モノクローナル抗体カラム法で製造された高純度第Ⅷ因子製剤 (クロスエイト M) 中の第Ⅷ因子の生化学的性質

古田 求¹⁾ 高橋 勲¹⁾ 八子 文恵¹⁾ 水野 伸一¹⁾
神谷 忠¹⁾²⁾ 室塚 剛志²⁾ 伊藤 碩候²⁾ 関口 定美²⁾

愛知県赤十字血液センター¹⁾

日本赤十字社血漿分画センター²⁾

(平成3年12月27日受付)

BIOCHEMICAL PROPERTIES OF FACTOR VIII IN HIGHLY-PURIFIED FACTOR VIII CONCENTRATES (CROSS EIGHT M) PRODUCED BY MONOCLONAL ANTIBODY COLUMN

Motomu Furuta¹⁾, Isao Takahashi¹⁾, Fumie Yako¹⁾, Shinichi Mizuno¹⁾, Tadashi Kamiya¹⁾²⁾,
Tsuyoshi Murozuka²⁾, Hiroyoshi Ito²⁾ and Sadayoshi Sekiguchi²⁾

¹⁾Aichi Red Cross Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center

Biochemical properties of Factor VIII (FVIII) in highly-purified FVIII concentrates (CROSS EIGHT M) produced by monoclonal antibody column were studied and compared with those of Hemofil M which was already used clinically. The FVIII clotting activity (FVIII:Cclot) levels obtained by one-stage method using severe hemophilia A plasma as a substrate were 614~729 U/vial and identical with those indicated on the label (500U/vial). The FVIII light chain antigen (FVIII:Ag) levels measured by Enzyme Immunoassay were 540~760U/vial. The ratio of FVIII:Ag to FVIII:Cclot (FVIII:Ag/FVIII:Cclot) were 0.88~1.04. The ratio of FVIII:Ag to von Willebrand Factor antigen (vWF:Ag) (FVIII:Ag/vWF:Ag) were 49.0~60.8. No difference was observed between CROSS EIGHT M and Hemofil M on the FVIII:Cclot levels, FVIII:Ag levels, FVIII:Ag/FVIII:Cclot and FVIII:Ag/vWF:Ag.

SDS-PAGE patterns showed almost no contamination except albumin being added as a stabilizer. Western blot analysis revealed FVIII heavy chain antigen of M.W. 90 kDa~220 kDa and FVIII light chain antigen of M.W. 80 kDa. No degradates of M.W. 43 kDa~50 kDa derived from FVIII heavy chain antigen were observed. CROSS EIGHT M lacked the large multimers of vWF which were detected in normal human pooled plasma. No difference was observed between CROSS EIGHT M and Hemofil M by western blot analysis of FVIII and multimer analysis of vWF.

These results suggest that CROSS EIGHT M preserves the fundamental structure of FVIII molecule for coagulant activity. Therefore, CROSS EIGHT M as well as Hemofil M may be clinically used with safety as FVIII concentrates.

はじめに

これまで、日本国内では輸血用血液製剤に関しては日本赤十字社がその供給を担当し100%国内で自給してきたが、血漿分画製剤に関しては90%以上を輸入製剤に依存してきた。近年、凝固因子製剤輸注によるエイズウイルス感染の問題を契機

に、厚生省では血液製剤にくわえ血漿分画製剤に関しても国内自給の方針を定めた。そのため、日本赤十字社では、1) 血漿分画製剤用原料血漿の国内確保、2) 血漿分画製剤の製造体制の確立及び血漿分画製剤の供給、を重要事項の一つとして努力することとなった。第Ⅷ因子製剤の製造に関して

は、バクスター社よりモノクローナル抗体カラム法を技術導入し、高純度第Ⅷ因子製剤（治験薬名 RCG-11, 商品名クロスエイト M）を製造し現在臨床試験中である。今回、我々はクロスエイト M 中の第Ⅷ因子に関して、第Ⅷ因子凝固活性、第Ⅷ因子抗原量及びウエスタンブロッティング法による第Ⅷ因子抗原の解析等の生化学的諸性質を、すでに臨床使用されているバクスター社製剤（ヘモフィル M）¹⁾²⁾と比較検討した。その結果、クロスエイト M はヘモフィル M とほぼ同等の製剤であることを確認したので報告する。

