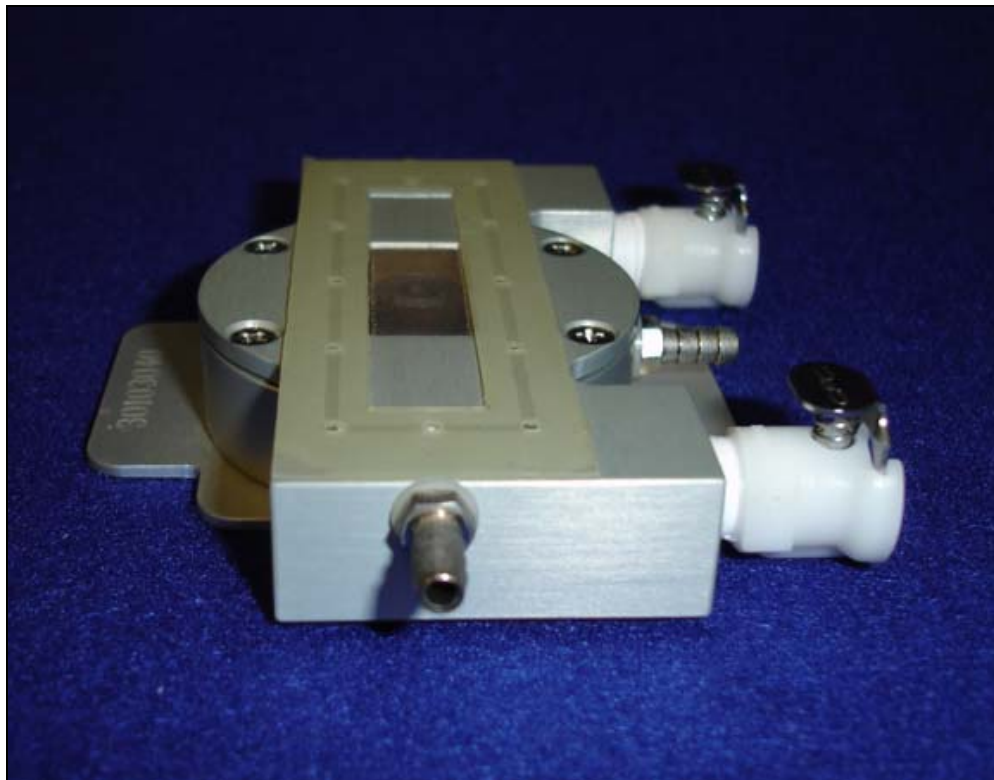




FlexFlow™

(FX-5000™ Tension System コントロール)

ユーザー用マニュアル



07-15-10
Rev: 1.1

Culturing Cells in a Mechanically Active Environment™
Flexcell International Corporation • 437 Dimmocks Mill Road, Suite 28 • Hillsborough, NC 27278
800-728-3714 • (919) 732-1591 • FAX: (919) 732-5196 • www.flexcellint.com

COPYRIGHT © 2009 FLEXCELL® INTERNATIONAL CORPORATION



目次

1. FlexFlow™ System の構成品	1
2. 背景：細胞に流体せん断応力を加える	1
3. Flexcell® FlexFlow™ について	2
4. FlexFlow™ アセンブリー	2
4.1 シリコンメンブレン上での細胞培養.....	3
4.2 Culture Slip® での細胞培養	3
5. フローシステムのセットアップ	3
5.1 フローのみの適用	5
5.2 フレックスとフローの適用.....	5
6. 実験に先立つ FlexFlow™ アセンブリー	5
7. 実験の開始	6
7.1 初回ユーザーの場合	6
7.2 すべてのユーザー	6
7.3 Culture Slip® のセット	6
7.4 FlexFlow™ と FX-5000™ Tension System の連結.....	7
8. 細胞の顕微鏡観察	8
9. FlexFlow™ の清掃	8
補遺.....	10
補遺 1: FlexFlow™ 変換表.....	11



1. FLEXFLOW™ SYSTEM の構成品

FlexFlow™ システムには次の品目が構成品として含まれている必要があります:

