

Streamer[®] System

STR-4000

ユーザー用マニュアル



FLEXCELL[®] INTERNATIONAL CORPORATION
437 DIMMOCKS MILL ROAD, SUITE 28
HILLSBOROUGH, NC 27278 USA
800-728-3714 (USA ONLY) OR 919-732-1591
WWW.FLEXCELLINT.COM

MAY 2006

Copyright © 2003 Flexcell[®] International Corporation

STR-4000 Streamer System 目次

目次.....	2
使用を始めるにあたって	3
イントロダクション	3
システム構成	3
STREAMER® セットアップ	4
システムのアセンブリー	4
Streamer® の滅菌法	5
インキュベーター内へのStreamer® 設置	5
ポンプの使用	5
クイックスタート法	6
STREAMSOFT™ V4.0 ソフトウェア	8
インストールの方法	8
メインパネル (MAIN PANEL)	9
一般的インフォメーション (General Information) タブ	9
システム (System) タブ	10
実験用設定 (Pre-Test Configuration)	12
プルダウンメニュー	13
オペレーションメニュー (OPERATE)	14
手動モード (Manual Mode)	14
データを見る (View Data)	15
ユーザーの設定 (Configure Users)	16
レジームの構成 (Configure Regimes) : パラメーターの設定	17
実験装置の設定 (Configure Testing Apparatus)	19
システム可変数の設定 (Configure System Variables)	21
ハードウェアの再初期化	22
STREAMSOFT™ V4.0 に関するご注意	23
実験法	24
概要	24
レジームの作成	25
実験の準備	26
実験後の分析	28
アプリケーションノート	29
CULTURE SLIPS® 細胞培養法	29
補遺	30
保証期間と保証内容について (WARRANTY INFORMATION)	31
FLEXCELL® 代理店一覧	33
北アメリカ	33
台湾	33
ヨーロッパ	33
ブラジル	33
日本	33
韓国、中国、マレーシア、シンガポール、香港	33

使用を始めるにあたって

イントロダクション

身体のすべての組織において、間質液が移動する結果流体誘発性せん断応力(シアストレス)が生じています。細胞周囲間質液の動きは、組織が圧縮力、張力、応力などにより歪む結果として起こるものです。そのような液体の流動はイオン、たんぱく質、炭水化物、その他の分子のマトリックス内での移動を可能にする輸送担体の作用をしています。この液体が細胞膜を通り過ぎる際、シアストレス τ を生じます。そこで、平行平板フローチャンバーにおいて、チャンバーを通じて層流が起こると仮定すれば、流体誘発性シアストレスの値は次の方程式で与えられます： $\tau = 6\mu Q/bh^2$ ；ここに、 τ はシアストレスを dyne/cm^2 で、 μ は粘度を dyne.s/cm^2 で、 Q は流速を ml/s で、 b はフローチャンネルの幅を cm で、 h はフローチャンネルの高さを cm で、各々表わします。シアストレス値は、血管系においては 1 dyne/cm^2 未満から 35 dyne/cm^2 以上に変化することがあります。細管だけでみても、骨ではシアストレス変化の範囲が 1 dyne/cm^2 から 20 dyne/cm^2 であるのに対し、軟骨では 1 dyne/cm^2 から 5 dyne/cm^2 ということがあります。

Flexcell® Streamer® は、平行平板型フローシステムとして単層培養系の細胞に流体誘発性シアストレスを適用する目的で使用されるものです。システムにはカルチャースリップ(Culture Slips®、寸法 $75\text{ mm} \times 25\text{ mm} \times 1\text{ mm}$) を保持する6チャンバー式層流装置が含まれ、細胞をこのマトリックス処理型スライドガラス上に培養します。StreamSoft™ ソフトウェアを用いてペリスタルティックポンプを制御することにより、チャンバーへ入る流速と細胞に適用されるシアストレスを調節しています。使用するチューブラインの寸法により異なりますが、シアストレス値としては、 1 dyne/cm^2 から 35 dyne/cm^2 の範囲が得られます。この6チャンバー式フロー装置を使用して、細胞の流体誘発性シアストレス応答としてのRNAおよびたんぱく質発現、灌流液中への分泌分子産生などの評価ができます。

システム構成

- Streamer® フロー装置
- チューブおよび脱着コネクター類
- Masterflex® L/S ペリスタルティックポンプ
- RS232 接続ケーブル
- 脈動減衰器(パルスダンパー) 2個
- Culture Slips® 12枚
- StreamSoft™ ソフトウェア
- Dell Inspiron ノートブックコンピューター(オプション)
- 培養メデューム用リザーバー(貯留ビン容量 500 ml)、脱着コネクター、フィルター

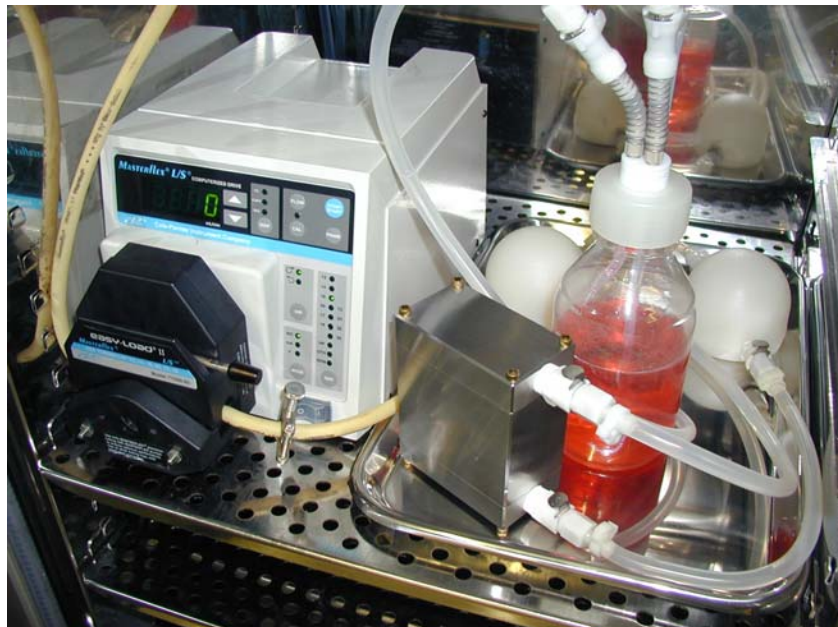
Streamer® セットアップ

システムのアセンブリー

以下の指示はStreamer® 全システムのアセンブリーに関するものです。インキュベーター内に組み立てを完了すると、システムは下図の写真のような状態になっているはずです。使用前には常に、チューブに割れ目や漏れのないことを確認してください。

1. メデュームリザーバーと第一番目のパルスダンパーをベージュ色のチューブ(Phar-Med®、長さ0.9 m(3'))で接続してください。メデュームリザーバーの蓋に付いた二つの脱着コネクターのうち、ピンの底まで届くチューブに接続している方を使わなければなりません。ピン内で曲ったチューブにつながる脱着コネクターをこの接続に使わないでください。
2. 次に、Phar-Med® チューブのライン内に取り付けられている締め金を端へ動かし、このパルスダンパーにできるだけ近づけます。そして、このチューブを真中のところでポンプヘッドに挿入してください。まずレバーを左方向へ回転してポンプヘッドを開いてチューブをセットし、それから右方向へ回転してチューブをポンプヘッドへ固定します。実験を行っていないときは、このポンプヘッドレバーを左方向に回転して、チューブに圧がかからないようにしてください。
3. 第一番目のパルスダンパーと第二番目のパルスダンパーをシリコンチューブ(長さ7.6 cm(3"))で接続してください。
4. 第二番目のパルスダンパーを、シリコンチューブ(長さ0.6 m(2')、2本あるうちの1本)でStreamer® 入り口(下部のポート)へ接続してください。
5. Streamer® 出口(上部のポート)と、メデュームリザーバーの蓋に付いたピン内で曲った短いチューブにつながるもう一つの脱着コネクターを、シリコンチューブ(長さ0.6 m(2')の他の1本)を用いて接続してください。
6. 初回使用時に先立っては、脱イオン水を全システムに通過させ、どこにも漏れのないことを確認してください。

***ご注意:** 上記のチューブ長さは、いずれもユーザーのセットアップで必要に応じて短縮することも延長することも可能です。



Streamer® の滅菌法

Streamer® フローシステムの構成部品はすべて(ポンプとコンピューターを除く)、標準的オートクレーブ条件(温度120°C、圧力103 kPa (15 psi)、時間15-20分)で効果的にかつ安全に滅菌することができます。オートクレーブにかける際は、システムの全構成部分が互いに接続されたままで行ってください。まず、メデュム用リザーバーと第一番目のパルスダンパー間をつなぐPhar-Med® チューブのライン内の締め金を解除します。Streamer® 上部をわずかに開き、蒸気が装置内まで達するようにしてやります。また、パルスダンパーは高温下では荷重により変形することがあるため、システム構成部分をパルスダンパーの上に置かないでください。したがって、オートクレーブ内で、パルスダンパーが他のシステム構成部品の上にくるはずです。**ご注意: オートクレーブをかけた後は、Streamer® の入り口、出口およびパルスダンパーに付いている脱着コネクターのネジの締め具合を確認してください。ゆるくなっている場合は、手で1/4回転余分に回して多少きつく締めてください。**オートクレーブがない場合は、エチレンオキサイドガス処理の後真空処理して滅菌することが可能です。70%エチルアルコールをポンプでシステムに通過させて消毒することもできますが、この方法で完全には滅菌されません。

インキュベーター内へのStreamer® 設置

実験に際し、Streamer® システムを温度コントロールのあるCO₂ インキュベーター内に設置する必要があります。Flexcell® では、Streamer® を実験の少なくとも20分前にインキュベーター内に入れ、装置を細胞培養に適した温度に安定させるようにお勧めしています。ポンプもシステムと共にインキュベーター内に設置してください。こぼれ防止用のトレーを一枚システムの下に置き、これに載せてシステムを細胞培養フードへ移動したり、また万一液体漏れの起きた場合の受け皿にしたりします。**コンピューターをインキュベーター内に入れてはいけません。**

