

凍結臍帯血の保存バッグとセグメント間の造血機能検査（有核細胞数，生細胞率，CD34 測定，CFU-GM 測定）の比較と凍結期間による造血機能の評価

杉本 達哉¹⁾ 佐藤 薫²⁾ 佐々木ひとみ²⁾ 中塩屋千絵¹⁾ 兵藤 理¹⁾
土田 文子¹⁾ 櫻井 朋美¹⁾ 村上 美知¹⁾ 山口 陽子¹⁾ 板垣 浩行¹⁾
武井美恵子¹⁾ 菅井さや佳²⁾ 三島 大志³⁾ 小林 信昌¹⁾ 吉場 史朗¹⁾
加藤 俊一^{1)~3)}

背景：臍帯血移植は凍結細胞を用いるため，凍結臍帯血の造血機能評価は重要である．しかしながら，液体窒素に保存された造血前駆細胞の造血機能がどの期間保持されるかは明らかでない．

方法

1. Validation の 23 件（凍結期間 1 年 2 カ月～5 年）から有核細胞数，生細胞率，CD34 測定及び CFU-GM 数より凍結前，解凍後のバッグ大室，バッグ小室，セグメントの評価を行った．

2. Validation と移植出庫前セグメント解凍検査（凍結期間 1 カ月～8 年）より凍結期間による造血機能の影響を検討した．

結果

1. 検体別の造血機能検査比較

凍結前またはバッグ大室，小室と比べセグメントの造血機能検査値は低値傾向にあったが，各検体間で良好な相関を認めた．

2. 凍結期間別造血機能検査比較

生細胞回収率で 5 年以上保存群が有意 ($p < 0.05$) に低値を示したが，CD34 陽性細胞，CFU-GM 数では各保存期間群に差を認めなかった．

考察：臍帯血移植申込時の造血機能評価として，セグメントからバッグ内生細胞数や機能推測の妥当性が示された．今回検討の保存期間で造血前駆細胞の造血機能減少は認めなかったが，今後も継続的な検討が必要である．

キーワード：臍帯血，凍結保存，造血機能

第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会推薦論文

はじめに

臍帯血バンクを介しての非血縁者間臍帯血移植は骨髓バンクを介しての非血縁者間骨髓移植とともに，同胞などの血縁者間に適合ドナーを見いだせない患者における代替ドナー移植として近年移植数が増加している^{1)~5)}．その利点として，①コーディネートに時間を要さないため速やかに移植を行うことが可能であること，②ヒト白血球抗原 (Human leukocyte antigen, 以下：HLA) の 1 抗原及び 2 抗原ミスマッチ移植が可能であることから比較的ドナーを検索しやすいこと，③移植

後の免疫反応である移植片対宿主病 (Graft versus host disease) が比較的軽症であること等があげられている．

1998 年 8 月に，HLA 情報の全国一元管理，適合臍帯血の公開検索など，臍帯血移植が公平かつ安全に実施されるために日本さい帯血バンクネットワークが設立され，2008 年 5 月現在 11 の臍帯血バンクにより運営されている．各臍帯血バンクは日本さい帯血バンクネットワークの各基準書を基にして移植用臍帯血を適正に保存・管理している．また，臍帯血バンクでは凍結保存臍帯血における品質管理の一環として，凍結保存臍

1) 東海大学医学部付属病院細胞移植再生医療科・輸血室
2) 東海大学医学部付属病院臍帯血バンク
3) 東海大学伊勢原校舎研究支援センター・研究資源バンク
〔受付日：2008 年 6 月 20 日，受理日：2009 年 8 月 10 日〕

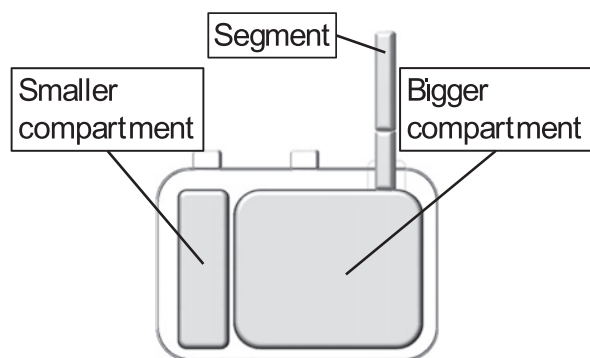


Fig. 1 Structure of Freezing bag

帯血 100 件当たり 1 件の割合で定期的に臍帯血を抜き取り、解凍後造血機能検査を実施して臍帯血保存処理が的確に行われていることを確認している。日本さい帯血バンクネットワーク発足時から長期間の移植用臍帯血が保存されているが、長期凍結保存臍帯血の造血機能の評価は明確になっていない。そこで我々は、①凍結臍帯血定期的抜き取り検査（以下：validation）による、凍結前後の造血機能検査から、バッグ大室、バッグ小室、セグメント (Fig. 1) の各検体の比較評価を行った。また、② validation と移植出庫前検査のセグメント解凍検査から、凍結期間による造血機能の影響について検討したので報告する。

