

# KBM NK kit

簡易マニュアル

コージンバイオ株式会社



# 1. キットの説明

## 1-1. キット概要

本キットは、ヒト末梢血リンパ球からNK細胞を選択的に培養できるキットです。

実際の培養試験において、細胞数としては最大30億~36億細胞まで増殖することが可能で、多くの試験にて50%以上がNK細胞となることがわかっています（※1）。

## 1-2. キットの構成

キットの構成内容は以下の通りです。

番号	名称	用途
①	NKCC- b	培養バッグ
②	NKCC- c	コーティング剤
③	NKCC-1	初代培養用培地
④	NKCC-2	拡大培養用培地



（※1）NK比率には、個人差があるため50%を超えないことも稀にあります。

## 2. 利用手順

### 2-1. コーティング方法

準備するもの

- ・ NKCC- c
- ・ 15mLもしくは50mLのチューブ
- ・ 75cm<sup>2</sup>フラスコ

方法

- 1) NKCC-c 1mLを13mLのD-PBS(-)へ添加する（写真1）。
- 2) 14mLのコーティング液を75cm<sup>2</sup>フラスコに全量添加する（写真2）。
- 3) コーティング液を添加したフラスコを冷蔵（2-8℃）であれば一晩、37℃であれば4時間静置する。
- 4) 静置後、コーティング液を除去し、D-PBS(-)で2回洗浄する。
- 5) 使用時まで冷蔵（2-8℃）保存する（乾燥しなければ数日間は無問題なく使用可能）。

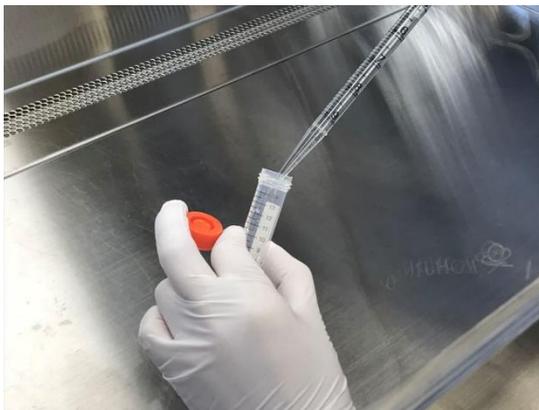


写真1 コーティング液の調整



写真2 フラスコへのコーティング液添加

## 2. 利用手順

### 2-2. 培養方法

準備するもの

- ・ヒト末梢血（30～50mL）PBMC採取用途（ヘパリン管を使用）
- ・ヒト末梢血（10～20mL）自己血清採取用途（プレイン管を使用）
- ・NKCC-1
- ・NKCC-2
- ・NKCC- b

- 1) ヒト末梢血30mL～50mLからPBMCを密度勾配遠心法（Ficollなどを使用）で単離する。この際、遠心管上清の血漿は、培養に使用するので別容器に保存する。
- 2) チュルク氏液などを用いて細胞数をカウントする（有核細胞のみで、赤血球はカウントしない）。
- 3) NKCC-1に血清を10%添加し、細胞密度40万細胞/cm<sup>2</sup>、細胞濃度100万細/mLになるように細胞を播種する（75cm<sup>2</sup>フラスコであれば3000万細胞程度）。
- 4) 37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベータに4～6日間静置する。
- 5) 4～6日経過後、写真3のように培養液が黄色く変色し、コロニーの形成を確認できたら、細胞数をカウントし、細胞数が2～3倍に増殖していたら遠心管に細胞懸濁液を移し、1200rpm、5分遠心して上清液を除去して細胞を回収する。

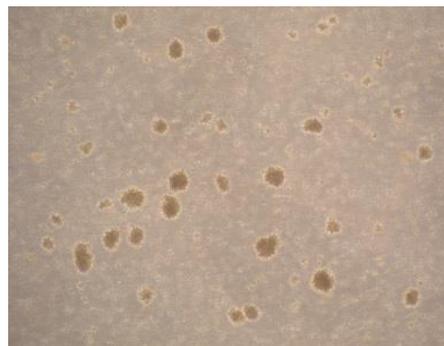
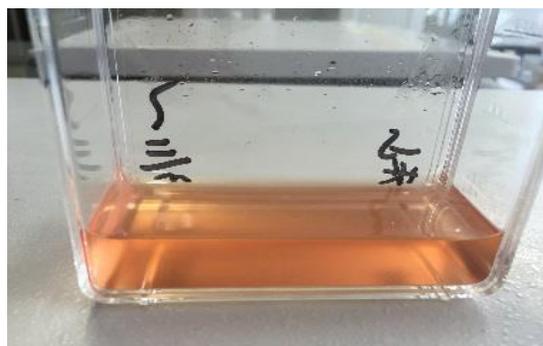


