

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00134432.3

[43] 公开日 2001年8月8日

[11] 公开号 CN 1307237A

[22] 申请日 2000.11.30 [21] 申请号 00134432.3

[30] 优先权

[32]2000.2.3 [33]JP [31]26828/2000

[32]2000.2.3 [33]JP [31]26829/2000

[32]2000.4.21 [33]JP [31]121587/2000

[71] 申请人 大日精化工业株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 铃木英明 高桥树由

葛城寿史 青木洋祐

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

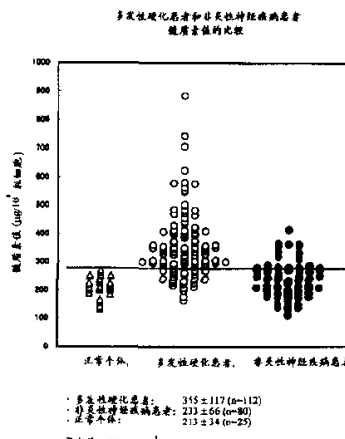
代理人 张广育 钟守期

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图页数 5 页

[54] 发明名称 人髓质素的免疫测定方法以及用该方法  
诊断多发性硬化

[57] 摘要

一种髓质素的免疫测定方法,其中,当使用抗人髓质素抗体测定血液中的髓质素时,用所述抗人髓质素抗体测定血样中人髓质素的量是在用一种含水液体处理所述血样之后进行的,所述含水液体的比渗透压不同于血液的渗透压,以便完全裂解白细胞;和一种诊断多发性硬化的方法,其特征在于,血样中的人髓质素的含量是用一种免疫测定方法测定的,并且,根据该测定值的大小或变化诊断多发性硬化的发作和疾病的程度。



# 权 利 要 求 书

1. 一种免疫测定血液中人髓质素含量的方法，其特征在于包括下面的步骤 (a) 和 (b)：

(a) 通过让所述血样与下面的含水液体 (i) 或 (ii) 或 (i) 和 (ii) 的含水液体的混合物接触，裂解血样中白细胞的步骤

(i) 渗透压为 250mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 或更低的含水液体，或渗透压为 310mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 或更高的含水液体；

(ii) 含有一种溶血产物的含水液体； 和

(b) 用一种抗人髓质素抗体免疫测定由在步骤 (a) 中裂解的白细胞释放到血样中的人髓质素的量。

2. 如权利要求 1 的免疫测定血液中人髓质素含量的方法，其中，所述含水液体 (i) 是可包括水溶性有机溶剂的缓冲溶液和/或蒸馏水。

3. 如权利要求 1 的免疫测定血液中人髓质素含量的方法，其中，所述含水液体 (i) 是含有选自下列一组的水溶性物质的含水溶液：无机酸盐、有机酸盐、糖、糖醇、氨基酸和蛋白质。

4. 如权利要求 1 的免疫测定血液中人髓质素含量的方法，其中，所使用的所述含水液体 (i) 的量以体积单位计为血样的 50-100000 倍。

5. 如权利要求 1 的免疫测定血液中人髓质素含量的方法，其中，所述含水液体 (ii) 是表面活性剂的水溶液。

6. 如权利要求 5 的免疫测定血液中人髓质素含量的方法，其中，所述含水液体 (ii) 是具有至少一种类型的选自下列一组的溶血产物的含水溶液：高级脂肪酸盐、烷基芳基磺酸盐、烷基磺酸盐、烷基磺酸酯盐、烷基吡啶盐、烷基三甲基铵盐、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯和烷基甜菜碱。

7. 如权利要求 1 的免疫测定血液中人髓质素含量的方法，其中，所使用的所述含水液体 (ii) 的量以体积单位计为血样的 50-100000 倍。

8. 如权利要求 1 的免疫测定血液中人髓质素含量的方法，其中，所述免疫测定血样中人髓质素含量的步骤 (b) 包括，在有标记的抗人髓质素抗体的条件下，让含有从在步骤 (a) 中裂解的白细胞中释放的所述人髓质素的血样与固定在一不溶性载体上的抗人髓质素抗体接触，以便形成夹心复合体，并通过抗原-抗体反应将人髓质素捕获在标记的免疫复合体上，然后测定所述复合体中标记材料的活性量。

9. 如权利要求 1 的免疫测定血液中髓质素含量的方法，其中，所述步骤 (b) 包括，将所述血样中的人髓质素加在固定在不溶性载体上的抗人髓质素抗体和标记的抗人髓质素抗体之间，以便通过抗原-抗体反应形成复合物，并测定所述复合物中标记的量。

5 10. 如权利要求 8 的免疫测定血液中髓质素含量的方法，其中，所述抗人髓质素抗体的至少一种是抗人髓质素单克隆抗体。

11. 一种诊断多发性硬化的方法，其特征在于包括下面的步骤 (a)、(b) 和 (c)：

10 (a) 通过让所述血样与下面的含水液体 (i) 或 (ii) 或 (i) 和 (ii) 的含水液体混合物接触，裂解血样中白细胞的步骤

(i) 渗透压为 250mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 或更低的含水液体，或渗透压为 310mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 或更高的含水液体；

(ii) 含有一种溶血产物的含水液体；

15 (b) 用一种抗人髓质素抗体免疫测定由在步骤 (a) 中裂解的白细胞释放到血样中的人髓质素的量；和

(c) 观察在步骤 (b) 中测定的血液中髓质素含量的大小和/或变化。

12. 如权利要求 11 的诊断多发性硬化的方法，其中，所述抗人髓质素抗体的至少一种是抗人髓质素单克隆抗体。

20 13. 如权利要求 11 的诊断多发性硬化的方法，其中所述含水液体 (i) 是可包括水溶性有机溶剂的缓冲溶液和/或蒸馏水。

14. 如权利要求 11 的诊断多发性硬化的方法，其中所使用的所述含水液体 (i) 的量以体积单位计为血样的 50-100000 倍。

25 15. 如权利要求 11 的诊断多发性硬化的方法，其中所述含水液体是表面活性剂的水溶液。

16. 如权利要求 11 的诊断多发性硬化的方法，其中所使用的所述含水液体 (ii) 的量以体积单位计为血样的 50-100000 倍。

30 17. 如权利要求 11 的诊断多发性硬化的方法，其中，所述步骤 (b) 包括，在有标记的抗人髓质素抗体的条件下，让含有从在步骤 (a) 中裂解的白细胞中释放的所述人髓质素的血样与固定在不溶性载体上的抗人髓质素抗体接触，以便形成夹心复合物，并通过抗原-抗体反应将人髓质素捕获在标记的免疫复合物上，然后测定所述复合物中标记

材料的活性量。

18. 如权利要求 11 的诊断多发性硬化的方法，其中所述步骤 (b) 包括将所述血样中的人髓质素加在固定在不溶性载体上的抗人髓质素抗体和标记的抗人髓质素抗体之间，以便通过抗原-抗体反应形成复合体，并测定所述复合体中标记的量。
- 5

# 说明书

## 人髓质素的免疫测定方法以及用该方法诊断多发性硬化

### 5 技术领域

本发明涉及免疫测定血液中人髓质素(medullasin)的方法, 以及利用该方法诊断多发性硬化的方法。更具体地讲, 本发明涉及一种免疫测定血液中人髓质素的方法, 该方法包括这样一个步骤: 对血样进行预处理, 以便精确测定血液中粒细胞中髓质素的含量, 并涉及一种利用血液中髓质素的含量诊断多发性硬化的方法。

### 相关技术的说明

髓质素是一种存在于粒细胞等中的丝氨酸蛋白酶, 它被认为在包括炎症表达, 特别是慢性炎症表达的防御机制中普遍起着重要作用。在多种慢性炎症性疾病的发展阶段, 粒细胞中的髓质素的量增加, 并在缓解阶段趋于正常。不过, 在患有多发性硬化的患者中, 观察到髓质素的量在发展阶段的前几天明显增加, 并在缓解之前趋于正常。多发性硬化的特征是在中枢神经系统的白色物质中的局部脱髓鞘溃疡和神经胶质增生。这是一种严重的慢性炎症性疾病, 它会反复地缓解和恶化, 并在很多情况下会在 10-15 年内导致死亡。尚未确定多发性硬化的原因, 但它被认为是一种自身免疫病, 其中, 当免疫系统受到病毒或细菌的刺激时, 自身抗体会攻击神经组织。这种病的诊断十分困难, 并且, 目前是通过磁共振成像(MRI)或类似方法进行的。不过, 像 MRI 这样的方法需要非常大型的设备, 以及很高的测定操作技能, 因此费用昂贵。另外, 测定骨髓液的方法的问题是会给患者造成很大的痛苦。鉴于这种情况, 正在开发一种简单的诊断方法, 通过该方法可以诊断上述疾病, 了解这种疾病的状态, 并且可以设想后果。结果, 业已研究了测定血液中粒细胞内髓质素的活性的方法, 并且开发了一种免疫测定方法, 通过该方法可以方便地测定, 提供了根据血液中粒细胞髓质素含量诊断多发性硬化的可能性。