対 象

母親からインフォームドコンセントが得られ、細胞処理と保存が行われた臍帯血を対象にした。

①各検体の比較評価では、2003 年から 2006 年に実施された validation、凍結期間 1 年 2 カ月から 5 年の 23 件において造血機能検査の比較検討を行った。

②凍結期間による造血機能の影響では、1997 年から 2006 年に実施された validation と移植出庫前のセグメント解凍検査、凍結期間 1 カ月から 8 年を対象に生細胞数、CD34 陽性細胞数、顆粒球マクロファージコロニー形成細胞（以下：CFU-GM）数の回収率から比較検討を行った。

方 法

1. 細胞処理及び凍結

臍帯血の細胞処理は HES 遠心法で行った。臍帯血採取施設にて臍帯血専用バッグ (ニプロバッグ CBC-20A, ニプロ, 大阪) に採取された臍帯血に抗凝固剤 (CPD 液) を含めた血液量の 20% 容量の 6% hydroxyethylstarch (HES40, ニプロ, 大阪) を添加した。500 rpm, 6 分間遠心後、多有核細胞血漿を回収し、赤血球の大部分を除去した。1,600rpm, 10 分遠心後、血漿成分を除き、多有核細胞血漿を 20ml となるよう調整した。

凍害保護液は 10% DMSO (Cryoserv, Bioniche Pharma, Lake Forest) / 1% dextran (デキストセラン G, TERUMO, 東京) となるように添加した。プログラムフリーザー (-3°C/min at -60°C, -5°C/min at -80°C) にて凍結し、液体窒素中に保存した。

2. 解凍

解凍は 37°C 温水中で速やかに行った。洗浄操作は行わず、検査用臍帯血を採取し、造血機能検査を行った。

3. 有核細胞数測定

凍結前臍帯血検体は自動血球測定器 COULTER Ac.T 10 (BECKMAN COULTER, 東京) で測定した。解凍後臍帯血はチュルク液 (和光純薬, 大阪) で核染色し、計算盤を用い顕微鏡にて計測した。

4. 生細胞率測定

0.2% トリパンブルー (和光純薬, 大阪) で細胞染色し、死細胞を計測した。有核細胞数から死細胞を差し引き、生細胞数を算出した。生細胞数 / 有核細胞数 × 100 (%) にて生細胞率を算出した。

5. CD34 陽性細胞測定

ProCOUNT 試薬キット (日本ベクトン・ディッキンソン, 東京) は TRUCOUNT™ tube, Control 試薬 A (核染色剤/IgG₁ PE/CD45PerCP) 及び CD34 試薬 B (核染色剤/CD34 PE/CD45 PerCP) から構成される。測定する検体毎に TRUCOUNT™ tube を 2 本用意し、一方に Control 試薬 A を 20μl, 他方に CD34 試薬 B を 20μl 加えた。各試験管に検体を 50μl ずつ加え、試薬と混和するように旋回しながら混和した。室温、暗所にて 15 分間インキュベーション後、10 倍希釈された FACS Lysing Solution (日本ベクトン・ディッキンソン, 東京) を 450μl 加え旋回混和した。解析は ProCOUNT 法のゲート設定に従い、得られた数値より以下の計算式から CD34 陽性細胞数を算出した。

CD34 陽性細胞数 (/μl) = (測定 CD34 陽性細胞数 / 測定ビーズ数) × (試験管当りのビーズ数 / 検体量)

6. CFU-GM 測定

凍結前、解凍後の検体を 35mm 培養皿 2 枚に播種した。1 dish あたり有核細胞数 20,000 個になるよう培地 (MethoCult GF H4434V, Stem Cell Technology Inc, Vancouver) に加え、37°C, 5% CO₂ 環境下にて 2 週間培養した後、顕微鏡で CFU-GM のコロニーをカウントした。

7. 臍帯血処理工程における凍結バッグ吊下げ時間によるバッグ大室、バッグ小室、セグメントの有核細胞数の変化

臍帯血移植保存条件を満たさなかった臍帯血で、研究利用への同意が得られていた臍帯血 3 件を用いて、臍帯血処理工程における凍結バッグへの濃縮有核細胞の移行状態を検証した。臍帯血保存処理工程では凍結