ポンプの使用

1. ポンプのプラグを電源に差込みます(ヨーロッパ、日本: 220V、北アメリカ: 110V)。
2. **フローシステムを手動で使用する場合(即ち、コンピューターのコントロール無し)** ポンプに付けたチューブの寸法が正しく、流れ方向が時計回りにセットされていることを確認してください。標準チューブとしてStreamer® システムに含まれているのはMasterflex® L/S 17です。したがって、ポンプ前面右下にある“size”ボタンを、緑色ライトが数字“17”位置にくるまで押していきます。ご注意として、チューブサイズ“25”まで到達すると、緑色ライトは次に押す2回とも“25”に止まっていますが、二回目にはインディケーターのライト系列下方にある“HP” LEDを点灯させることとなります。“HP”ボタンは、右側パネルにあるリストからチューブのサイズ番号を規定するものです。したがって、緑色ライトが“17”位置にあるとき“HP”ライトをオフ(OFF)にします。このようにセットすると、ポンプのディスプレイがポンプ作動中その特定のチューブサイズにおける流速を表示していきます。望むシアストレスレベルに相当する流速の値を見つけるには、このマニュアル終末にある補遺のデータを参照してください。必要な流速の選択には、ポンプ前面左上にある矢印キーを使います。フローの開始と停止には、青色の start/stop ボタンを押してください。
3. **フローシステムをコンピューターのコントロールで使用する場合** RS-232ケーブルの雄端をポンプ背面へ、雌端をコンピューターのシリアルポートへ接続してください。電源を入れて、StreamSoft™ ソフトウェアをスタートさせます。ソフトウェアのコントローラーが機能しているとき、ポンプ前面のディスプレイパネルには“PO1”と表示が出ます。このソフトウェアを用いて望みの流速のレジメンを作成してください。ソフトウェアの使用法について詳しくは9-26ページを参照してください。

クイックスタート法

1. Streamer® 全システムをインキュベーター内に設置する。システムセットアップについては、4ページを参照。
2. Streamer® 装置およびシステム構成部分の滅菌を行う。滅菌法に関しては、5ページを参照。
3. ポンプからくるケーブルをコンピューターのシリアルポートへ接続する。コンピューターとポンプの電源を入れ、Stream Soft™ ソフトウェアのプログラムを開ける。
4. *Operate* メニューを選択、次に *Users* を選択する。 *Add User* をクリックしてユーザーとして名前を登録し、それから *Return* ボタンをクリックする。
5. *Operate* メニューを再び選択、次に *Configure Regimes* を選択する。 *Regime Name* 空欄に新しくレジーム名をタイプし、 *Insert Step* をクリックしてそのレジームにステップを一つ入れる。ステップ(単数でも複数でも可)に数値を入力してレジームを一つ作成する。完成したら、 *Save Regime* をクリックする。 *Return* をクリックしてここを閉じる。
6. メインスクリーンに戻り、 *Configure* をクリックすると、 *Pre-Test Configuration* ウィンドウが開く。この *User*、 *Regime*、 *Hardware* リストから適切なものを選択し、それから *Update* をクリックする。これで、このレジームはいつでも開始できる。
7. カルチャースリップ (Culture Slips®) 6枚を用いて細胞を培養する。テフロン (Teflon®) 周縁でプリントされている方が培養面になっていることを確認し、細胞をこの境界範囲内のみ注意深くプレーティングする。最小限48時間おいて細胞をスライドガラスに接着させる。

スライドガラスへの細胞接着後:

8. Streamer® 装置が閉鎖された状態であることを確認する(上蓋と体部が接触して同一平面に位置する)。
9. メディウム用リザーバー容器に滅菌済みPBSを500 mlとり、ポンプでシステムを通過させて不純物を流し出す。この操作を行うには、レジームをスタートしてでも、ソフトウェアの *Operate* メニューにある *Manual Mode* を作動してでもよい。ソフトウェアを使用していない場合は、ポンプを適切な寸法のチューブ設定で流速300 ml/minにセットし、スタートボタンを押す。
10. ポンプで数分間流した後、メディウム容器のPBSを除いて滅菌済み500 ml培養メディウムに交換する。
11. 培養メディウムをポンプでシステムに通過させて、残留のPBSを流し出す。次に、この培養メディウムを除去して、新しく滅菌済み培養メディウム500 mlに交換する。
12. 培養メディウムをポンプでシステム全体に通す。システムがメディウムで満たされたら、パルスダンパーを一個ずつ、底を約20度浮かせて傾け、流れが角の頂点から拡大した方へ向うようにする。接続アダプターから液体が再び入ってくるまでパルスダンパーをこの位置に保ち、それから水平位に戻す。この操作により、パルスダンパー内の液がアダプターよりわずかに高いレベルまで上がり、ひとつの気泡トラップとなって、気泡が誤ってシステム内に入ることを防ぐ。第二番目のパルスダンパーも第一番目と同様にする。このプロセスを完了したら、流れを継続して次のステップに進む。
13. 流れを継続させた状態で、チューブライン内に目に見える気泡が封じ込められていないかチェックする。さらに、メディウム容器の側壁に気泡が発生していないかチェックする。気泡が認められた場合は、容器を揺らしてメディウムの渦で側壁から気泡を解放してやる。
14. チューブとフロー装置がメディウムで満たされ気泡が全部除かれたら、流れの方向をポンプで逆にセットし、メディウムを引き戻してチャンバーヘッドを通過したところまで減じてポンプを止める。液体のレベルは、Streamer® ヘッドから来るチューブ内に認められなくなった後は推測する他ない。
15. Phar-Med® チューブに付いた小さな締め金をポンプヘッドのすぐ右側で締め、チューブライン流路を完全に閉鎖する。
16. MasterFlex® ポンプのレバーを左方向へ全回してチューブをポンプヘッドから外す。Streamer® 装置、チューブライン、パルスダンパー、液体用リザーバーをトレーに載せたまま、培養用フードへ注意深く運ぶ。
17. Streamer® のネジを外し、蝶番になった蓋を開ける。

18. 細胞をインキュベーターから培養用フードへ移動する。
19. 滅菌済み手袋をはめ、ピンセットと指先でCulture Slip®をつまみ、フロー装置の個々の溝内へ挿入する。**スライドガラス面の細胞の接着した側が溝に隣接するフロー領域と向かい合い、閉鎖された壁側を向いていないことを確認する。**Culture Slip®は静かに、チャンバー底に到達するまで滑り込ませる。このプロセスで、Culture Slip®のガラスがステンレスの角に当たって割れないように注意する。**流速の適切な数値を確保するために、溝は6つ全部を満たす必要がある。細胞培養したCulture Slip®を6枚使いたくない場合は、ブランクのCulture Slip®を余剰の溝に用いればよい。**
20. 装置の蓋を閉め、ボルトをまず手で回し、それからシステム付属のヘキサゴンレンチ(HEXレンチ)で締める。
21. トレーをシステム構成部分を載せたままインキュベーターに戻す。Phar-Med®チューブをMasterflex®ポンプヘッド内に戻し、ヘッドを下げて固定する。
22. Phar-Med®チューブの小さな締め金のネジをゆるめて、流路を全開にする。
23. ソフトウェアのStartボタンをクリックする(手動の場合は、適用したい流速にポンプをセットし、スタートボタンを押す)。レジメンが開始され、スクリーン右上角の緑色ライトが点灯する。
24. ソフトウェアでは指定したシアストレスと実測値のグラフがリアルタイムでディスプレイされる。この間、システムに漏れがないか定期的にチェックする。
25. フローのレジメンが終了しポンプが止まったら、Streamer®システムを前述のようにしてインキュベーターから出す。蓋を開け、スライドガラスを取り出して試料処理にかかる。
26. Streamer®装置とシステムを脱イオン水で清掃する。**メデュームにさらされると、ステンレスの仕上げが時間の経つうちには腐食されるので、実験後は必ずStreamer®装置からメデュームを除く。**

StreamSoft™ v4.0 ソフトウェア

インストールの方法

NI-DAQ ソフトウェア (StreamSoft™ V4.0 を適切に機能させるためにインストールする必要があります) :

- 1) コンピューターのCD-ROMに、Windows NI-DAQ V6.9.3 のCDを挿入します。このNI-DAQ V6.9.3 CDがない場合は、StreamSoft™ V4.0 のCDを挿入してください。
- 2) NI-DAQ V6.9.3 CDの場合はインストールのプロセスが自動的に開始します。StreamSoft™ V4.0 のCDを使用している場合は、次の方法で行ってください：
 - A) スクリーンの左下角にある *Start* メニューをクリックし、*Run* を選択します。ブラウザ (*Browse*) ボタンを用いてCD-ROMドライブを開き、続いて *NI-DAQ Installation Files* というフォルダーを開いてください。
 - B) *Setup* というファイルを選択、*Open* をクリックします。*Run* ウィンドウで *OK* をクリックし、ステップが開始したら指示に従ってください。
- 3) インストール中に“*Feature Tree*”ウィンドウが現れたら、*LabView 6.0 Support* という区画へマウスをもっていき左ボタンをクリックしてそのメニューを引き出します。*Install this feature to a local drive* を選択してください。
- 4) 同様にして *NI-DAQ V6.9.3 Device Driver* と *NI-DAQ OPC Server* がすでに選択されていることを確認してください。
- 5) *Next* をクリックしてインストールを続行します。インストールが完了したら、コンピューターを再起動してください。
- 6) 再起動されると、NI-DAQ が StreamSoft™ の機能には不要なインフォメーションをコンピューターにさらにインストールすることを申し出てきますから、*Cancel* をクリックしてください。
- 7) OsciFlow® 装置を使用しておりDAQCard-DIG-24がある場合は、ラップトップの側面にあるPCM/CIA スロットにそのカードを挿入してください。ラップトップではカードがインストールされたことを認知して音を発するはずですが、OsciFlow® 装置を使用しておらずこのカードがない場合は、StreamSoft™ V4.0 のインストールに進んでください。

StreamSoft™ V4.0 インストレーション:

- 1) StreamSoft™ V4.0 のCDをコンピューターのCD-ROMに挿入してください。
- 2) スクリーンの左下角にある *Start* メニューをクリックし、*Run* を選択します。*Run* ウィンドウでブラウザ (*Browse*) ボタンをクリックし、CD-ROM 続いて *Streamer (rev 2-2-1) Installation Disks* というフォルダーを開いてください。
- 3) “*Setup.exe*”というファイルをクリック、続いて *Open* をクリックします。*Run* ウィンドウで *OK* をクリックし、インストレーションの指示に従ってください。セットアップ (*Setup*) では最初にStreamSoft™ V4.0 ソフトウェアをインストールし、次にLabVIEW™ ファイルをインストールしてこのソフトウェアをサポートします。
- 4) これでStreamSoft™ V4.0 のインストレーションが完了しました。

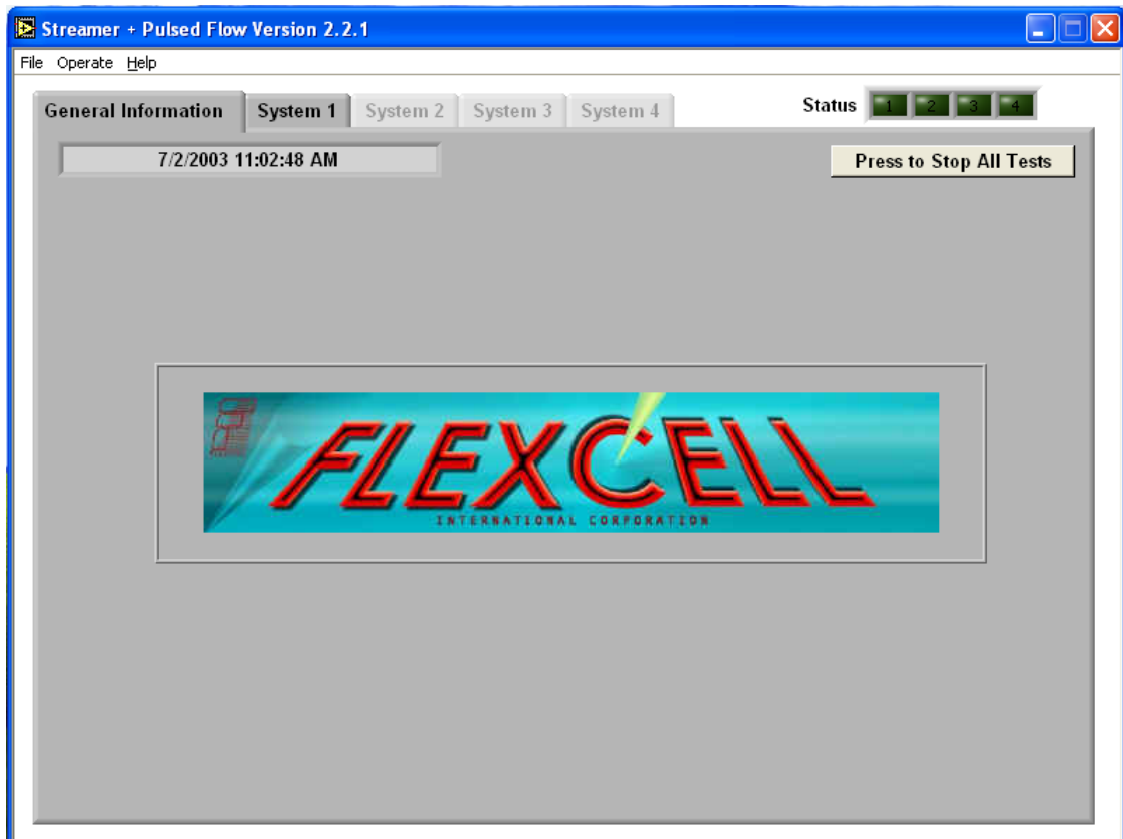
StreamSoft™ V4.0 へのパラメーター設定:

StreamSoft™ V4.0 には、特定のパラメーターを設定して使用される装置とシステム用にカスタマイズする必要があります。**フロー実験の正確な結果を特定のシステムにおいて保証するために、これらのパラメーターを設定することは非常に重要です。**パラメーター設定の方法に関しては、19、20ページ(実験装置の設定、*Configure Testing Apparatus*)および21ページ(システム可変数の設定、*Configure System Variables*)を参照してください。実験に取りかかる前に、このセットアップを完了させてください。

メインパネル (Main Panel)

一般的インフォメーション (General Information) タブ

機能: このデフォルトメインパネルで、ユーザーはシステムが動いていることを確かめ、またそれをいつでも停止することができます。

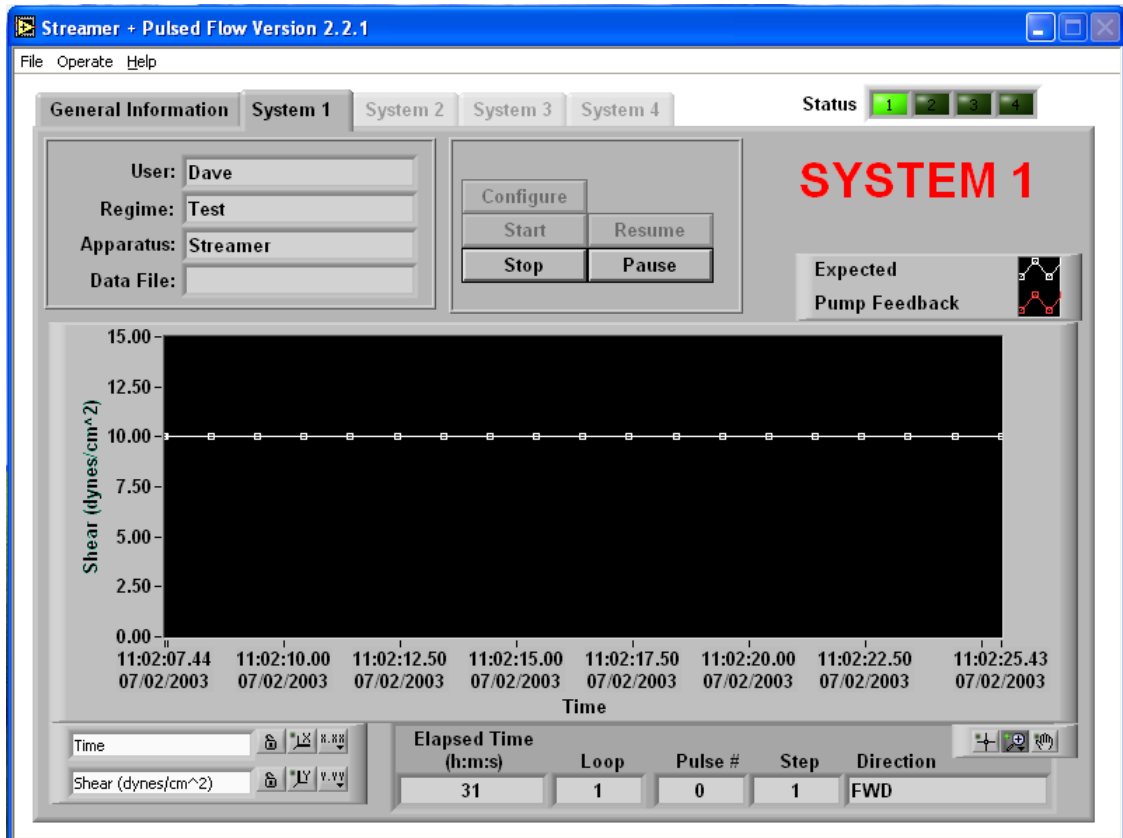


ボタン (buttons)、フィールド (fields)

Status ボタン	実験が進行中のときは番号に明るい緑色ライトがつく。
System 1、2、3、4	コンピューターに接続されたポンプの数(1-4)に従い、このタブが自動的にハイライトされる。
Date and Time	現在の日時
'Press to Stop All Tests'	現在のレジームを中止する。

システム(System)タブ

機能: このパネルは実験を施行するために使用されるものです。他の各System(2, 3, 4)タブもここに示されているSystem 1と同一です。



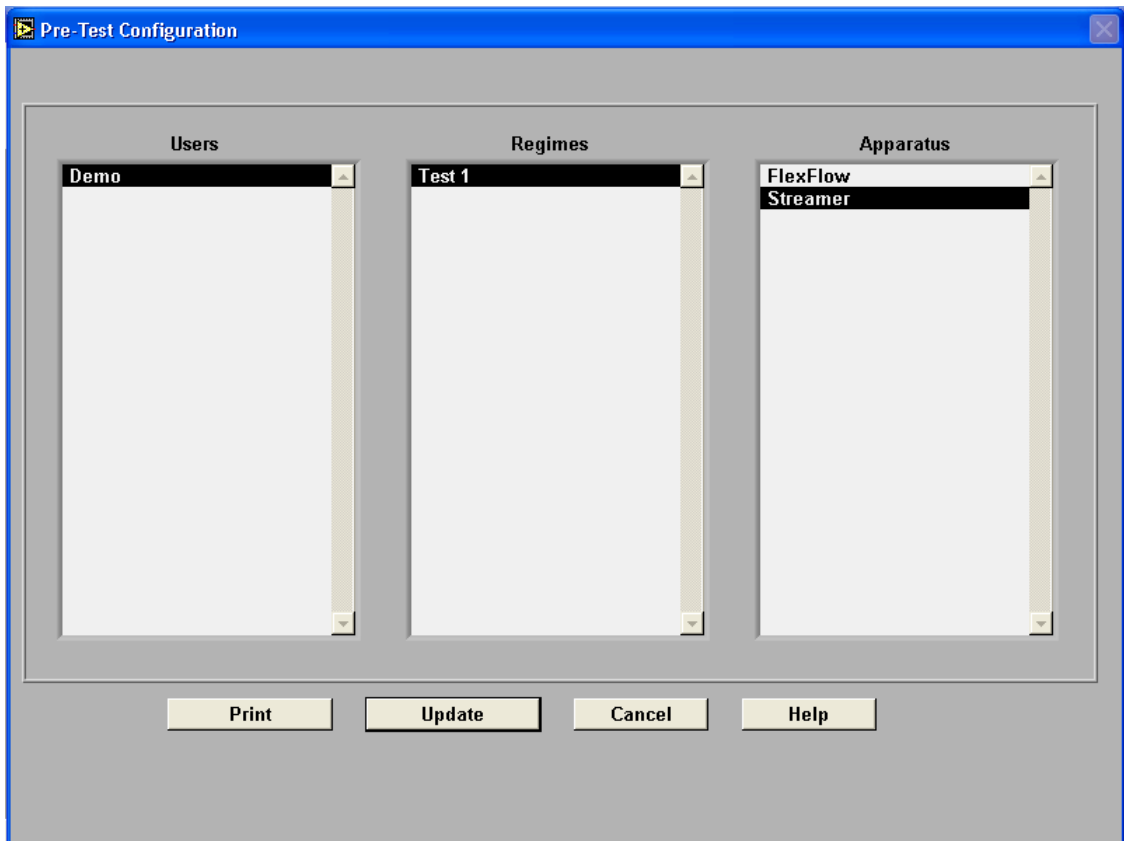
ボタン(buttons)、フィールド(fields)