1. MasterFlex® L/S™ ペリスタルティックポンプ 7550-10型 Easy-Load® II ポンプヘッド及び電源コード付き
2. MasterFlex® ポンプ RS-232 接続ケーブル
3. MasterFlex® L/S™ 用シリコンチューブ(7.6 m (25'))
4. FlexFlow™ 装置と脱着コネクター類
5. シリコン潤滑剤
6. FlexFlow™ ベース(顕微鏡台適合用)
7. 脱着コネクター付き脈動減衰器(パルスダンパー) 2個
8. FlexFlow™ バイパスコネクター
9. FX-5000™ Tension System 連結用アダプター
10. 各種フィッティング入りパッケージ
11. 雄型脱着コネクター入りパッケージ
12. 大型チュービングクランプ入りパッケージ
13. 小型チュービングクランプ入りパッケージ
14. FlexFlow™ 装置前面及び側面のポート用脱着コネクター入りパッケージ
15. トレー(液体受け皿)
16. 真空チューブ(透明ビニールチューブ 3 m、青色ポリエチレンチューブ 3 m)入りパッケージ
17. 白色 PVC 製インライン容量体
18. コラーゲン表面処理薄型カルチャースリップ(Culture Slips®)(滅菌済み) 6枚
19. StageFlexer® 用コラーゲン表面処理メンブレン(滅菌済み)6枚
20. 表面無処理薄型カルチャースリップ(Culture Slips®)(無滅菌) 3枚
21. StageFlexer® 用表面処理メンブレン(無滅菌) 3枚
22. 細胞培養メデューム用ビン(脱着コネクター付き) 1個
23. 真空ビン(脱着コネクター付き) 1個
24. FlexFlow™ マニュアル
25. StreamSoft™ ソフトウェアとマニュアル
26. ビデオ CD カルチャースリップ(Culture Slips®)の設置法とガスケットへのグリース塗布法

以上の品目がすべて梱包されていることを確認してください。もし何か欠けている場合は、Flexcell® International 社までどうぞご連絡ください。

2. 背景: 細胞に流体せん断応力を加える

脈管系の細胞、特に内皮細胞、平滑筋細胞が動脈を血液が通過する際流体せん断応力(シアストレス)を受けることはよく認知されています。動脈硬化症や血管形成術後においては、裏打ちする内皮細胞層の損傷により下層の平滑筋細胞が流れにさらされることがあります。しかしながら、現在では、組織に張力や圧縮力が加わる際間質液の移動とそれに伴う流体誘発性シアストレスを生じる結果、すべての細胞がシアストレスを受けていることが認識されるようになりました。すなわち、骨芽細胞、軟骨細胞、腱靱帯細胞、膀胱上皮細胞、その他すべての細胞が程度の差はあれ流体せん断応力にさらされています。細胞の流体誘発性シアストレス応答として、イオンチャンネルの開閉、セカンドメッセンジャーを介するシグナル伝達、転写因子の活性化、遺伝子発現の変化、ア

クチンストレスケーブルの重合、細胞接着点(focal adhesions)の再分布および細胞形態変化を起します。

従来、この分野の研究者により、ローラーボトル式培養装置、培養プレートを揺り動かす、試料をラインに入れたポンプとフロー閉鎖回路、円錐・平板型粘度計、平行平板フロー装置にインジェクターで細胞の上に液体を通過させて流体誘発性シアストレスを起こす、などの方法が用いられてきました。しかしながら、現在に至るまで商品として流体誘発性シアストレスを再現性よく加えられるシステムは得られませんでした。それゆえ、Flexcell® International社では、細胞のシアストレス応答を試験する能力のある流体誘発性シアストレスシステムを開発いたしました。



3. FLEXCELL® FLEXFLOW™ について

FlexFlow™ は、平行平板型層流装置として、培養細胞に流体せん断応力と周期伸縮力とを組み合わせた負荷レジメンを適用することができ、さらにその細胞活動を顕微鏡下にリアルタイムで観察できるようデザインされた装置です。StageFlexer® はこの周期伸縮を加えながら細胞観察を行う目的でデザインされた装置で、FlexFlow™ をこれに適合します。

細胞培養はStageFlexer® シリコンメンブレンあるいはカルチャースリップ (Culture Slip®、標準型または薄型) 表面で行います。StageFlexer® メンブレン上で培養した場合、フローのみでは適用面積 (流れを受ける総面積) が 2.85 cm^2 となります。このメンブレン上の細胞に周期伸縮を加えるときは、適用培養面積はメンブレンのフレックス用ポスト (flex post) 上面を覆う領域に限られ、これが 0.25 cm^2 です。フロー

のみの適用で細胞をカルチャースリップ上に培養したい場合は、使用できるフロー面積が 7.0 cm^2 まで拡大されます。なお、装置の側面 (右か左かは流れの方向によります) にある液体流入ポートの周囲内 0.25 cm ($0.10''$) には細胞培養できません。上述の適用面積にはこの条件が考慮されています。