Table 1 Comparison of hematopoietic cell function in 23 validation samples

Head	Sample	Mean	S.D.	C.V.	N
Nucleated cell concentrations ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Cord blood before freezing	28.60	8.62	1.80	23
	Bigger compartment	30.31	9.77	2.04	23
	Smaller compartment	29.60	9.18	1.92	23
	Segment	25.73	7.66	1.60	23
Viability (%)	Cord blood before freezing	97.0	2.85	0.59	23
	Bigger compartment	88.1	6.33	1.32	23
	Smaller compartment	88.9	5.98	1.25	23
	Segment	86.7	10.76	2.24	23
CD34 positive cell concentrations ($/\mu\text{l}$)	Cord blood before freezing	61.28	31.15	6.50	23
	Bigger compartment	51.21	25.90	5.40	23
	Smaller compartment	52.14	23.96	5.00	23
	Segment	49.09	25.21	5.26	23
Total CFU-GM count	Cord blood before freezing	612,760	339,020	70,690	23
	Bigger compartment	557,220	389,136	81,140	23
	Smaller compartment	488,000	378,075	78,834	23
	Segment	333,925	262,335	54,700	23

S.D.: standard deviation, C.V.: coefficient of variation, N: number

バッグに濃縮有核細胞を移行させる時、凍結バッグ内の空気抜きのため、セグメントが凍結バッグより上位に位置する。そこで、凍結バッグ吊下げ経過時間によるバッグ大室、バッグ小室、セグメントの有核細胞数の推移を測定した。臍帯血の保存処理工程において凍結バッグ吊下げ5分後に各検体の有核細胞数を自動血球測定器 COULTER Ac.T 10 (BECKMAN COULTER, 東京) で測定した。

8. 統計処理

解凍後のバッグ大室とバッグ小室、バッグ大室とセグメント、バッグ小室とセグメントの各組み合わせによる有核細胞数、生細胞率、CD34 陽性細胞数、総 CFU-GM 数について、相関係数と回帰式を求めた。また、各組み合わせについて、Wilcoxon singled rank test で比較検定を行った。比較検定は $P < 0.05$ で有意とした。

凍結期間による造血機能の影響について、移植出庫前検査とセグメント解凍検査から生細胞数、CD34 陽性細胞数、CFU-GM 数の回収率を算出した。凍結期間1年未満の造血機能検査における各回収率と比較し、1年～2年未満、2年～3年未満、3年～4年未満、4年～5年未満、5年以上群の5群を Mann-Whitney U-test にて有意差検定を行った。有意差判定は $P < 0.05$ で有意とした。

結 果

1. 造血機能検査における凍結前、バッグ大室、バッグ小室、セグメントの統計と比較評価

東海大学さい帯血バンクで2003年から2006年に実施された凍結バッグのバッグ大室、バッグ小室及びセグメントの validation 結果を Table 1 に示した。

また、Table 1 の有核細胞数、生細胞率、CD34 陽性細胞、総 CFU-GM について、各検体間で行った比較検定の p 値をチェッカーボード方式で記載した結果を Table 2 に示した。

有核細胞数では凍結前とバッグ大室間で凍結前が有意に低値を示した。また、凍結前とセグメント間、バッグ大室とセグメント間、及びバッグ小室とセグメント間でセグメントが有意に低値を示した。

生細胞率では凍結前とバッグ大室間、凍結前とバッグ小室間、及び凍結前とセグメント間で後者が有意に低値を示した。

CD34 陽性細胞では凍結前とバッグ大室間、凍結前とバッグ小室間、及び凍結前とセグメント間で後者が有意に低値を示した。

CFU-GM では凍結前とバッグ小室間、凍結前とセグメント間、バッグ大室とセグメント間、及びバッグ小室とセグメント間で後者が有意に低値を示した。

2. 凍結前、バッグ大室、バッグ小室、セグメント間における有核細胞、CD34 陽性細胞、総 CFU-GM 数の相関

凍結前、解凍後のバッグ大室、バッグ小室、セグメントの有核細胞の相関を Fig. 2 に、CD34 陽性細胞の相関を Fig. 3 に、総 CFU-GM の相関を Fig. 4 に示した。

有核細胞における各検体間の相関係数(r^2)は 0.781～0.931 であり、良好な相関が認められた。CD34 陽性細胞における各検体間の相関係数も 0.769～0.879 であり、良好な相関が認められた。しかし、総 CFU-GM における各検体間の相関係数は 0.410～0.724 であり、弱い相関にとどまった。

Table 2 Comparison of P values of hematopoietic cell functions in 23 validation samples of cord blood (CB) before freezing and after thawing from bigger or smaller compartments or segments

