

第 VIII 因子および第 IX 因子定量法の標準化

Standardization of FVIII & FIX assays

T. W. Barrowcliffe

NIBSC, Potters Bar, UK

緒 言

血友病治療が始まった当初から、患者の血漿サンプルおよび製剤中の第 VIII 因子 (FVIII) および第 IX 因子 (FIX) レベルの測定は、至適治療レジメンの開発および実際の治療において極めて重要な役割を果たしてきた。特に、最近では様々な原料から、そして様々な地域で製造された凝固因子製剤が利用可能となり、種々の製剤中における FVIII 活性および FIX 活性測定法の標準化が必要となった (凝固因子活性が測定される理由は、凝固因子製剤の推奨用量が凝固因子活性の単位で表示されることによるものである)。患者の血漿中凝固因子を正確に測定することは、診断のためにも、また、凝固因子製剤による治療の効果を評価するためにも極めて重要といえる。

本稿では FVIII および FIX 定量法の標準化に焦点を当てる。特に、凝固因子製剤および輸注後血漿での定量に重点を置く。

FVIII の定量法

FVIII の定量には、現在 3 種類の方法、すなわち、1 段法、2 段法および合成基質法が利用されている。

Correspondence: Dr Trevor Barrowcliffe, Head of Division of Haematology NIBSC, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QG.
Tel.: (01707) 654 753; fax: (01707) 656 730/647 227;
e-mail: tbarrowcliffe@nibsc.ac.uk

Haemophilia (2003), 9, 397–402
©Blackwell Publishing Ltd.

これらの定量法の原理や実施方法については、本稿では省略させていただく^(1–3)。

1 段法は簡便で自動化も容易であることから、臨床検査では常にこの方法が好まれている。一方、2 段法は精度が高いうえ、凝固因子欠乏血漿の供給量とは無関係に測定可能であることから、製造業者の間で広範に利用されてきた。しかし、2 段法は現在では臨床検査ではほとんど利用されておらず、製造業者の間でも 2–3 社が用いているのみである。これに対して、2 段法と同一の原理に基づいている合成基質法は、凝固因子の定量に急速に採用されつつあり、臨床検査でも急激にはないが徐々に採用されつつある。凝固因子製剤の標準定量法として以前欧州薬局方は 2 段法を推奨していたが、1995 年には合成基質法に変更され、国際血栓止血学会 (ISTH) もこの方法を推奨している。

これら 3 種類の定量法の比較については、これまでに広範にレビューされている^(4–6)。凝固因子製剤の定量における重要なポイントは、1 段法による FVIII の定量では他法に比べて高い力価が得られるが、2 段法ではこの傾向がみられないこと、さらに、1 段法は脂質やヘパリンといった不純物の影響を受けやすいことである。また、合成基質法も、活性化時間を十分にとった後に活性化 FX 産生を測定するのであれば、FVIII 活性の影響は受けない。これについては最近発表された Lundblad ら⁽⁷⁾ のレビューでも強調されている。なお、これら 3 法のいずれもが前希釈段階での FVIII 欠乏血漿による希釈の有無により影響される (後の節を参照)。

1 段法に用いられている試薬および定量条件は施設ごとに極めて異なっている。例えば、英国の臨床施設では活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 試薬 25 種、凝固因子欠乏血漿 20 種、標準血漿 13 種および検査機器 11 種が使用されている [UK National External Quality Assessment Service (NEQAS) からの情報]。一方、合成基質法は比較的統一されており、製造業者 4 社から 5 種類のキットが市販されている。

現在、欧州の凝固因子製剤製造業者のほとんどが自社製品のラベルに合成基質法で測定した凝固因子レベルを記載しているが、米国で製造されているほとんどの凝固因子製剤 (2 種類の完全長遺伝子組換え型製剤を含む) は、1 段法により定量されている。

FVIII 製剤および血漿を定量するための標準サンプル

FVIII の力価は国際単位 (IU) で測定される。これは、世界保健機関 (WHO) により確立された国際標準血漿 (International Standards ; IS) によって定義されている。FVIII の定量には “like vs. like (同様のものを比較する)” の原則に基づいて 2 種類の WHO 標準サンプルがある。1 つは血漿サンプル中の FVIII レベルを測定するためのサンプルであり、他の 1 つは凝固因子製剤中の FVIII レベルを測定するためのサンプルである。