材料及び方法

1) 製剤：高純度第Ⅷ因子製剤はクロスエイト M（治験薬名 RCG-11；表示活性500U/vial, Lot No. 2MX002, 005, 008, 100mg ヒト血清アルブミン含有）を用いた。また、比較対照としてヘモフィル M（表示活性500U/vial, Lot No. EE039 K, EJ047K, EJ048K, 100mg ヒト血清アルブミン含有、バクスター社）を用いた。

2) 標準血漿：第Ⅷ因子凝固活性・抗原量、von Willebrand 因子リストセチンコファクター活性・抗原量及び von Willebrand 因子マルチマーの標準として20名成人男子健常者のプール血漿（正常ヒトプール血漿；NHPP）を用いた。

3) 第Ⅷ因子凝固活性（F VIII：Cclot 活性）の測定³⁾：0.1ml のカオリン加リン脂質液に0.1ml の先天性第Ⅷ因子欠乏血漿（ジョージキング社）を加え37℃で3分間静置した後、希釈試料0.1ml および25mM の塩化カルシウム液0.1ml を加え Coa Screener（ベーリンガー・マンハイム山之内社）を用いて凝固時間を測定した。なお、試料はクロスエイト M 及びヘモフィル M を添付注射用蒸留水にて10U/ml に溶解した後、先天性第Ⅷ因子欠乏血漿を用いて1U/ml に希釈し、さらにオーレンペロナールバッファーにて40倍及び80倍に希釈したものを用いた⁴⁾。

4) 第Ⅷ因子 L 鎖抗原（F VIII L：Ag）量の測定：抗第Ⅷ因子同種抗体（抗第Ⅷ因子 L 鎖抗体及び抗第Ⅷ因子 H 鎖抗体を含む；1,000 Bethesda U/ml）を一次抗体、ハイブリテック社抗第Ⅷ因子 L 鎖モノクローナル抗体をビオチン化したものを

二次抗体としてサンドイッチエンザイムイムノアッセイ（EIA）により第Ⅷ因子 L 鎖抗原量を測定した。発色剤は Tetramethylbentzine（TMBZ；住友ベークライト社）を用いた。なお、抗第Ⅷ因子同種抗体は血友病 A 患者に発生した抗体をプロテイン A にて精製したものを用いた。

5) von Willebrand 因子リストセチンコファクター活性（vWF：Rcof 活性）：フォンウィルブランド試薬（ヘキスト社）を用いて測定した。

6) von Willebrand 因子抗原（vWF：Ag）量の測定：アセラクロム F VIII R：Ag（ベーリンガー・マンハイム山之内社）を用いて測定した。

7) トロンビンによる第Ⅷ因子の活性化⁵⁾：ヒト血清アルブミン（80mg/ml）にて1.1U/ml に希釈した製剤に1/10量のトロンビン液（持田製薬社、最終濃度0.01U/ml）を加え、37℃で0.5～20分インキュベートし経時的に第Ⅷ因子凝固活性を測定した。

8) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動⁶⁾：製剤100U/ml, 20μl を非還元及び還元条件下で SDS 処理し、その1μl をファルマシアグラジエントゲル 4～15%中で電気泳動した。泳動後、クマシーブリリアントブルーを用いてタンパク染色を行った。

9) 第Ⅷ因子抗原（F VIII：Ag）のウエスタンブロッティング⁷⁾：製剤50U/ml, 20μl を SDS 含有ポリアクリルアミドゲル（4～20%、テフコ社ミニゲル）中で電気泳動した後、PVDF 膜（パイオ・ラド社）にタンパク質成分を転写した（7.5V/cm, 2時間, 4℃）。PVDF 膜を5%スキムミルクにてブロッキングし、洗浄後抗第Ⅷ因子モノクローナル抗体と共に4℃で一晩反応させた。その後ビオチン化抗マウスイムノグロブリン、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体を順次反応させ、ECL 検出試薬（アマシャム社）を用いて検出を行った。また、製剤の高分子画分（ファルマシア社 Sephacryl S-300のゲルろ過ボイド画分を濃縮したもの、分子量1,500kDa 以上）についても500U/ml, 20μl を用い、同様に行った。なお、抗第Ⅷ因子モノクローナル抗体は J.R. サイエントフィック社の抗第Ⅷ因子 H 鎖モノクローナ