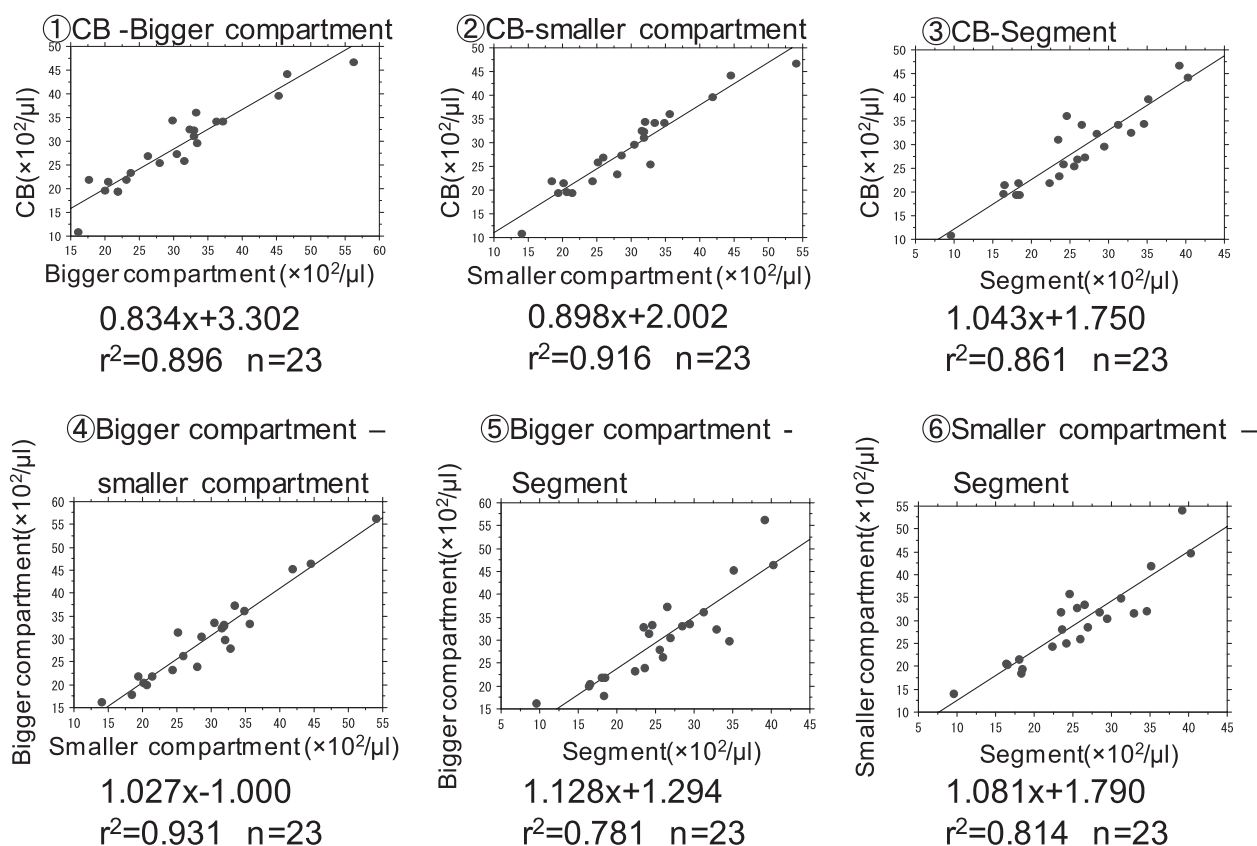
Nucleated cell concentrations	CB	Bigger compartment	Smaller compartment	Segment
CB		0.0208	0.1245	0.0005
Bigger compartment			0.1573	0.0004
Smaller compartment				0.0002
Segment				

CD34 positive cell concentrations	CB	Bigger compartment	Smaller compartment	Segment
CB		0.0062	0.0192	0.0007
Bigger compartment			0.5034	0.2478
Smaller compartment				0.5034
Segment				

Viability	CB	Bigger compartment	Smaller compartment	Segment
CB		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Bigger compartment			0.2734	0.7265
Smaller compartment				0.3696
Segment				

