



For research use only. Not for clinical diagnosis.

Neuronal stem cell line 1464R, Rat

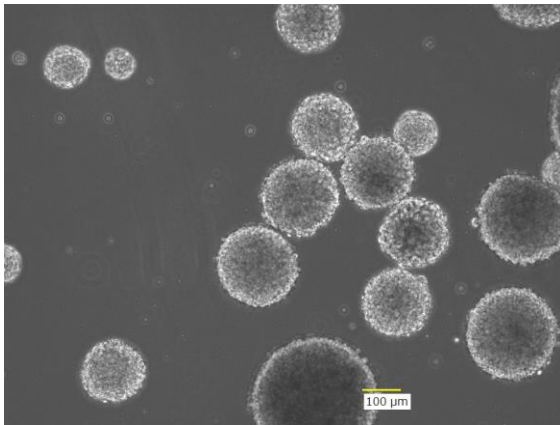
Rat neuronal stem cell line 1464R, Catalog No. RNSCL-C

July 1, 2024

I. Product Overview

Neural stem cell line 1464R is a spontaneously immortalized cell line obtained from brain stem cultures of adult male Fischer 344 rats. It can be cultured for a long period of time and maintained without morphological changes even after repeated passaging. In the presence of retinoic acid, 1464R cells stop dividing and differentiate mainly into tubulin beta-III (TuJ1)-positive neurons. They also differentiate into GFAP-positive astrocytes and O4-positive oligodendrocytes as glial cell lineages.

This product was established by Professor Kazuhiko Watabe of the Laboratory of Molecular Neurobiology, Kyorin University School of Health Sciences, and is sold under license from the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science.



Floating culture of neurosphere (undifferentiated)

II. Precautions before use

Please review this manual before use.

All of this product should be performed under [aseptic operation]. The biosafety level is [Level 1].

For culturing this product, use a medium prepared with the recommended medium or a supplement for the cultured medium (sold separately).

III. Product Warranty

We guarantee against growth failure after the start of culture only when cells are properly stored in liquid nitrogen and cultured according to the manual using the dedicated medium and reagents.

Our company, Product Support (e-mail: bio-products@cosmobio.co.jp) for more information on how to get in touch with us.

The warranty period is [within 6 months from receipt of product].

Please note that the warranty does not apply if any changes are made to the culture medium or method of use, or if re-frozen cells are used.

IV. Component

Product name	Size	Storage	Warranty period
Neuronal stem cell line 1464R, Rat	1 vial (1×10 ⁶ cells/vial)	Store in liquid nitrogen	6 months

*If you do not use the frozen cells immediately after receipt, please store them in liquid nitrogen.

*The cells may only be used for your own research purposes and may not be provided (distributed, loaned, transferred, licensed for use, etc.) to any third party in accordance with the license agreement with the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science regarding this product.

*Cells have been verified as negative for mycoplasma infection.

V. Cell origin

Derived from brain stem tissue containing rat facial nerve nuclei (Fischer 344 male, adult)

VI. Recommended medium and coatings (sold separately)

Product name	Catalog no.	Size	Storage	Validity period
Supplement for Maintaining 1464R cells* ¹	RNSCL-SM	Growth factor 6mL x 1 Antibiotics 2.5mL x 1	Stored at -20°C (After mixing Stored at 4°C)	Indicated on bottle
Coating powder A for Maintaining 1464R* ² cells	RNSCL-CS A01	1 bottle	Store at room temperature	Indicated on bottle
Differentiation Medium for 1464R cells* ³	RNSCL-DM	Basic culture medium 500mL x 1 Serum 25mL x 1 Supplement 100µL x 1 Antibiotics 2.5mL x 1	Medium, Serum, Antibiotics Stored at -20°C supplement Stored at -80°C (After mixing Stored at 4°C)	Indicated on bottle
Coating Solution B for Differentiating 1464R cells	RNSCL-CS B	1mL x 1	Stored at -20°C (After preparation Stored at 4°C)	Indicated on bottle

*1: In addition to supplements,

the Neurobasal™ Medium: Thermo Fisher Scientific K.K., Cat No. 21103049

B-27™ Supplement (50x), serum free: Thermo Fisher Scientific K.K., Cat No. 17504044 is required.

*2: Coating powder A should be dissolved 2 to 3 days prior to use.

*3: In addition to the differentiation medium

B-27™ Supplement (50x), serum free: Thermo Fisher Scientific K.K., Cat No. 17504044

N-2 Supplement (100x): Thermo Fisher Scientific K.K., Cat No. 17502048 is required.

VII. Instruction for Use

This product is [Subculture possible].

Preparation of Coating Solution A for Maintaining 1464R cells

* Coating Solution A for Maintaining 1464R cells should be dissolved 2 to 3 days prior to use.

[To be prepared]

- Coating powder A for Maintaining 1464R cells
- 99.5% ethanol and sterile MilliQ water

[Preparation of Coating Solution A]

1. Prepare 50 mL of 95% ethanol by mixing 99.5% ethanol and sterile MilliQ water on a clean bench.
2. Add 50 mL of 95% ethanol to the Coating Powder A bottle on a clean bench, add a sterile stirrer, and close the lid tightly.
3. Stir the mixture for 1 hour while heating it in a stirrer that can be heated to 37°C or in a 37°C water bath.
* **lumpy powder is very hard to dissolve, so please keep heating and stirring until it dissolves.**
4. When some of the granular material is no longer visible, allow to stand at room temperature for 2 to 3 days to dissolve completely.