細胞観察はスタンダード型 (正立) 顕微鏡で、細胞を上方あるいは下方から照らし出す光源を使用して行うことができます。FlexFlow™ の作動にはペリスタリックポンプを使用し、これにFlexcell® FX-5000™ Tension System を併用して特定のレジメンで流れと伸展力を負荷し、その細胞活動を顕微鏡下にリアルタイムで観察することができます。

4. FLEXFLOW™ アセンブリー

FlexFlow™ は八種の主要部分から成り、次のような順序で組み立てます (図 1):

1. StageFlexer® 本体
2. 黄色ガスケット
3. ポスト (stretch/flow または flow-only)
4. シリコンメンブレン
5. O-リング
6. FlexFlow™ 本体
7. ネジ 4 個
8. カルチャースリップ (Culture Slip®)

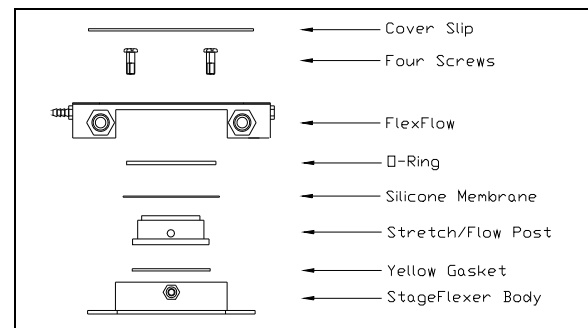


図 1. FlexFlow™ の組み立て順序

まず、StageFlexer® 本体内側の底部表面へシリコングリース (システム付属品に含まれています) を塗布します。黄色ガスケットを本体内に挿入し、上面にまたシリコングリースを一層に塗布してください。ポスト (stretch/flow または flow-only) をその上へ載せ、これを回転して長辺がStageFlexer® 前面にある接続バルブと直角になる位置にセットします。細胞を伸展する予定の場合は、stretch/flow ポストを用い、シリコングリースをポスト全上面特に円状中心部に薄層状に塗布してください。

ご注意: 中央部が円環になっている方が stretch/flow ポストです。このポストを使用するのはフローの有無にかかわらず、ストレッチを行うときに限ります。フローのみの場合は常に、表面が平滑で小さな真空孔が4つ開いた flow-only ポストを使用してください。

組み立ての次の段階は、細胞をシリコンメンブレン面に培養するかカルチャースリップ面にするかにより決まてきます。したがって、以下のステップをすぐに試みず、このフローシステムのセットアップ (セクション 5を参照) が完了してから指示にそって行えるように備えておいて



ください。次の二つのセクションは、まずは読んでおき、マニュアルを全部読み終えてから取りかかるのが最善でしょう。

4.1 シリコンメンブレン上での細胞培養

細胞をシリコンメンブレン面で培養した後、ポスト (stretch/flow または flow-only) の上へメンブレンを注意深く、できるだけポストおよび StageFlexer® 本体の中央にくるように載せます。細胞面が上向きで、培養域がポスト上でフロー領域の中央にあることを確認してください。ストレッチを行う場合は、培養域が stretch/flow ポスト中心部の円筒状フレックスポスト (flex post) の中央にあることを確認してください。次にO-リングをシリコンメンブレン外縁に、圧迫して締め付けた時これが StageFlexer® 本体上面円周の溝に入るように置きます。

この、StageFlexer® 本体、ポスト、シリコンメンブレンの重ねの上に FlexFlow™ 本体を注意深く載せてください。ポストの長方形を FlexFlow™ の穴の長方形とそろえ、FlexFlow™ に圧をかけてメンブレンをポストとの間の定位置に固定します。O-リングが StageFlexer® 本体上面円周の溝にはまり、メンブレンを締め付けて封鎖していなければなりません。それから、FlexFlow™ に4個あるネジ穴にネジを入れ、StageFlexer® 上面と同一平面にくるまで締め付けてメンブレンを固定します。StageFlexer® 内でO-リングが StageFlexer® 上面と FlexFlow™ 底面の間に圧縮されていることを確認してください。正しく圧縮されている場合、FlexFlow™ と StageFlexer® 間にはすき間がほとんどないはずです。

4.2 CULTURE SLIP® 上での細胞培養

メンブレンでなくカルチャースリップ (Culture Slip®) を細胞培養面として選択する場合は、装置にブランクメンブレン (細胞無しの、空メンブレン) をセットします。装置に用いる前に、メンブレンの裏側に貼り付いているプラスチックの薄片を必ず剥してください。このメンブレンは、カルチャースリップを交換して実験する際にも再使用ができます。カルチャースリップを装置にセットする方法については、セクション 7. 3 の解説をお読みください。