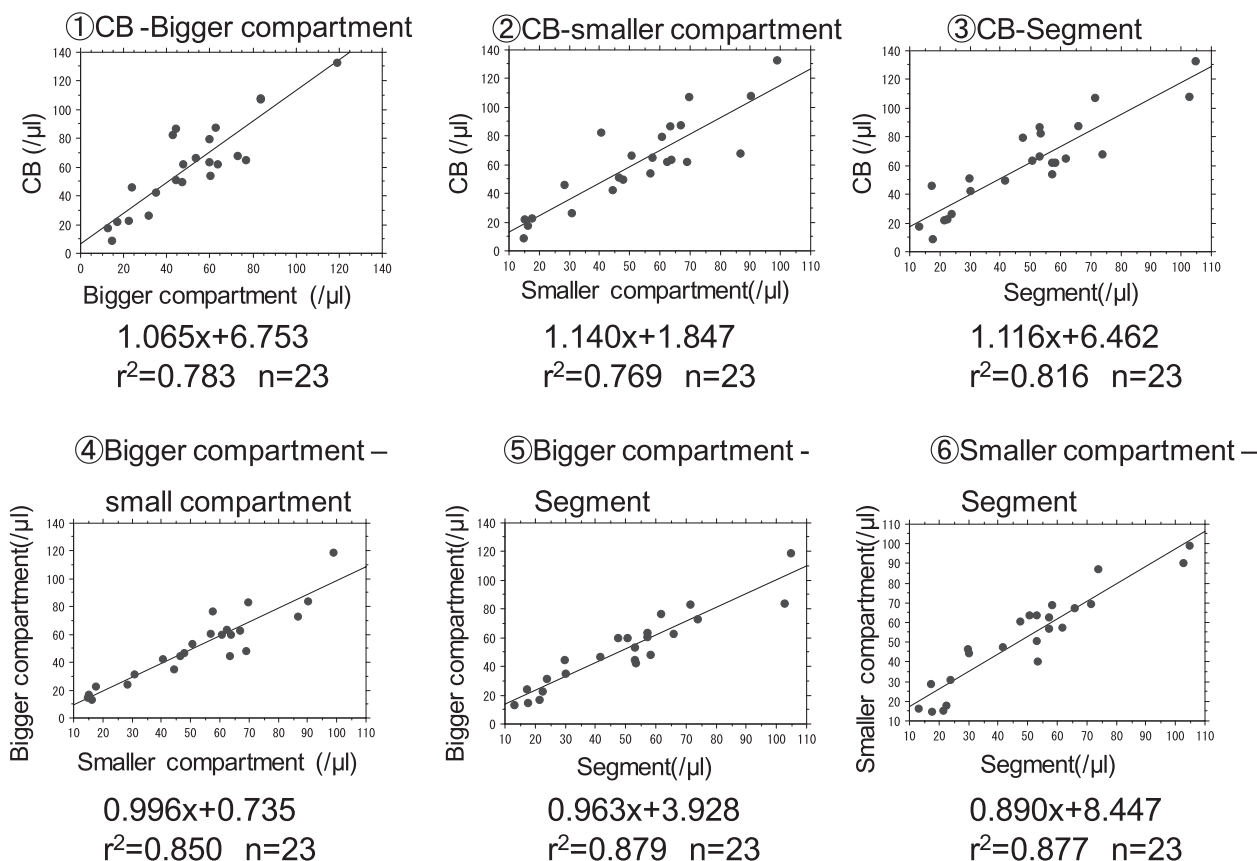
Total CFU-GM counts	CB	Bigger compartment	Smaller compartment	Segment
CB		0.2015	0.0116	0.0001
Bigger compartment			0.2735	0.0002
Smaller compartment				0.0119
Segment				

CB: Cord blood before freezing



CB: Cord blood before freezing

Fig. 2 Correlation between concentrations in cord bloods (CB) of nucleated cells before freezing with those after thawing contained in bigger or smaller compartments or segments.



CB: Cord blood before freezing

Fig. 3 Correlation between concentrations in cord bloods (CB) of CD34-positive cells before freezing and those after thawing contained in bigger or smaller compartments or segments.

3. 臍帯血処理工程における凍結バッグ吊下げ時間によるバッグ大室、バッグ小室、セグメントの有核細胞数の変化

臍帯血保存処理工程に伴う凍結バッグ吊下げ5分後の各検体の有核細胞数の結果を Table 3 に示した。セグメントにおける有核細胞数はバッグ大室及びバッグ小室に比べ、凍結バッグ吊下げ5分後で低値傾向を示した。ただし、n が少ないため統計学的な検討を行うことはできなかった。

4. 凍結期間による造血機能の影響

東海大学さい帯血バンクで1997年から2006年に移植出庫前検査あるいはバリデーションを目的として実施された Segment 解凍検査の結果を検討した。

凍結期間は1カ月から8年に分布し、1年未満、1年～2年未満、2年～3年未満、3年～4年未満、4年～5年未満、5年以上の6群に分け、生細胞数、CD34陽性細胞数、CFU-GM数の凍結前臍帯血から回収率を算出し、凍結期間1年未満群とその他の群の比較検定を行った結果を Table 4 に示した。なお、生細胞、CD34陽性細胞、CFU-GMの数が各々で異なるのは、検査開

