นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก โดยใช้วิธีปั่นแยก และการใช้เครื่องอัตโนมัติ

อารยา ตัตวธร, ภาวิณี คุปตวินทุ, ศิริลักษณ์ เพียรเจริญ, พรทิพย์ รัตจักร์, กนกวรรณ ชินบดี และ อ้อยทิพย์ ณ ถลาง*

*ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330, *ภาควิชาพยาธิวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์-พระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400*

บทคัดย่อ : *ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้จัดตั้งธนาคารเลือดจากรกแห่งชาติขึ้นในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2545 โดยเปิดให้บริการ 2 แบบคือรับบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากมารดาผู้แสดงความจำนงบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก (unrelated cord blood) และการบริการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกสำหรับใช้ในครอบครัวตนเอง (autologous and related cord blood) ก่อนการเก็บรักษาเซลล์โดยการแช่แข็ง ต้องมีการลดปริมาตรรวมในถุงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต เพื่อประหยัดพื้นที่ในการเก็บและลดค่าใช้จ่าย การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิผลในการแยกเซลล์และข้อมูลที่เกี่ยวข้องของวิธีการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกที่ได้จากการคลอดปกติ และผ่าท้องคลอด โดยใช้วิธีปั่นแยกและการใช้เครื่องอัตโนมัติ ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2545 ถึงเดือนธันวาคม 2549 จำนวนทั้งสิ้น 388 ราย โดยเก็บจากมารดาที่คลอดปกติ 255 ราย และผ่าท้องคลอด 133 ราย ผลการศึกษาพบว่า การเจาะเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากวิธีการคลอดปกติ และผ่าท้องคลอด ได้ค่าเม็ดโลหิตขาว (white blood cell: WBC) และ เซลล์ CD34+ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ส่วนปริมาตรของโลหิต, ฮีมาโตคริต (hematocrit: Hct) และค่าเม็ดโลหิตแดง (red blood cell: RBC) ที่ได้จากวิธีการผ่าท้องคลอดมากกว่าวิธีคลอดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อศึกษาเปรียบเทียบการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตทั้ง 2 วิธี พบว่า ค่า % WBC recovery ที่ได้จากวิธีปั่นแยกให้ผลดีกว่าวิธีการใช้เครื่องอัตโนมัติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) แต่ค่าเซลล์ CD34+ หลังการเตรียมไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และค่าที่ได้ใกล้เคียงกับที่มีรายงานจากต่างประเทศ ส่วน % RBC depletion นั้น วิธีการใช้เครื่องอัตโนมัติสามารถลดปริมาตรเม็ดโลหิตแดงได้ดีกว่าวิธีปั่นแยกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้เครื่องอัตโนมัติมีการเติมสาร hydroxyethyl starch เพื่อช่วยตกตะกอนเม็ดโลหิตแดงทำให้ % RBC depletion เพิ่มขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า ปริมาณเซลล์ CD34+ ที่ได้จากการเตรียมทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกัน การใช้เครื่องอัตโนมัติในการเตรียมแยกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกจะมีต้นทุนค่าใช้จ่ายสูง แต่สามารถลดปริมาตรรวมในถุงได้ดีกว่า จึงช่วยประหยัดพื้นที่และค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาระยะยาว เหมาะสำหรับการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ซึ่งเป็นศูนย์กลางระดับชาติในการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกจำนวนมาก เพื่อให้เพียงพอสำหรับผู้ป่วยต่อไป*

Key Words : ● *Umbilical cord blood* ● *Cell separation* ● *Cryopreservation* ● *Cord blood bank*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2550;17:325-34.

ได้รับต้นฉบับ 15 กรกฎาคม 2550 ให้ลงตีพิมพ์ 10 ตุลาคม 2550

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ นางสาวภาวิณี คุปตวินทุ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ปทุมวัน กรุงเทพ ฯ 10330

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก (umbilical cord blood transplantation) เป็น อีกวิธีหนึ่งในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาว โรคไขกระดูกฝ่อ ธาลัสซีเมีย และโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องแต่กำเนิด[1] ซึ่งในปี ค.ศ. 1989 Gluckman และคณะได้นำเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกมาใช้ในการรักษาโรค Fanconi anemia ประสบความสำเร็จเป็นรายแรก[2] ต่อมาในปี ค.ศ. 1993 จึงได้มีการจัดตั้ง Cord blood bank ขึ้นเป็นที่แรกที่เมืองนิวยอร์ค ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยได้มีการพัฒนากระบวนการในการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต การแยกเซลล์ และการแช่แข็งเซลล์ในถังไนโตรเจนเหลวพบว่า สามารถเก็บเซลล์ได้เป็นเวลานานหลายปีโดยที่คุณภาพของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง[3] หลังจากนั้นจึงได้มีการจัด Cord blood bank ในประเทศต่างๆ ทั้งในยุโรป และเอเชีย[1,4,5,6]