ル抗体と抗第Ⅷ因子 L 鎖モノクローナル抗体の混合液を用いた。また、製剤のトロンビン処理は、製剤50U/ml 及びその高分子画分500U/ml をトロンビン濃度10U/ml で37℃ 2時間インキュベートした¹⁾⁸⁾。

10) von Willebrand 因子のマルチマー構造解析⁹⁾¹⁰⁾：0.1% SDS 含有1.5%アガロースゲル(120×190×1mm, シーケム HGT, FMC 社)を用いて行った。試料50U/ml, 8μl を SDS 処理後 BPB が80mm 移動するまで電気泳動した。泳動後ゲルを蒸留水にて洗浄し、一晚乾燥させた後再び PBS (-) にて洗浄した。その後、抗 vWF-ペルオキシダーゼ (200倍希釈, ダコ社) と室温で一晩インキュベートし、PBS (-)-0.1% Tween20 にて洗浄したのち ECL 検出試薬を用いて検出した。

結 果

1) クロスエイト M 中の第Ⅷ因子凝固活性, 第Ⅷ因子 L 鎖抗原量, von Willebrand 因子リストセチンコファクター活性, von Willebrand 因子抗原量

表1にクロスエイト M 中の第Ⅷ因子凝固活性, 第Ⅷ因子 L 鎖抗原量, vWF : Rcof 活性, vWF 抗原量について示した。クロスエイト M 3ロットについて測定したが, 第Ⅷ因子凝固活性, 第Ⅷ因子

L 鎖抗原量はそれぞれ614~729U/vial, 540~760 U/vial であった。第Ⅷ因子 L 鎖抗原量と第Ⅷ因子凝固活性の比 (F VIII L : Ag/F VIII : Cclot) は 0.88~1.04 とヘモフィル M とほぼ同等であった。vWF : Rcof 活性, vWF 抗原量はそれぞれ 10.3~14.0U/vial, 9.5~14.5U/vial であり, 第Ⅷ因子 L 鎖抗原量と vWF 抗原量の比 (F VIII L : Ag/vWF : Ag) は 49.0~60.8 となりヘモフィル M との間に大きな差は認められなかった。また, WF : Ag クロスエイト M 中の第Ⅷ因子凝固活性, 第Ⅷ因子 L 鎖抗原量及び vWF : Rcof 活性, vWF 抗原量について, 測定したかぎりではロット間に大きな差は認められなかった。

2) トロンビンによる第Ⅷ因子の活性化

図1にはクロスエイト M 1U/ml にトロンビン (最終濃度0.01U/ml) を添加し経時的に第Ⅷ因子

図1 クロスエイト M 中の第Ⅷ因子のトロンビンによる活性化。クロスエイト M 及びヘモフィル M 1 U/ml にトロンビン液 (最終濃度0.01U/ml) を添加し37℃でインキュベートし経時的に第Ⅷ因子凝固活性を測定した。

クロスエイト M 2MX005, ヘモフィル M EJ047 K

表1 クロスエイト M 中の第Ⅷ因子凝固活性, 第Ⅷ因子 L 鎖抗原量及び vWF リストセチンコファクター活性, vWF 抗原量

	クロスエイト M			ヘモフィル M	
	2MX002	2MX005	2MX008	EJ047K	EJ048K
Indicated (U/vial)	500	500	500	500	500
FVIII : Cclot (U/vial)	680	729	614	557	685
FVIII L : Ag (U/vial)	710	760	540	540	570
vWF : Rcof. (U/vial)	14.0	11.4	10.3	7.6	9.5
vWF : Ag (U/vial)	14.5	12.5	9.5	7.5	8.0
FVIII L : Ag	1.04	1.04	0.88	0.97	0.83
FVIII : Cclot	49.0	60.8	56.8	72.0	71.3
vWF : Ag					

凝固活性を測定した結果を示した。クロスエイト M の第Ⅷ因子凝固活性はトロンビン添加により増加し添加後 1 分で最大になった（添加前の 17.5 倍）。その後、凝固活性は減少し 20 分では添加前の 10% 程まで減少した。一方、ヘモフィル M でも同様のタイムコース、活性増加を示し、トロンビンによる第Ⅷ因子の活性化に関してクロスエイト M とヘモフィル M との間にはほとんど差は認められなかった。

3) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

予め安定化剤として添加されたヒト血清アルブミン製剤以外のタンパク質はほとんど認められなかった（データは示していない）。

4) ウェスタンブロッティング法による第Ⅷ因子抗原の解析

図 2 にはクロスエイト M 中の第Ⅷ因子抗原を直接ウェスタンブロッティング法にて解析した結果を示した。クロスエイト M には、分子量 80kDa の L 鎖と分子量 90kDa~220kDa の多形性の H 鎖バンドが検出されたが、トロンビンによる分解物と考えられる分子量 43kDa~50kDa のバンド

図 2 ウェスタンブロッティング法によるクロスエイト M 中の第Ⅷ因子抗原の解析。クロスエイト M 及びヘモフィル M を添付注射用蒸留水にて 50U/ml に溶解し、その 20 μ l を用いてウェスタンブロッティングを行った。

Lane 1: クロスエイト M 2MX002, Lane 2: クロスエイト M 2MX005, Lane 3: クロスエイト M 2MX008, Lane 4: ヘモフィル M EE039K, Lane 5: ヘモフィル M EJ047K, Lane 6: ヘモフィル M EJ048K

は検出されなかった。一方、ヘモフィル M においても同様のバンドが検出され、クロスエイト M とヘモフィル M との間に検出バンドの差は認められなかった。また、クロスエイト M について 3 ロットを測定したが、ロット間に差は認められなかった。

図 3 にはトロンビン処理を施したクロスエイト M について、ウェスタンブロッティング法にて第Ⅷ因子抗原を解析した結果を示した。クロスエイト M に検出された分子量 80kDa~220kDa のバンドは、トロンビン処理により消失し、新たにトロンビンによる分解物と考えられるバンド（H 鎖由来）が検出された。また、ヘモフィル M においても同様の結果が得られた。このようにトロンビン処理による第Ⅷ因子の分解に関してクロスエイト M とヘモフィル M の間に差は認められなかった。次にクロスエイト M を Sephacryl S-300 によりゲルろ過し、安定化剤として添加されているヒト血清アルブミンを除いて高分子画分（分子

図 3 トロンビン処理クロスエイト M 中の第Ⅷ因子抗原の解析。クロスエイト M 及びヘモフィル M 50 U/ml, 20 μ l にトロンビン処理（最終濃度 10U/ml, 37 $^{\circ}$ C, 2 時間）を施し、その後ウェスタンブロッティングを行った。

Lane 1: クロスエイト M, 2MX002, トロンビン未処理, Lane 2: 同, トロンビン処理, Lane 3: クロスエイト M 2MX005 トロンビン未処理, Lane 4: 同 トロンビン処理, Lane 5: クロスエイト M 2MX008 トロンビン未処理, Lane 6: 同 トロンビン処理, Lane 7: ヘモフィル M EE039K トロンビン未処理, Lane 8: 同 トロンビン処理

図4 ウェスタンブロッティング法によるクロスエイト M 高分子画分中の第VIII因子抗原の解析. クロスエイト M 及びヘモフィル M より Sephacryl S-300 を用いて高分子画分 (ゲルろ過ポイド画分, 分子量 1,500kDa 以上) を調製し濃縮後, 500U/ml, 20 μ l を用いてウェスタンブロッティングを行った.
Lane 1: クロスエイト M 2MX002, Lane 2: クロスエイト M 2MX005, Lane 3: クロスエイト M 2MX008, Lane 4: ヘモフィル M EE039K

図5 クロスエイト M 高分子画分中の第VIII因子抗原のトロンビンによる分解. クロスエイト M 及びヘモフィル M の高分子画分500U/ml, 20 μ l にトロンビン処理 (最終濃度10U/ml, 37 $^{\circ}$ C, 2時間) を施し, その後ウェスタンブロッティングを行った.
Lane 1: クロスエイト M 2MX002 トロンビン未処理, Lane 2: 同 トロンビン処理, Lane 3: クロスエイト M 2MX005 トロンビン未処理, Lane 4: 同 トロンビン処理, Lane 5: クロスエイト M 2MX008 トロンビン未処理, Lane 6: 同 トロンビン処理, Lane 7: ヘモフィル M EE039K トロンビン未処理, Lane 8: 同 トロンビン処理