写真3 培養液の変色（左）とコロニー形成（右）

## 2-2. 培養方法（つづき）

- 6) 写真4のように、ポートのキャップを外したNKCC- bを50mL程度のシリ  
ンジに結合し、回収した細胞をNKCC-2に再懸濁し、培養液と細胞懸濁液  
を注ぐ。この際の細胞濃度の目安は50万細胞/mLとする。  
また、この際PBMCを単離した際に採取した血漿を非働化して全量加える。
- 7) 細胞数が200万細胞/mLを超えないように、数日おきに25万細胞/mL程度  
になるように培養液を添加し、10日~14日培養後細胞密度が200万  
~300万細胞/になったら回収する。



写真4 NKCC- bへの培養液の充填方法

- ① キャップ装着時のシリリンジポート
- ② キャップ脱着時のシリリンジポート
- ③ NKCC- bとシリリンジの結合
- ④ 培養液充填

### 3. 培養例

#### 培養条件

細胞：PBMC

初代培養用培地：NKCC-1+10%ヒト血清

拡大培養用培地：NKCC-2+ヒト血漿（非働化）

初代培養用フラスコ：T75フラスコ（Corning、430641U）をNKCC-cでコーティング

拡大培養用バッグ：NKCC-b

1. PBMC  $2.0 \times 10^7$ 細胞をコーティングしたT75フラスコへ播種（NKCC-1 20mL、血清 2mL添加）し、37℃、5%CO<sup>2</sup>インキュベータにて静置培養。
2. 培養5日後、細胞数が $8.2 \times 10^7$ 細胞となっていたので回収（1200rpm×5min）。
3. 細胞濃度が40万細胞/mL程度になるように200mLのNKCC-2を添加。その際PBMC分離時に取得したヒト血清を非働化して添加（10mL）。
4. 培養7日後、培養液が黄色く変色したのを確認し、残りのNKCC-2を800mLをバッグに添加。
5. 培養10日後、細胞数をカウントし、フローサイトメーターにて細胞表面マーカーの確認およびK562を使用した細胞障害活性の測定を実施。

Table1 細胞数の変化

培養日数	細胞数	細胞生存率
0	$2.0 \times 10^7$	—
5	$8.2 \times 10^7$	—
10	$3.7 \times 10^9$	94.6%

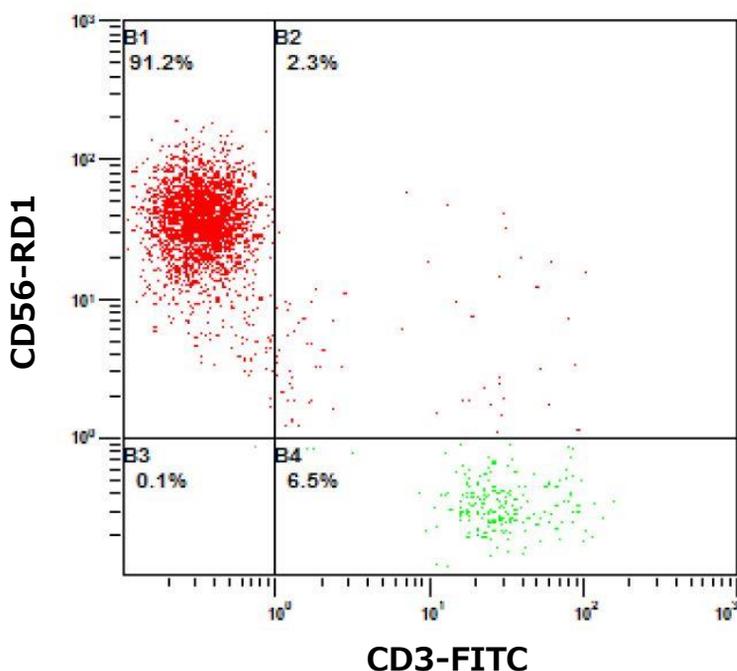


Fig.1 フローサイトメトリー測定結果

Table2 細胞障害活性測定結果

E/T 比	Cytotoxicity	
	2 hr	4 hr
12	100%	100%
24	100%	100%

Table3 フローサイトメトリー測定結果(まとめ)

マーカー	比率
CD56+/CD3-	91.2%
CD56+/CD3+	2.3%
CD56-/CD3+	6.5%
CD56-/CD3-	0.1%

## 4. お問い合わせ先

会社名	コージンバイオ株式会社
本社	〒350-0214 埼玉県坂戸市千代田5丁目1番地3 TEL:049-284-3781
東京営業所	〒170-0013 東京都豊島区東池袋1丁目21番11号 オーク池袋ビルディング5階 TEL:03-5459-1575
大阪事業所	〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目11番10号 第3中島ビル10階 TEL:06-6838-3977
福岡営業所	〒812-0013 福岡県福岡市博多区博多駅東2丁目8番10号 TOFUKU3