30 不过, 业已观察到这样的现象, 在免疫测定人髓质素的方法中, 在用一种含水介质稀释血样之后, 如果所述测定是在不进行一种处理以便将存在于粒细胞中的髓质素完全排出粒细胞的情况下进行的话, 测定值

的可再现性不高，会导致测定值的波动。因此，需要一种能以良好的可再现性免疫测定血液中髓质素的量的方法。

5 就多发性硬化是否可以根据血液中髓质素的量进行诊断的问题而言，这种判断需要检查大量的临床资料。不过，到目前为止，尚不存在这种类型的资料，而且，也难于进行精确诊断，因为难于获得血液中粒细胞内髓质素的精确测定值，这是由于测定值有很大的波动。因此，根据血液中髓质素的量诊断多发性硬化是困难的。

### 发明概述

10 因此，本发明的发明人为了解决上述问题业已进行了深入研究，结果，他们发现通过用一种含水液体对血样进行处理以便完全裂解白细胞之后，用抗人髓质素抗体免疫测定人髓质素，可以良好的可再现性精确地测定血液中髓质素，所述含水液体含有一种溶血产物或者是一种具有不同于人血渗透压的比渗透压的含水液体。

15 另外，随着所述能以良好的可再现性精确地测定人髓质素方法的建立，本发明的发明人注意到在血样中测定的人髓质素含量的大小和变化与多发性硬化的发作及其程度等密切相关，本发明就是根据这些发现而完成的。

20 本发明的第一方面涉及一种免疫测定血液中髓质素含量的方法，其特征在于包括下面的步骤 (a) - (b)：

(a) 通过让所述血样与下面的含水液体 (i) 或 (ii) 或 (i) 和 (ii) 的含水液体的混合物接触，裂解血样中白细胞的步骤

(i) 渗透压为 250mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 或更低的含水液体，或渗透压为 310mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 或更高的含水液体；

25 (ii) 含有一种溶血产物的含水液体；和

(b) 用一种抗人髓质素抗体免疫测定由在步骤 (a) 中裂解的白细胞释放到血样中的人髓质素的量。

本发明的第二方面涉及一种诊断多发性硬化的方法，其特征在于包括下面的步骤 (a)、(b) 和 (c)：

30 (a) 通过让所述血样与下面的含水液体 (i) 或 (ii) 或 (i) 和 (ii) 的含水液体混合物接触，裂解血样中白细胞的步骤

(i) 渗透压为 250mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 或更低的含水液体，或渗透压为

310mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 或更高的含水液体;

(ii) 含有一种溶血产物的含水液体;

(b) 用一种抗人髓质素抗体免疫测定由在步骤(a)中裂解的白细胞释放到血样中的人髓质素的量; 和

5 (c) 观察在步骤(b)中测定的血液中人髓质素含量的大小和/或变化。

### 附图简述

10 图1是测定人髓质素的校正曲线, 是通过用在实施例2中所述酶免疫测定方法测定的吸收值作为抗原浓度的函数作图制备的。

图2是测定人髓质素的校正曲线, 是通过用在实施例3中所述酶免疫测定方法测定的吸收值作为抗原浓度的函数作图制备的。

图3表示血样中人髓质素值( $\mu\text{g}/10^8$ 粒细胞)分别对正常个体、患有多发性硬化的患者和患有非炎性神经病的患者作图。

15 图4表示血样中人髓质素值( $\mu\text{g}/10^8$ 粒细胞)分别对患有多发性硬化的女性和男性患者作图。

图5表示血样中人髓质素值( $\mu\text{g}/10^8$ 粒细胞)分别对不同年龄的患有多发性硬化的患者作图。

### 优选实施方案的详细说明

20 下面将对本发明作更详细的说明。本发明的优选实施方案包括下面的(1)和(2)

(1) 首先, 提供了一种免疫测定血液中人髓质素含量的方法, 包括: (a) 通过用下面的含水液体(i)或(ii)或含水液体(i)和(ii)的含水液体混合物稀释血样, 裂解血样中白细胞的步骤

25 (i) 渗透压为250mOsm/kg. H<sub>2</sub>O或更低的含水液体, 或渗透压为310mOsm/kg. H<sub>2</sub>O或更高的含水液体;

(ii) 含有一种溶血产物的含水液体;

30 (b) 将人髓质素捕获在标记过的免疫复合体上的步骤, 通过让含有由在步骤(a)中裂解的白细胞释放的所述人髓质素的血样在存在标记过的抗人髓质素抗体的条件下与固定在一不溶性载体上的抗人髓质素抗体接触, 以便通过抗原-抗体反应形成一种夹心复合体。

(c) 测定在步骤(b)中获得的复合体中的标记材料的活性的步骤。

(2) 还提供了一种诊断多发性硬化的方法, 包括: (a) 通过用下面的含水液体 (i) 或 (ii) 或含水液体 (i) 和 (ii) 的含水液体混合物稀释血样, 裂解血样中白细胞的步骤

(i) 渗透压为 250mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 或更低的含水液体, 或渗透压为 5 310mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 或更高的含水液体;

(ii) 含有一种溶血产物的含水液体; 和

(b) 将人髓质素捕获在标记过的免疫复合体上的步骤, 通过让含有由在步骤 (a) 中裂解的白细胞释放的所述人髓质素的血样在存在标记过的抗人髓质素抗体的条件下与固定在一不溶性载体上的抗人髓质素抗体接触, 以便通过抗原-抗体反应形成一种夹心复合体。 10

(c) 测定在步骤 (b) 中获得的复合体中的标记材料的活性的步骤;

(d) 观察由在步骤 (c) 中获得的标记材料量的值获得的血样中人髓质素含量的大小和/或变化的步骤; 和

(e) 根据在步骤 (d) 中获得的观察的结果诊断多发性硬化的发作和/或程度。 15

本发明要测定的血样中人髓质素的主要部分存在于粒细胞内, 它是存在于血液中的白细胞的一种成分, 因此, 在进行测定之前必须完全裂解粒细胞, 以便将所有的髓质素释放到细胞膜外面, 从而进行精确测定。因此, 如果没有完全满足这一要求, 在测定方面会有很大的变化, 并且, 只能获得可再现性较差的测定数据。 20

机械方法、使用超声波的方法、以及包括反复冷冻和解冻的方法, 都可以作为完全裂解血样中白细胞的方法。不过, 本发明的发明人通过大量研究业已发现, 下面的方法作为进行高精度测定的实用方法是十分有效的, 并且, 相对上述方法而言能以比较简单的方式进行。

(1) 首先, 一种用渗透压不同于血液的含水液体处理血样的方法; 和 25

(2) 其次, 一种用含有溶血产物的含水液体处理血样的方法, 溶血产物是一种药物, 用它可以在温和的条件下将粒细胞的细胞膜破坏。

人血液的渗透压大约为 280-290 mOsm/kg. H<sub>2</sub>O, 因此使用渗透压为 30 250-310 mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 的含水液体将血液中的粒细胞完全裂解是困难的。

因此, 完全裂解人血液中的粒细胞可以这样实现: 通过用渗透压低

于 250 mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 的含水液体或渗透压高于 310 mOsm/kg. H<sub>2</sub>O 的含水液体稀释血液。

可以使用的这种类型的含水液体包括纯水，它可以含有水溶性有机溶剂，以及含水溶液和缓冲液，它们是具有极高浓度或极低浓度的溶质的含水液体，所述溶质包括水溶性物质，如无机酸盐、有机酸盐、糖、糖醇，氨基酸，和蛋白，并且，它所具有的渗透压能够完全裂解粒细胞。具体地讲，氯化钠、磷酸钠等是优选的无机酸盐，而乙酸钠、柠檬酸钠等是优选的有机酸盐。另外，葡萄糖和山梨醇等是优选的糖和糖醇。具有极高浓度的上述溶质的含水溶液含有 0.05mol% 或更高，优选 0.1mol% 或更高的溶质，而具有极低浓度的上述溶质的含水溶液含有 0.005mol% 或更低，优选 0.01mol% 或更低的溶质。所使用的含水液体的量以体积为单位表示，为血样的 100,000 倍，优选 100-10,000 倍，更优选 500-2000 倍。