図6 クロスエイト M 中の von Willebrand 因子のマルチマー構造解析. クロスエイト M 及びヘモフィル M を100U/ml (F VIII: Cclot) に溶解し, その8 μ l を用いてマルチマー構造解析を行った.
Lane 1: 正常ヒトブール血漿 (NHPP), Lane 2: クロスエイト M 2MX002, Lane 3: クロスエイト M 2MX005, Lane 4: クロスエイト M 2MX008, Lane 5: 正常ヒトブール血漿 (NHPP), Lane 6: ヘモフィル M EJ047K, Lane 7: ヘモフィル M EJ048K, Lane 8: 正常ヒトブール血漿 (NHPP)

量1,500kDa 以上) を調製し, 濃縮後, ウェスタンブロッティング法により同様の解析を行った. その結果, クロスエイト M において分子量80kDa の L 鎖と分子量90kDa~220kDa の 8 本の H 鎖バンドが観察され, クロスエイト M とヘモフィル M との間には検出バンドの差はほとんど認められなかった (図4). また, これら分子量80kDa~220kDa のバンドはトロンビン処理により消失し, 新たにトロンビンによる分解物と考えられる分子量43kDa のバンド (H 鎖由来) が検出された (図5). 以上のようにヒト血清アルブミンを除いた高分子画分について, クロスエイト M とヘモフィル M とを比較しても検出される第VIII因子抗原にはほとんど差は認められなかった.

5) von Willebrand 因子 (vWF) のマルチマー構造解析

クロスエイト M 中に含まれる少量の vWF に関してマルチマー構造解析を行った. その結果, 正常ヒトブール血漿に比較して large multimer の量が低下していた (図6). 一方, ヘモフィル M もほぼ同様のマルチマー構造を示し, クロスエ

ト M とヘモフィル M との間にはほとんど差は認められなかった。また、クロスエイト M 3 ロットを測定したがロット間にはほとんど差は認められなかった。

考 察

日本赤十字社では国内で献血された血漿を原料に高純度第Ⅷ因子製剤(治験薬名 RCG-11, 商品名クロスエイト M)を試験製造し、現在臨床試験を行っている。我々はクロスエイト M について製剤中の第Ⅷ因子凝固活性、第Ⅷ因子 L 鎖抗原量等の測定ならびにウエスタンブロッティング法による第Ⅷ因子抗原の解析を行い、すでに臨床使用されているヘモフィル M (バクスター社)¹⁾²⁾と比較検討した。

その結果、クロスエイト M 中の第Ⅷ因子凝固活性、第Ⅷ因子 L 鎖抗原量は概ね表示どおりであり、製剤の品質のマーカーとなる第Ⅷ因子抗原量と第Ⅷ因子凝固活性の比 (F VIII L: Ag/F VIII: Cclot) は 0.88~1.04 とヘモフィル M とほぼ同等であった。また、クロスエイト M 3 ロットを測定したかぎりではロット間に大きな差は認められなかった。

トロンビンによる第Ⅷ因子の活性化に関してタイムコース及び活性化率を測定したが、同様にクロスエイト M とヘモフィル M との間にはほとんど差は認められなかった。

また、ウエスタンブロッティング法によるクロスエイト M 中の第Ⅷ因子抗原の解析においては、Andersson らの報告⁵⁾のように、分子量 80kDa の L 鎖と分子量 90kDa~220kDa の H 鎖が検出され、トロンビンによる分解物と考えられる分子量 43kDa~50kDa のバンドは検出されなかった。これら分子量 80kDa~220kDa のバンドはトロンビン処理により消失し新たに分子量 43kDa のバンド (H 鎖由来) が検出された。一方、ヘモフィル M においても同様のバンドが検出され、ウエスタンブロッティング法による第Ⅷ因子抗原の解析に関してもクロスエイト M とヘモフィル M との間にはほとんど差は認められなかった。