カルチャースリップ (Culture Slip®) 面で細胞培養する場合には、考慮すべき重要な点がいくつかあります。第一は、カルチャースリップのガスケット上に載っている部分は流れに当たらず適用から除外されるので、培養面に限界のあることです。プレーティングの際に、カルチャースリップ上で利用できるのは幅 1.4 cm の範囲、すなわちカルチャースリップの短辺方向で中央点から各側 0.7 cm までです。プレーティングする前にカルチャースリップを FlexFlow™ 上面に中心をとって載せ、ガスケットの境界が装置の幅および液体流入口の境界に対してどの位置にくるか、フェルトペンか尖端の細いマーカーで印を付けると手助けになります (下側から照らし出す場合はレキサン製ポストの境界をとります)。この境界線を手がかりにすると、細胞をより適切にプレーティングでき、実験を始める際には装置にカルチャースリップをより正確な位置にセットすることができます。特にスポット培養をしているときは、適切にプレーティングされた後さらに、細胞が増殖している位置を印しておく役立ちます。この印を手がかりに、顕微鏡観察の際にも細胞を容易に見つけることができます。

5. フローシステムのセットアップ

フローシステムは次の八種の主要部分から成っています：

1. ペリスタルティックポンプ (ソフトウェアによる制御が可能)
2. 接続チューブと脱着コネクタ類
3. 液体パルスダンパー 2個

4. FlexFlow™
5. バイパスコネクタ (Bypass Connector)
6. 細胞培養メデュームビン
7. 真空ビン



図 2 にセットアップの様子が示されています。各構成部品間を接続するチューブの長さは、実験室の条件に最も都合のよいセットアップにしたがい、できる限り短く保って切断する必要があります。



図 2. フローシステムセットアップの様子(左から右へ): 各々プラスチック容器に入った真空ピン、細胞培養メデュームビン、ペリスタルティックポンプ、液体パルスダンパー 1、顕微鏡台にセットされたFlexFlow™、液体パルスダンパー 2。

システムの組み立てには、まずすべての構成部品をセットアップ完了時にあるべき位置に置きます。配置をあらかじめ設定することで、各チューブがどのくらいの長さ必要かを決めるのに助かります。ピンは両方とも引っ張り返らないような安全な場所に置きます。このうち、小さい方の雌型脱着コネクタが二つ付いてポートの一つが開孔しているピンは液体メデューム用です。二つ付いた脱着コネクタの片方が大きい、開孔ポートのないピンは真空ピンです。

ご注意: 以下に続くセクションにおいて、バルブ連結端へのシリコンチューブの接続部にはすべて、システム付属のチューブ用白色クランプを使用してください。

次に、コネクタチューブを作っていきます。液体メデュームビン上にある出口脱着コネクタ接続部(ビンの中へ入った、真直ぐな長いチューブに付着した接続部です)からポンプヘッドを通過し、第一番目の液体パルスダンパー(2つあるうちのいずれか)にある接続部をつなぐに必要なコネクタチューブの長さを決め、これを切断してください。このチューブの一端に、“Male Quick Disconnects (used throughout system)” というラベルの付いたパッケージに入った脱

着コネクタの一つをバルブ端で連結します。この雄型脱着コネクタを液体メデュームビン上にある出口脱着コネクタに接続してください。チューブをポンプヘッドに挿入し、固定されるときに位置にくるようにセットします。チューブの他方遊離端に、同様にして雄型脱着コネクタの一つをバルブ端で連結し、これを第一番目のパルスダンパーに接続してください。次に、ごく短いチューブを切り出し(約8-10 cm、3-4”)、雄型脱着コネクタを両端に付け、このコネクタチューブで二つのパルスダンパーを一緒に連結してください。

第二番目の液体パルスダンパー反対側の接続端からFlexFlow™ に十分届く長さのチューブを測って切断します。片端に雄型脱着コネクタを付け、この端を第二番目のパルスダンパーに連結してください。チューブの他方の端は遊離した状態にしておきます

液体メデュームビンの入口脱着コネクタ(ビンの中で曲がった、短いチューブに付着した接続部です)からFlexFlow™ に届く長さのチューブを切断します。片端に雄型脱着コネクタを付け、チューブの他方の端は遊離した状態にしておきます。