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้รับมอบหมายจากแพทยสภาให้ดำเนินการจัดหาผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่มิใช่ญาติให้กับผู้ป่วย (unrelated donor) ในปี พ.ศ. 2545 จึงได้จัดตั้งธนาคารเลือดจากรกแห่งชาติขึ้นเพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสให้กับผู้ป่วยได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตได้มากขึ้น โดยเฉพาะผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคทางพันธุกรรม[7,8] โดยธนาคารเลือดจากรกที่จัดตั้งขึ้นมีการให้บริการ 2 แบบคือ รับบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากมารดาผู้แสดงความจำนงบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก (unrelated cord blood) และบริการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกสำหรับใช้ในครอบครัวตนเอง (autologous and related cord blood) โดยได้ทำการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกมารดาที่คลอดบุตรทั้งในกรณีคลอดปกติหรือผ่าท้องคลอด ทางศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ ร่วมกับภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รายงานการศึกษาวิธีการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก พบว่า การเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกในมารดาที่คลอดปกติและผ่าท้องคลอดนั้น ได้จำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตไม่แตกต่างกัน และวิธีการเจาะเก็บเซลล์ต้นกำเนิดในขณะที่รกยังไม่ลอกตัว (in utero placenta aspiration) เป็นวิธีที่เหมาะสมในการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกในผู้บริจาค[9]

การเก็บและเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกเพื่อใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตให้กับผู้ป่วย จำเป็นต้องเตรียมให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดที่มีปริมาณเซลล์ CD34+ เพียงพอ และมีคุณภาพดี เพื่อให้การรักษาได้ประโยชน์สูงสุด เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่เก็บได้ต้องมีกระบวนการเตรียมก่อนการเก็บแช่แข็ง สามารถเตรียมโดยวิธีการปั่นแยก แต่เนื่องจากปัจจุบันในต่างประเทศมีการนำเครื่องอัตโนมัติมาช่วยในการปั่นแยกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก ซึ่งมีรายงานว่าให้ผลดีกว่าวิธีปั่นแยก คือลดการปนเปื้อนของเม็ดโลหิตแดงซึ่งช่วยทำให้ใช้พื้นที่ในการเก็บน้อยกว่าวิธีเดิม และทำให้ลดปริมาณไนโตรเจน เหลวที่ใช้ในการเก็บรักษา[10,11,12] ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการในการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกโดยใช้วิธีปั่นแยก และโดยการใช้เครื่องอัตโนมัติ

วัสดุและวิธีการ

เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก

คัดเลือกจากมารดาซึ่งตั้งครรภ์เดี่ยว มีอายุครรภ์มากกว่าหรือเท่ากับ 37 สัปดาห์ หรือมีน้ำหนักตัวโดยประมาณของทารกในครรภ์มากกว่า 2,500 กรัม ทารกในครรภ์ไม่มีโรคทางพันธุกรรม หรือโรคที่เป็นข้อห้ามต่อการจัดเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบเลือด ภูมิคุ้มกัน และผลการตรวจเชื้อ เอชไอวี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบซี และเชื้อซิฟิลิสเป็นลบ ในกรณีแสดงความจำนงบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก มารดาต้องมีความเข้าใจและยินดีเข้าร่วมบริจาคเลือดจากรก โดยลงชื่อแสดงความยินยอมการบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกเพื่อการปลูกถ่าย

เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต จากนั้นทางแพทย์ได้ส่งใบแสดงความยินยอมให้กับทางศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ ก่อนคลอด กรณีการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกสำหรับนำไปใช้ในครอบครัวตนเอง มารดาต้องมีความเข้าใจในประโยชน์ และข้อจำกัดของการเก็บ stem cells ไว้สำหรับครอบครัวในอนาคต และแสดงความจำนงผ่านสูตินรีแพทย์มายังศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2545 จนถึงเดือนธันวาคม 2549 มีเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกที่จัดเก็บไว้จำนวน 518 ราย แต่มีข้อมูลครบสามารถนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งสิ้น 388 ราย ดังนี้ คือ มารดาผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจำนวน 229 ราย และมารดาผู้ต้องการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกสำหรับนำไปใช้ในครอบครัวตนเองจำนวน 159 ราย

วิธีการเจาะเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก

ในการเจาะเก็บใช้ถุงบรรจุโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ ชนิด single bag ที่มีปริมาตรของ CPDA-1 บรรจุในถุง 28 มล. ภายหลังจากการคลอดทารก เมื่อแพทย์ทำการผูกและตัดสายสะดือให้ชิดกับทารก และส่งทารกให้เจ้าหน้าที่พยาบาลแล้ว เจ้าหน้าที่ผู้ทำการเจาะเก็บจึงทำการเช็ดทำความสะอาดสายสะดือส่วนที่ติดกับตัวมารดาด้วยผ้าก๊อสชุบน้ำยาฆ่าเชื้อ 10% Povidine solution โดยวิธีปราศจากเชื้อจากบริเวณเหนือรอยผูกไปจนถึงบริเวณสายสะดือที่ติดกับรก หลังจากนั้นใช้เข็มที่ติดถุงบรรจุโลหิต แทงเข้าบริเวณเส้นเลือดดำของสายสะดือ ปล่อยให้เลือดจากสายสะดือไหลเข้าถุงบรรจุโลหิตตามแรงโน้มถ่วง โดยต้องให้ถุงบรรจุโลหิตอยู่ต่ำกว่าเข็ม เมื่อเลือดหยุดไหลแล้วจึงผูกสายถุงบรรจุโลหิตและนำกลับมาเตรียมปั่นเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต ที่หน่วยห้องปฏิบัติการเม็ดโลหิตขาวและเกล็ดโลหิต ฝ่ายห้องปฏิบัติการร่วมกับองค์การอนามัยโลก

ก่อนการปั่นแยกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก ได้ทำการเก็บตัวอย่างประมาณ 8 มล. เพื่อส่งตรวจ viability โดยวิธี Tryphan blue exclusion dye[5], CBC โดยใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ (Beckman-Coulter, Miami, FL, USA), ตรวจ CD34 ด้วยวิธี Flow cytometry ด้วยเครื่อง FacScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) โดยใช้น้ำยา monoclonal antibody CD34-Phycoerythrin และ CD45-Fluorescein thyocyanate (Becton Dickinson, San Jose, CA)[13], ตรวจ HLA-A, -B และ -DR typing ด้วยวิธี PCR-SSO (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) และส่งตรวจ Infectious markers ได้แก่ เชื้อซิฟิลิส เชื้อเอชไอวี ไวรัสตับอักเสบบี และไวรัสตับอักเสบซี ที่ฝ่ายคัดกรอง จ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ

เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกที่มีปริมาตรน้อยกว่า 50 มล. และปริมาณเซลล์เม็ดโลหิตขาว น้อยกว่า 4×10^8 หรือมีก้อนเลือดแข็งตัว (partial clotted blood) จะไม่ได้รับการปั่นแยกและแช่แข็งเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต[14] สำหรับการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกที่จะนำมาเตรียมเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต โดยวิธีการปั่นแยก หรือใช้เครื่องอัตโนมัตินั้น คัดเลือกโดยวิธีการสุ่ม (random sampling)

กระบวนการปั่นแยกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก

1. การปั่นแยกโดยใช้เครื่องปั่น นำถุงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกไปเชื่อมสายต่อกับ transfer bag ขนาด 300 มล. ด้วยวิธีปราศจากเชื้อ ภายใต้ห้องสะอาด (clean room class 100 A) แล้วจึงนำไปปั่น 2,700 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีโดยใช้เครื่องปั่น refrigerated centrifuge (HIMAC CR7B3, HITACHI KOKI Co., Ltd., Tokyo, Japan) เมื่อครบเวลาบีบเอาพลาสมาออกให้เหลือพลาสมาประมาณร้อยละ 20 หลังจากนั้นให้เก็บตัวอย่าง 0.5 มล. ส่งตรวจ viability, CBC และ CD34 จากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง[3,9]

2. การปั่นแยกโดยใช้เครื่องปั่นแยกอัตโนมัติ ดำเนินการภายใต้ห้องสะอาดโดยชั่งน้ำหนักถุงที่เหลือภายหลังจากการเก็บตัวอย่าง เพื่อคำนวณปริมาตรที่ได้แล้วจึงเติม hydroxy ethyl starch (HES) solution (Grifols Ltd.,

Barcelona, Spain) ในอัตราส่วนร้อยละ 20 ของปริมาตรเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกทั้งหมดโดยวิธีปราศจากเชื้อภายใต้ภาวะปลอดเชื้อ (Biosafty cabinet) และนำไปเขย่าที่เครื่อง three dimension rotator (Orbitron Rotator II, Fisher Scientific, Ontario, Canada) นาน 15 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน จากนั้นจึงนำถุงไปติดเข้ากับชุดอุปกรณ์ปั่นแยกอัตโนมัติ Sepax S-100 Cell Separation System โดยใช้ CS-510 cell separation kit (Sepax, Biosafe S.A., Eysins-s/Nyon, Switzerland) โดยเครื่องจะทำการปั่นแยกเอาพลาสมา รวมทั้งลดปริมาณเม็ดโลหิตแดง ให้เหลือแต่เพียง buffy coat ประมาณ 20 มล. หลังจากนั้นให้เก็บตัวอย่าง 0.5 มล. เพื่อส่งตรวจ viability, CBC และ CD34 จากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง[3,10,11]