FVIII 製剤のための最初の WHO 標準サンプルは 1971 年に確立されたが、この当時は利用可能な凝固因子製剤が比較的少なく、純度も低かった。しかし現在では、種々の製剤が利用できるようになったことに加え、様々な血漿由来製剤および遺伝子組換え型製剤が利用可能で、これらの製剤の組成に大きな違いがみられるようになり、“like vs. like” の原則の適用が困難になってきている。WHO 標準サンプルは主要標準血漿として世界的に利用されているが、定量法間で、そして同一の定量法を用いている施設間で依然として測定値に相違が認められている。しかし、このような相違が発生する原因については一部ではあるが既に明らかにされており、推奨事項が発表されている。

極めて純度の高いモノクローナル抗体で精製された血漿由来製剤および遺伝子組換え型製剤、これら

の製剤のサンプルそして他の数種類の凝固因子製剤を対象とした多施設共同研究が 1980 年代の後期に実施され、11 施設が当時の WHO (第 3 次) 標準サンプル (凝固因子製剤用) に対してこれらすべての製剤中 FVIII を定量した。その結果、以前にも報告されているように⁽⁸⁾、極めて純度の高い血漿由来製剤と遺伝子組換え型製剤では施設間で大きなバラツキが認められ、3 種類の方法間の変動係数 (GCV 値) は 19 ~ 100% 以上であった。一方、2 種類の間純度製剤での施設間のバラツキは比較的小さく、GCV 値は 4 ~ 15% であった。なお、この時点における WHO 標準サンプルは中間純度製剤であった。

これらの結果は “like vs. like” の原則の重要性を強く示しているとともに、高純度製剤には他の専用の標準サンプルが必要であることを示唆しているとも考えられる。しかし、後の研究では、高純度製剤、とりわけ遺伝子組換え型製剤での定量に特に影響を及ぼす技術的因子が多数特定され、これらの標準化が必要となった。以下にそれらの技術的因子を示す。

(i) FVIII 欠乏血漿

1 段法で正確な定量を行うためには、血友病患者の血漿または von Willebrand 因子 (VWF) レベルの正常な FVIII 欠乏血漿を使用する必要がある。

(ii) 緩衝液

再現性の高い結果を得るためには、すべての緩衝液に 1% w/v のアルブミンが含まれていなければならないことが示されている。

(iii) 前希釈

いずれの定量法を用いる場合も、遺伝子組換え型製剤および高純度血漿由来製剤の定量ではすべて血友病患者の凝固因子欠乏血漿またはそれと同等の物質で前希釈する必要がある。

その後、2 種類の遺伝子組換え型製剤と 3 種類の高純度血漿由来製剤を対象に、上述した比較的シンプルな改変を加えて同一の施設で再度試験が行われた。第 4 次 WHO 標準サンプル (中間純度製剤) に対して定量が行われたが、結果として、最初の試験に比べて著明な改善がみられ、2 種類の遺伝子組換

え型製剤における GCV 値は 3 ~ 10.7% となり、他の凝固因子製剤についても施設間で良好な一致がみられた。その後、遺伝子組換え型製剤および高純度血漿由来製剤の定量のためのこれらの改変事項は ISTH の FVIII and FIX Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee (SSC) の推奨事項として発表された⁽⁹⁾。

後に凝固因子製剤用第 6 次 WHO 標準サンプル (遺伝子組換え型製剤) を較正するための国際多施設共同試験が行われたが、この試験では、これらの推奨事項が加味され、施設間の GCV 値は全体的に 9 ~ 10% であった⁽¹⁰⁾。このように、特定の技術的条件を忠実に満たせば、血漿由来標準サンプル (血漿由来製剤) を用いての遺伝子組換え型製剤の定量は良好に行えることは明らかであり、両タイプの凝固因子製剤について別々の標準サンプルは不要である。遺伝子組換え型 FVIII 製剤の標準サンプルに対して血漿由来製剤の定量を良好に行えるか否かという疑問は、Albertengo ら⁽¹¹⁾ の研究で提起された。この研究では、第 5 次 WHO 標準サンプル (血漿由来製剤) および第 6 次 WHO 標準サンプル (遺伝子組換え型製剤) に対して 9 種類の血漿由来製剤の定量が行われた。結果として、いずれのサンプルを用いても結果に有意差はなく、遺伝子組換え型標準サンプルは様々な血漿由来製剤の較正に十分に適用可能であることが示された。