User	現在設定されているレジームのユーザー
Regime	現在設定されているレジーム
Apparatus	ソフトウェアを使用している装置 (Streamer® あるいは FlexFlow™)
Data File	データを保存するファイル名 (該当する場合)
Configure	実験の設定 (ロード); <i>Pre-Test Configuration</i> ウィンドウが現れる
Start	実験を開始する。
Stop	実験を終了する。このボタンは実験が進行しているときのみ機能する。
Pause	実験を中断する; ポンプが停止するが、実験レジメンはメモリーに保存される。
Resume	中断した実験を再開する。
Graph	実験中グラフがシアストレスの予想値および実測値を示す。
Elapsed Time (h:m:s)	現在進行中の実験経過時間
Loop	現在ステップあるいは一連のステップにまたがっている現在進行ループ
Pulse #	このレジームでの弁調整により形成される脈動 (方形波) あるいは振動

	(FWD/REV)の総数
Step	レジーム内で現在(アクティブな)ステップ
Direction	現在の流れ方向(FWD/REV)

実験用設定 (Pre-Test Configuration)

機能: このパネルでは、ユーザーが実験パラメーターの設定をすることができ、*System* パネルにある *Configure* ボタンを押すと現れます。ここで選択されたインフォメーションは *System* パネルの *User*、*Regime*、*Apparatus* フィールドに転送されます。



ボタン(buttons)、フィールド(fields)

Users	全ユーザーのリスト; マウスを使ってユーザーをリストから選択する。
Regimes	選択したユーザーが作成したレジームのリスト; マウスを使ってリストからレジームをハイライトし、選択する。
Apparatus	構成フロー装置のリスト; 実験に使用する装置を選択する。 重要事項: その特定装置に対するパラメーターが適切に設定されていることを <i>Configure Testing Apparatus</i> ウィンドウにおいて確認する。19、20ページを参照。
Print	現パネルをプリンターあるいはHTMLファイルへプリントする。
Update	現在選択した設定を用いて実験を施行する。
Cancel	更新選択事項をキャンセルし、以前に設定したセットアップで実験する。
Help	オンラインヘルプ(未だ開かれていない)

プルダウンメニュー

このセクションでは、三箇所のプルダウンメニューにある個々の事項と機能について要約します。

<i>File</i>	<i>Operate</i>	<i>Help</i>
-Print -Exit	-Manual Mode -View Data -Users -Configure Regime -Configure Apparatus -Configure System -Reinitialize Hardware	-Help -About LabVIEW

File

Print – これでユーザーは現在のパネルをプリントできる。このシステムでは、プリント機能で現パネルのコピーがプリンターあるいは HTML ファイルへ送られる。コンピューターにプリンターが接続されていない場合、プリントしようとするとうィンドウズのデフォルトプリンターのキューからエラーメッセージが現れる。

Exit – これでユーザーはプログラムを閉じることができる。この *Exit* 施行時にポンプが作動している場合、継続される。キーボードで操作する場合、ショートカットキーは **Ctrl-Q**。

Operate

Manual Mode – これでユーザーは実験レジメンをセットアップせずに、ポンプを手動でコントロールできる。

View Data – これでユーザーは以前行った実験のシアストレスデータを見ることができる。

Users – これでユーザー名を追加したり削除したりできる。

Configure Regime – これでユーザーは実験プロトコルを作成できる。

Configure Apparatus – これでユーザーがフロー装置のパラメーター構成を行うことにより、ソフトウェアが望むシアストレスに相当する流速を指定することができる。**適切なシアストレス値が画面に示されることを保証するためには、このパラメーターが正しく設定されなければならない。適切な数値については装置のマニュアルを参照。**

Configure System – これでユーザーはデータ保存、使用 Comポート、システム内の弁の有無などシステムレベルにおけるパラメーター構成ができる。

Reinitialize Hardware – 万ケーブルの接続が断たれたりポンプのスイッチが切れた場合、これでソフトウェアとポンプ(使用していればOsciFlow™も含む)間の接続を再初期化できる。

Help

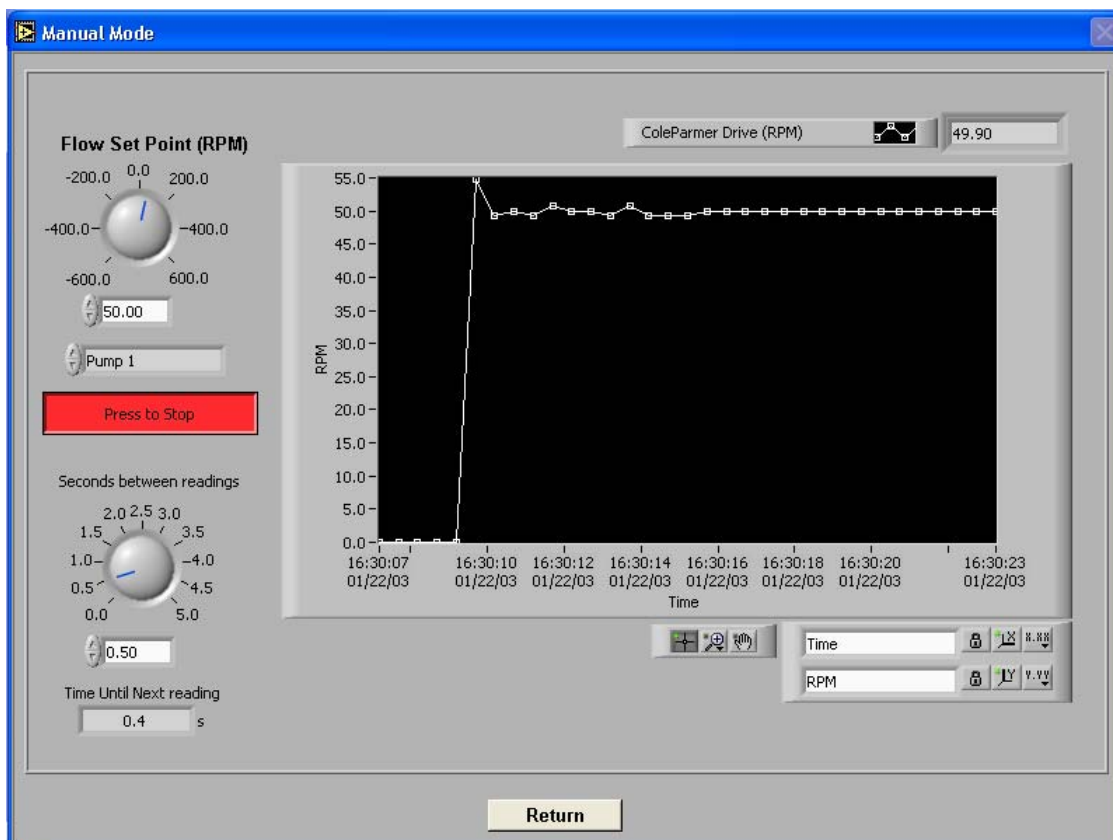
Help – オンラインヘルプ(未だ開かれていない)

About LabVIEW – ソフトウェアのバージョンに関するインフォメーション

オペレーションメニュー (Operate)

手動モード (Manual Mode)

機能: このパネルでは、ユーザーがポンプを手動制御できます。実際の流速およびポンプ速度(回転数、RPM)は、ポンプが作動している時グラフ上に示されます。手動モードは、ポンプ機能のトラブルシューティングに使用されることがあります。シアストレス値は使用するチューブの寸法とフローチャンバーに依存してくるため、このパネルには示されません。