กระบวนการแช่แข็ง

1. การใช้วิธีปั่นแยก

ใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) Hybri-Max® (Sigma, St. Louis, MO, USA) เป็น cryopreservative โดยใช้ DMSO ผสมกับ 20% Albumin (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ กรุงเทพฯ) ในอัตราส่วน 1:4 ค่อยๆ เติมส่วนผสมลงในถุงบรรจุเซลล์ โดยใช้ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของเซลล์ที่ได้หลังการปั่นแยก

2. การใช้เครื่องอัตโนมัติ

ใช้ 55% DMSO solution with 5% dextran 40 (Pall, Newquay Cornwall, UK) ในอัตราส่วน DMSO 5 มล. ต่อ buffy coat 20 มล. นำเข้าเครื่อง Cool Mix (Sepax, Biosafe S.A., Eysins-s/Nyon, Switzerland) โดยใช้ Syringe pump (Terumo, Shibuya-ku, Tokyo, Japan) ปรับอัตราการเติม DMSO ไว้ที่เครื่อง 30 มล. ต่อชั่วโมง

หลังจากเติมน้ำยา cryopreservative ลงในถุงแช่แข็งทั้ง 2 วิธีแล้วให้เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างใส่ cryovial tube 3 หลอด หลอดละ 0.5 มล. แล้วจึง seal แบ่งสายถุงแช่แข็งเป็น 3 ส่วน นำตัวอย่างทั้ง 3 หลอด พร้อมถุงที่เติม DMSO ใส่ในเครื่อง control rate freezer (Planer Products Ltd., Sunbury-on-Thames, UK) เพื่อลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องไปที่อุณหภูมิ -80 ˚ซ. โดยลดอุณหภูมิประมาณ 1 ˚ซ. ทุก 1 นาที[15] เมื่อครบเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำหลอดตัวอย่างพร้อมถุงบรรจุเซลล์ต้นกำเนิดไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 ˚ซ. ต่อไป

นอกจากนี้ได้มีกระบวนการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิด aerobe, anaerobe และเชื้อรา โดยทำการเก็บตัวอย่างจากในถุง pack red cells ที่เหลือจากการปั่นแยก ส่งตรวจที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป VersaTREK® (TREAK Diagnostic System, Cleveland, OH, USA) และ BD BACTECTM (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) เพื่อประเมินผลการเก็บและกระบวนการแช่แข็ง หากมีการปนเปื้อน จากเชื้อแบคทีเรีย ให้ทำการทิ้งถุงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตนั้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่า % Recovery ของ WBC และ CD34 และ % RBC Depletion โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าของเซลล์หลังปั่น} \times 100}{\text{ค่าของเซลล์ก่อนปั่น}}$$

$$\% \text{ Depletion} = \frac{\text{ค่าของเซลล์ก่อนปั่น} - \text{ค่าของเซลล์หลังปั่น} \times 100}{\text{ค่าของเซลล์ก่อนปั่น}}$$

เปรียบเทียบค่า % recovery ของ WBC และ CD34, % RBC depletion โดยใช้ Independence-samples t-test (SPSS for Window, Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

ผลการศึกษา

จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกจำนวน 388 ราย มีปริมาตรของโลหิตทั้งหมดอยู่ในช่วง 43.4-176.8

มล. (mean±SD = 96.07±25.85), จำนวนเม็ดโลหิตขาว มีค่าตั้งแต่ 1.81-38.22 x 10^8cells/bag (mean±SD = 9.12±4.66), ค่าเซลล์ CD34+ = 0.40-39.68 x 10^6 cells/bag (mean±SD = 5.26±5.89) เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบตามวิธีคลอด แยกเป็นคลอดปกติ 255 ราย ผ่าท้องคลอด 133 ราย พบว่าปริมาตรของโลหิต จำนวนเม็ดโลหิตแดง และฮีมาโตคริต ที่ได้จากวิธีผ่าท้องคลอดมากกว่าวิธีคลอดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) สำหรับค่าเม็ดโลหิตขาว และ เซลล์ CD34+ ให้ผลไม่แตกต่างกันจากการคลอดทั้ง 2 วิธี ($p > 0.05$)ดังแสดงในตารางที่ 1