始時期がそれぞれ異なる経緯によるものである。

生細胞回収率は5年未満の期間では有意差を認めなかったが、5年以降では有意に低下していた ($P = 0.004$)。一方、CD34陽性細胞とCFU-GM細胞数の回収率では各期間とも有意差を認めなかった。

考 察

臍帯血幹細胞を含む造血前駆細胞は液体窒素中で理論的には半永久的に保存が可能であるとされているが、実際の臍帯血バンク事業においては保存の途中に他の臍帯血の搬出などに際して短時間ではあるものの温度の上昇を受ける機会があるため何らかの影響がある可能性が指摘されている⁶⁾。

また、伊藤らは臍帯血バッグ本体における細胞の生存状況をセグメントで検査することが可能であることを報告⁷⁾しているが、長期凍結保存による凍結臍帯血の造血機能への影響は明らかにされていない。

今回我々は東海大学さい帯血バンクにおいて冷凍保存された臍帯血の内、移植出庫前検査あるいは validation として解凍検査を行った検体を対象として、①凍結

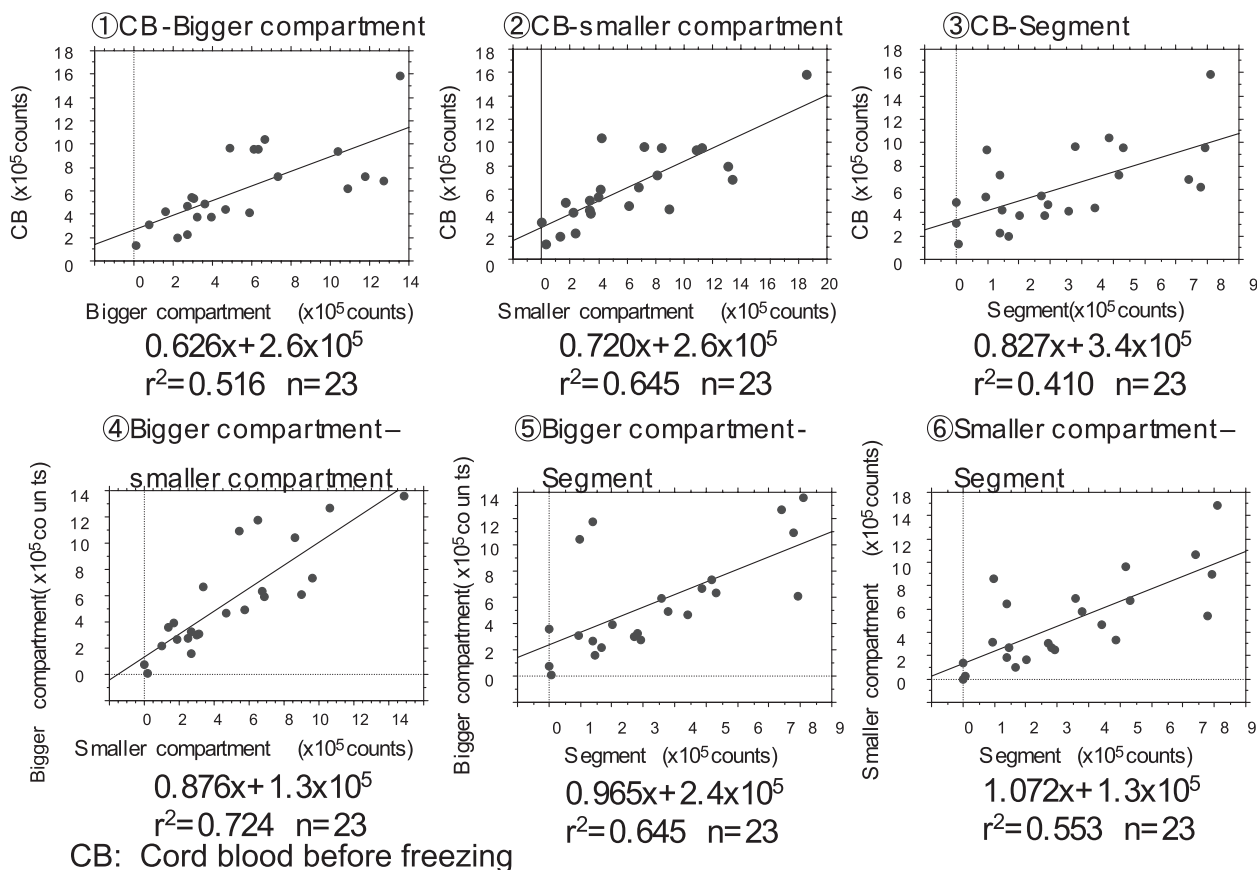


Fig. 4 Correlation between counts in cord bloods (CB) of total CFU-GM before freezing with those after thawing contained in bigger or smaller compartments or segments.