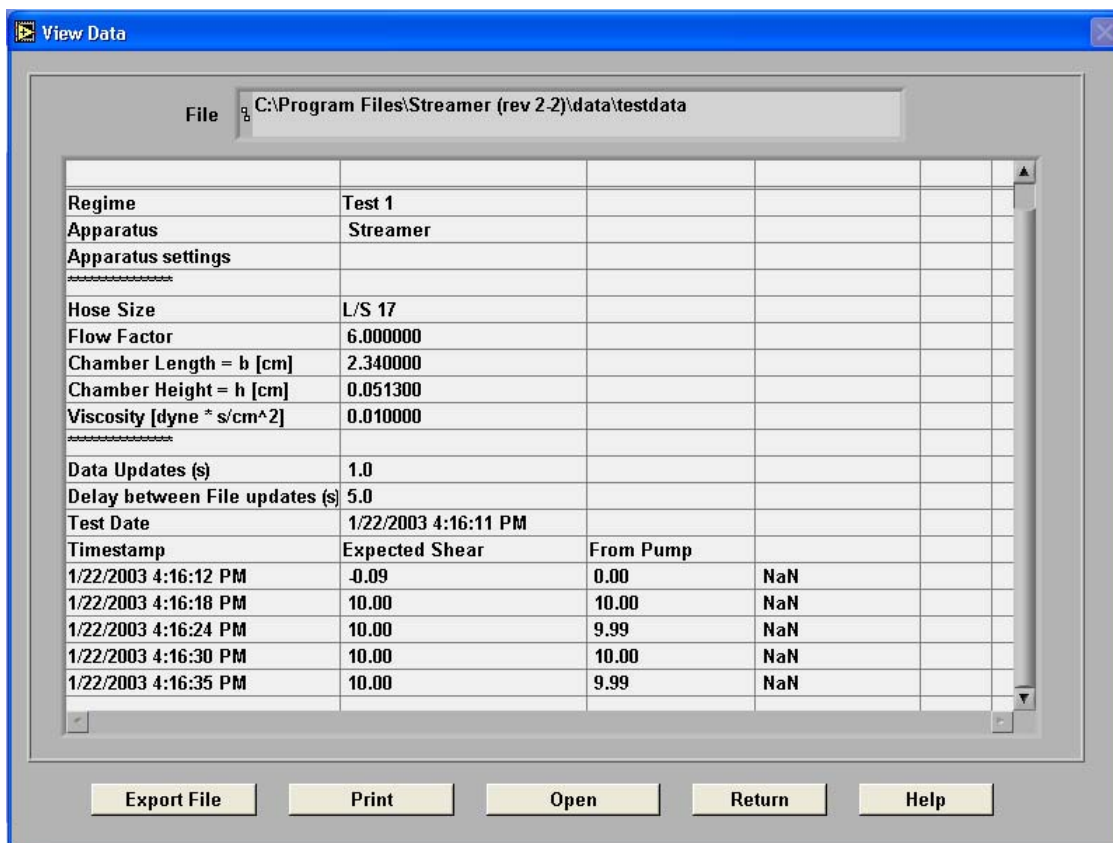


方法

1. 一定の流速(ポンプ回転数)を、*Flow Set Point* ボックス内に数値を記入するかあるいはマウスを使って文字盤の目盛りを望みのレベルへ合わせて入力する。
2. 読みの秒間隔を0と5の間で調整する。この時間は、グラフ上に示されるデータ更新の間隔に相当する。
3. *Press to Start* をクリックして開始する。
4. 停止するときには *Press to Stop* をクリックする。
5. 終了したら *Return* をクリックする。

データを見る (View Data)

機能: このパネルでは、ユーザーが既に収集された実験データを一覧表で見ることができます。

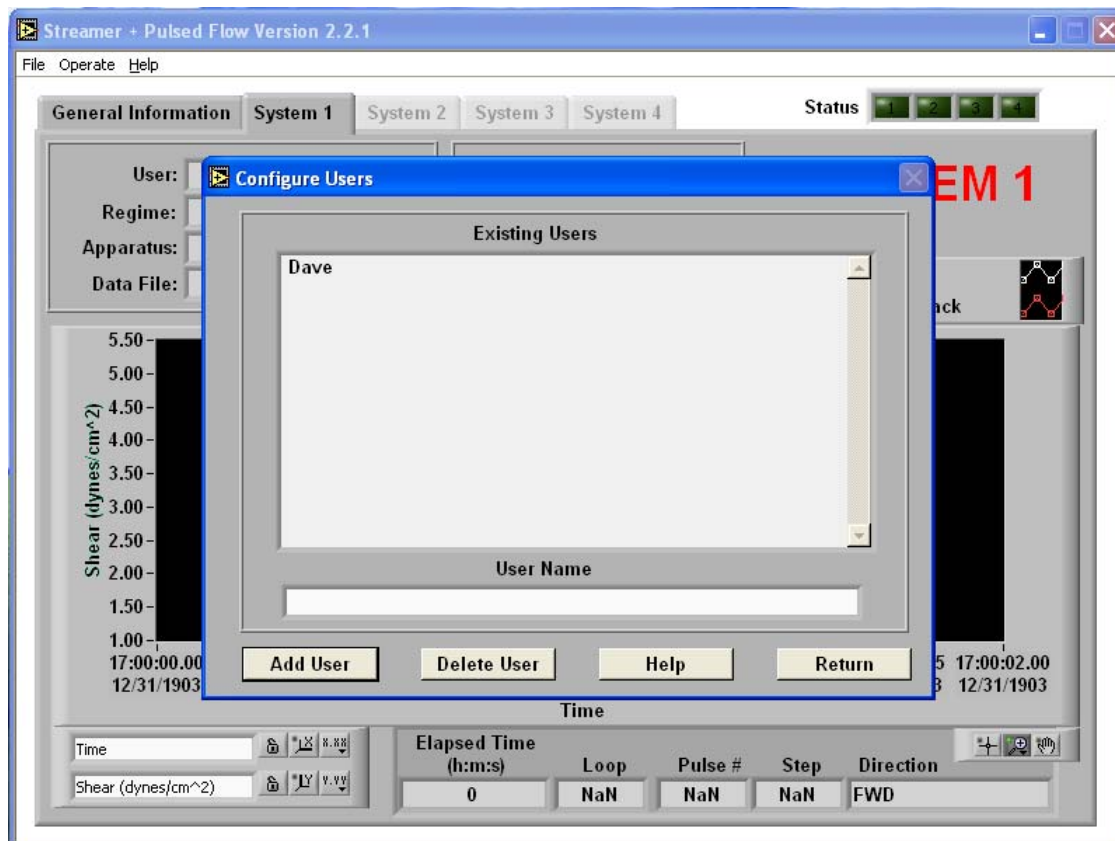


ボタン(buttons)、フィールド(fields)

File	画面に見えているデータに至る完全ファイルパス
Table	実験データログのファイル内容
Export File	データを表計算スプレッドシート互換性のフォーマットにエクスポート
Print	現パネルをウィンドウズのデフォルトプリンターあるいは HTML ファイルへプリントする。
Open	データファイルを一つ開く
Return	このパネルを閉じてメインパネル (<i>Main Panel</i>) へ戻る
Help	オンラインヘルプ (未だ開かれていない)

ユーザーの設定 (Configure Users)

機能: このパネルでは、ユーザーを設定あるいは削除することができます。



ボタン(buttons)、フィールド(fields)

Existing Users	現在のシステム全ユーザーをリスト
User Name	新ユーザーの入力に用いられる欄
Add User	システムに新ユーザーを追加
Delete User	システムからユーザーを削除
Help	オンラインヘルプ(未だ開かれていない)
Return	このパネルを閉じてメインパネル(Main Panel)へ戻る

方法

ユーザーの追加:

- 1) *User Name* 欄に名前をタイプする。
- 2) *Add User* ボタンを押す。

ユーザーの削除:

- 1) マウスを使って *Existing Users* リストからユーザーを選択する。
- 2) *Delete User* ボタンを押す。そのユーザーの名前でレジームとデータが保存されている場合は、削除の前に確認を促される。

レジームの構成 (Configure Regimes): パラメーターの設定

機能: このパネルでは、ユーザーがレジームを作成することができます。

Step	Name	Flow Type	ON/ HI (s)	OFF/ LO (s)	Shear (dyne/cm ²)	Duration (hh:mm:ss.ss)	GoTo	Loop
1	Oscillate	OSCILLA	1.00	1.00	10.00	00:01:00.000	0	0
2		FWD	1.00	1.00	5.00	00:00:10.000	0	0
3		REV	1.00	1.00	8.00	00:00:10.000	0	0
4		PULSED	1.00	1.00	5.00	00:00:30.000	0	0
5		OSCILLATION	0.50	0.50	9.00	00:00:25.000	1	5

ボタン(buttons)、フィールド(fields)

Existing Users	既存ユーザーのリスト; マウスを使ってユーザーを一人リストから選択する。
Regimes for Selected Users	そのユーザーの名前で作成されたレジームのリストで、レジームを選択するとロードされ、ユーザーはこれを見たり修正したりできる。
Regime Name	現在のレジーム名; 新しくレジームを作成する場合は、この空欄にその名前を記入する。
Time Between Pump Updates	コンピューターがポンプのパラメーターを更新してゆく時間間隔; デフォルトタイムは1秒。
Time Between Data Log to File	コンピューターが実験中の流れデータをサンプリングする間隔で、デフォルトの値は10秒。きわめて長時間にわたる実験では、この間隔を延長してデータファイルの大きさを縮小する。ご注意: この機能は、 <i>Configure System Variables</i> ウィンドウでデータ保存のオプションを選択したときのみ適用される。21ページ参照。
Estimated file size	与えられた実験所要時間とデータサンプリングの間隔で作動すると、データファイルがどの位の大きさになるかの見積もり。ご注意: この機能は、 <i>Configure System Variables</i> ウィンドウでデータ保存のオプションを選択したときのみ適用される。21ページ参照。
Step	現在選択あるいは修正しているステップ番号

Step Name	現在選択されているステップの名前
Flow Type	このステップに特定の流れ方向あるいは型(順流、逆流、脈流(方形波)、振動流)を指定。
ON/HI (s)	脈流(方形波)あるいは振動流を用いる場合、弁をどの位の時間一定状態にして流れを継続するか(脈流)あるいは順方向に維持するか(振動流)を指定。正常の順流あるいは逆流(一方向性フロー)では、この値を1.00にしておく。
OFF/LO (s)	脈流(方形波)あるいは振動流を用いる場合、弁をどの位の時間一定状態にして装置への流れを停止するか(脈流)あるいは逆方向にするか(振動流)を指定。正常の順流あるいは逆流(一方向性のフロー)では、この値を1.00にしておく。
Shear (dyne/cm ²)	このステップで細胞に適用されることになるシアストレス値
Duration (h:m:s.ss)	このステップの持続時間(時間:分:秒:ミリ秒)
GoTo	ループを形成する場合、どのステップに戻るかを指示。 <i>GoTo</i> ステップは常に現在のステップより以前のステップ番号でなければならない。
Loop	ループが <i>GoTo</i> ステップと現在のステップ間を何回往復するかを指示。
Summary Table	レジームに現在含まれるステップをリストした表。特定の一行を選択すると、そのステップのパラメーターを見たり修正したりできる。
Insert Step	レジーム内に現在のステップの前後で一ステップ挿入する。
Delete Step	現在選択しているステップを削除する。
New Regime	すべてのパラメーターを排除して、新レジームを開始する。 <i>Regime Name</i> 欄に新しく名前をタイプし、 <i>Insert Step</i> を選択する。
Delete Regime	現在選択しているレジームを削除する。
Save Regime	新しく作成あるいは修正したレジームをセーブする。
Return	このパネルを閉じてメインパネル(<i>Main Panel</i>)へ戻る。
Check Shear	レジームに入力したシアストレスの値が、使用している装置、ポンプ、チューブ寸法で達成可能かどうかを確認する。
Print	現パネルをプリンターあるいはHTMLファイルへプリントする。
Help	オンラインヘルプ(未だ開かれていない)