การเปรียบเทียบวิธีการปั่นแยกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกทั้ง 2 วิธี พบว่าวิธีใช้เครื่องอัตโนมัติสามารถลดจำนวนเม็ดโลหิตแดงได้ดีกว่าวิธีปั่นแยกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ส่วนค่าของ % WBC recovery ที่ได้จากวิธีปั่นแยก ให้ผลดีกว่าวิธีการใช้เครื่องอัตโนมัติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) แต่ค่าเซลล์ CD34+ ที่ได้จากวิธีการเตรียมทั้ง 2 วิธี ให้ผลไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการปั่นแยกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ด

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาตรโลหิต ค่า WBC, RBC, Hct และ CD34 + cells จากการคลอด 2 วิธี

Parameter	คลอดปกติ Mean±SD (n=255)	ผ่าท้องคลอด Mean±SD (n=133)	p-value
Volume (mL)	92.59±24.69	102.74±26.78	< 0.001
Hct (%)	31.44±5.36	33.49±5.78	0.001
Total RBCs (x10^6) /bag	299.10±127.78	333.89±120.41	0.009
Total WBCs (x10^8) /bag	9.18±4.83	8.99±4.33	0.688
Total CD34+ cells (x10^6) /bag	4.67±3.36	5.64±7.06	0.324

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่า RBC, WBC, CD34+ cells จากวิธีการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก 2 วิธี

Parameter	วิธีปั่นแยก (n = 235)	เครื่องอัตโนมัติ (n = 153)	p-value
RBC (x 10^6) /bag			
Pre	303.88±130.75	322.00±118.54	0.159
Post	238.38±97.47	72.20±26.05	< 0.001
% depletion	20.68±9.39	73.43±14.64	< 0.001
WBC (x 10^8) /bag			
Pre	9.32±5.06	8.79±3.96	0.251
Post	8.41±4.70	7.09±3.35	0.001
% recovery	89.86±6.80	79.71±10.02	< 0.001
CD34 (x 10^6) /bag			
Pre	3.40±3.04[a]	5.42±6.06[b]	0.107
Post	3.53±4.54	4.23±4.17	0.117
% recovery	75.74±16.35[a]	76.96±15.96[b]	0.835

[a] (n = 9), [b] (n = 106)

โลหิตจากรกในกลุ่มคลอดปกติ 255 ราย พบว่าค่า % RBC depletion จากการใช้เครื่องอัตโนมัติ ได้ผลดีกว่าวิธีปั่นแยกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ค่า % WBC recovery ที่ได้จากวิธีปั่นแยก ให้ผลดีกว่าวิธีใช้เครื่องอัตโนมัติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ส่วนค่าเซลล์ CD34+ ที่ได้จากวิธีการเตรียมทั้ง 2 วิธี ให้ผลไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3 จากการเปรียบเทียบวิธีการปั่นแยกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากการผ่าท้องคลอด 133 รายพบว่าค่า % RBC depletion จากการใช้เครื่องอัตโนมัติ ได้ผลดีกว่าวิธีปั่นแยก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ค่า % WBC recovery ที่ได้จากวิธีปั่นแยก ให้ผลดีกว่าวิธีใช้เครื่องอัตโนมัติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ส่วนค่าเซลล์ CD34+ ที่ได้จากวิธีการเตรียมทั้ง 2 วิธี ให้ผลไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3

สำหรับการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียพบว่า จากการเตรียมในช่วงเวลาตั้งแต่ พฤษภาคม 2545 จนถึงธันวาคม 2549 ตรวจพบการปนเปื้อนจำนวน 4 ราย (0.77%) ซึ่งตรวจพบว่าเป็นเชื้อ *E. Coli* และ *Leuconostoc Spp.* 1 ราย, *Pseudomonas stutseri* 1 ราย ติดเชื้อ *Staphylococcus Spp.* 1 ราย และ Corynybacterium 1 ราย ซึ่งทั้ง 4 ยูนิต ต้องนำไปทิ้ง

วิจารณ์

ธนาคารเลือดจากรกจัดตั้งขึ้นเพื่อรองรับการจัดหาเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตให้กับผู้ป่วยที่ไม่สามารถหาผู้บริจาคที่เป็นพี่น้องและครอบครัวเดียวกันได้ และลดปัญหาการติดเชื้อ Cytomegalovirus ซึ่งจะพบได้น้อย

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาตรของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต, RBC, WBC, CD34+ cells ที่ได้จากการเตรียม 2 วิธี จำแนกตามวิธีการคลอด