Maintaining medium preparation and coating

[To be prepared]

- 100mm dish for cell culture
* Recommends culture containers with removable lids such as dishes or plates for drying during coating.
- Supplement for Maintaining 1464R cells
- Coating Solution A for Maintaining 1464R cells
- Neurobasal™ Medium: Thermo Fisher Scientific K.K., Cat No. 21103049
- B-27™ Supplement (50x), serum free: Thermo Fisher Scientific K.K., Cat No. 17504044
- PBS(-)

[Preparation of culture medium for maintenance]

1. Add 10 mL of pre-thawed B-27™ Supplement (50x) at 4°C to 500 mL of Neurobasal™ Medium.
2. Thaw the Supplement for Maintaining 1464R cells (growth factor and antibiotic) at 4°C in advance and add 6 mL of growth factor and 2.5 mL of antibiotic to the medium.
3. Store at 4°C after preparation.

[Coating for Maintaining]

1. Prepare enough dishes, plates, etc. for the culture.
2. Add Coating Solution A for Maintaining 1464R cells to each container according to the table below and spread to ensure uniformity.
3. Allow to dry completely in a clean bench with the container lid open until the liquid is gone (1-2 hours required).
4. After drying, store in plastic wrap or an airtight bag at room temperature.
5. Wash 1~2 times with PBS(-), etc. immediately before use.

Culture Vessels	Amount of coating agent added	Culture Vessels	Amount of coating agent added
100 mm dish	3.3mL	60mm	1.3mL
35mm	540µL	12well	250µL
24well	120µL	48well	60µL
96well	30µL		

Cell thawing and seeding

*The following is the protocol for culturing in 100 mm dishes.

[To be prepared].

100 mm dishes with maintenance coating

Pre-prepared maintenance medium

PBS(-)

1. Wash the coated 100mm dish with PBS (-) or similar 1~2 times.
2. Thaw vials of frozen cells by heating them in 37°C warm water for 2 minutes.
***If you need more time to transfer frozen vials from liquid nitrogen, place them on dry ice, etc.**
3. Thawed cell suspension should be transferred to a 50 mL centrifuge tube containing 9 mL of medium previously brought to room temperature, mixed, and then 1 mL of the medium in the centrifuge tube should be removed and the vial should be co-washed to collect the cell suspension.
4. Centrifuge at 120 x g for 5 minutes at room temperature.
5. After centrifugation, remove the supernatant, add 20 mL of medium, pipette, and resuspend the cells.
6. Seed 10 mL each of the cell suspension into two 100 mm dishes for cell culture and incubate in a 37°C incubator in the presence of 5% CO₂.
7. Medium replacement should be performed every 2 to 3 days using medium heated to 37°C. To avoid aspirating floating neurospheres, tilt the dish just enough so that the medium does not spill over (so that the neurospheres are on one side), and slowly aspirate half of the medium (about 5 mL) with a pipette from the surface of the liquid on the opposite side of the tilt.

*As aspiration with a pipette with adjustable speed and volume is recommended, as aspiration with a suction device or similar device may result in excessive aspiration.
8. Add about the same amount of medium (about 5 mL) as the aspirated medium and incubate in the incubator again.

*Neurospheres will be formed in 3-7 days.

Subculturing of cells

[To be prepared].

Maintenance coated 100mm dish

Pre-prepared maintenance medium

1000µL micropipette

1. The timing of passaging should be done when the neurospheres reach the same size (100 to 200 µm in diameter), as shown in the culture photograph in Figure 1.

***If the neurosphere size is increased too much, problems such as undistributed neurospheres and necrosis in the center of the neurosphere are more likely to occur, so we recommend twice**

weekly passages after the first passages after thawing.

***The size of the neurospheres can vary considerably. If the center of a larger neurosphere becomes necrotic or the periphery of the neurosphere crumbles, it is overconfluent and should be passaged before that happens.**

2. Collect all floating neurospheres with the entire medium in a 50-mL centrifuge tube.
3. Centrifuge at 120 x g for 5 minutes at room temperature.
4. After removing the supernatant, add 1 to 2 mL of medium and pipette 20 to 30 times with a micropipette.

*If most of the cells are distributed in Single cell or a few clumps, there is no problem.

5. Add 10mL/dish of maintenance medium to the coated dish.
6. Seed the dispersed cell suspension to a split ratio (1:5 to 1:10).
7. Incubate in a 37°C incubator in the presence of 5% CO₂.
8. If medium replacement is necessary, perform it every 2 to 3 days using medium heated to 37°C. To avoid aspirating floating neurospheres, tilt the dish just enough so that the medium does not spill (so that the neurospheres are on one side), and slowly aspirate half of the medium with a pipette from the surface of the liquid on the opposite side of the tilt.

*Basically, for twice-weekly passages, it is better to passage than to change the medium.