Table 3 Comparison of nucleated cell concentrations among bigger and smaller compartments of bags and segments after five minutes hanging.

Passage	5 min		
Kind	Bigger compartment	Smaller compartment	Segment
Cord blood ①	7.19	6.72	6.11
Cord blood ②	5.87	5.83	5.51
Cord blood ③	4.23	4.16	4.00

Unit: $\times 10^3/\mu\text{l}$

前の臍帯血と解凍後の臍帯血本体およびセグメントの間に相関が認められるか、②保存期間により生細胞率や造血機能が変化するかどうかという2つの問題を検討した。

まず、凍結前の検体と解凍後の臍帯血バッグ大室、小室、セグメントを比較すると、有核細胞数、CD34陽性細胞数、総CFU-GM数のいずれにおいてもセグメントが低値傾向を示していた(Table 1)。これはセグメント作製時に凍結バッグを吊り下げバッグ内の空気を抜く工程の影響が考えられた。我々は、凍結バッグを吊り下げることによりバッグより上位のセグメント部分の細胞が下位に位置するバッグ内への移動により細

胞数が若干低下することを観察した(Table 3)。したがって、細胞数の関与する検査項目である有核細胞数、CD34陽性細胞数、総CFU-GM数の濃度が低下したものではないかと考えている。しかしながら凍結バッグを吊り下げ実験のn数が3と少なく有意に細胞数が低下するとは言えず、細胞濃度が低下する傾向があるのではという推測にとどまった。他にも、バッグとセグメントの材質、形状の違いによる差も原因となっている可能性を否定することはできない。

次に、このような細胞濃度に差は認められたものの、凍結前、解凍後の検体間においては有核細胞数、CD34陽性細胞数は強い相関を示し、CFU-GM数においては弱い相関を示した(Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4)。

有核細胞数算定やCD34陽性細胞数算定は検査の結果が安定していることから信頼性が高く、セグメントの検査結果により臍帯血バッグ本体の細胞数を推定することが可能であることを示したと考える。

一方、コロニー形成アッセイはその性質上施設間変動、施設内変動、検査間変動が大きいことが知られている⁸⁾。今回の結果からも、セグメントにおけるコロニー形成試験の結果から臍帯血バッグ中のCFU-GMを定量的に推測することには慎重であるべきであると考えら

Table 4 Influence of freezing period on the number of viable nucleated cells, CD34-positive cell and CFU-GM in cord blood

Freezing period	Viable nucleated cell numbers (n=617)				CD34-positive cell numbers (n=184)				CFU-GM numbers (n=119)			
	RM (%)	R	N	P	RM (%)	R	N	P	RM (%)	R	N	P
-1year	87.8	72.5-98.9	30		64.3	21.8-114.8	13		80.9	40.0-108.4	10	
1-2years	90.7	35.9-102.4	285	0.1169	50.3	5.8-483.6	79	0.6022	77.6	12.5-124.1	35	0.8805
2-3years	90.6	46.3-102.5	164	0.0961	63.3	20.3-304.2	46	0.2418	70.4	7.3-122.4	24	0.9397
3-4years	89.6	54.2-104.7	61	0.8164	67.3	28.2-115.9	15	0.9083	80.8	65.5-123.3	14	0.3792
4-5years	85.5	44.9-104.8	49	0.1127	95.0	19.6-190.1	21	0.4461	80.0	50.0-148.0	16	0.1964
5years-	79.0	45.5-93.4	28	0.0040	89.8	40.6-243.1	10	0.1366	81.7	50.9-133.8	20	0.0901

RM: Recovery median, R: Range, N: number, P: P value

れる。

次に凍結保存期間による生細胞回収率は5年以上の群で1年未満の群と比較して有意に低下していたが、CD34陽性細胞やCFU-GM数では有意差を認めなかった(Table 4)。保存期間が5年以上経過した生細胞回収率の低下は、臍帯血保存凍結処理時に残存する顆粒球等の造血前駆細胞以外の細胞による影響が大きいと考えられた。しかし、今回の検討では顆粒球の染色や算定をしていないために推測にとどまり、今後より詳細な検討が必要であると考えている。