另外，用含有上述溶血产物的含水介质处理血样的方法也是优选的。溶血产物的非限定性具体例子包括诸如高级脂肪酸盐、烷基芳基磺酸盐、烷基磺酸盐和烷基磺酸酯的阳离子型表面活性剂，诸如烷基吡啶盐、烷基三甲基铵盐、和烷基聚氧乙烯胺的阴离子型表面活性剂；诸如聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯烷基醚和聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯的非离子型表面活性剂；诸如甜菜碱的兼性表面活性剂；诸如皂苷、卵磷脂和胆酸的天然表面活性剂；和诸如补体和蛇毒、蜂毒和诸如蛋白酶的酶的生物组分。所述溶血产物可以含水液体形式使用，其重量百分比为 0.0001-10wt. %，优选 0.001-5wt. %，更优选 0.005-1wt. %。例如，所述含水液体介质可以是水或含有水和水溶性有机溶剂的混合介质。所使用的含水液体量以体积单位计为血样的 50-100000 倍，优选 100-10000 倍，更优选 500-2000 倍。

测定人髓质素的免疫学方法是通过用上述含水液体 (i) 或含水液体 (ii) 处理血样获得的水稀释过的液体血样进行的，并且其中的粒细胞已经被完全裂解。所述方法包括一个免疫反应步骤，其中，在有标记过的抗原或抗体的条件下让待测定的样品与抗人髓质素抗体接触，以便通过抗原-抗体反应，以标记过的免疫复合体的形式固定人髓质素；以及一个检测步骤，其中，用存在于其分子上的标记材料测定由此所产生的免疫复合体。在所述免疫反应步骤中，可将任何方法用于抗原-抗体

反应。

可以使用的方法的非限定性例子包括：

(1) 夹心方法，其中，标记过的抗体与要测定的血样中的抗原起反应，该反应是在用固定在一种不溶性载体上的抗体对它进行固定以后进行；

(2) 双抗体方法，其中，使用不同于在夹心方法中固定在不溶性载体上的抗体的由动物产生的抗体，并且，其中，相对这种抗体的标记过的第二抗体与所产生的夹心复合体进一步起反应；

(3) 竞争方法，其中，在有过氧化物酶-标记过的抗原存在的条件下让待测定的血样抗原与固定在不溶性载体上的抗体起反应；

(4) 凝集-沉淀方法，其中，用标记过的抗体与包括待测定的抗原的血样处理含有待测定抗原的血样，所述抗体能与所述抗原特异性反应，以便实现凝集沉淀，然后检测通过离心分离的免疫复合体中的标记材料；和

(5) 生物素-亲合素方法，其中，让标记过的亲合素与生物素标记过的抗体起反应。

当不溶性载体被用于本发明的免疫测定人髓质素的方法中时，所述不溶性载体的例子包括聚合物，如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、聚丙烯腈、氟树脂、交联葡聚糖和多糖，以及玻璃、金属、磁性颗粒及其组合。所述不溶性载体可以各种形式使用，例如，盘状、球形、纤维、棒、圆片、容器、小室、微型平板、和试管。可以用任何方法将所述抗原或抗体固定在所述不溶性载体上。例如，可以使用物理吸附方法、共价结合方法和离子结合方法。

任何类型的免疫球蛋白抗体都可用于本发明的免疫测定人髓质素的方法中，不过优选使用 IgG 类型的抗体。可以使用单克隆抗体或多克隆抗体，但优选使用单克隆抗体。例如，所述抗体可以全抗体或诸如 F(ab')<sub>2</sub> 和 Fab 的片段形式使用。抗体可以从任何来源获得，但优选使用获自小鼠、大鼠、兔、母牛、山羊、鸡等的抗体。

其次，优选使用酶、荧光物质、发光物质和放射性物质等作为标记材料，用于在所述检测步骤中测定以这种方式固定的人髓质素的标记过的免疫复合体。非限定性例子包括诸如过氧化物酶、碱性磷酸酶、和 β-D-半乳糖苷酶的酶；诸如异硫氰酸荧光素和藻胆蛋白的荧光物质；诸

如鲁米诺、dioxetanes 和吡啶盐的发光物质；诸如  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$  和  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  的放射性物质。当一种酶被用作标记材料时，根据需要，将一种底物、着色剂、荧光剂或发光剂用于测定其活性。如果过氧化物酶被用作所述酶的话，可将过氧化氢等用作底物，将 2, 2'-连氮-双-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸]铵盐 (ABTS)、5-氨基水杨酸、邻苯二胺、4-氨基安替比林、3, 3', 5, 5, -四甲基联苯胺等用作着色剂，将 4-羟苯基乙酸、3-(4-羟苯基)丙酸等用作荧光剂，将鲁米诺、光泽精电荷转运复合物用作发光剂（例如，参见国际公开号 W000/09626）。另外，如果将碱性磷酸酶用作所述酶的话，可将 4-硝基苯基磷酸酯、4-甲基伞形基磷酸酯、皮质醇-21-磷酸酯等用作底物；如果将  $\beta$ -D-半乳糖苷酶用作所述酶的话，可将 2-硝基苯基- $\beta$ -D-半乳糖苷、4-甲基伞形基- $\beta$ -D-半乳糖苷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''- $\beta$ -D-半乳糖基羟苯基)-1, 2-dioxetane (AMPGD) 等用作底物。

可用于本发明的免疫测定人髓质素的方法中的优选的多克隆抗体，是一种作为抗体成分从抗人髓质素抗血清中获得的材料，所述抗血清是通过用人髓质素作抗原按照常规方法对动物进行免疫而获得的。例如，优选使用山羊抗人髓质素多克隆抗体和兔抗人髓质素多克隆抗体。可用于本发明的单克隆抗体及其生产方法详细披露于日本专利申请公开号 151085/1999 中。

就是说，可用于本发明的免疫测定人髓质素的方法中的抗人髓质素单克隆抗体，是通过在一种培养基中培养杂交瘤而生产的，所述杂交瘤是通过骨髓瘤细胞和从用人髓质素免疫过的动物体内回收的抗体产生细胞之间进行细胞融合而制备的，所述人髓质素是从由正常人体的血液中分离的粒细胞中提取的，并从所述培养物中回收单克隆抗体，或者通过腹膜内途径给动物服用所述杂交瘤，在腹水中繁殖所述杂交瘤，并从腹水中回收所述单克隆抗体。

能产生所述抗人髓质素单克隆抗体的杂交瘤可以通过细胞融合方法生产。就是说，可以这样获得所述需要的能产生单克隆抗体的杂交瘤：从用人髓质素免疫过的动物体内回收可能产生抗体的细胞，让能产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合，选择性地繁殖所获得的杂交瘤，从所获得的杂交瘤中筛选产生抗体的杂交瘤，并克隆所选择的杂交瘤。

上述能产生抗体的细胞的例子包括脾细胞、淋巴节细胞、和 B-淋

巴细胞等，这些细胞是从用人髓质素或含有人髓质素的细胞或组合物免疫过的动物体内获得的。用于免疫的动物的例子有小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊和马。例如，免疫可以通过皮下、肌肉或腹膜内途径给动物服用人髓质素而进行，服用的剂量为每次大约 1 微克-1 毫克，每月 1-2 次，服用 1-6 个月。抗体产生细胞的收集，可以在最后一次接种之后 2-4 天进行。

骨髓瘤细胞可来自小鼠、大鼠等。优选的是抗体产生细胞和骨髓瘤细胞来自同一种动物。

任何融合细胞的方法都可以使用；没有限制。例如，可以在有诸如聚乙二醇的融合促进剂存在的条件下，在诸如 Dalbecco's 改进的 Eagle 培养基 (DMEM) 的培养基中混合抗体产生细胞和骨髓瘤细胞而进行。