血漿サンプルの定量のための標準サンプルの確立は凝固因子製剤の定量のための標準サンプルの確立ほど複雑なものではなかった。したがって、重要なことは、IU と「正常血漿の単位」との関連を維持することである。この関連の維持は、各国際標準血漿の確立のための較正試験において正常血漿プールからのサンプルも使用し、IU と「正常血漿 1 mL 中の平均凝固因子量」との相違を最小限にする必要がある場合に調整することによって試みられてきた (例えば、FVIII/VWF 血漿の第 4 次 IS の較正⁽¹²⁾)。

地域的標準サンプルおよび血液製剤製造業者独自の標準サンプルの較正に WHO 標準サンプルは広く一般に利用されているが、英国の施設間における FVIII 定量結果のバラツキは依然極めて大きく、NEQAS の継続調査では CV 値が最大 35% に達して

いる。先述したことであるが、これはおそらく各施設で使用している試薬および定量法に大きな違いがあったことによるものと考えられる。特に問題となっているのは、免疫除去または化学的手法によって人工的に FVIII を欠乏させた血漿が導入されたことである。重症血友病患者の血漿には病原体が混入している恐れがあること、そして最近の治療レジメンの向上により長期間血漿中 FVIII レベルを 1% 以上に維持することが可能になったこと、などの理由から現在英国の半数以上の施設では、重症血友病患者から得た血漿の代わりに人工的に FVIII を欠乏させた血漿が使用されている。人工的 FVIII 欠乏血漿のうち、一部は FVIII が完全に除去されていないものや、VWF も除去されているものもあり、比較試験でも示されているように、これらの血漿は高純度製剤の定量には不適当である⁽¹³⁾。我々の施設で最近行われた研究では、一部の試薬の活性化を示す証拠が得られ、これは特に輸注後血漿の定量で問題となる可能性がある。

FVIII 定量法の比較

治療用凝固因子製剤の定量に凝固因子製剤を標準サンプルとして使用することは“like vs. like”の原則に則っており、理論的には 3 種類の定量法を用いた FVIII の定量で力価に大差はないはずである。1970 年代から 1980 年代初頭にかけてはこの考えでよかったが、ウイルス不活化処理工程が導入されたこと、そして高純度血漿由来製剤および遺伝子組換え型製剤が導入されたことから、凝固因子製剤の組成が多様となり、これが原因で定量法間に相違が生じるようになったと考えられる。13 種類の凝固因子製剤を対象に 1990 年に実施された調査⁽¹⁴⁾ では、1 段法と 2 段法との間で著明な相違が認められ、数種類の血漿由来製剤において 1 段法での測定値が 2 段法に比べて最大 40% 高かった。また、10 種類の凝固因子製剤 (血漿由来製剤 7 種、遺伝子組換え型製剤 3 種) を対象に 1 段法と合成基質法とを比較したより最近の研究⁽¹⁵⁾ では、免疫精製された血漿由来製剤で最も大きな相違が認められ、1 段法での測定値が合成基質法での測定値を 33% 上回ったほか、B ドメイン欠乏遺伝子組換え型製剤では合成基質法での

測定値が 1 段階での測定値を 28% 上回っていた。

完全長遺伝子組換え型製剤を対象に 3 つの定量法を比較した試験では異なる結果が得られた。この試験は、英国の National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) の施設で行われ、ISTH (SSC) により推奨されている定量法を用いて第 5 次 WHO 標準サンプル (血漿由来製剤) に対して定量が行われた。各製剤のいくつかのバッチが定量され、3 種類の定量法間に著明な違いはみられなかった (Table 1)。A 製剤では 2 段階での測定値が合成基質法での測定値よりも 8% 低値であった ($p < 0.05$) が、これを除いては他の比較で統計学的有意差が認められたものはなかった。

Table 2 は、3 種類の定量法で遺伝子組換え型製剤を定量した 3 編の多施設共同比較試験のデータをまとめたものである。これらの試験では施設間で共通

Table 1. Comparison of methods on full-length recombinant concentrates (data from NIBSC).

Product	No. of batches	Potency (% of label)		
		One-stage	Two-stage	Chromogenic
A	10	95	91	99
B	6	112	105	106

NIBSC assays were performed with the WHO fourth concentrate standard and ISTH/SSC recommended methodology. Manufacturers used the one-stage method against the US Mega Standard.

Table 2. Comparison of methods on recombinant concentrates (data from controlled collaborative studies).