結 語

凍結・解凍後の臍帯血セグメントにおける検査値は凍結時の操作や融解による影響からやや低値傾向を認めたものの、バッグ大室、小室及びセグメントの造血機能検査には良好な相関関係が認められ、凍結セグメントを用いて移植用臍帯血の品質評価を行うことが可能であると考えられた。

また、凍結期間が5年を過ぎると生細胞回収率の低下が認められるが、CD34陽性細胞やCFU-GM数の回収率に有意差は認めなかった。死滅する細胞は顆粒球が主であり、造血前駆細胞の機能には影響がないものと推測された。

謝辞：本研究の一部は厚生労働省科学研究費(H17-再生—一般-014, H20-免疫-015)の補助により行われた。

文 献

- 1) Grewal SS, Barker JN, Davies SM, et al: Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? Blood, 101: 4233—4244, 2003.
- 2) Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al: Outcomes among 562 recipients of placental blood transplants from unrelated donors. The New England Journal of Medicine, 339: 1565—1577, 1998.
- 3) Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et al: Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. Blood, 97: 2962—2971, 2001.
- 4) Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, et al: Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. The New England Journal of Medicine, 344: 1815—1822, 2001.
- 5) 加藤俊一：臍帯血移植の現状. 移植学会雑誌, 40: 486—489, 2005.
- 6) 斉藤健一, 安武幹智, 芹沢 領, 他：臍帯血バンクにおける臍帯血処理方法の検討. 輸血学会雑誌, 44: 12—19, 1998.
- 7) 伊藤のぞみ, 佐藤典宏, 茂木裕子, 他：臍帯血凍結保存状態に関する保管検体による評価の有用性の検討. 輸血学会雑誌, 50: 621—625, 2004.
- 8) 三村 治, 樋口泰彦, 高橋 圭, 他：臍帯血造血幹細胞の評価方法とその標準化. 編者 原 宏, 臍帯血移植, 新興医学出版社, 東京, 2006, 52—54.

COMPARATIVE EVALUATION OF CORD BLOOD HEMATOPOIETIC CELL FUNCTIONS BEFORE FREEZING AND AFTER THAWING, AND ANALYSIS BASED ON SAMPLE TYPE AND FREEZING PERIOD

*Tatsuya Sugimoto*¹⁾, *Kaoru Sato*²⁾, *Hitomi Sasaki*²⁾, *Chie Nakashioya*¹⁾, *Osamu Hyodo*¹⁾,
*Fumiko Tsuchida*¹⁾, *Tomomi Sakurai*¹⁾, *Michi Murakami*¹⁾, *Yoko Yamaguchi*¹⁾, *Hiroyuki Itagaki*¹⁾,
*Mieko Takei*¹⁾, *Sayaka Sugai*²⁾, *Taishi Mishima*³⁾, *Nobumasa Kobayashi*¹⁾,
*Fumiaki Yoshida*¹⁾ and *Shunichi Kato*^{1)~3)}

¹⁾Department of Blood Transfusion Service, Cell Transplantation & Regenerative Medicine, Tokai University Hospital

²⁾Department of Cord Blood Bank, Tokai University Hospital

³⁾Department of Research Resources Bank, Research Support Center, Tokai University Isehara Campus

Abstract:

Background: Since CBT is performed using frozen cells, it is important to evaluate the hematopoietic function of frozen cells. However, it is not yet clearly known how long this hematopoietic stem cell function can be maintained in liquid nitrogen.

Study design and Methods:

First, we evaluated the hematopoietic function of 617 cord blood units, including 23 validation units, which were frozen between 1997 and 2006 and thawed one month to eight years after freezing. Nucleated cell numbers, viability, CD34 positive cell numbers and CFU-GM numbers were measured in the bigger and smaller compartments of the freezing bags, and values from segment samples of each cord blood unit were compared with those before freezing. Second, hematopoietic cell function was evaluated according to freezing period.

Results:

1. Comparison according to sample type

Viability, total nucleated cell numbers, CD34 positive cell numbers and total CFU-GM numbers of segments appeared lower than those of pre-freezing samples or those of the bigger and smaller compartments of the bag. However, significant correlation was found among samples.

2. Comparison according to freezing period

The viability of samples frozen for more than five years was significantly lower than those less than five years. CD34-positive cell numbers and CFU-GM numbers did not differ based on each freezing period.

Conclusion:

This study proves the validity of predicting hematopoietic cell number and function of frozen cord blood cells in a freezing bag by segment sampling. Although hematopoietic stem cells have not been reduced during freezing periods of up to eight years, follow-up examination is required.

Keywords:

Umbilical cord blood, Frozen periods, Hematopoietic cell function