在细胞融合操作之后，可以通过以下方法筛选杂交瘤：用 DMEM 等适当稀释所述细胞，对所得到的稀释液进行离心，将沉淀物悬浮在诸如 HAT 培养基的选择培养基中，然后在该培养基中培养所述细胞。然后通过用所述培养物上清液进行酶免疫测定，筛选能产生抗体的杂交瘤，并通过有限稀释方法克隆筛选的杂交瘤，以便获得能产生抗人髓质素单克隆抗体的杂交瘤。

所述单克隆抗体可以这样获得：在合适的培养基中或在动物体内培养由此获得的能产生抗体的杂交瘤，并从所述培养物中回收所述单克隆抗体。为了生产大量的单克隆抗体，所述方法优选给与骨髓瘤细胞的供体属于同一物种的动物通过腹膜内途径服用所述杂交瘤，在其腹水中积累所述单克隆抗体，并从腹水中回收所述单克隆抗体。

从所述培养物或腹水中分离单克隆抗体，可以通过阴离子交换柱或蛋白 A、G 等柱层析进行，或者通过用硫酸铵分离进行，硫酸铵通常被用于 IgG 纯化。

用这种方式获得的抗人髓质素单克隆抗体，根据用于产生这些抗体的杂交瘤的类型以四种形式存在：3F03，3G03，2E04 和 1G12。上述单克隆抗体的每一种的免疫球蛋白类型是 IgG，而亚类是 IgG1，并且每一种抗体能与作为相应抗原的人髓质素特异性反应。因此，上述抗人髓质素单克隆抗体可用于本发明的免疫测定人髓质素的方法中。

然后，本发明的诊断多发性硬化的方法，包括根据血样中人髓质素含量测定值的大小或变化诊断多发性硬化的发作和/或程度或状态，所

述测定值是通过上述免疫测定人髓质素的方法获得的。具体地讲，可以使用这样一种方法：其中，根据在血样中测定的人髓质素的浓度，和用同一个血样测定的血样中粒细胞的数量，计算出  $10^8$  个粒细胞中人髓质素的量，通过比较所述测定值和截止值（正常个体的平均值  $\pm 2SD$ （标准误））值的大小，判断多发性硬化的发作，或者通过比较在不同时间测定的所述值的变化，判断疾病程度随时间的改变。

在通过该方法诊断患有多发性硬化的 112 位患者中，有 85 位髓质素值不低于所述截止值的患者呈阳性，得到了 75.8% 的很高的阳性百分比。相反，在患有各种非炎性神经疾病的 80 位患者中，髓质素值不低于所述截止值的阳性患者的数量为 13，得到 16.3% 的低的阳性百分比。由此可以看出，根据血液中人髓质素的值诊断多发性硬化的方法是一种可靠性极高的诊断方法。另外，正常个体（换句话说，健康人体）产生阳性髓质素值的百分比为 0%（参见表 5 和图 3）。还发现多发性硬化患者的髓质素含量值在男性和女性之间没有差别（参见图 4），在不同年龄之间也没有不同（参见图 5）。

### 实施例

下面将通过对实施例和参考实施例的说明对本发明进行具体说明。本发明不以任何方式受这些实施例的限定。在实施例中所涉及的百分比是重量百分比。

#### 参考实施例 1

##### 制备纯化的人髓质素

以血液：含水的葡聚糖溶液=2: 1 的比例将来自正常个体的数百毫升血液与溶解在生理盐水中的 6% 的葡聚糖（分子量：200, 000-300, 000）溶液混合，并用玻璃棒轻轻搅拌所得到的混合物，然后将所得到的溶液在 4-8°C 下放置约 1 小时。除去沉淀的红细胞，并以 15, 000rpm 的速度对所获得的上清液进行离心，然后回收沉淀物以便获得白细胞。向所获得的白细胞中加入用 pH7.0 的 1M 磷酸钾缓冲液（PKB）配制的含有 1mM 乙二胺四乙酸二钠（EDTA）和 1mM 对氯汞基苯甲酸的提取缓冲液，并在 37°C 下，在搅动的条件下温育所得到的混合物 20 分钟。对所得到的溶液进行超声波处理 15 秒，以便完全裂解所述细胞，所得到的产物在 37°C 下温育 20 分钟，然后在 4°C 下以 12, 000rpm 的速

度离心 10 分钟。回收上清液，并用蒸馏水透析。对沉淀的残余物进行上述操作若干次，以便进行提取。将所获得的提取液加样到 CM-琼脂糖凝胶柱上，该柱用 50mM PKB (pH6.0) 平衡，并且用相同的缓冲液洗涤该柱。然后用 1M PKB (pH6.0) 洗脱吸附的物质，洗脱液用蒸馏水透析过夜，以便除去盐，然后用火棉胶膜浓缩所得到的溶液，获得 1.5 毫克纯化的人髓质素。

## 参考实施例 2

### 生产抗人髓质素单克隆抗体

10 (1) 通过在抗体产生细胞和骨髓瘤细胞之间进行细胞融合制备杂交瘤

用弗氏完全佐剂乳化在参考实施例 1 中从人粒细胞中提取并纯化的人髓质素，并以 50 微克/小鼠的剂量通过皮下方式给 7 周龄 BALB/C 小鼠服用。4 周以后，用与第一次接种相同的方法对所述小鼠再进行一次接种。在第二次接种之后 7 天，证实了血液抗体含量的增加。再过 7 天之后，以 50 微克/小鼠的剂量通过腹膜内服用方法最后一次接种所述抗原。另一方面，在补充了 20% 的胎牛血清的 DMEM 培养基中对小鼠骨髓瘤 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) 细胞进行传代。在最后一次接种之后 3 天，从所述小鼠体内收集脾细胞，并用聚乙二醇 4000 与 P3U1 细胞融合，并将所得到的溶液放置在 96 孔微型平板的孔中。在细胞融合操作之后，20 将所述培养基换成补充了 100 微摩尔次黄嘌呤、0.4 微摩尔氨基喋呤、和 16 微摩尔胸苷的 DMEM (HAT 培养基)，并通过选择培养 2-3 周，获得脾细胞和骨髓瘤细胞的杂交瘤。

(2) 筛选能产生抗人髓质素抗体的杂交瘤

25 通过 ELISA (酶联免疫吸附测定) 测定所述杂交瘤的培养液中抗体的效价，以便进行筛选。就是说，将人髓质素吸附在用于 ELISA 的微型平板壁上，并用溶解在 10mM 磷酸缓冲的盐溶液 (PBS) (pH7.4) 中的 2% 的牛血清白蛋白 (BSA) 封闭所述孔。每孔加入 50 微升的杂交瘤培养液，并将所得到的平板放置 1 小时。在去掉杂交瘤培养物之后洗涤所述孔。向每一个孔中加入 100 微升用 PBS 制备的 2 微克/毫升的过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG-Fc 抗体溶液，并让所得到的混合物在 37°C 30 下反应 1 小时。在去掉所述酶标记过的抗体溶液并洗涤所述孔之后，加入 200 微升含有 0.05% ABTS 和 0.0034% 过氧化氢的 0.1M 磷酸柠檬酸缓

冲液 (pH4.6), 以便产生颜色, 从而筛选能产生抗人髓质素抗体的杂交瘤。

### (3) 克隆产生抗体的细胞并制备单克隆抗体

5 通过有限稀释方法对上述每一种能产生抗人髓质素抗体的杂交瘤的培养物进行克隆, 以便最终获得四种单克隆杂交瘤。通过腹膜内途径分别给 BALB/C 小鼠服用所述杂交瘤, 所述小鼠预先接受了降植烷, 并让所述杂交瘤生长, 以便获得分别含有所述单克隆抗体的腹水。然后, 向所获得的腹水中添加 50% 的饱和硫酸铵, 以便使所述抗体沉淀。分离所述沉淀物, 溶解在 PBS 中。用含有 3M 氯化钠的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.8) 对所得到的溶液进行透析, 然后将其加样到蛋白 A 琼脂糖凝胶 CL4B 柱 (由 Pharmacia 出售) 上。用 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH5.0) 洗脱吸附的抗体, 并对洗脱液进行中和, 然后从里面纯化抗体, 以便获得四种单克隆抗体 3F03, 3G03, 2E04 和 1G12。