Study date	Reference standard	Test sample	Potency (%)		
			One-stage	Two-stage	Chromogenic
1992	WHO fourth IS	1	100 (9)	99.7 (5)	114.6 (10)
		2	100 (9)	91.2 (5)	98.5 (10)
1994	WHO fourth IS	3	100 (17)	104.1 (6)	110.6 (18)
		3	100 (17)	101.5 (6)	118.3 (18)
1998	WHO fifth IS	4	100 (21)	94.7 (6)	110.7 (25)
		5	100 (21)	97.8 (6)	110.5 (25)

Samples 1–5 are different ampouled preparations of the two full-length recombinant concentrates (Kogenate & Recombinate). Figures in brackets are numbers of laboratories performing each method. Potencies have been calculated as a percentage of those with the one-stage method. All participants used SSC recommended methodology and data were analysed centrally.

の標準サンプルおよび同一のプロトコールが用いられたほか、データは中央集約的に計算処理された。その結果、6 セットのデータのうち 5 セットで、合成基質法での平均測定値が 1 段階より 10 ~ 18% 高値であった。ただし、これら 3 編のうち、最初の 2 編の研究が行われた時点では、凝固因子製剤の定量に合成基質法を取り入れたばかりの施設が数施設あったため、より最近の試験で得られたデータの方が現在の状況に即していると思われる。

全体的に言えることは、特に SSC が推奨する定量法を用いた場合、1 段階と合成基質法で完全長遺伝子組換え型製剤に認められる力価の差は 10% 未満であり、臨床的意義をもたらす可能性は低いと考えられる。

しかし、B ドメイン欠失凝固因子製剤である ReFacto では、これほど良好な結果は得られていない。Mikaelsson ら⁽¹⁶⁾はこの製剤を対象に検討したが、WHO 標準サンプル (凝固因子製剤) と ISTH (SSC) が推奨する定量法を用いた場合でも、合成基質法での測定値は 1 段階での測定値より著明に高く、使用する試薬によっては最大 2 倍となった。さらに他の複数の研究では、1 段階で用いられるリン脂質試薬のタイプと濃度がこの差をもたらす原因となっていること、そして血小板存在下における定量法間の比較および *in vivo* 回収率のデータの比較から、合成基質法での測定値が適切な値であることが示された。このようなことから、この製剤の製造業者は合成基質法での測定値をラベルに記載している。

Hubbard らの調査では、“Method M” というモノクローナル抗体による精製過程を経て製造されている 2 つの製剤で、1 段階と合成基質法との間における最大の差が認められている⁽¹⁵⁾。両定量法間におけるトロンビン活性化の差が、これらの違いを生じさせていることが示唆されており、最近行われた Hubbard らの研究では、これに関する証拠が得られている⁽¹⁷⁾。

血漿および凝固因子製剤の単位と FVIII *in vivo* 回収率

血漿標準サンプルに対する FVIII 製剤の定量は、測定値に施設間そして定量法間において大きなバラツ

キがみられ、積年の問題となっており、また、これが理由で血漿用と凝固因子製剤用の2種類のWHO標準サンプルが開発された。しかし、ルーチンの定量でこのような比較を避けることはできるが、血漿由来製剤の製造業者のほか、特に*in vivo*回収率を測定する医師にとっては問題である。凝固因子製剤輸注後の患者の血漿サンプルは基本的に血友病患者の血漿で“希釈された”凝固因子製剤であり、*in vivo*回収率の測定では血漿標準サンプルに対して定量しなければならない。

血漿に対して凝固因子製剤を定量した場合、1段法よりも2段法での力価の方が高いことが1978年に初めて見いだされ⁽¹⁸⁾、この時期に実施された数多くの多施設共同試験で認められた力価の相違は平均で20%であった。これ以降に実施された多施設共同試験においても、力価の相違こそ試験ごとに異なっていたが、ほぼすべての試験でこの傾向が認められた(力価の相違が試験ごとに異なっていた理由として、試験ごとにタイプの異なる凝固因子製剤が用いられたことが可能性として挙げられる)。