Parameter	คลอดปกติ (n=255)			ผ่าท้องคลอด (n=133)		
	วิธีปั่น (n=198)	เครื่องอัตโนมัติ (n=57)	p- value	วิธีปั่น (n=37)	เครื่องอัตโนมัติ (n=96)	p- value
Volume (mL)						
Pre	91.10±23.91	97.76±26.83	0.095	106.97±26.41	101.11±26.87	0.257
Post	44.06±15.19	21.32±1.25	<0.001	45.25±13.65	21.36±1.51	<0.001
RBC (x 10^6) /bag						
Pre	291.56±129.39	325.32±119.39	0.068	369.85±119.13	320.04±118.61	0.034
Post	232.22±97.81	57.99±25.96	<0.001	271.36±89.91	72.32±26.23	<0.001
% depletion	19.78±8.24	73.33±15.22	<0.001	25.46±13.17	73.49±14.37	<0.001
WBC (x 10^8) /bag						
Pre	9.15±5.08	9.31±3.88	0.798	10.28±4.94	8.49±3.99	0.054
Post	8.24±4.69	7.52±3.30	0.191	9.33±4.69	6.83±3.37	0.005
% Recovery	89.78±6.81	79.97±7.75	<0.001	90.30±6.87	79.55±11.18	<0.001
Total CD34+ cells (x 10^6) /bag						
Pre	3.44±3.25[a]	4.94±3.37[b]	0.268	3.06[c]	5.68±7.1[d]	ND
Post	3.43±4.71	4.28±3.10	0.112	4.06±3.58	4.21±4.71	0.841
% Recovery	75.94±17.48[a]	79.72±13.86[b]	0.579	74.18[c]	75.47±16.89[d]	ND

[a] (n=8); [b] (n=37); [c] (n=1); [d] (n=69); ND = Not done

กว่าการใช้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้ใหญ่ การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกนั้นพบว่าประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีโดยเฉพาะในผู้ป่วยเด็ก เนื่องจาก immunogenicity และ maturity ของ T cells ของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกนั้นยังไม่มากเท่ากับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่ได้จากผู้ใหญ่ จึงทำให้ปัญหาของการเกิด graft-versus-host disease (GVHD) พบได้น้อยกว่า ดังนั้นการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกและวิธีการเตรียมเซลล์ที่ได้มาตรฐานเป็นการเพิ่มโอกาสให้ผู้ป่วยได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตเพิ่มมากขึ้น[14,16]

การศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบปริมาตรของโลหิต จำนวนเม็ดโลหิตแดง และฮีมาโตคริต ตามวิธีคลอด พบว่า ค่าที่ได้จากวิธีผ่าท้องคลอดมากกว่าวิธีคลอดปกติอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับค่าเม็ดโลหิตขาว และเซลล์ CD34+ ให้ผลไม่แตกต่างกันจากการคลอดทั้ง 2 วิธี ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานไว้[9] การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกโดยวิธีปั่นแยก และการใช้เครื่องอัตโนมัติพบว่า ปริมาตรของการเจาะเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก ไม่มีผลต่อการลดปริมาตรของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในการเตรียมทั้ง 2 วิธี เมื่อเทียบความสามารถในการลดปริมาตรเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่ได้ พบว่า การใช้เครื่องอัตโนมัติ จะลดปริมาตรได้เหลือไม่เกิน 25 มล. ต่อถุง ในขณะที่วิธีปั่นแยกจะคงเหลือปริมาตรมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งทำให้ประหยัดพื้นที่ในการเก็บประมาณ 1 เท่า สามารถเพิ่มจำนวนถุงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกในการเก็บต่อถังได้มากขึ้น และยังช่วยลดปริมาณ DMSO ที่เข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย วิธีการในการลดปริมาตรของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกทำได้หลายวิธี ทั้งการใช้เครื่องปั่นแยก และเครื่องอัตโนมัติ วิธีการตกตะกอน และการเติมสารต่างๆ เข้าไปใน cord blood เพื่อช่วยแยกชั้นเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต โดยอาศัยความถ่วงจำเพาะของสาร (density gradient)[6,11,17] นอกจากนี้การลดปริมาตรของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตและพลาสมาอาจใช้วิธีการปั่นด้วยถุงชนิดพิเศษที่เป็นระบบปิด (top-and-bottom) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถลดปริมาตรได้ใกล้เคียงกับการใช้เครื่องอัตโนมัติ (Sepax) อีกทั้งช่วยลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย[17,18]