### (4) 单克隆抗体的特性

#### 15 Western 印迹

通过 Western 印迹方法固定对应于所述单克隆抗体的抗原。

首先, 对源于人粒细胞的髓质素进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。以 7V/cm 的电压降, 用在电解质溶液缓冲液中添加了 25mM Tris (羟甲基) 氨基甲烷, 192mM 甘氨酸和 20% 甲醇的溶液, 用 2 小时时间将所述蛋白从凝胶板上转移到硝酸纤维素膜上。然后, 切割所述纤维素膜上的每一个泳道, 并用酰胺黑对其中的膜之一进行蛋白染色, 并将其他的膜用于按以下方法进行酶免疫测定。就是说, 在用 2% BSA/PBS 封闭所述膜之后, 加入小鼠抗人髓质素单克隆抗体作为一级抗体, 然后加入过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG-Fc 特异性抗体作为二级抗体作为二级  
25 抗体, 并让所得到的混合物反应。在洗涤所述膜之后, 加入用 PBS 制备的含有 0.04% 3, 3'-二氨基联苯胺和 0.0034% 过氧化氢的底物溶液, 以便产生颜色。通过这种方法证实, 所有四种类型的小鼠抗人髓质素单克隆抗体能识别源于人粒细胞的髓质素。

#### 抑制试验

30 让固定在微型平板的孔上的、用于 ELISA 的人髓质素与生物素化的第一抗体在有未标记过的第二抗体的条件下反应, 然后亲和素缀合的过氧化物酶反应, 然后添加底物溶液以便产生颜色, 从而进行抑制试验。

这样，对所述单克隆抗体的任何组合来说，反应的生物素化的抗体量不会改变。因此，证实了所述四种单克隆抗体能识别彼此不同的表位（抗原位点）。

#### 实施例 1

#### 5 制备测定人髓质素的校正曲线

(1) 制备在它上面固定了单克隆抗体的珠。

在洗涤聚苯乙烯珠（直径 6 毫米）之后，在 4℃ 下，在含有 10 微克/毫升小鼠抗人髓质素单克隆抗体（2E04）的 PBS（pH7.4）溶液中浸泡所述珠 1 昼夜。然后用 PBS 洗涤，并通过在 4℃ 下，在 1% 的 BSA 含水溶  
10 液中放置 1 昼夜进行封闭处理，以便获得在它上面固定了单克隆抗体的珠。

(2) 制备过氧化物酶标记的单克隆抗体

向用 PBS 溶液配制的 1.0 毫克/毫升的小鼠抗人髓质素单克隆抗体（2E04）的溶液中加入 0.1 毫升用二甲基甲酰胺配制的 10 毫克/毫升  
15 N-（m-马来酰亚胺苯甲酸）-N-琥珀酰亚胺酯（MBS），并让该混合物在 25℃ 下反应 30 分钟。然后将该反应混合溶液加样到装有 Sephadex G-25 的柱上，并用 0.1M 的磷酸缓冲液（pH6.0）进行凝胶渗透层析，以便分离马来酰亚胺结合的单克隆抗体和未反应的 MBS。

与此同时，将含有浓度为 10 毫克/毫升的 N-琥珀酰亚胺基-3-（2-吡啶基硫基）丙酸酯（SPDP）的乙醇溶液加入含有 1.0 毫克/毫升辣根  
20 过氧化物酶作为过氧化物酶的 PBS 溶液中，在 25℃ 下反应 30 分钟。然后，将该反应混合溶液加样到装有 Sephadex G-25 的柱上，并用 10mM 的乙酸缓冲液（pH4.5）进行凝胶渗透。收集含有吡啶基二硫化物结合的 HRP 的级份，在冰冷却的条件下，在火棉胶背层上将所收集的级份浓  
25 缩大约 10 倍。向浓缩物中添加含有 0.1M 二硫苏糖醇的 0.1M 乙酸缓冲的生理盐水溶液 1 毫升（pH4.5），然后在 25℃ 下搅拌 30 分钟，以便还原被引入 HRP 分子中的吡啶基二硫化物基团。然后用装有 Sephadex G-25 的柱对该反应混合溶液进行凝胶渗透层析，并获得含有硫醇盐化的 HRP 的级分。

30 然后，混合所述马来酰亚胺结合的单克隆抗体和所述硫醇盐化的 HRP，并在火胶棉袋中在冰冷却条件下将该混合物浓缩到蛋白浓度为 4 毫克/毫升。将所得产物在 4℃ 下放置 1 天，然后用装有 Ultrogel AcA44

(由 SEPRACOR 生产) 的柱对所得产物进行凝胶渗透层析, 并获得由过氧化物酶标记的单克隆抗体。

### (3) 人髓质素的夹心酶免疫测定

混合在它上面固定了小鼠抗人髓质素单克隆抗体 (3F03) 的珠, 50 微升含有 2% BSA 的、并含有浓度为 0、1、10、100 或 200ng/ml 纯化的人髓质素 (标准参考材料) 的 PBS 溶液, 以及 350 微升含有 2% BSA 的 PBS 溶液, 并在 37°C 下温育该混合物 30 分钟。

然后, 在通过移液方式取出试管中的溶液之后, 用生理盐水溶液洗涤所述珠, 然后, 再向该试管中加入 400 微升含有 2% BSA、并含有浓度为 0.2 微克/毫升的 HRP 标记的小鼠抗人髓质素单克隆抗体 (2E04) 的 PBS 溶液, 然后在 37°C 下温育 30 分钟。然后通过移液方式取出试管中的溶液, 用生理盐水溶液洗涤。然后向每一个试管中加入 400 微升含有 0.0034% 过氧化氢和 0.05% ABTS 的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH4.6), 然后在 37°C 下温育 30 分钟。向每一个试管中加入 1 毫升 0.1N 草酸水溶液作为反应终止剂, 终止所述酶反应。然后, 用分光光度计测定所得到的溶液在 420nm 波长下的吸收值。通过用所测定的吸收值对标准参考材料的浓度作图, 获得了图 1 所示的具有良好浓度依赖性的校正曲线。

### 实施例 2

#### 通过酶免疫测定临床样品中的髓质素

在室温下, 将从正常个体 (健康人体) 和从多发性硬化患者体内采集的冷冻血液样品解冻, 并向 10 微升每一种样品中添加 2 毫升蒸馏水 (渗透压=0mOsm/kgH<sub>2</sub>O), 并用涡旋搅拌器适度搅拌, 以便获得样品溶液。然后将 10 微升样品溶液加入试管, 并通过加入 390 微升含有 2% BSA 的 PBS 溶液 (pH7.4) 进行稀释。然后, 向所述每一个试管中加入一个在它上面固定了小鼠抗人髓质素单克隆抗体 (3F03) 的珠, 并在 37°C 下温育 30 分钟。在通过移液方式取出试管中的溶液之后, 用生理盐水溶液洗涤。然后再向该试管中加入 400 微升含有 2% BSA 并含有浓度为 0.2 微克/毫升的 HRP 标记的小鼠抗人髓质素单克隆抗体 (2E04) 的 PBS 溶液, 然后在 37°C 下温育 30 分钟。然后, 通过与上文所述制备校正曲线完全相同的操作方式进行洗涤、酶反应和反应终止。然后用分光光度计测定 420nm 波长下的吸收值, 并根据所述校正曲线测定人髓质素的浓度。为了研究该测定的可再现性, 将从样品稀释处理开始的测定操作分

别重复 5 次。结果，证实了所测定的血样中的人髓质素的浓度具有极高的可再现性，如表 1 所示。

表 1-血液中人髓质素的测定值

测定序号	测定值 ( $\mu\text{l/ml}$ )	
	正常个体	患者
1	8.2	37.2
2	8.0	35.9
3	8.2	35.5
4	7.9	36.4
5	8.2	35.8
平均	8.1	36.2
变异系数 (%)	1.7	1.8

5

### 比较实施例 1

通过酶免疫测定测定临床样品中的髓质素

10 通过使冷冻保藏的分别从正常个体和多发性硬化患者体内采集的血样恢复到室温而进行解冻。取 10 微升血样并加入 2 毫升 PBS 溶液 ( pH7.4 ) 中 ( 渗透压=290 mOsm/kg. H<sub>2</sub>O ) ， 并均匀混合，以便获得样品溶液。然后将 10 微升样品溶液加入试管中，并通过加入 390 微升含有 2% BSA 的 PBS ( pH7.4 ) 进行稀释。然后，向每一个试管中加入在它上面固定了小鼠抗人髓质素单克隆抗体 ( 3F03 ) 的珠，并在 37℃ 下温