9. Add about the same amount of medium as the aspirated medium and incubate in the incubator again.

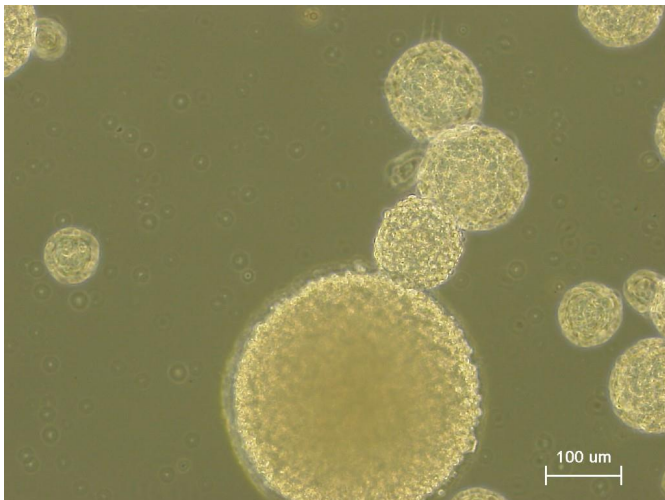


Figure 1: Neurosphere on day 7 of culture after thawing and seeding.

Preparation of frozen stock

[To be prepared].

COS banker (Cat No. COS-CFM01)

1000μL micropipette

Tubes for cryopreservation

Container for freezing cells (Cat No. BCS-136 or equivalent)

1. Perform cell passaging methods 1-3.

2. After centrifugation, remove the supernatant, add 1 to 2 mL of COS banker (Cat No. COS-CFM01) and pipet 20 to 30 times with a micropipette.
3. Count the number of cells and add COS banker to reach 1×10^6 cells/mL.
4. Dispense at 1mL/tube into cryopreservation tubes and freeze at -80°C using a cell-freezing container.
5. After frozen at -80°C for at least 1 day, transfer to liquid nitrogen.

Preparation and coating of differentiation medium

[To be prepared]

- Culture vessel for cell culture (dish, plate, flask, etc.)
- Differentiation Medium for 1464R cells
- Coating Solution B for Differentiating 1464R cells
- B-27™ Supplement (50x), serum free: Thermo Fisher Scientific K.K., Cat No. 17504044
- N-2 Supplement (100x): Thermo Fisher Scientific K.K., Cat No. 17502048
- Sterile ultrapure water
- PBS(-)
-

[Preparation of differentiation medium]

1. Thaw the basic medium, serum, supplements and antibiotics supplied with the differentiation Medium for 1464R cells at 4°C beforehand.
2. Thaw B-27™ Supplement and N-2 Supplement at 4°C prior to use.
3. Add 25mL of thawed serum, 100μL of supplement, and 2.5mL of antibiotic to 500mL of basic medium.
4. Add 5 mL (x100) of B-27™ Supplement and 2.5 mL (x200) of N-2 Supplement.
5. Store at 4°C after preparation.

***After preparation of the medium, avoid storing in direct sunlight or in places where it is constantly exposed to light, as the supplement is sensitive to light.**

***To prevent light-induced deterioration of the contained supplements, we also recommend that excess medium be aliquoted at -20°C and stored frozen (multiple freeze-thaw cycles are not recommended).**

[Coating for differentiation]

1. Prepare enough dishes, plates, etc. for the culture.
2. Thaw the coating Solution B for Differentiating 1464R cells and add to sterile ultrapure water to x 100.
3. Add to each container according to the table below and spread evenly.
4. Place in a 37°C incubator overnight or longer with the lid closed.
5. Wash twice with PBS(-), etc. immediately before use.

Culture Vessels	Amount of coating agent added	Culture Vessels	Amount of coating agent added
100 mm dish	5.5mL	60mm	2.1mL
35mm	0.9mL	12well	0.4mL
24well	0.2mL	48well	100μL
96well	50μL		

Culture differentiation

[To be prepared]

Differentiation coated culture vessel

Pre-prepared differentiation medium

1000 μ L micropipette

1. Perform cell passaging methods 1-3.
2. After removing the supernatant, add 1 to 2 mL of differentiation medium and pipette 20 to 30 times with a micropipette.

*If most of the cells are resolved into single cells or a few clumps, there is no problem.

3. Count the number of cells and seed into differentiation coated culture vessels at a density of 1.5 to 2 x 10⁴ cells/cm² with the appropriate amount of differentiation medium.
4. Incubate in a 37°C incubator in the presence of 5% CO₂.

*Unlike floating cultures in the neurosphere for maintenance of undifferentiation, cells adhere and differentiate.

5. Medium should be changed every 2 to 3 days with medium heated to 37°C, replacing the entire medium, taking care not to detach the cells.

*It will begin to differentiate about 10 hours after seeding. It takes about 7 to 10 days for complete differentiation. Since they do not proliferate after differentiation, they can be maintained in a differentiated state for 1 to 2 months (medium change is necessary).