最近の凝固因子製剤の定量では、2段法に代わって合成基質法が広く用いられるようになった。驚くほどのことではないが、2段法と同一の原理に基づく合成基質法では、1段法より高い測定値が得られる。このような相違が生じる理由についてはこれまでにかなり研究されてきたが、未だ明らかにはなっていない。血漿由来製剤と遺伝子組換え型製剤はその製造工程において広範な処理を受けるが、これが両定量法において正常血漿中FVIIIとは異なる活性化あるいは不活化を生じさせる原因になっていると考えられ、これについては最近のいくつかの研究で証拠が得られている⁽¹⁹⁾。WHO標準サンプル(凝固因子製剤)とWHO FVIII標準サンプル(血漿)とを比較した場合、1段法での測定値はほぼ等しいが、2段法および合成基質法では異なってくる⁽⁸⁾。

一部の研究では、血漿由来製剤に比べて遺伝子組換え型製剤でこの差がより大きいことが示されている。以前NIBSCにおいて英国の血漿標準サンプルに対して、1段法と合成基質法による2種類の完全長遺伝子組換え型製剤の定量が行われたが、両法間の測定値の比率はそれぞれ1.44, 1.53であった。また、こ

の多施設共同試験では第5次IS(WHO血漿標準サンプルおよび1種類の遺伝子組換え型製剤)の較正が行われ、合成基質法/1段法の効力比は1.48であり、第6次ISについて実施された他の研究では1.26であった⁽¹⁰⁾。

これらの値は、遺伝子組換え型製剤輸注後の患者の血漿サンプルにおいて、なぜ合成基質法と1段法とで測定値に大きな違いがみられるかを説明するものである⁽²⁰⁾。輸注後の遺伝子組換え型製剤は、これらの定量法において基本的に*in vitro*で血友病患者の血漿で希釈されたこれらの製剤と類似した動態を示すと考えられる。

一方、血漿由来製剤については、製剤の特性および用いる試験系によって異なる結果が得られている。例えば、Leeら⁽²¹⁾の試験では、Hemofil Mは輸注後血漿で1段法と合成基質法で20%の差が生じることが示されたが、類似の製剤についてCLBで行われた試験では、両法間に全く差は認められなかった(K. Mertens博士からの私信)。また、タイプの異なる血漿由来製剤輸注後の血漿サンプルについて検討したNEQASによる試験でも、定量法間で違いは認められなかった。

この問題を解決するためには、これらの相違を生じさせている原因を突き止めねばならず、そうすることによってのみいずれかの定量法あるいは両定量法を調整することが可能となり、同様の値を得ることができる。当面の対応策としてSSCのFVIII/FIX Subcommitteeでは、輸注後血漿サンプルを患者の血漿で希釈された凝固因子製剤と考慮することを基本とし(実質的にその通りである)、標準曲線を作成する際は血漿標準サンプルではなく、血友病患者の血漿で希釈された凝固因子製剤用標準サンプルを用いることが提案されている。血友病患者の血漿で希釈された凝固因子製剤用標準サンプルを用いた場合、定量法間で測定値はほぼ一致しており(前項を参照)、これを考慮する限り、この方法により合成基質法と1段法による遺伝子組換え型製剤の*in vivo*回収率の測定において良好な一致がみられるはずである。ただし、この標準サンプルは、実際に輸注される製剤とできるだけ同じようにその性状を注意深く検討する必要がある。このように、いずれの完全長遺伝

子組換え型製剤も標準サンプルとして利用可能であるが、B ドメイン欠失 FVIII 製剤である ReFacto 輸注後の血漿サンプルでは ReFacto 専用の標準サンプルが必要である。

In vivo 回収率について検討した最近の試験でこのアプローチがテストされた。この試験では、Recombinate 輸注後の患者の血漿サンプルが血漿標準サンプルと Recombinate 凝固因子製剤標準サンプルに対して定量された⁽²⁰⁾。その結果、血漿標準サンプルでは1段法と合成基質法との間で25%の差が生じたが、Recombinate 凝固因子製剤標準サンプルではこのような差は全くみられなかった。

FIX の定量のための標準サンプル

FIX 定量法の標準化についてはFVIIIの定量法ほど問題は多くない。これは、用いられる定量法が1段法のみで、これが血漿にも凝固因子製剤にも適用されるためである。FVIIIと同様に、最初の標準サンプル(凝固因子製剤)は治療用製剤の定量目的でWHOにより確立され、これはプロトロンビン複合体製剤(PCC)であった⁽²²⁾。最近になり主力製剤が高純度FIX単一製剤に切り替えられたが、定量法の標準化に特に影響はないと考えられる。すなわち、PCCとFIX単一製剤とは相互に良好に定量できる。現在のWHO標準サンプルはFIX単一製剤である。