15 涂。向该试管中加入 400 微升含有 2% BSA 并含有浓度为 0.2 微克/毫升的 HRP 标记的小鼠抗人髓质素单克隆抗体 ( 2E04 ) 的 PBS 溶液，然后在 37℃ 下温育 30 分钟。然后，用与上述制备标准曲线完全相同的操作进行洗涤、酶反应和反应终止。用分光光度计测定 420nm 波长下的吸

20 收值，并根据所述校正曲线测定人髓质素的浓度。为了研究该测定的可再现性，将从样品稀释处理开始的测定操作分别重复 5 次。结果，证实了测定血样中的人髓质素的浓度所得到的数据的可再现性并不总是像是在表 2 中所示的那样好。

表 2-血液中人髓质素的测定值

测定序号	测定值 ( $\mu\text{l/ml}$ )	
	正常个体	患者
1	7.8	28.8
2	6.6	25.2
3	7.1	27.0
4	5.9	21.6
5	6.9	26.3
平均	6.9	25.8
变异系数 (%)	10.1	10.4

实施例 3

通过酶免疫测定测定临床样品中的髓质素

- 5 在室温下，将从正常个体（健康人体）和从多发性硬化患者体内采集的冷冻血液样品解冻，取 10 微升样品加入 2 毫升含有 0.01% 的十二烷基三甲基溴化胺的蒸馏水中，并用涡旋搅拌器适度搅拌，以便获得样品溶液。然后将 10 微升样品溶液加入试管，并通过加入 40 微升含有 2% BSA 的 PBS 溶液 (pH7.4) 进行稀释，然后，将在它上面固定了小鼠
- 10 抗人髓质素单克隆抗体 (3F03) 的一个珠和 350 微升含有 2% BSA 并含有浓度为 0.2 微克/毫升的 HRP 标记的小鼠抗人髓质素单克隆抗体 (2E04) 的 PBS 溶液加入每一支试管，然后在 37°C 下温育 30 分钟。然后，通过与上文所述制备校正曲线完成相同的操作方法进行洗涤、酶反应和反应终止。然后用分光光度计测定 420nm 波长下的吸收值，并根据
- 15 所述校正曲线测定人髓质素的浓度。为了研究该测定的可再现性，将从样品稀释处理开始的测定操作分别重复 5 次。结果，证实了所测定的血样中的人髓质素的浓度具有极高的可再现性，如表 3 所示。

表 3-血液中人髓质素的测定值

测定序号	测定值 ( $\mu\text{l/ml}$ )	
	正常个体	患者
1	8.3	39.6
2	8.1	38.8

3	8.3	39.2
4	8.4	40.1
5	7.9	39.5
平均	8.2	39.4
变异系数 (%)	2.4	1.2

## 比较实施例 2

### 通过酶免疫测定测定临床样品中的髓质素

通过使冷冻保藏的分别从正常个体和多发性硬化患者体内采集的  
5 血样恢复到室温而进行解冻。取 10 微升血样并加入 2 毫升 PBS 溶液  
(pH7.4) 中, 并均匀混合, 以便获得样品溶液。然后将 10 微升样品  
溶液加入试管中, 并通过加入 40 微升含有 2% BSA 的 PBS (pH7.4) 进  
行稀释。然后, 将在它上面固定了小鼠抗人髓质素单克隆抗体 (3F03)  
的一个珠和 350 微升含有 2% BSA 并含有浓度为 0.2 微克/毫升的 HRP  
10 标记的小鼠抗人髓质素单克隆抗体 (2E04) 的 PBS 加入所述试管中,  
然后在 37°C 下温育 30 分钟。然后, 用与上述制备标准曲线完全相同的  
操作进行洗涤、酶反应和反应终止。用分光光度计测定 420nm 波长下的  
吸收值, 并根据所述校正曲线测定人髓质素的浓度。为了研究该测定的  
可再现性, 将从样品稀释处理开始的测定操作分别重复 5 次。结果, 证  
15 实测定血样中的人髓质素的浓度所得到的数据的可再现性并不总是像  
是在表 4 中所示的那样好。

表 4-血液中人髓质素的测定值

测定序号	测定值 ( $\mu\text{l/ml}$ )	
	正常个体	患者
1	7.4	25.8
2	6.8	30.4
3	6.2	32.7
4	7.6	23.9
5	5.9	29.1
平均	6.8	28.4
变异系数 (%)	10.9	12.5

#### 实施例 4

##### 计算血样中人髓质素值以及疾病诊断

在室温下，将从正常个体、多发性硬化患者和非炎性神经疾病患者体内采集的冷冻血液样品解冻，取 10 微升血样加入 2 毫升蒸馏水（渗透压=0mOsm/kg. H<sub>2</sub>O）中，并用涡旋搅拌器适度搅拌，以便获得样品溶液。然后将 10 微升样品溶液加入试管，并通过加入 390 微升含有 2% BSA 的 PBS 溶液（pH7.4）进行稀释。然后，将在它上面固定了小鼠抗人髓质素单克隆抗体（3F03）的一个珠加入每一个试管中，在 37℃ 下温育 30 分钟。在通过移液方式取出试管中的溶液之后，用生理盐水溶液洗涤。向该试管中加入 400 微升含有 2% BSA 并含有浓度为 0.2 微克/毫升的 HRP 标记的小鼠抗人髓质素单克隆抗体（2E04）的 PBS 溶液，然后在 37℃ 下温育 30 分钟。然后，通过与上文所述制备校正曲线完全相同的操作方式进行洗涤、酶反应和反应终止。然后，用分光光度计测定 420nm 波长下的吸收值，并根据所述校正曲线测定人髓质素的浓度。

根据人髓质素浓度和测定的每一种血样中的粒细胞的数量计算表示 10<sup>8</sup> 个粒细胞中髓质素的量的人髓质素值（微克/10<sup>8</sup> 粒细胞），结果如图 3 所示。

图 3 表示正常个体、多发性硬化患者和非炎性神经疾病患者相应的人髓质素值的比较。下面的结果是从图 3 中获得的。

- 多发性硬化：305 ± 117 (n=112)
- 非炎性神经疾病患者：233 ± 66 (n=80)
- 正常个体：213 ± 34 (n=25)

将上述结果与截止值（281 微克/10<sup>8</sup> 粒细胞）进行比较，并归类为阳性或阴性。在表 5 中示出了阳性和阴性的数量以及阳性的百分比。

表 5-临床血样中的人髓质素值

样品	阳性数量	阴性数量	阳性%
多发性硬化患者	85	27	75.8
非炎性疾病患者	13	67	16.3
正常个体	0	25	0.0

从上述结果可以看出，根据血样中的髓质素值诊断多发性硬化是一种高可靠性的诊断方法。另外，在根据男性或女性（参见图 4）以及根据不同年龄（参见图 5）对多发性硬化患者的髓质素值水平进行分类之后获得了以下结果。

5 男性/女性

· 多发性硬化患者

女性:  $351 \pm 107$  (n=78)

男性:  $367 \pm 143$  (n=34)

· 正常个体:  $214 \pm 34$  (n=24)

10 · 截止值: 281 (微克/ $10^8$  粒细胞)

根据年龄

· 多发性硬化患者

10-19:  $421 \pm 154$  (n=9)

20-29:  $329 \pm 94$  (n=26)

15 30-39:  $357 \pm 104$  (n=30)

40-49:  $330 \pm 157$  (n=17)

50 岁以上:  $375 \pm 125$  (n=25)

· 正常个体:  $213 \pm 34$  (n=25)

· 截止值: 281 (微克/ $10^8$  粒细胞)

20 以上结果表明，在男性和女性之间没有发现差别，并且在不同年龄之间也没有发现差别。

本发明的效果

25 通过以上所述的本发明，可以精确地、并且以良好的可再现性免疫测定血样中的人髓质素的含量。另外，可通过血液中人髓质素的测定值诊断多发性硬化的发作或这种病的程度或状态，以便诊断慢性炎症性疾病，特别是多发性硬化。