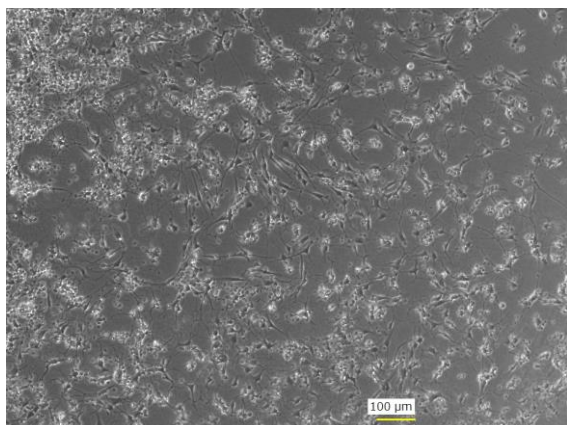
VIII. Q&A

1. How long can the cells be cultured for? What is the number of passages?

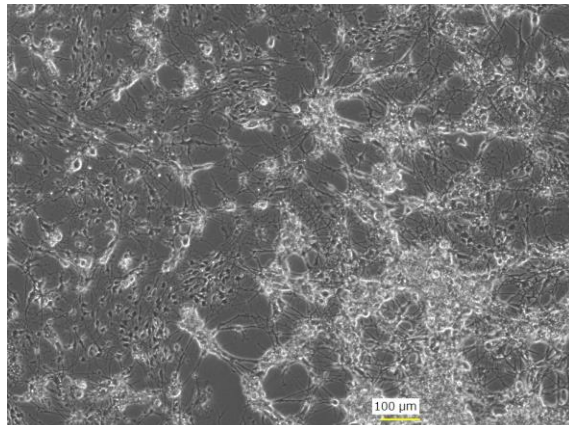
Ans. According to the developer's experience, it has been confirmed that up to 50-70 passages are possible. The number of passages depends on the lot size, so please contact us for more information.

2. Is it possible to control the differentiation ratio?

Ans. Because these cells are not used in which forced differentiation agents, the final convergence is approximately 70% neurons, 20% astrocytes, and 10% oligodendrocytes. Therefore, it is not possible to control the ratio.



Culture Example: Differentiation Day 3



Differentiation day 10

*Since cells spontaneously form clumps, the condition of cells varies depending on the location of

observation. The above photo is an example.

IX. Technical Information

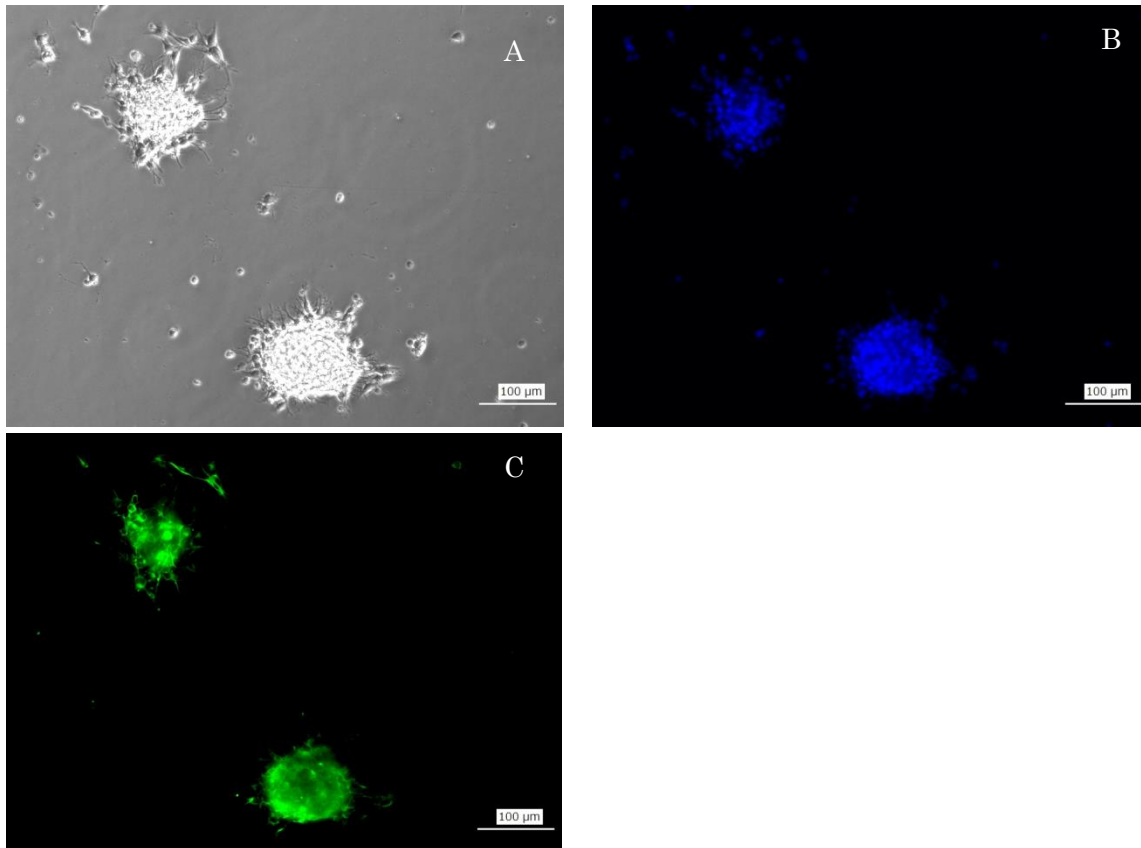


Figure 2: Immunostaining photographs in the undifferentiated state (A: phase contrast image, B: nuclear staining, C: Anti-Nestin antibody)