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกในกรณีที่มี ABO incompatibility ระหว่างผู้บริจาคและผู้ป่วยนั้น หากผู้ป่วยมีไตเตอร์ของ anti-A และ/หรือ anti-B ค่อนข้างสูง จำเป็นต้องลดความเสี่ยงของการเกิด transfusion reaction เนื่องจากมี free hemoglobin จากเม็ดโลหิตแดงที่แตก ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยเกิดอันตรายเพิ่มมากขึ้นได้ ดังนั้นวิธีการลดปริมาณเม็ดโลหิตแดงในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกให้เหลือน้อยจึงเป็นวิธีการลดความเสี่ยงดังกล่าวได้ การศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตโดยใช้เครื่องอัตโนมัติสามารถลดปริมาตรของเม็ดโลหิตแดงได้ 73.4±14.6% ซึ่งสามารถลดปริมาตรของเม็ดโลหิตแดงได้มากกว่าวิธีปั่นแยก จากการศึกษาในต่างประเทศพบว่า การใช้ HES เพื่อช่วยตกตะกอนเม็ดโลหิตแดงเป็นวิธีที่สามารถลดปริมาตรเม็ดโลหิตแดงได้ดีกว่าวิธีปั่นแบบธรรมดา หรือปั่นด้วยถุงชนิด top and bottom[10,17] นอกจากนี้มีรายงานการใช้ poligeline, gelatin ในการแยกเม็ดโลหิตแดง พบว่า gelatin สามารถลดปริมาตรเม็ดโลหิตแดงได้ดีที่สุด แต่มีข้อจำกัดคือ Gelatin ที่นำมาใช้สกัดมาจากปลา ซึ่งบางประเทศอาจจะไม่ได้รับอนุมัติให้นำมาใช้ในคน[6]

จำนวนเม็ดโลหิตขาวที่แช่แข็งขึ้นกับจำนวนเม็ดโลหิตขาวที่ได้จากการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก และวิธีการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตโดยการปั่นลดปริมาตร การศึกษานี้พบว่า ค่า % WBC recovery ด้วยวิธีปั่นแยกให้ผลดีกว่าการใช้เครื่องอัตโนมัติ แต่ค่า % CD34+ cell recovery ที่ได้จากทั้ง 2 วิธี นั้นไม่แตกต่างกัน ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับที่มีรายงานจากต่างประเทศ[6,10,16] ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของความเร็ว

รอบในการปั่นอาจทำให้มีผลกระทบต่อการลดจำนวนเซลล์เม็ดโลหิตขาวชนิด granulocyte โดยไม่มีผลกระทบต่อ mononuclear cell (MNC) หรือ เซลล์ CD34+[10]

นอกจากนี้ในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก ภาวะการติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยอาจเกิดขึ้นได้ และเป็นปัญหาแทรกซ้อนที่ทำให้การปลูกถ่ายไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นการทิ้งเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกที่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา จึงเป็นข้อที่ควรคำนึงถึง ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียร้อยละ 0.77 โดยพบในกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่เตรียมโดยวิธีปั่นแยกเท่านั้น เชื้อที่พบส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ตามผิวหนังซึ่งอาจปนเปื้อนได้ในระหว่างกระบวนการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตซึ่งเป็นระบบเปิด ดังนั้นวิธีการทำความสะอาดอุปกรณ์ และพื้นที่การปฏิบัติงานจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญที่ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความระมัดระวังเป็นอย่างยิ่ง การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตด้วยระบบปิด เช่น การใช้เครื่องอัตโนมัติจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้ดี แต่มีข้อเสียคือราคาแพง

สรุป

การใช้เครื่องอัตโนมัติในการเตรียมแยกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกมีต้นทุนค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีปั่นแยก แต่มีข้อดีคือกระบวนการปั่นแยกถูกควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ทำให้การลดปริมาตรของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตและปริมาตรเม็ดโลหิตแดงมีความคงที่ดีกว่า ช่วยประหยัดพื้นที่รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาระยะยาว และลดปัญหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย จึงเหมาะสมกับกรณีที่มีเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรกจัดเก็บจำนวนมาก โดยเฉพาะศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ซึ่งเป็นศูนย์กลางระดับชาติในการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากรก เพื่อให้เพียงพอสำหรับผู้ป่วยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณดวงใจ คุขุนทด เจ้าหน้าที่หน่วยห้องปฏิบัติการเม็ดโลหิตขาวและเกล็ดโลหิต ฝ่ายห้องปฏิบัติการร่วมกับองค์การอนามัยโลก ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บรวบรวมข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