# 说明书附图

测定血样中人髓质素的校正曲线

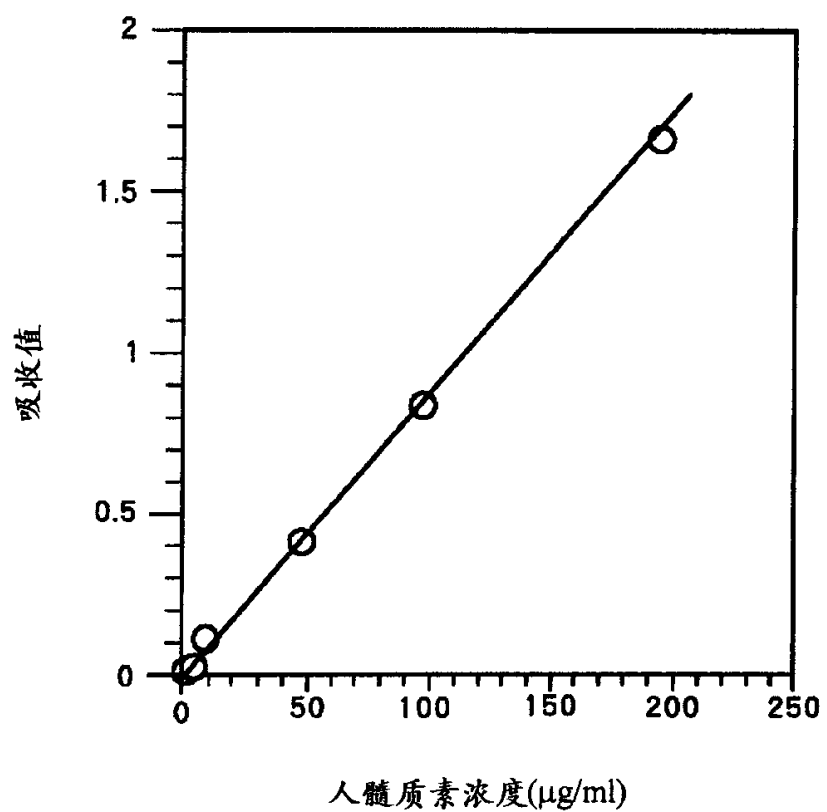


图 1

测定血样中人髓质素的校正曲线

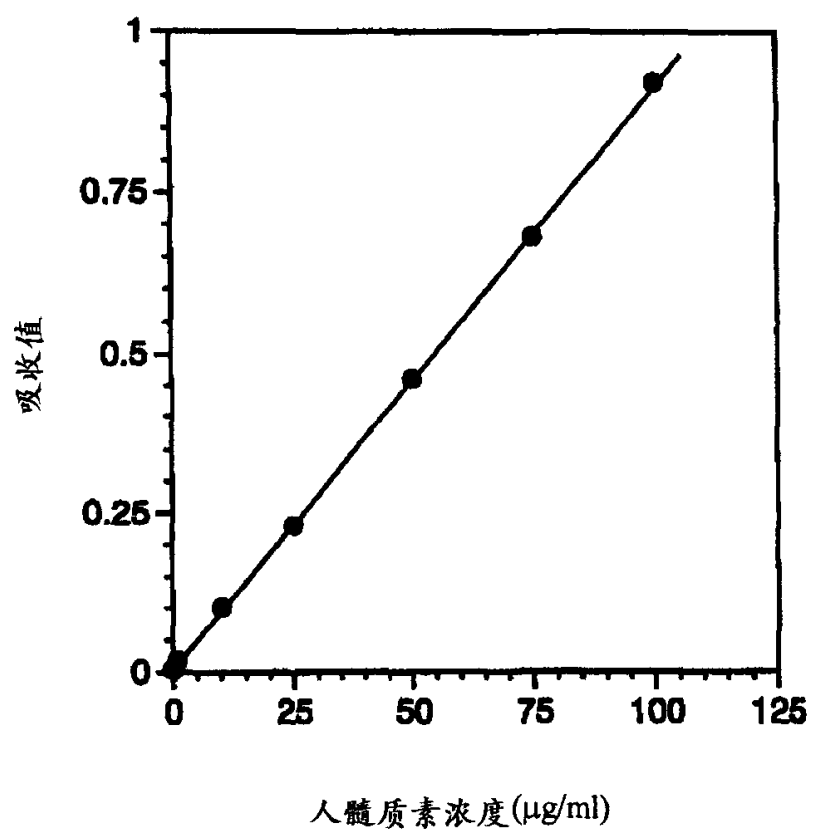
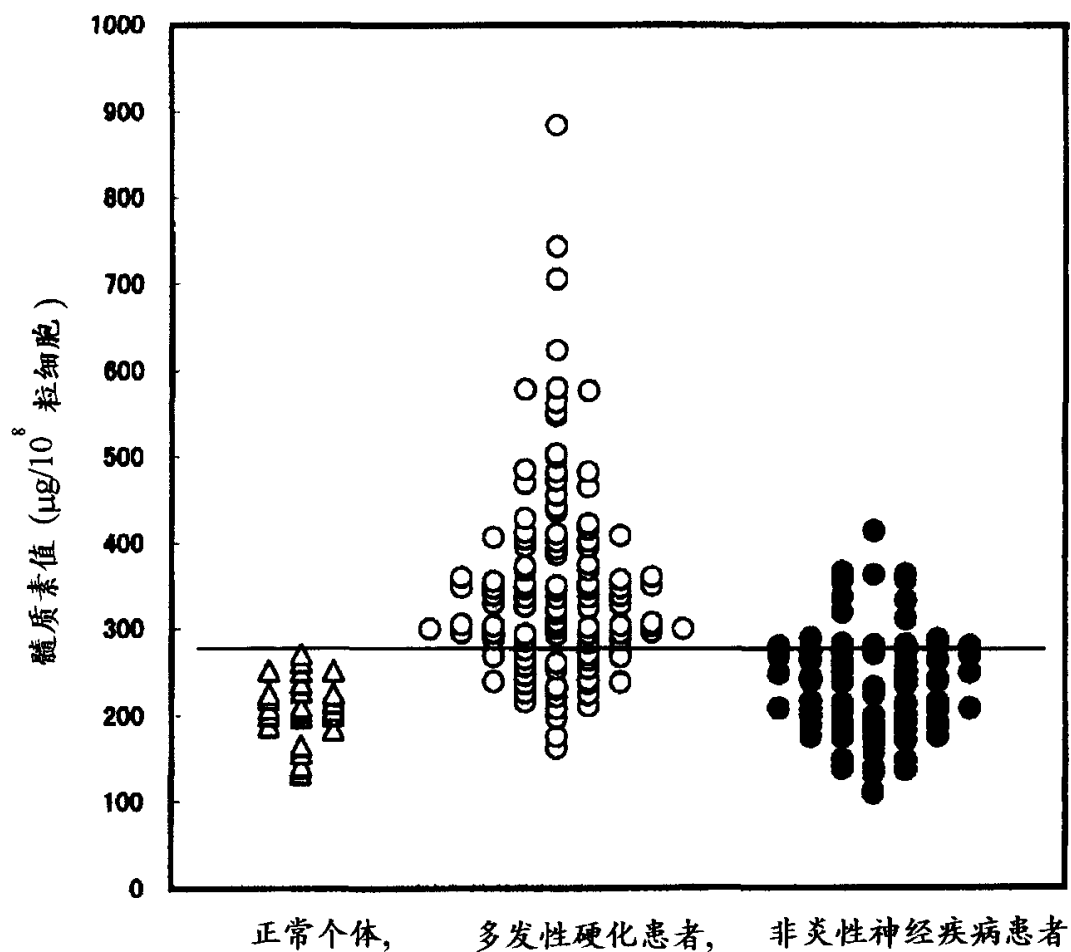


