞密度を 0.7×10^6 Cells/mL - 1.5×10^6 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50mLを超えた場合はT182/T175フラスコに移して継続培養します。
- 5.6 **DAY8-12 -培地追加**：細胞懸濁液の色または細胞密度に基づき、NK 増幅完全培地+2%自己血漿/PLTを添加します。培地追加後の細胞密度を $0.7.0 \times 10^6$ Cells/mL - 1.5×10^6 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。（Day8/9頃）。
- 5.7 **DAY13-16 -細胞回収**：通常は13～16日目が細胞回収の最適時期です。

表 3：NK細胞培養プロセスにおける培地容量の目安*

時間	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D12	D1 3- D1 6
容量 (mL)	10	10	20	40	80	160	320	640	1000	1500	2000	2000
操作	活性化	--	--	培地追加	培地追加	培地追加	培地追加	培地追加 バッグに移行	培地追加	培地追加	培地追加	培地追加
培養容器	T75			T182				リンパ球培養バッグ				

*本表はあくまで参考であり、 10×10^6 個の生細胞の開始点を例とします。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。