1. *Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. N Engl J Med 2006;354:1813-26.*
2. *Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989; 321:1174-8.*
3. *Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:10119-22.*
4. *Yasutake M, Sumita M, Terashima S, Tokushima Y, Nitadori Y, Takahashi TA. Stem cell collection filter system for human placental/umbilical cord blood processing. Vox Sang 2001;80:101-5.*
5. *Regidor C, Posada M, Monteagudo D, et al. Umbilical cord blood banking for unrelated transplantation : Evaluation of cell separation and storage methods. Exp Hematol 1999;27:380-5.*
6. *Perutelli P, Catellani S, Scarso L, Ferraris PC, Dini G. Processing of Human cord blood by Three Different Procedures for Red Blood Cell Depletion and Mononuclear Recovery. Vox Sang 1999;76:237-40.*
7. *ไตรโรจน์ ครุธเวโช. โครงการรับบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาค. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2545;3:191-3.*
8. *ข้อบังคับแพทยสภา ว่าด้วยการรักษาจริยธรรมแห่งวิชาชีพเวชกรรม (ฉบับที่6), ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไปเล่ม 119 ตอนที่ 42ง วันที่ 23 พฤษภาคม 2545:52-6.*
9. *Wacharaprechanont T, O-Charoen R, Vanichsetakul P, et al. Cord Blood Collection for the National Cord Blood Bank in Thailand. J Med Assoc Thai 2003;86(Suppl. 2) S409-S416.*

10. *Zingsem J, Strasser E, Weisbach V, Zimmermann R, et al. Cord blood processing with an automated and functionally closed system. Transfusion 2003;43: 806-13.*
11. *Yang H, Acker JP, Abley D, McGann LE, Akabutu J. High-efficiency volume reduction of cord blood using pentastarch. Bone Marrow Transplant 2001;27:457-61.*
12. *Hurtado C, Bonanad S, Soler MA, et al. Quality analysis of blood components obtained by automated buffy-coat layer removal with a Top & Bottom system (Optipress II). Haematol 2000;85:390-5.*
13. *Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Naryar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytomety. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother 1996;5:213-6.*
14. *รัชนี โอเจริญ. Cord blood bank in Thailand. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2549;16:239-42.*
15. *Areman ME, Deeg HJ, Sacher RA. Cryopreservation of peripheral stem cells following processing. Bone marrow and stem cell processing: A manual of current techniques. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1992:352-4.*
16. *Reboredo NM, Diaz A, Castro A, Villaescusa RG. Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. Bone Marrow Transplant 2000;26:1263-70.*
17. *Armitage S, Fehily D, Dickinson A, Chapman C, Navarrete C, Contreras M. Cord blood banking : volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system. Bone Marrow Transplant 1999;23:505-9.*
18. *Lapierre V, Pellegrini N, Bardey I. Cord blood volume reduction using an automated system (SEPAX) vs. a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. Cytotherapy 2007;9:165-9.*
19. *Kogler G, Sarnowski A, Wernet P. Volume reduction of cord blood by Hetastarch for long-term stem cell banking. Bone Marrow Transplant 1998;22(Suppl. 1): 14-5.*

Comparison of Cord Blood Processing Procedure using Standard and Automated Centrifugation Techniques

Araya Tatawatorn, Pawinee Kupatawintu, Sirilak Phiancharoen, Pornthip Ratajak, Kanokwan Chinbordee and Oytip Nathalang*

*National Blood Centre, Thai Red Cross Society; *Department of Pathology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand*

Abstract: *The National Cord Blood Bank of Thailand has been set up since May 2002. Collection and processing of cord blood donations have been performed to serve for patients waiting for unrelated, autologous and related stem cell transplants. Prior to the addition of cryoprotectant, the reduction of the volume of cord blood units is needed in order to allow lower storage and overall expenses. This retrospective study was undertaken to evaluate cord blood processing procedure using standard and automated centrifugation techniques. Altogether, 388 cord blood units, which were cryopreserved at the National Blood Centre, Thai Red Cross Society from May 2002 to December 2006 were studied. Of these, 255 and 133 cord blood units were collected from normal delivery and cesarean section. A comparison of total white blood cell (WBC) and total CD34+ cells in cord blood that collected from normal delivery were similar to cesarean section ($p > 0.05$). Total red blood cells (RBC), hematocrit and volume of cord blood that collected from cesarean section were significantly higher than those collected from normal delivery ($p < 0.05$). Moreover, using a standard centrifugation technique the collection efficiency of WBC (% WBC recovery) is better than an automated technique ($p < 0.001$), while CD34+ cells after processing is not different ($p > 0.05$). On the other hand, using and automated technique, % RBC depletion is more effective than standard centrifugation technique ($p < 0.001$). This may be due to the addition of hydroxyethyl starch during processing with an automated technique. In conclusion, CD34+ cells of cord blood processing using standard centrifugation technique were similar to automated centrifugation technique. Although an automated centrifugation technique needs more expense, it allows lower storage and long-term liquid nitrogen supplied. The automated centrifugation technique appears to be suitable in cord blood processing in view of large-scale National Cord Blood Bank.*

Key Words : ● *Umbilical cord blood* ● *Cell separation* ● *Cryopreservation* ● *Cord blood bank*

Thai J Hematol Transf Med 2007;17:325-34.