X. References

- 1) Watabe K, Akiyama K, Kawakami E, Ishii T, Endo K, Yanagisawa H, Sango K, Tsukamoto M. Adenoviral expression of TDP-43 and FUS genes and shRNAs for protein Neuropathology. 2014 Feb;34(1):83-98. doi: 10.1111/neup.12058. PMID:23937386.
- 2) Ishii T, Kawakami E, Endo K, Misawa H, Watabe K. Myelinating cocultures of rodent stem cell line-derived neurons and immortalized Schwann cells. Neuropathology. 2017 Oct;37(5):475-481. doi: 10.1111/neup.12397. doi: 28707715.
- 3) Ishii T, Kawakami E, Endo K, Misawa H, Watabe K. Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by PLoS One. 2017 Jun 9;12(6):e0179375. doi: 10.1371/journal.pone.0179375. PMID: 28599005.
- 4) Watabe K, Kato Y, Sakuma M, Murata M, Niida-Kawaguchi M, Takemura T, Hanagata N, Tada M, Kakita A, Shibata N. Praja1 RING-finger E3 ubiquitin ligase Neuropathology 2020;40(6):570-586. doi: 10.1111/neup.12694. PMID: 32686212.

凍結株化細胞製品

1464R ラット由来神経幹細胞株

【 1464R Rat neuronal stem cell line, 品番：1464R-RNSCL-C】

2024年7月1日改訂

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

XI. 製品概要

神経幹細胞 1464R 細胞は、Fischer 344 ラット（成体・オス）の脳幹培養から得られた自然に不死化した細胞株です。長期間培養が可能であり、継代を重ねても形態の変質等がなく維持が可能です。レチノイン酸の存在下では、1464R 細胞は分裂を停止し、主にチューブリン β -III (TuJ1) 陽性の神経細胞に分化します。さらにグリア細胞系として GFAP 陽性のアストロサイトや O4 陽性のオリゴデンドロサイトにも分化します。

本製品は杏林大学・保健学部 分子神経生物学研究室 渡部 和彦 特任教授が樹立され、公益財団法人東京都医学総合研究所のライセンスを受けて販売しています。

XII. 使用前注意事項

本マニュアルを使用前に必ずご確認ください。

本製品はすべて【無菌操作】で実施して下さい。バイオセーフティーレベルは【レベル1】です。

本製品の培養には別売の専用メディウム又は専用培地用サプリメントにて調製したメディウムをご使用下さい。

XIII. 製品の保証について

細胞を液体窒素にて正しく保存し、専用メディウム及び試薬を用いてマニュアル通りに培養された場合のみ、培養開始後の増殖不良に関して保証致します。

当社、製品サポート（メール：bio-products@cosmobio.co.jp）までご連絡下さい。

保証期限は【製品お受け取りから6ヶ月以内】です。

メディウムや使用方法に変更を加えられた場合や、再凍結した細胞を使用された場合は、保証の対象になりませんのでご注意ください。

XIV. 製品構成

構成	容量	本数	保存方法	有効期限
1464R ラット由来神経幹細胞株（凍結細胞）	1×10 ⁶ cells/vial	1本	液体窒素保存	6ヶ月

※受け取り後、直ちにご使用にならない場合は凍結細胞を液体窒素にて保存してください。

※本製品に関し、公益財団法人 東京都医学総合研究所とのライセンス契約に基づき、自己の研究目的にのみ使用し、細胞の第三者への提供（分配、貸与、譲渡、使用許可等）を禁止します。

XV. 細胞の由来

ラット顔面神経核を含む脳幹組織由来 (Fischer 344 male, adult)

XVI. 専用メディウム及びコーティング剤 (別売)

品名	品番	容量	保存方法	有効期限
1464R 用維持培地 サプリメント※1	RNSC-SM	増殖因子 6mL×1 本 抗生剤 2.5mL×1 本	-20℃保存 (混合後 4℃保存)	ボトル記載
1464R 細胞維持用 コーティング溶液 A※2	RNSC-CSA	50mL×1 本 (Ready to Use)	室温保存	ボトル記載
1464R 細胞維持用 コーティング剤 A (粉末) ※2	RNSC-CSA01	1 本	室温保存	ボトル記載
1464R 用分化培地※3	RNSC-DM	培地 500mL×1 本 血清 25mL×1 本 サプリメント 100μL×1 本 抗生剤 2.5mL×1 本	培地・血清・抗 生剤 -20℃保存 サプリメント -80℃保存 (混合後 4℃保存)	ボトル記載
1464R 細胞分化用 コーティング溶液 B	RNSC-CSB	1mL×1 本	-20℃保存 (調製後 4℃保存)	ボトル記載

※1：サプリメントの他に、

Neurobasal™ Medium : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 21103049

B-27™ Supplement (50×), serum free : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 17504044

が必要になります。

※2：コーティング溶液 A は Ready to Use ですが、コーティング剤 A (粉末) は使用する 2~3 日前に溶解・調製する必要があります。

※3：分化培地の他に、

B-27™ Supplement (50×), serum free : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 17504044

N-2 Supplement (100×) : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 17502048