FIX製剤を標準サンプル(凝固因子製剤)に対して定量する場合も、血漿に対して定量する場合も、最適かつ再現性のある結果を得るためには、FVIIIと同じく、凝固因子製剤をFIX欠乏血漿で前希釈する必要があることが示されている⁽²³⁾。FIXの国際標準サンプルは、他のビタミンK依存性凝固因子であるFII、FVIIおよびFXの標準サンプルとともに1987年にWHOによって確立され⁽²⁴⁾、現在ではほとんどの地域的・商業的標準サンプルがIUで較正されている。しかし、NEQASの調査では依然として施設間で大きなバラツキがあることが示されており、これはおそらく使用されるAPTT試薬および凝固因子欠乏血漿が多様であることによるものと考えられる。また、FVIIIと同様に、人為的にFIXを欠乏させた血漿が主な試薬として使用されているが、血友病B患者の血漿を使用した場合との成績を比較した体系的

研究は未だ行われていない。

FVIII・FIXの定量に代わる代替検査法

FVIIIおよびFIX製剤の薬物動態試験では、輸注後の血漿中FVIIIおよびFIXを定量する必要があるが、前述したように定量法間で測定値にバラツキがみられ、実際の治療において患者の止血状態を見極めるにはこれらの定量法は必ずしも満足のいくものではない。また、一般的に止血効果と輸注後の凝固因子レベルとは凝固因子製剤の組成とは無関係に相関関係にあると考えられているが、現在市販されている種々の凝固因子製剤は成分や分子構造が異なっていることから、この考えは全くの真実ではないと考えられる。さらに、個々の患者の止血能は血漿中FVIII・FIXレベルのほか、他のパラメーターによっても左右されると考えられる。これは、血漿中凝固因子レベルが同等の患者においても臨床的表現型が著明に異なり得るという事実からも明らかである。

凝固因子製剤および個々の患者間におけるこれらの相違を反映すると考えられる代替的定量法としてトロンビン生成検査が挙げられる。これは古い検査法で、Biggsらにより1953年に初めて提唱されたものであるが⁽²⁵⁾、十数年前にHemkerら⁽²⁶⁾によってより洗練され、この10年間で再び利用されるようになった。この検査では、組織因子やAPTT試薬といった活性化物質の存在下で未希釈の血漿にカルシウムを添加して凝固させ、フィブリノゲン中へのサブサンプリングあるいは合成基質法によって経時的にトロンビン産生を測定する。この検査の適用はほとんどの場合、抗凝固薬の分野であったが、最近我々は、様々なFVIII製剤の止血効果の比較にこの方法を用いている。予備的データからは、同じFVIIIレベルで比較した場合、製剤間でトロンビン産生促進能に幾分差があることが示されている。また、5IU/dL未満という比較的低いFVIIIレベルが、血友病患者の血漿中における不完全なトロンビン産生の回復に驚くほど効果的であることも示された。この結果は、定期補充療法(予防投与療法)と関連した様々な臨床試験、あるいは低凝固因子レベルしか認められない状況における遺伝子療法の有効性の評価においても重要であると考えられる。

この検査の利点の1つは、比較的簡便な試薬および器具を用いて検査が実施できることであり、発展途上国における治療のモニタリングに適しているかもしれない。また、血小板を添加することにより、これまでに使用されてきた人工リン脂質試薬よりも、より生理状態に近似できることから、血小板存在下での凝固因子製剤の効果もいくつかの試験で現在検討されている。