一般に、血漿から精製された第Ⅷ因子は分子量 90kDa~200kDa の H 鎖と分子量 80kDa の L 鎖

から構成され、さらに von Willebrand 因子(分子量 500kDa~20,000kDa)と結合し高分子構造を形成している。また、クロスエイト M には安定化剤としてヒト血清アルブミンが添加されているため、クロスエイト M を直接ウエスタンブロッティング法で解析する場合その検出感度に限界が生じる。そこで、ゲルろ過法にて調製した高分子画分についても検討を行ったが、同様にクロスエイト M とヘモフィル M との間にはほとんど差は認められなかった。

クロスエイト M に関して製剤の品質のマーカーである第Ⅷ因子 L 鎖抗原量と第Ⅷ因子凝固活性との比 (F VIII L: Ag/F VIII: Cclot) は 0.88~1.04 となりやや低いものもあったが、ウエスタンブロッティング法によりトロンビンによる分解物と思われるバンドが検出されないことから、仮に第Ⅷ因子が活性化されているにしても極めて少量のものが活性化されているにすぎないと考えられる。

クロスエイト M に含まれる少量の vWF については、ヘモフィル M と同様に正常ヒトプール血漿にくらべ large multimer が減少しており、クロスエイト M は von Willebrand 病患者に対する止血管理には適さないものと考えられた。

以上、高純度第Ⅷ因子製剤クロスエイト M について生化学的諸性質を解析しすでに臨床使用されているヘモフィル M と比較検討した。その結果、クロスエイト M はヘモフィル M とほぼ同等の生化学的性質を有することが明らかになった。

血友病患者の止血管理には、高純度製剤の使用が望まれている。高純度第Ⅷ因子製剤クロスエイト M は日本赤十字社が製造した初めての高純度製剤であり、臨床の場で今後活用されることが期待される。

結 語

日本赤十字社は国内で献血された血漿を原料としてモノクローナル抗体カラム法を用いて高純度第Ⅷ因子製剤(クロスエイト M)を試験製造した。今回、我々はクロスエイト M 中の第Ⅷ因子について第Ⅷ因子凝固活性、第Ⅷ因子 L 鎖抗原量の測定及びウエスタンブロッティング法による第Ⅷ因子

抗原の解析を行い、すでに臨床使用されているヘモフィル M と比較検討した。その結果、クロスエイト M はヘモフィル M とほぼ同等の生化学的性質を有する事が明らかになった。従って、クロスエイト M はヘモフィル M 同様安全に臨床使用されうると思われる。

文 献

- 1) 田中一郎, 他: モノクローナル抗体による高純度第Ⅷ因子製剤, Hemofil M および Monoclate, 中の第Ⅷ因子/フォンウィルブランド因子 (F.Ⅷ/vWF), 臨床血液, 30(7): 951—957, 1989.
- 2) 腰原公人, 他: 純化第Ⅷ因子製剤(ヘモフィル M)の複数ロットにおける第Ⅷ因子の性状についての検討. 日輸血会誌, 36(3): 406—410, 1990.
- 3) Hardisty, R.M., et al.: A one-stage factor VIII (anti-haemophilic globulin) assay and its use on venous and capillary plasma. Thromb. Diath. Haemorrh., 7: 215—229, 1962.
- 4) 高橋 勲, 他: 高純度第Ⅷ因子製剤についての第Ⅷ因子凝固活性測定法に関する検討. 日血会誌, 54(Suppl 1): 280, 1991.
- 5) Andersson, L.O., et al.: Isolation and charac-

terization of human factor VIII: Molecular forms in commercial factor VIII concentrate, cryoprecipitate, and plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 2979—2983, 1986.

- 6) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680—685, 1970.
- 7) Eaton, D.L., et al.: Characterization of recombinant human factor VIII. J. Biol. Chem., 262: 3285—3290, 1987.
- 8) 吉岡 章, 他: 遺伝子組換え型第Ⅷ因子製剤 (BAY w 6240)中の第Ⅷ因子の性状. 血栓止血誌, 1: 212—218, 1990.
- 9) Ruggeri, Z.M., et al.: Variant von Willebrand's disease. Characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. J. Clin. Invest., 65: 1318—1325, 1980.
- 10) Thomas, W., et al.: Influence of different surfactants on the separation of von Willebrand factor multimers by use of agarose gel electrophoresis and semidry blotting technology. Throm. Res., 61: 181—189, 1991.