が必要になります。

XVII. 操作方法

※本製品は【継代可能】です。

1464R 細胞維持用コーティング溶液 A の調製

※1464R 細胞維持用コーティング剤 A (粉末) は使用する 2~3 日前に溶解・調製を行ってください

【準備するもの】

- ・ 1464R 細胞維持用コーティング剤 A (粉末)
- ・ 99.5 エタノール及び滅菌された超純水

【コーティング溶液 A 調製】

1. クリーンベンチ内で 99.5%エタノールと滅菌 MilliQ 水を混合し、50mL の 95%エタノールを調製してください。
2. クリーンベンチ内で 50 mL の 95%エタノールを 1464R 細胞維持用コーティング剤 A (粉末) のボトルに加え、滅菌した撈拌子を加えて、蓋をしっかり閉めてください。
3. 37°Cに加熱できるスターラーまたは 37°Cのウォーターバスで加熱しながら 1 時間撈拌してください。
*塊状の粉末は非常に溶けにくいいため、溶解するまで加熱・撈拌を続けてください。
4. 粒状の物が見えなくなったら、室温で 2~3 日静置し、完全に溶解させてください。

維持用培地調製・コーティング

【準備するもの】

- ・ 細胞培養用 100mm dish
※コーティング時の乾燥のため、ディッシュやプレート等の蓋を外せる培養容器を推奨
- ・ 1464R 用維持培地サプリメント
- ・ 1464R 細胞維持用コーティング溶液 A (Ready to Use もしくは粉末から調製した溶液)
- ・ Neurobasal™ Medium : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 21103049
- ・ B-27™ Supplement (50×), serum free : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 17504044

【維持用培地調製】

1. Neurobasal™ Medium 500mL に、4°Cで事前に解凍した B-27™ Supplement (50×)を 10mL 添加してください。
2. 1464R 用維持培地サプリメントを事前に 4°Cで解凍しておき、上記の培地に増殖因子 6mL 及び抗生剤 2.5mL を添加してください。
3. 調製後は 4°Cで保管ください

【維持用コーティング】

1. 培養に必要な分のディッシュやプレート等を用意してください。
2. 1464R 細胞維持用コーティング溶液 A を各容器に下記の表に従って添加し、均一になるように広げてください。
3. クリーンベンチの中で、ディッシュの蓋を開けた状態で液が無くなるまで（要 1~3 日）、完全に乾燥させてください。
4. 使用直前に PBS(-)等で 1~2 回洗浄してください。

培養容器	コーティング剤添加量	培養容器	コーティング剤添加量
100 mm dish	3.3mL	60mm	1.3mL
35mm	540 μ L	12well	250 μ L
24well	120 μ L	48well	60 μ L
96well	30 μ L		

細胞解凍・播種

※下記は、100 mm dish で培養する場合のプロトコールになります。

【準備するもの】

- ・維持用コーティング済 100mm dish 2 枚
- ・調製済維持培地

1. コーティング済 100mm dish を PBS (-) 等で 1~2 回洗浄してください。
2. 凍結細胞のバイアルを、37°C温水にて 2 分間加温して解凍してください。

※凍結バイアルを液体窒素から移動する際に時間がかかる場合はドライアイス等に入れて移動してください。

3. 解凍した細胞液は、予め室温に戻したメディウム 9 mL が入っている 50 mL 遠沈管に移し混和した後、遠沈管内の培養メディウムを 1 mL 分取し、バイアルを共洗いして細胞液を回収してください。
4. 室温下で、120 \times g、5 分間遠心してください。
5. 遠心後、上清を除去し、20mL の培地を加えてピペッティングし、再度細胞を懸濁してください。
6. 細胞懸濁液を、細胞培養用 100mm dish 2 枚に 10mL ずつ播種し、5% CO₂ 存在下の 37°C インキュベーターで培養してください。
7. 培地交換は 37°C に加温したメディウムを用いて、2~3 日に 1 回、浮遊している細胞塊を吸引しないように注意しながら、半量（約 5mL）を交換する形で行ってください。

※3~7 日で細胞塊を形成します。

細胞継代

【準備するもの】

- ・維持用コーティング済 100mm dish
- ・調製済維持培地
- ・1000 μ L マイクロピペット

1. 継代を行うタイミングは図1の培養写真を参照と同程度の細胞塊になった段階で行ってください。

※細胞塊を大きくしすぎると、細胞塊が解れない・中心部分が壊死する等、問題が発生する可能性が高くなるため、解凍播種後1回目の継代以降は週2回の頻度で継代することを推奨いたします。

2. 浮遊している細胞塊を培地ごと全て50mL遠沈管に回収してください。

3. 室温下で、120 \times g、5分間遠心してください。

4. 上清を除去後、培地を1~2mL入れ、マイクロピペットで20~30回ピペッティングしてください。

※大部分がSingle cellか数個の塊に解れていれば問題ありません。

5. コーティング済dishに維持培地を10mL/dish添加してください。

6. 解した細胞懸濁液をsplit ratio (1:5~1:10)になるように播種してください。

7. 5% CO₂存在下の37 $^{\circ}$ Cインキュベーターで培養してください。

8. 培地交換は37 $^{\circ}$ Cに加温したメEDIUMを用いて、2~3日に1回、浮遊している細胞塊を吸引しないように注意しながら、半量を交換する形で行ってください。