References

- Over J. Methodology of the one-stage assay of Factor VIII (VIII:C). In: Nilsson I-M, Barrowcliffe TW, Schimpf K, eds. *Factor VIII Concentrates and their Clotting Activity*; *Scand J Haematol* 1984; 33 (Suppl. 41): 13–24.
- Barrowcliffe TW. Methodology of the two-stage assay of Factor VIII (VIII:C). In: Nilsson I-M, Barrowcliffe TW, Schimpf K, eds. *Factor VIII Concentrates and their Clotting Activity*; *Scand J Haematol* 1984; 33 (Suppl. 41): 25–38.
- Rosén S, Friberger P, Andersson M, Vinazzar H. A new chromogenic assay for determination of human Factor VIII:C activity. In: Triplett DA, ed. *Advances in Coagulation Testing*. Skokie, IL: College of American Pathologists, 1986: 255–60.
- Barrowcliffe TW. Comparisons of 1-stage and 2-stage assays of factor VIII:C. In: Nilsson I-M, Barrowcliffe TW, Schimpf K, eds. *Factor VIII Concentrates and their Clotting Activity*; *Scand J Haematol* 1984; 33 (Suppl. 41): 39–54.
- Barrowcliffe TW. The one-stage versus the two-stage factor VIII assay. In: Triplett DA, ed. *Advances in Coagulation Testing*. Skokie, IL: College of American Pathologists, 1986: 47–62.
- Hubbard AR, Curtis AD, Barrowcliffe TW, Edwards SJ, Jennings CA, Kembell-Cook G. Assay of factor VIII concentrates: comparison of chromogenic and 2-stage clotting assays. *Thromb Res* 1986; 44: 887–91.
- Lundblad RL, Kingdon HS, Mann KG, White GC. Issues with the assay of Factor VIII activity in plasma and Factor VIII concentrates. *Thromb Haemost* 2000; 84: 942–8.
- Barrowcliffe TW. Standardization and assay. *Sem Thromb Haemost* 1993; 19: 73–9.
- Barrowcliffe TW. Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Recommendations for the assay of high-purity factor VIII concentrates. *Thromb Haemost* 1993; 70: 876–7.
- Raut S, Heath A, Barrowcliffe TW. Establishment of the 6th International Standard for FVIII concentrate. *Thromb Haemost* 2001; 85: 1071–8.
- Albertengo ME, Barrowcliffe TW, Oliva L, Bevan S, Raut S. New recombinant standard for FVIII concentrate gives same results as previous plasma derived standards on a range of FVIII products. *Thromb Haemost* 2000; 83: 789–90.
- Hubbard AR, Rigsby P, Barrowcliffe TW. Standardisation of Factor VIII and von Willebrand Factor in plasma: calibration of the 4th International Standard (97/586). *Thromb Haemost* 2001; 85: 634–8.
- Barrowcliffe TW, Tubbs JE, Wong MY. Evaluation of Factor VIII deficient plasmas. *Thromb Haemost* 1993; 70: 433–7.
- Barrowcliffe TW, Watton J, Tubbs JE, Harman A, Kembell-Cook G. Potency of high purity factor VIII concentrates. (*Letter*) *Lancet* 1990: 124.
- Hubbard AR, Weller LJ, Bevan SA. A Survey of one-stage and chromogenic potencies in therapeutic FVIII concentrates. *Br J Haematol* 2002: in press.
- Mikaelsson M, Oswaldsson U, Sandberg H. Influence of phospholipids on the assessment of factor VIII activity. *Haemophilia* 1998: 646–50.
- Hubbard AR, Weller LJ, Bevan SA. Activation Profiles of FVIII in concentrates reflect one-stage/chromogenic potency discrepancies. *Brit J Haematol* (in press).
- Kirkwood TBL, Barrowcliffe TW. Discrepancy between 1-stage and 2-stage assay of factor VIII: C. *Brit J Haematol* 1978; 40: 333–8.
- Hubbard AR, Bevan SA, Weller LJ. Potency estimation of recombinant factor VIII: effect of assay method and standard. *Brit J Haematol* 2001; 113: 533–6.
- Lee CA, Owens D, Bray G *et al.* Pharmacokinetics of recombinant factor VIII (Recombinate) using one-stage clotting and chromogenic factor VIII assay. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1644–7.
- Lee C, Barrowcliffe TW, Bray G *et al.* Pharmacokinetic in vivo comparison using 1-stage and chromogenic substrate assays with two formulations of Hemofil-M. *Thromb Haemost* 1996; 76: 950–6.
- Brozovic M, Bangham DR. Study of a proposed International Standard for Factor IX. *Thromb Haemost* 1976; 35: 222–36.
- Barrowcliffe TW, Tydeman MS, Kirkwood TBL. Major effect of prediluent in Factor IX clotting assay. *Lancet* 1979; 2: 192.
- Barrowcliffe TW. Standardisation of Factors II, VII, IX, and X in plasma and concentrates. *Thromb Haemost* 1987; 59: 334.
- Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test: the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Path* 1953; 6: 3–8.
- Hemker HC. The mode of action of heparin in plasma. In: Verstraete M, Vermynen J, Lijnen R, Arnout J, eds. *Thrombosis and Haemostasis*. Leuven University Press, 1987: 17–36.