** 実験に必要なすべてのパラメーターをどのように設定するかは、このマニュアルの実験法セクションにあります。

実験装置の設定 (Configure Testing Apparatus)

機能: このパネルでは、ユーザーが実験装置 (Streamer® あるいはFlexFlow™ フローチャンバー) の設定、修正、あるいは削除をすることができます。Streamer®、FlexFlow™ いずれもが厳密な基準寸法に製造されているゆえに、個々の装置に付きチャンバーの高さおよび幅をソフトウェアに入力しなければなりません。正確なシアストレス測定を確保するためには、これらの数値はその特定の装置のものであり、正しい値である必要があります。数値は使用されている装置のマニュアル補遺に掲載されています。

ボタン(buttons)、フィールド(fields)

Testing Apparatus	適用する流れ装置のリスト
Name	実験装置を一つ選択すると、この欄(およびそのパラメーター)が更新される。
Flow Factor	フローチャンバー内における平行流路数を示すファクターで、その数はStreamer®では6、FlexFlow™では1に当たる。
Hose Size	望みの流速およびシアストレス値を得るにはポンプがどの位速く動かなければならないかは、ホースの寸法により決定される。リストされているのはMasterflex® チューブライン標準寸法で、現システムで使用している寸法を選択する。

b	Streamer® あるいはFlexFlow™ 装置の単一チャンバー内フロー領域の幅をcmで示し、その数値は使用装置のマニュアル補遺に <i>Flow Area Width (cm)</i> として記載されている。
h	Streamer® あるいはFlexFlow™ 装置の単一チャンバー内フロー領域の高さをcmで示し、その値は使用装置のマニュアル補遺に <i>Flow Area Hight (cm)</i> として記載されている。
Viscosity	実験に使用する灌流液/メデュームの粘度を示し、その標準値は0.01dynes*s/cm ² 。
Print	現パネルをプリンターあるいはHTML ファイルへプリントする。
Save Apparatus	更新事項を <i>Name</i> 欄にリストされたこの装置下にセーブする。
Delete Apparatus	<i>Name</i> 欄にリストされたこの装置を削除する。
Help	オンラインヘルプ(未だ開かれていない)。
Return	このパネルを閉じてメインパネル(<i>Main Panel</i>)へ戻る。セーブされていない更新事項はここですべて廃棄される。

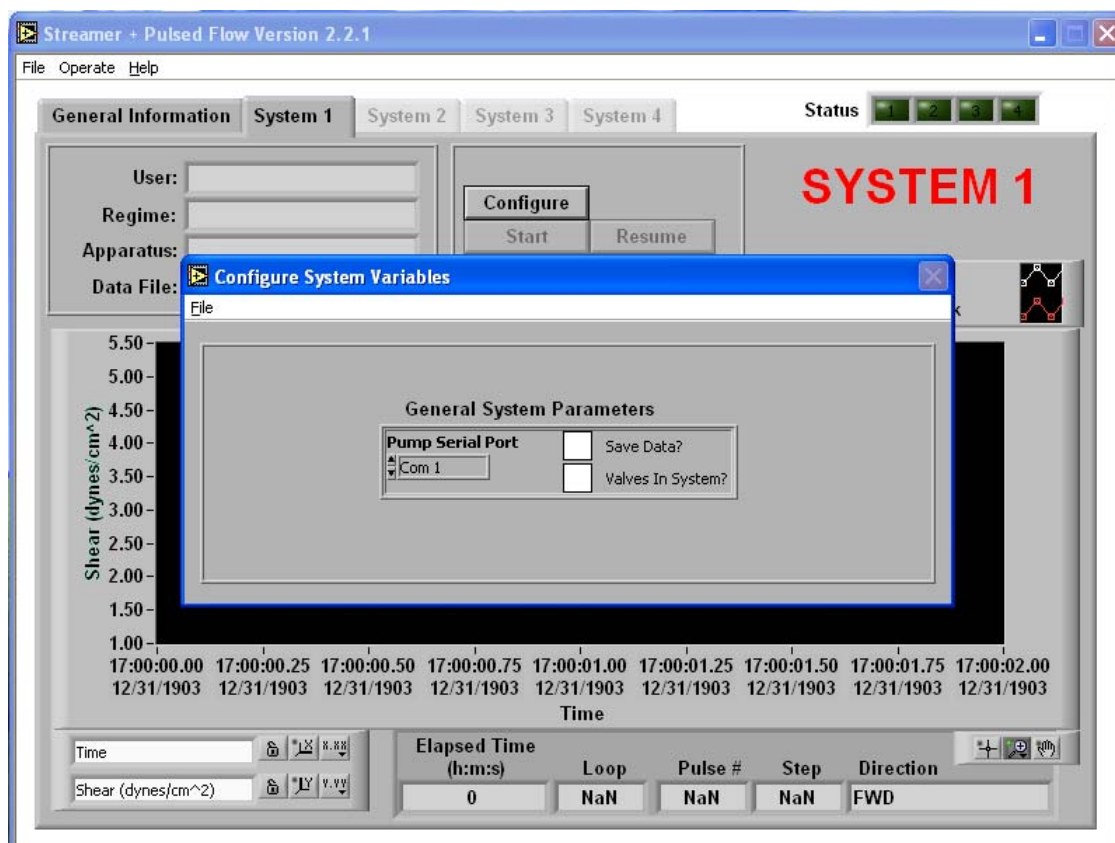
使用装置に伴う適切な数値を入力するには:

マニュアルの補遺を調べて、bとhに適切な値を確認してください。

1. 実験に使用する装置を*Testing Apparatus* から選択するか、*Name* 空欄に新しい装置名を記入します。
2. 正しいフローファクター(Flow Factor)を入力します。この数字は装置内の平行流路数を規定するものです。
3. 実験に使用するMasterflex® タイプのチューブ寸法を*Hose Size* から正しく選択してください。
4. *b*と*h*に適切な値を入力します。
5. 実験に使用する灌流液の粘度を*Viscosity*に入力します。このデフォルト値は0.01dyne.s/cm²です。
6. *Save Apparatus* ボタンをクリックし、次に*Return* をクリックしてこの画面を閉じます。

システム可変数の設定 (Configure System Variables)

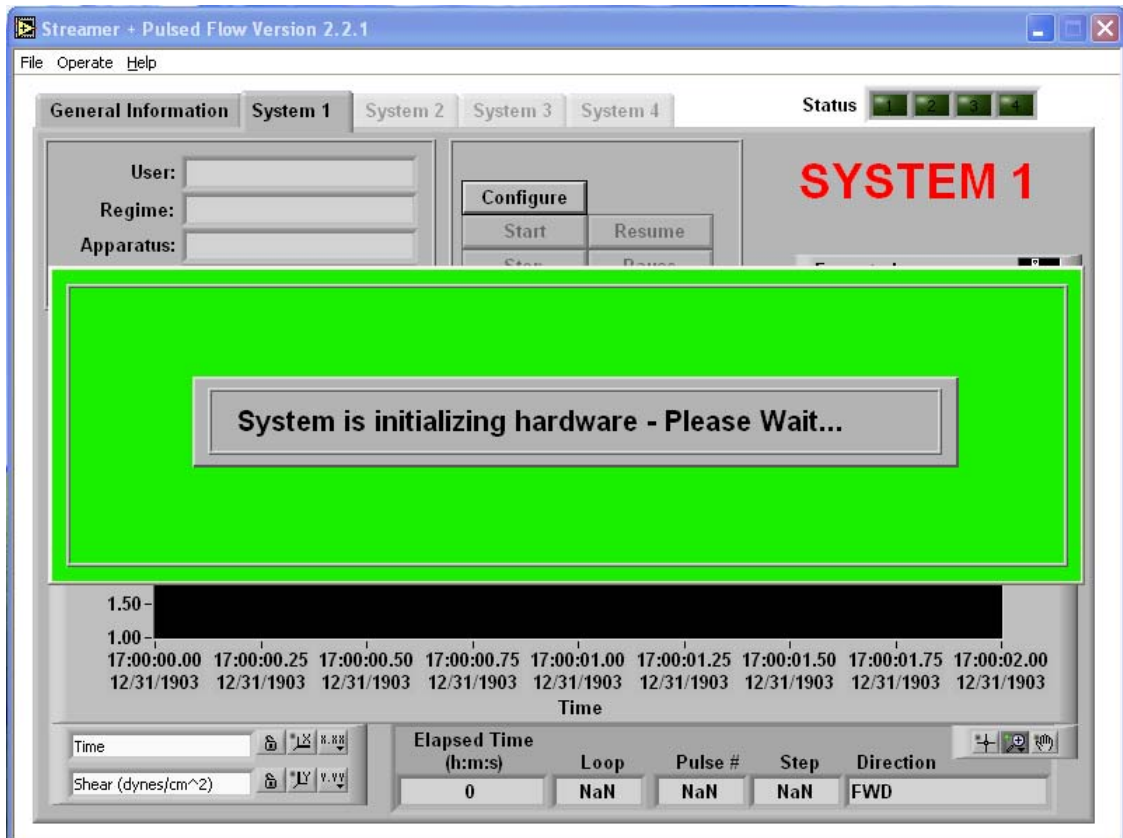
機能: このパネルでは、フローシステムにおける連関ポート、データ保存、弁の有無、の三つのシステムパラメーターを選択する目的で使用します。



Pump Serial Port	Com 1ポートはデフォルトで、変更する必要があるのは使用するコンピューターでこのポートが干渉を起こすときに限る。
Save Data ?	レジームのデータファイルをセーブしたければ、このオプションを選択する。
Valves in System ?	このオプションを選択するのは、OsciFlow® フローコントローラーを使用しているときに限る。ご注意: このオプションの機能を作動させない場合、流れの型として規定できるのはFWDのみとなり(Flow Type、18ページ参照)、 <i>Configure Regimes</i> ウィンドウ内のその他のオプションが選択不可能になる。