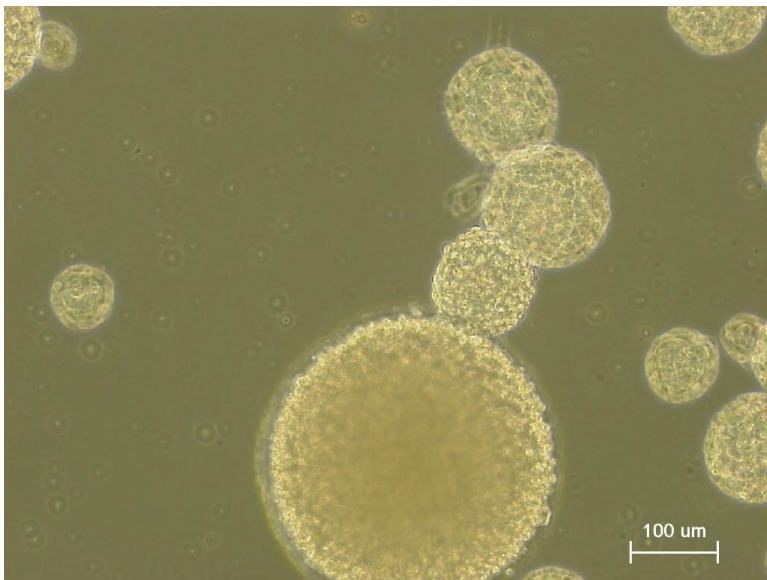


図1：解凍播種後、培養7日目

凍結ストックの調製

【準備するもの】

- ・ COS banker(KOJ、品番：COS-CFM01)
- ・ 1000 μ L マイクロピペット

1. 細胞継代方法の1～3を行います。
2. 遠心後、上清を除去し、COS banker(KOJ、品番：COS-CFM01)を1～2mL添加し、マイクロピペットで20～30回ピペッティングしてください。
3. 細胞数をカウントし、 1×10^6 cells/mLになる様にCOS bankerを添加してください。
4. 凍結保存用チューブに1mL/チューブで分注し、細胞凍結用コンテナ(BM機器、品番：BCS-136または同等品)を用いて-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存します。
5. 1日以上-80 $^{\circ}$ Cにて静置後、液体窒素中に移してください。

分化用培地調製・コーティング

【準備するもの】

- ・ 細胞培養用の培養容器 (dish、plate、flask 等)
- ・ 1464R 用分化培地
- ・ 1464R 細胞分化用コーティング溶液 B
- ・ B-27TM Supplement (50 \times), serum free : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 17504044
- ・ N-2 Supplement (100 \times) : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 17502048

【分化用培地調製】

1. 事前に1464R用分化培地の培地に血清、サプリメント及び抗生物質を4 $^{\circ}$ Cで解凍してください。
2. 事前にB-27TM Supplement及びN-2 Supplementを4 $^{\circ}$ Cで解凍してください。
3. 培地500mLに血清25mL、サプリメント100 μ L、抗生物質2.5mLを添加してください。
4. B-27TM Supplementを5mL ($\times 100$)、及びN-2 Supplementを2.5mL ($\times 200$)添加してください。
5. 調製後は4 $^{\circ}$ Cで保管ください

※サプリメントが光に弱いため、直射日光や常に光が当たる場所での保管はお止めください。

※含有するサプリメントの光による劣化を防ぐため、余剰な培地は分注後、-20 $^{\circ}$ Cで凍結保管する方法もお勧めいたします（複数回の凍結融解はお勧めできません）。

【分化用コーティング】

1. 培養に必要な分のディッシュやプレート等を用意してください。
2. 1464R 細胞分化用コーティング溶液 B を解凍し、滅菌済み超純水で 100 希釈してください。
3. 各容器に下記の表に従って添加し、均一になるように広げてください。
4. 蓋をした状態で、37°Cインキュベーターに一晩以上静置してください。
5. 使用直前に PBS(-)等で 2 回洗浄してください。

培養容器	コーティング剤添加量	培養容器	コーティング剤添加量
100 mm dish	5.5mL	60mm	2.1mL
35mm	0.9mL	12well	0.4mL
24well	0.2mL	48well	100μL
96well	50μL		

分化培養

【準備するもの】

- ・分化用コーティング済培養容器
- ・調製済分化培地
- ・1000μL マイクロピペット

1. 細胞継代方法の 1~3 を行います。
2. 上清を除去後、分化培地を 1~2mL 入れ、マイクロピペットで 20~30 回ピペッティングしてください。
※大部分が Single cell か数個の塊に解れていれば問題ありません。
3. 細胞数をカウントし、分化培地を適量添加して $1.5\sim 2\times 10^4$ cells/cm² の密度でコート済み培養容器に播種してください。
4. 5% CO₂ 存在下の 37°Cインキュベーターで培養してください。
5. 培地交換は 37°Cに加熱したメEDIUMを用いて、2~3 日に 1 回、細胞を剥離しないように注意しながら全量交換してください。

※播種後、10 時間程度で分化し始めます。完全に分化するには 7~10 日程度かかります。分化後は増殖しないため、分化した状態で、1~2 カ月は維持が可能です（培地交換は必要です）。

XVIII. Q&A

1. 長期培養とありますが、どのくらいの期間培養可能ですか？また継代数はどのくらいですか？

Ans.開発者の先生の実績では、50～70回位までは継代可能であることを確認しております。

継代数はロットによって異なりますので、お問い合わせください。

2. 分化割合をコントロールすることは可能ですか？

Ans.強制分化剤等で分化させる系ではないため、およそ神経細胞 70%、アストロサイト 20%、オリゴデンドロサイト 10%の割合に最終的に収束します。よって、割合をコントロールすることは出来ません。