图 2

多发性硬化患者和非炎性神经疾病患者  
髓质素值的比较

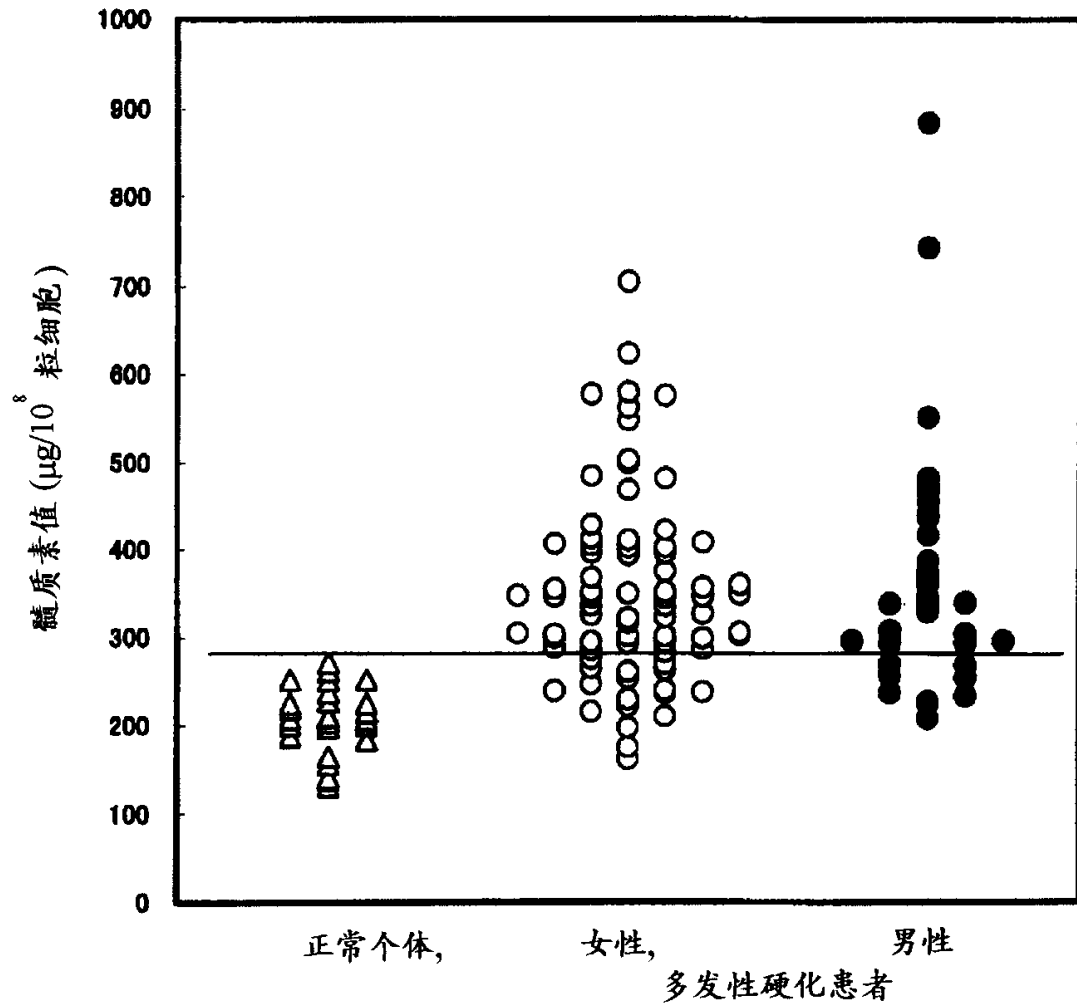


- 多发性硬化患者:  $355 \pm 117$  (n=112)
- 非炎性神经疾病患者:  $233 \pm 66$  (n=80)
- 正常个体:  $213 \pm 34$  (n=25)

截止值 =  $281$  ( $\mu\text{g}/10^8$  粒细胞)

图 3

男性和女性多发性硬化患者的髓质素值比较

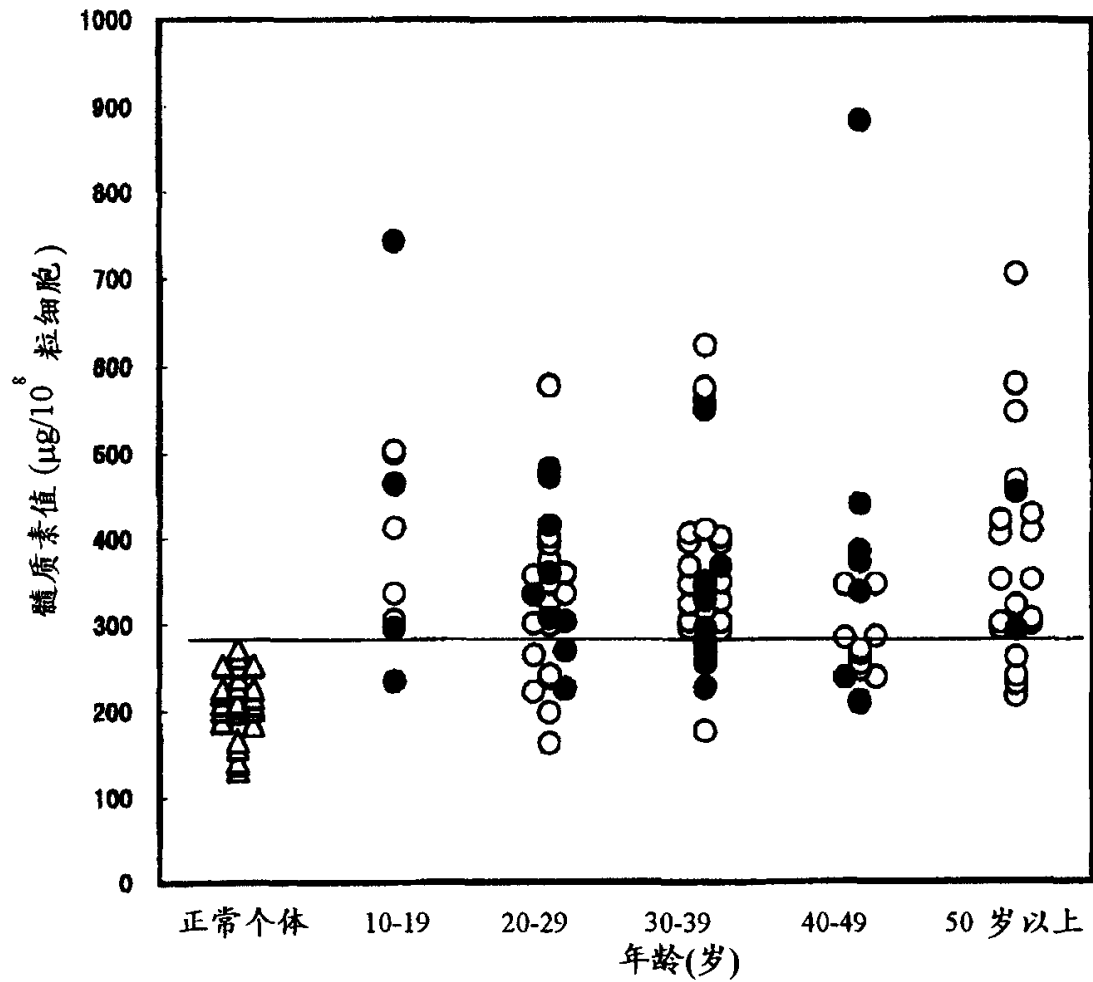


- 多发性硬化患者:
  - 女性:  $351 \pm 107$  (n=78)
  - 男性:  $367 \pm 143$  (n=34)
- 正常个体:  $214 \pm 34$  (n=24)

截止值 =  $281$  ( $\mu\text{g}/10^8$  粒细胞)

图 4

不同年龄组多发性硬化患者的髓质素值比较



○：女性， ●：男性  
 · 多发性硬化患者：  
 10-19: 421 ± 154 (n=9)  
 20-29: 329 ± 94 (n=26)  
 30-39: 357 ± 104 (n=30)  
 40-49: 330 ± 157 (n=17)  
 50 岁以上: 375 ± 125 (n=21)  
 · 正常个体: 213 ± 34 (n=25)

截止值 = 281 (µg/10<sup>8</sup> 粒细胞)

图 5

专利名称(译)	人髓质素的免疫测定方法以及用该方法诊断多发性硬化		
公开(公告)号	<a href="#">CN1307237A</a>	公开(公告)日	2001-08-08
申请号	CN00134432.3	申请日	2000-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	大日精化工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	大日精化工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	大日精化工业株式会社		
[标]发明人	铃木英明 高桥树由 葛城寿史 青木洋祐		
发明人	铃木英明 高桥树由 葛城寿史 青木洋祐		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/564 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/53 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/564 Y10S436/811 G01N2800/285 G01N33/573		
优先权	2000026828 2000-02-03 JP 2000026829 2000-02-03 JP 2000121587 2000-04-21 JP		
其他公开文献	CN1237346C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种髓质素的免疫测定方法,其中,当使用抗人髓质素抗体测定血液中的髓质素时,用所述抗人髓质素抗体测定血样中人髓质素的量是在用一种含水液体处理所述血样之后进行的,所述含水液体的比渗透压不同于血液的渗透压,以便完全裂解白细胞;和一种诊断多发性硬化的方法,其特征在于,血样中的人髓质素的含量是用一种免疫测定方法测定的,并且,根据该测定值的大小或变化诊断多发性硬化的发作和疾病的程度。