システム構成品のバイパスコネクタ(Bypass Connector)を取り出してください(図 3)。各止水栓から出るシリコンチューブの二端がFlexFlow™ にある二つのポートに、止水栓の弁レバーが上面にくるように連結します。反対側に開いた各接続端に液体メデュームビンからくるチューブの遊離端と第二番目のパルスダンパーからくるチューブの遊離端をそれぞれ連結してください。第二番目の液体パルスダンパーからくるチューブが流れの入口に相当するポート側に、液体メデュームビンからくるチューブが流れの出口に相当するポート側になるように接続する必要があります。

次に、青色チューブ(O.D.1/4”)の一端をFlexFlow™ 側面にある真空ポートのバルブ端へ連結します。他方の端は真空ビン上に付いた小さい方の脱着コネクタ(1/4”)に連結します。FlexFlow™ 装置から約8-10 cm 離れた位置でチューブを切断し、脱着コネクタを二つライン内に付けます。透明のビニールチューブ(O.D.3/8”)を、真空源から真空ビンの上に付いた大きい方の脱着コネクタ(3/8”)に届く長さに切断します。片端を真空源に、他方の端を真空ビン上の脱着コネクタに接続してください。

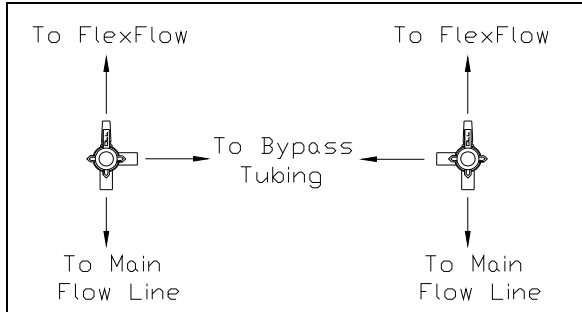


図 3. バイパスコネクタと二止水栓の配置

ご注意: FlexFlow™ の十分な封鎖を確保するためには、最小限-75 kPa の定常真空を引く能力のある真空源を使用される必要があります。

5.1 フローのみの適用

フローのみ適用する場合（即ち、ストレッチ無し）は、真空ラインをFlexFlow™ の側面のポートだけでなく前面にも適用する必要があります。まず、青色チューブ（O.D.1/4”）をもう一本、FlexFlow™ の前面から真空ピン近く、先ほど連結したばかりの青色チューブ真空ライン上まで十分届く長さに切断します。次に、この二本目の青色真空ラインをフラスコの近くで切断し、システムに付属の灰色のプラスチック製“T字型”フィッティングを用いて切断端をつないでください。“T字型”フィッティングの残りの接続部へ二本目の青色チューブを付け、これをFlexFlow™ 前面の脱着コネクタバルブ端へ接続します。この連結様式によりカルチャースリップおよびフローポストに定常真空を与えること

ができます。システムに加えた灰色の二方向性（“T字型”）フィッティングは、FlexFlow™ の前面ポートに定常真空を供給する必要のなくなった時に使用するためです。

5.2 フレックスとフローの適用

フレックスとフロー両方を適用する場合は、FlexFlow™ 前面の脱着コネクタ接続バルブと FX-5000™ Tension Systemにある“Flex In” および“Flex Out” ポートを連結する必要があります。この接続には StageFlexer® →FX-5000™ アダプターを用いてください。このアダプターは、大きな“T字型”コネクタに青色と透明の短いチューブと青色の長いチューブが連結されたもので、各チューブ端にはそれぞれ脱着コネクタが付いています。この長い方の青色チューブに付いた脱着コネクタをFlexFlow™ 前面の脱着コネクタに接続します。そして、短い方の青色チューブ、透明チューブは FX-5000™ Tension System にある“Flex In”、“Flex Out” につながるコネクタチューブの脱着コネクタにそれぞれ接続します。次に StageFlexer® →FX-5000™ アダプターにつながる太い透明のチューブをその中間で切断し、PVC製の白色パイプ容量体（システム構成に含まれています）をインラインで入れます。これは、空気容積を十分にすることにより FX-5000™ の安定化をはかるものです。

6. 実験に先立つ FLEXFLOW™ アセンブリー

セクション 4 “FlexFlow™ のアセンブリー”にしたがってFlexFlow™ を組み立ててください。フローのみ適用（ストレッチ無し）の場合は、この段階で上面の平らなフロー用ポストを用います。フレックスとフロー両方の場合は、中央が円環になったポスト（stretch/flow ポスト）を用いてください。この領域を用いて真空をかけ、メンブレンをストレッチすることになります。メンブレンをこのポストの上にセットする際には、先ずシリコングリース（システムの付属品に含まれています）を薄く一層、ポストの上面全体特に円形中央部に塗布してください。