ハードウェアの再初期化

機能: このコンピュータープログラムを最初に開始したときにこのパネルが現れます。さらに、このパネルは *Operate* メニューから *Reinitialize Hardware* を選択したときにも現れます。システム初期化が適切に行われると、ポンプに PO1 とディスプレイされ、カチツというOsciFlow® の弁の音がします。もしポンプにつながる電源が実験中に起動、停止、再起動現象を示したり、連関が途絶えたりした場合は、プログラムを一旦オフにして再び開始するという操作の前に、まずハードウェアの再初期化を行う必要があります。



StreamSoft™ v 4.0 に関するご注意

StreamSoft™ V4.0でレゾーム作動中は、同じコンピューターを他のアプリケーションに併用しないでください。ポンプとOsciFlow®間の連関調整にはCPU中央処理機能全てを必要とするからです。CPU電力を要する他のプログラムあるいはオペレーションを同時作動した場合、ポンプや弁の同調タイミングがさえぎられる可能性があります。この影響は、OsciFlow®周波数(頻度)を2秒間ON、2秒間OFFより高頻度にセットして使用している時、あるいは、ポンプ速度を規則的に変動して脈動流を起こしている時に認められることがあります。

実験法

概要

Streamer® システムを作動しての実験は、ポンプソフトウェアの条件設定と細胞培養したカルチャースリップ (Culture Slips®) を使用するフローチャンバーの準備という、二つの主要な部分で構成されます。

Flexcell®社では、以下のステップを踏まれることをお勧めします：

1. Culture Slips® 上に細胞を培養し、Streamer® システム構成部品を滅菌する。
2. StreamSoft™ プログラムを用い、レジームを一つ設定する。
3. Streamer® システムにメデュームを通した後、ラミナーフローフードなどの無菌培養環境下で Culture Slips® を Streamer® チャンバー内に挿入する。システムをインキュベーター内に移動する。**チャンバーに空いた溝があるとシアストレス値が無意味になるため、6つの溝全部に Culture Slips® が挿入されたことを確認する。必要に応じてブランクの Culture Slips® を用いる。**
4. 実験のユーザー (user)、レジーム (regime)、装置 (apparatus) をアサインする。
5. 実験を開始する。
6. 実験が終了したら、Culture Slips® を Streamer® フロー装置から取り出し、細胞の分析にかかる。

この章では、レジームの作成、フロー装置へのスライドガラス挿入のプロセスに関してさらに詳しく説明されています。

レジームの作成

1. メインパネルで、*Operate* メニューから *Configure Regimes* を選択する。
2. リストからユーザー名をクリックする。
3. レジームを一つ新しく作成するには、まず *New Regime* をクリックし、*Regime Name* 空欄にレジーム名を入力する。
4. *Insert Step* をクリックし、ステップ名を *Step Name* 空欄に入力する。
5. *Save Regime* をクリックする。レジーム名が上部にある *Regimes for Selected Users* のフィールドに現れる。
6. このステップでの特定の流れのタイプ (Flow Type: FWD、REV、PULSED、OSDCILLATION)、ON/HI & OFF/LO の回数、シアストレス値 (Shear)、継続時間 (Duration) を設定する。 *Save Regime* をクリックし、この時点までに入力したすべての情報をセーブする。**ご注意: 特定の Flow Type 設定は Osciflow® 装置の併用時のみ可能 – Osciflow® で使用される 'Values in System' 選択 (21ページ参照) がなければ、この Flow Type は FWD に維持される。詳細は 18 ページを参照。**

ステップを追加したい場合:

7. *Insert Step* をクリックする。このステップを現在のステップの前に挿入するのか後に挿入するのかをまず問われる。 *before* か *after* いずれか選んでクリックする。 #6 で行ったように、パラメーターを入力していく。このステップを #6 で作ったステップの後に挿入した場合、GoTo と Loop のオプションを利用してステップ 1 と 2 の二つをループにすることもできる。それには、ステップ 2 で GoTo に “1” を、Loop にステップ 1、2 を反復したい回数を入力する。
8. ステップを追加したいだけ追加する。レジームが完成したら、*Save Regime* をクリックする。
9. **オプション:** 作成したレジームのシアストレス値が、セットした装置、チューブ寸法、ポンプで達成できるかが確認できる。 *Configure Regimes* ウィンドウで、そのレジームが選択され表に要約されているところで、下方にある *Check Shear* をクリックする (Summary Table、18ページ参照)。 *Pre-Test Configuration* ウィンドウが現れる (12ページ参照)。ここでユーザー (User)、レジーム (Regime)、装置 (Apparatus) をリストから選択し、それから *Update* をクリックする。設定した装置、チューブ寸法、ポンプでレジームのシアストレス値を達成できるかがソフトウェアにより判定される。必要ならばシアストレスを修正する。
10. これで、このレジームはいつでも開始できる。

実験の準備

1. 4ページの指示に従ってStreamer® システムをインキュベーター内に設置する。
2. 5ページの指示に従ってStreamer® ユニットの滅菌を行う。蓋を閉め、ネジで上蓋と体部が接触して同一平面上にくるまで締める。
3. Streamer® をシステムごとインキュベーター内に設置して、ユニットの温度を37°Cに保つ。
4. カルチャースリップ(Culture Slips®)6枚を用いて細胞を培養する。**茶色のテフロン(Teflon®)周縁でプリントされている方が培養面になっていることを確認する。**細胞をこの境界範囲内のみ注意深くプレATINGする。最小限48時間おいて細胞をスライドガラスに十分接着させる。
5. StreamSoft™ ソフトウェアでレジームを作成する。

スライドガラスへの細胞接着後:

6. システム用メデュウム容器にPBSを一ビン分満たす。
7. ポンプでチューブラインおよびStreamer® 装置にPBSを通過させて流し出し、灌流液を廃棄する; この操作の目的は、滅菌操作中に蓄積した細胞毒性物質を除去することにある。
8. メデュウム容器に500ml培養メデュウムを入れる(システム必要容量に応じて、この量は後で調節する)。
9. ポンプでシステムに培養メデュウムを通過させて、残留のPBSを流し出す。次に、この培養メデュウムを除去して、新しく滅菌済み培養メデュウム500mlに交換する。
10. 培養メデュウムをポンプでシステム全体に通して、フロー装置とチューブラインを満たす。システムがメデュウムで満たされたら、パルスダンパーを一個ずつ、底を約20度浮かせて傾け、流れが角の頂点から拡大した方へ向うようにする。接続アダプターから液体が再び入ってくるまでパルスダンパーをこの位置に保ち、それから水平位に戻す。この操作によりパルスダンパー内の液がアダプターよりわずかに高いレベルまで上がり、気泡トラップとなって、システム内に気泡が誤って入ることを防ぐ。第二番目のパルスダンパーも第一番目と同様にする。このプロセスを完了したら、流れを継続して次のステップに進む。
11. 流れを継続させた状態で、チューブライン内に目に見える気泡が封じ込められていないことを確認する。さらに、メデュウム容器の側壁に気泡が発生していないかチェックする。気泡が認めれた場合は、容器を揺らしてメデュウムの渦で側壁から気泡を解放してやる。
12. チューブとフロー装置がメデュウムで満たされ気泡が全部除かれたら、流れを一旦止め、その方向を逆にし、メデュウムをStreamer® 体部の約80%を満たす位まで減じる。液体のレベルは、Streamer® 出口のコネクターを通過後は推測するしかないが、そこまで達したら再び流れを止める。
13. Phar-Med® チューブに付いた小さな締め金をポンプヘッドのすぐ右側で締め、チューブライン流路を完全に閉鎖する。
14. Masterflex® ポンプのレバーを左方向へ全回してチューブをポンプヘッドから外す。Streamer® 装置、チューブライン、パルスダンパー、液体用リザーバーをトレーに載せたまま、培養用フードへ注意深く運ぶ。
15. Streamer® のネジを外し、蝶番になった蓋を開ける。
16. 細胞をインキュベーターから培養用フードへ移動する。
17. 滅菌済み手袋をはめ、ピンセットと指先でCulture Slip® の片端をつまむ。スライドガラス上の細胞を刺激したり押しつぶしたりしないように注意する。
18. Culture Slip® をフロー装置の溝の一つへ挿入する。**スライドガラス面で細胞の接着した側がフロー領域(スライドガラスの溝に隣接して平行に走る短めの溝)と向かい合っていることを確認する。**このプロセスで、Culture Slip® のガラスがステンレスの角に当たって割れないように注意する。
19. 細胞の接着した側がフロー装置内で適切な方向に向いていることを確認しながら、各Culture Slip® についてこれを繰り返す。**ご注意: 流速の正しい数値を確保するために、溝は6つ全部を満たす必要がある。細胞培養したCulture Slips® を6枚使いたくない場合は、余剰の溝にブランクのCulture Slips® を用いる。**

20. Culture Slips® が全部 Streamer® ユニットに収まったら蓋を閉め、システム付属の HEX レンチでネジを締める。ご注意: この時点から、**Streamer® を移動するときは常に装置を垂直位に保ち、入り口コネクタが下に、出口コネクタが上にくるようにする。Streamer® を寝かせ側面を底にして作動させたい場合は、まずシステムを液体で満たし、Streamer® チャンバーから気泡を完全に追い出す。システムに誤って気泡が入ると終局的に最上段のスライドガラスに乾燥域を形成し、その細胞は液体媒質に触れず、したがってシアストレスを受けない、ということに留意する。気泡の発生(最初に液体を満たして気泡除去を行った後)がシステム内で常時見られることのないよう、Streamer® を横に寝かせて使用する前に確認する。**
21. システム構成部分を載せたままトレイをインキュベーターに戻す。Phar-Med® チューブを Masterflex® ポンプヘッド内に戻し、ヘッドを下げて固定する。
22. Phar-Med® チューブの小さな締め金のネジをゆるめて、流路を全開にする。
23. 手動で実験している場合は、適用したい流速にポンプをセットし、スタートボタンを押す。ソフトウェア制御で行っている場合は、メインパネルへ戻って *System* で *Configure* をクリックし、ここで *User*、*Regime*、*Apparatus* を指定する。 *Update* をクリックし、次に *Start* をクリックする。
24. 実験が終了したら、Streamer® を再び培養用フードへ運び、スライドガラスを取り出す。
25. スライドガラスを除いた後、**Streamer® 装置をインキュベーターに戻し、脱イオン水をシステムに通して残留メデュームを完全除去する。必要に応じて、脱イオン水を新しくしてこれを二度三度行う。メデュームにさらされると、ステンレスの仕上げが時間の経つうちには腐食されるので、実験後は必ず、Streamer® 装置内にメデュームが残っていないことを確認する。**