XIX. 技術情報

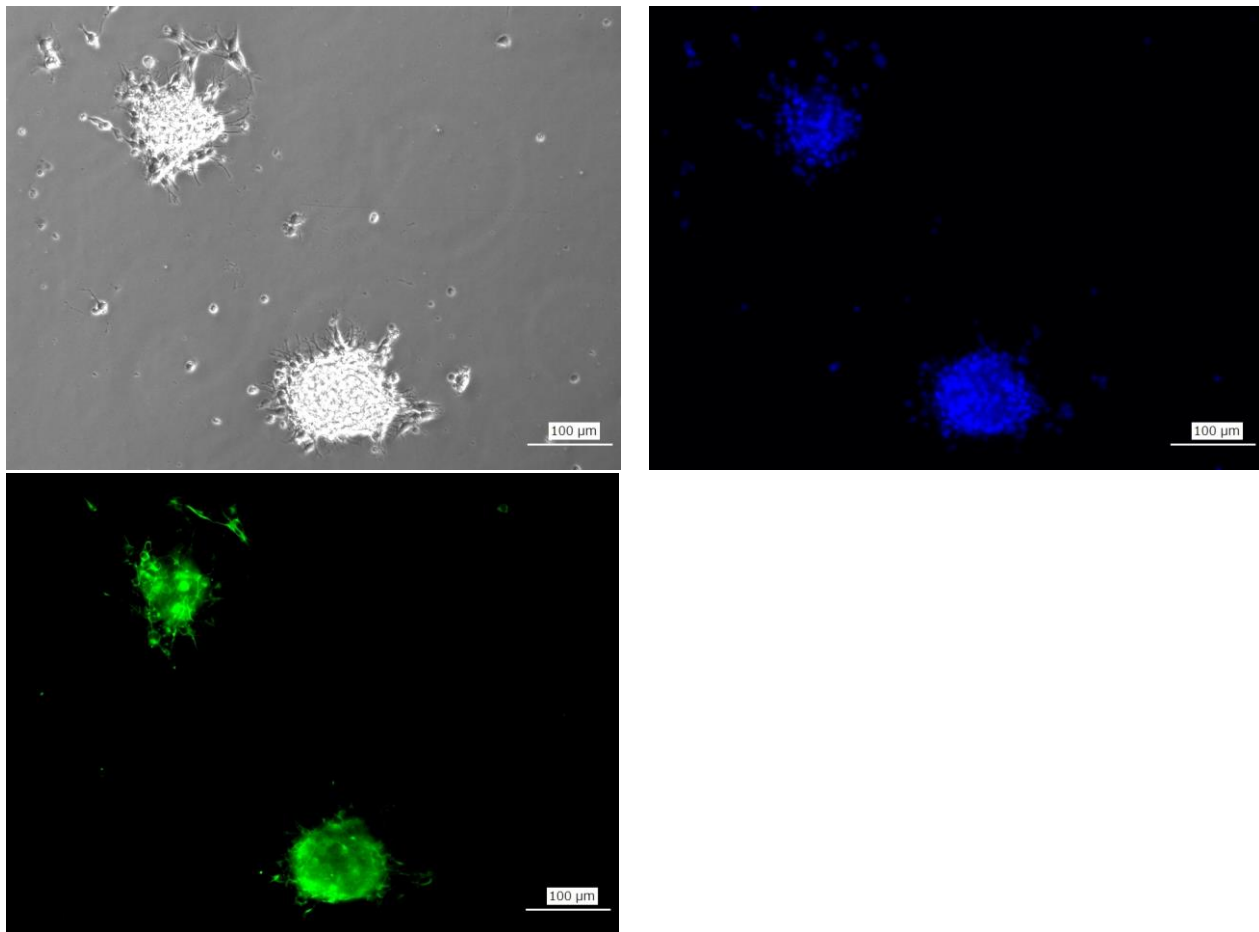


図 2：未分化状態での免疫染色写真（左上：位相差画像、右上：核染色、左下：Anti-Nestin 抗体）

XX. 参考文献

- 1) Watabe K, Akiyama K, Kawakami E, Ishii T, Endo K, Yanagisawa H, Sango K, Tsukamoto M. Adenoviral expression of TDP-43 and FUS genes and shRNAs for protein Neuropathology. 2014 Feb;34(1):83-98. doi: 10.1111/neup.12058. PMID:23937386.
- 2) Ishii T, Kawakami E, Endo K, Misawa H, Watabe K. Myelinating cocultures of rodent stem cell line-derived neurons and immortalized Schwann cells. Neuropathology. 2017 Oct;37(5):475-481. doi: 10.1111/neup.12397. doi: 28707715.
- 3) Ishii T, Kawakami E, Endo K, Misawa H, Watabe K. Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by PLoS One. 2017 Jun 9;12(6):e0179375. doi: 10.1371/journal.pone.0179375. PMID: 28599005.
- 4) Watabe K, Kato Y, Sakuma M, Murata M, Niida-Kawaguchi M, Takemura T, Hanagata N, Tada M, Kakita A, Shibata N. Prja1 RING-finger E3 ubiquitin ligase Neuropathology 2020;40(6):570-586. doi: 10.1111/neup.12694. PMID: 32686212.