細胞をこのシリコンメンブレン表面に培養する場合、FlexFlow™ を組み立て時メンブレンの取り扱いには十分注意してください。一つの手段としては、細胞無しのblankメンブレンを用いて慣れることです。初めてこのシステムをご使用される場合、実際に実験を開始する前にシステムに付属のblankメンブレンで練習することをお勧めします。

メンブレンを傷つけることなく、止めネジでFlexFlow™ を接点まで締め付けたら、液体および真空の全接続がしっかりできていることを確認してください。この時点



で、FlexFlow™ の上に載せるスライドガラスを除き、

システム全体が定められた位置にあるはずですが。

7. 実験の開始

7.1 初回ユーザーの場合

初回の試運転時には、まず水を用いて全システムを満たすのに必要な容量を正確に測定します。この容量がわかれば、細胞培養メデュームを正確な量で使用することができます。この最初の試験を行うには、細胞培養メデュームビンに水400 mLで満たし、液をシステム全体に通過させます（以下のセクションに説明されています）。システム全体に液が循環したら、ビンの残液量ををはかり400 mLから差し引いて必要量を決めてください。実際に供給する量としては、この値にさらに75–100 mLくらい追加します。ビンにこれだけメデュームを追加しておく、気泡がシステム内に侵入することを防止することができます。

7.2 すべてのユーザー

ご自分のシステムを使用され、すでに細胞培養メデュームの正確な必要量をご存じのユーザーは、その容量をメデュームビンに入れてください。

細胞を装置内に入れる前に培養メデュームをシステム全体に通過させ、気泡をすべて除去しておく必要があります。これは気泡により細胞がメンブレンあるいはカルチャースリップから引きちぎられ、損傷されることがあるからです。それゆえ、以下の方法にしたがって、すべての気泡をシステムから確実に除去しておかなければなりません。

バイパスコネクター各止水栓の“OFF”レバーをFlexFlow™ 方向にして、ポンプされたメデュームがFlexFlow™ を迂回し止水栓間のチューブ内を通過するようにします。ペリスタルティックポンプのモーターの方向は流れが直ちにパルスダンパーへ送られるようにします。ポンプの流速を100mL/min にセットしてスタートしてください。このようにしてFlexFlow™ を除く全システムに液を送ってやります。システムが満たされたら、パルスダンパーを一個ずつ、底を約20度浮かせて傾け、流れがこの角の頂点から拡大した方へ向うようにしま

す。接続アダプターから液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してやります。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ことができます。第二番目のパルスダンパーも第一番目と同様にしてください。このプロセスを完了しシステムが液で満たされたら、全体をチェックし、必要に応じてチューブを揺らしてライン内から気泡を完全に追い出します（流れを継続させた状態で行ってください）。チューブライン高位置のあちこちに気泡が認められることがあります。一般的に気泡が封じ込められやすいのは次の二か所です：

1. ラインの角あるいは側壁表面
2. 上方部表面（気泡は常に浮き上がってくる）

システムを通じて気泡を動かし解放してやるには、次の二方法があります：

1. チューブラインを気泡が封じ込められている個所で揺らす。
2. 流れが上行するようにチューブラインあるいはシステム構成部品のいずれかを持ち上げ、気泡を上面に浮き上がらせる。

通常気泡はシステムから流れ出るものですが、完全に除かれていることを確認するためには、最初から最後までシステムをチェックしている必要があります。

7.3 CULTURE SLIP® のセット

以下の解説はビデオでもご覧になれます。ビデオのCDはシステムの構成品として含まれています。解説を読む前後にこのファイルをご覧になり、説明されている内容を明らかにされることをお勧めします。

この時点では、流れがポンプで送られ気泡の除かれたシステム内を通過しているはずですが。バイパスコネク



ターは閉栓状態になってFlexFlow™ を分離しているはずですが、FlexFlow™ 装置自体は、カルチャースリップ (Culture Slip®) を除き組み立てが完了してなければなりません。FlexFlow™ へのチューブ接続は完全でそのままになっているはずですが、この先のステップに進む前に、システムに含まれているトレーを装置の下に置いてください。このトレーはこぼれ防止用で、液体漏れの起きた場合の受け皿にします。

まず、FlexFlow™ 上部のガスケットにシリコングリースを薄く一層に塗布してください。真空孔をグリースで塞がないように注意します。この薄層は、フロー適用中カルチャースリップとガスケット間封鎖の助けになります。

ご注意: 以下に説明される一連のステップについては、*実際の実験以前に何回か施行する必要があります。それは、この技術を完璧にこなすにはある程度練習を要するからで、初回から細胞で試すべきではありません。*