実験後の分析

フロー装置から除いた後は、このスライドガラスを多数のフロー後評価に供することができます：

- Culture Slips® 培養細胞は、ホルマリン固定し、透過化処理後、ローダミン-ファロイジン (Rhodamin-Phalloidin) および DAPI 染色を行って、細胞配列を観察できる。
- 適切な緩衝液で細胞を融解し、total RNA あるいは細胞内たんぱく質抽出ができる。
- Culture Slips® を最初の培養器に戻してさらに培養し、細胞上清の回収ができる。このメデューム液で、放出されたエフェクター分子類の分析ができる。
- 細胞をトリプシン処理し、再プレーティングあるいは細胞数カウントができる。

アプリケーションノート

Culture Slips® 細胞培養法

カルチャースリップ (Culture Slips®) は、培養表面をコラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン (RGD 反復ペプチド、プロネクチン F として)、ラミニン (YIGSR ペプチドとして) などの細胞外マトリックスで処理 (あるいは無処理) された 75 mm x 25 mm x 1.0 mm のスライドガラスで、テフロン製 (Teflon®) の縁が付いています。テフロン縁は、培養細胞の増殖域を流れ刺激下に制限する役目をしています。コーティングされたペプチドにより、細胞の接着が促進されます。

細胞は 3–5 ml のメデューム中に適当な密度になるように調製して、培養面にプレーティングします (細胞数 10–25,000/cm²)。テフロン縁のプリントがある側にプレーティングされていることを確認してください。細胞接着後メデュームを追加し、その培養容器ごと CO₂ インキュベーターに入れ、37°C に保ちます。細胞が増殖してコンフルエンスに達すれば (正常ならば 48 時間)、Culture Slips® を取り出し、Streamer® フロー装置に挿入して実験に使うことができます。フロー負荷の実験終了後は、Culture Slips® を元の培養容器に戻して、フロー後の分泌分子の分析などが行えます。

もしフロー負荷レジーム施行中に細胞が剥離を起こして問題になる場合は、以下に示すプロトコールを試みて、Culture Slips® への細胞接着改善を図ってください。

- 1) Culture Slips® にプレーティングする細胞数を通常の 1/2 にする。
- 2) メデューム中の血清濃度を下げて (できれば 5% まで) 細胞の増殖速度を遅くし、細胞が自己のマトリックスを生成して接着改善できる余裕を与える。
- 3) この条件下で、細胞が増殖してコンフルエントになるまで置く (4–5 日)。

補遺

平行チャンバー(Parallel Streamer)とシアストレス数値

<u>Flow Area Height(cm)</u>	<u>Flow Area Width(cm)</u>
0.0516	2.3390
<u>Serial #</u>	<u>Flow Factor</u>
SGS-1079	6
<u>System Flow Rate (mL/min)</u>	<u>Shear Stress (dyn/cm²)</u>
0	0.0
37	1.0
75	2.0
112	3.0
149	4.0
187	5.0
224	6.0
261	7.0
298	8.0
336	9.0
373	10.0
410	11.0
448	12.0
485	13.0
522	14.0
560	15.0
597	16.0
634	17.0
672	18.0
709	19.0
746	20.0
783	21.0
821	22.0
858	23.0
895	24.0
933	25.0
970	26.0
1007	27.0
1045	28.0
1082	29.0
1119	30.0
1157	31.0
1194	32.0
1231	33.0
1268	34.0
1306	35.0

Warranty Information

1. **FLEXCELL INTERNATIONAL CORPORATION** warrants to the original purchaser/customer all hardware components of the **Streamer Shear Stress System** serial # _SGS-1079_____ for a period of **one year** from the date of delivery to the purchaser/customer to be free from manufacturing defects in workmanship or materials with the following exceptions, terms and conditions:
 - a. **ITEMS EXCLUDED FROM THE WARRANTY ARE:** software, disks, manuals and external peripherals such as printers, mouse or track ball units, imaging devices, vacuum pumps, air tanks, electric voltage converters, compressors, surge suppressers and all other accessory equipment.
 - b. **DURING THE WARRANTY PERIOD**, the purchaser/customer must notify Flexcell of any warranty claim in writing, by telephone, fax transmission or email identifying each defective part or specifically describe the exact problem no later than the last day the warranty is in effect.
 - c. **FLEXCELL AGREES** to correct any defect in workmanship or material and supply new or rebuilt parts in exchange for defective parts upon completion and submission by purchaser/customer of a printed "Parts Return Authorization" form furnished by Flexcell. Parts must be properly packed in original container and shipped to our factory service center or distributor with all shipping costs prepaid if the unit is out of warranty coverage. If the original shipping box is not available, Flexcell will send the required protective shipping container. (Flexcell will recommend the insurance value for parts or equipment to be shipped.) Return carrier shipping costs will be paid by Flexcell from the service center. The purchaser/customer is solely responsible for payment of custom fees, taxes, holding fees or value added taxes.
 - d. **THIS LIMITED WARRANTY** only covers failures due to defects in materials or workmanship which occur during normal use. It does not cover damage which occurs in shipment or failures of original equipment due to products identified as add-ons not manufactured by Flexcell International Corporation or its distributors nor does this limited warranty cover damages or failures which result from accident or disaster such as fire, explosion, flood, wind, lightning, or earthquake or misuse, abuse, neglect, mishandling, misapplication, alteration, faulty installation, modification or service by anyone other than our factory or distributor. This warranty is extended only to the original purchaser/customer unless a transfer of ownership is approved by Flexcell in writing.
 - e. **LIMITED LIABILITY.** Flexcell or its distributor's only liability shall be to remedy any defect to comply with its warranty and return the repaired equipment to function as designed. Under no circumstances shall Flexcell or its distributors be liable for any special incidental or consequential damages based upon breach of warranty or contract or negligence. Such damages include, but are not limited to: loss of profits, revenue, loss of data, down time, customer's material or time.
 - f. **DISCLAIMER OF WARRANTIES:** The Limited Warranty expressed in the foregoing language is the only warranty applicable to this product. Any other warranty, expressed or implied warranty or of merchantability or fitness for a particular purpose are hereby disclaimed. No oral or written information or advice provided by Flexcell, through its agents or employees, in the use and functioning of the equipment shall in any way create a warranty or in anyway increase the scope of this limited warranty.
 - g. **DISCLAIMER: LANGUAGE.** This warranty document, accompanying instruction manual and supplemental applicable laws appear in the English language. In the event of any inconsistency in the meaning of the words and terminology and any foreign language translation, the English language shall prevail.

2. **GOVERNING LAW.** The performance of the duties and liabilities of the parties under the terms and conditions of this Limited Warranty shall be governed in all respects by the laws of the Commonwealth of Pennsylvania, the United States of America.

APPLICATION OF STATE LAWS: Some states do not allow the exclusion or limitation of consequential damages nor do some states allow limitations on how long an implied warranty lasts, so the above limitations may not apply to you. This warranty gives you specific legal rights and you may also have other rights which vary from state to state.

3. **INTERNATIONAL CUSTOMERS.** The full text of the foregoing limited warranty and all disclaimers is applicable to international customers/purchasers except when the purchase was made from an international distributor or reseller, the warranty will be covered through your distributor or reseller.

If technical advisory support service is not available through your distributor or reseller, for service contact warranty headquarters by phone or fax.

Within the United States only -toll free 1-800-728-3714 - Fax: 1-412-664-1179
 International Customers telephone: 01-412-664-3539 - Fax: 01-412-664-1179
 Email : sales@flexcellint.com

Issued March 2001

NOTICE

The information in this document is subject to change without notice. Flexcell International assumes no responsibility for any errors that may appear in this guide. This manual is believed to be complete and accurate at the time of publication. In no event shall Flexcell International Corporation be liable for incidental or consequential damages in connection with or arising from the use of the manual.

Flexcell® 代理店一覧北アメリカ

Flexcell International Corporation
 437 Dimmocks Mill Road
 Hillsborough, NC 27278 USA
 Phone: 919-732-1591
 800-728-3714 (USA only)
 Fax: 919-732-5196
 Email: flexcell@mindspring.com
 Web: www.flexcellint.com

台湾

Nature Opera Biotechnology, Inc.
 9F-2, No.70 Sec.4, Cheng Kung Rd.
 Nei-Hu Dist.
 Taipei, Taiwan
 Phone: 886-2-27905097
 Fax: 886-2-27931322
 Email: nobio@seed.net.tw

ヨーロッパ

Dunn Labortechnik GmbH
 Thelenberg 6
 56567 Asbach
 GERMANY
 Phone: 49-2683-43094
 Fax: 49-2683-42776
 Email: info@dunnlab.de
 Web: www.dunnlab.de

ブラジル

Sellex, Inc.
 5225 Wisconsin Ave, NW
 Suite 306
 Washington, DC 20015
 Phone: 5506-4646
 Fax: 5505-7433
 Web: www.sellex.com

日本

LMS CO. LTD.
 3-6-7, Hongo,
 Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033
 Japan
 Phone: 81-3-5842-4171
 Fax: 81-3-5842-4180
 Email: intltdpt@lms.co.jp

韓国、中国、マレーシア、シンガポール、香港

Daymoon Industries, Inc.
 P.O. Box 4585
 Cerritos, CA 90703-4585 USA
 Phone: 714-542-5156
 Fax: 714-542-6131
 Email: info@daymoon.com
 Web: www.daymoon.com

中国、香港、マカオ

Medic-Pharm Technology (Int'l) Ltd.
 Room 1301, 13/F., Fook Yip Bldg,
 53-57 Kwai Fung Crescent,
 Kwai Chung, N.T., Hong Kong.
 Tel: (852) 2418 0468
 Fax: (852) 2481 5067
 Email: <mailto:yuetaihk@netvigator.com>