真空ビンにつながる真空源をオンにしてください。それからFlexFlow™ 側面の接続部につながる止水栓を開けます。この開栓では真空源とFlexFlow™ 間のエアフローのみが開かれていることを確認してください (即ち、空気が外へ漏れていない)。装置上部ガスケットの小孔から空気音が聞こえるはずですが、次にペリスタルティックポンプの速度を最低セッティングにまで落としてください。ここでFlexFlow™ が液体受け皿の上に水平に置かれていることを確認してください。バイパスコネクターの止水栓レバー二つを同時に回して“OFF”が向かい合う、すなわち各々がバイパスコネクターのバイパス路上に配列する位置にもってきます。

この時点で、液体がFlexFlow™ のチャンバー内に流れ込み、中を通過して最後には上部から流れ出してガスケット領域を満たします。液体の一部が装置上部のガスケット孔を通して引かれることがあるので、真空ビンに混入しないことを確認してください。ガスケット内に収まる全容量 (内壁の幅×高さ×長さ) が液体で満たされたところで、ポンプを止めます。この際、ガスケットに囲まれたプールが完全に満たされるよう、カルチャースリップを用いて液を動かし空気を追い出す必要があるかもしれません。表面張力により、この液体プールはガスケットの縁にかぶさった一つの気泡のように見えるはずですが。

次に、培養している (あるいは練習用の) カルチャースリップの長辺の一つをそのシャープな縁からガスケット

片側に載せ、この地点から落として、スリップ中央がガスケットのフロー領域上にそしてすべての真空孔を覆うようにします (実際にポンプで液体をこのガスケットプール領域に送りこむ前に、カルチャースリップをこのようにしてガスケットの上に載せる練習をするとよいでしょう)。

カルチャースリップを適切な角度に整えたら、それをガスケットの上に注意深く倒して置いてください。この倒すプロセスにより、フロー領域のメデュムだけを残して、余剰はプールから真空ラインへ押し出されていきます。この時点において、フロー領域およびここに至るまでの全システムには気泡が一つも存在しないはずですが、システム内でただ一か所残るのはFlexFlow™ の出口側ポートの空気ですが、これは実験開始にともなって押し出されてしまいます。

これで細胞に流体せん断応力 (シアストレス) や周期伸縮力 (フレックス) を適用する準備ができました。StreamSoft™ ソフトウェアを使用されているユーザーの方は、このセクションの残りの二段落は参照の必要がありません。StreamSoft™ マニュアルで、望みのシアストレスを適用するためのポンプ操作法を参照されるだけで足りる。

ソフトウェアを使用しないがポンプを直接制御する場合は、細胞に適用したいシアストレスレベルを達成するのに必要な流速を決めなければなりません。この値を求めるには、マニュアル最後にある“FlexFlow™ 変換表”という題の付いたシアストレス表を参照してください。表に示されている値は、その個別のFlexFlow™ について計算されたものです。したがって、もしなくされた場合はFlexcell® 社までご連絡ください。代替の数値表をさしあげます。

使用されるポンプに適正な寸法 (16) のチューブがセットされていることを確認してください。それからポンプを望みの流速に設定し、スタートしてください。開始後 10-15 秒でシステムが安定されるはずですが。

7.4 FLEXFLOW™ と FX-5000™ TENSION SYSTEM の連結

FlexFlow™ に FX-5000™ Tension System を連結するにはユニットに付属の StageFlexer® → FX-5000™ アダプターを用います。このアダプターは大型の“T字型”コネクターで、それぞれのフィッティングに



一側には先端に脱着コネクターの付いた短い青色と透明のチューブが、他側にはこれも先端に脱着コネクターの付いた長めの青色チューブが接続しています。まず、長い青色チューブ端の脱着コネクターをFlexFlow™ 前面の脱着コネクターに接続してください。他側のアダプターチューブの脱着コネクター二つを、FX-5000™ の“Flex In”と“Flex Out”チューブに接続してください。さらに、PVC製の白色パイプ容積体をインラインで使用する必要があり、StageFlexer® →FX-5000™ アダプターの大きい透明チューブを切断し回路に加えます。

FX-5000™ Tension Systemには、予め定められたデータに基づいて各種装置へ送る真空レベルを調節し、その弾性材に対し伸縮を適用する性能があります。FlexFlow™ を用いた場合の真空度と%伸長さ変換に必要なパラメーターは、FX-5000™ のプラットフォーム(platform)名“FlexFlow”にすでに入力されています。したがって、このシステムを使用することにより、レジメンダウンロードの際に“FlexFlow”をプラットフォームに選択するだけで、FlexFlow™ メンブレンに伸縮をレジメンに指定された通りに加えることができます。

8. 細胞の顕微鏡観察

液が流れており装置が安全に封鎖されていれば、シアストレス下の細胞を観察することが可能です。まず顕微鏡の載台にあるクリップを固定しているネジをはずしてクリップを除いて下さい。次にプラスチックのラップで載台とその下の部分を覆ってください。FlexFlow™ を顕微鏡に設置する前に、万一液漏れのために濡れる可能性があるものはすべて十分に覆っておく必要があります。顕微鏡が完全に覆われて保護されたら、大きい顕微鏡用ベースプレート後方部にあるネジ穴を用いてFlexFlow™ の基部を載台にネジで固定します。購入されたユニットに小さい方の標準ベースが付いて梱包されている場合は、この大きいベースをFlexFlow™ にネジ止めする必要がありますでしょう。それから載台のネジをFlexFlow™ が完全に安定するまで閉めてください。

ご注意: もし真空ラインチューブがFlexFlow™ の左側から出て邪魔になる場合は、右側の小さな閉鎖用ボルトと左側のバルブ付きフィッティングを交換して真空ラインを右側に移すことができます。このフィッティング交換をした際は、中の小さなガスケットを圧縮するくらいに各々を強く締めてください。

FlexFlow™ が所定位置にしっかり固定されたら、細胞観察を開始することができます。対物レンズでカルチャースリップに圧がかかりすぎないように注意してください。カルチャースリップは非常に薄いガラス片ですから、過剰の圧力をかけると簡単に割れてしまいます。カルチャースリップを割ると、次にはメデュームが装置からこぼれ出し顕微鏡の上を濡らす原因となります。

9. FLEXFLOW™ の清掃

FlexFlow™ 使用後は、装置およびフローシステム全体にポンプで新鮮水を送って洗浄し、培養メデュームを完全に除去してください。これは培養メデューム液に含まれる塩類によりアルミニウム製の装置が腐食されるためで、使用後にはその都度洗浄してください。メデュームをシステム内に残したまま何日も置くと著明な腐食現象が起り始め、最終的にはFlexFlow™ およびその他のシステム構成品を損傷するに至ります。

FlexFlow™ をそのあと二日以上使用しない場合は、システム内ラインを洗浄するだけでなく、装置自体をStageFlexer® との組み立てから分離し、内部を清掃する必要があります。

もし装置が腐食してきた場合は、80%リン酸を希釈した水溶液に浸してください。この溶液が腐食を除去し始めるとアルミニウムをも同時に除去します。それゆえ、装置の浸漬中は目を離してはなりません。リン酸希釈液の割合は、酸5%に対して脱イオン水95%



に調製します。これに20-30分間浸した後、取り出して水洗し、磨き用のタワシでこすって腐食部を除去してください。必要に応じてこのプロセスを繰り返します。

システム使用後は、チューブラインのクランプを緩めて圧を解放してやるとシリコンチューブの寿命が延長されます。



補遺

補遺 1: FlexFlow™ 変換表



補遺 1 : FLEXFLOW™ 変換表

Press (-kPa)	% Elong	Strain
0.00	0.0	0.000
3.59	0.1	0.001
7.05	0.2	0.002
10.41	0.3	0.003
13.64	0.4	0.004
16.77	0.5	0.005
19.80	0.6	0.006
22.72	0.7	0.007
25.54	0.8	0.008
28.27	0.9	0.009
30.91	1.0	0.010
33.46	1.1	0.011
35.92	1.2	0.012
38.31	1.3	0.013
40.62	1.4	0.014
42.86	1.5	0.015
45.02	1.6	0.016
47.12	1.7	0.017
49.16	1.8	0.018
51.14	1.9	0.019
53.06	2.0	0.020
54.93	2.1	0.021
56.76	2.2	0.022
58.54	2.3	0.023
60.27	2.4	0.024
61.97	2.5	0.025
63.64	2.6	0.026
65.28	2.7	0.027
66.89	2.8	0.028
68.48	2.9	0.029
70.04	3.0	0.030
71.60	3.1	0.031
73.14	3.2	0.032
74.67	3.3	0.033
76.19	3.4	0.034
77.72	3.5	0.035
79.25	3.6	0.036
80.78	3.7	0.037
82.32	3.8	0.038
83.87	3.9	0.039
85.45	4.0	0.040
87.04	4.1	0.041
88.65	4.2	0.042
90.29	4.3	0.043