

소아의 전염성 단핵구증에서 사이토카인과 세포자멸사 연관 유전자의 발현의 변화

전북대학교 의과대학 소아과학교실, 임상의학연구소*, 치과대학 생화학교실†

조대선 · 한지혜 · 김선영* · 김민선 · 이호근† · 이대열 · 황평한

= Abstract =

Changes in the expression of cytokines and apoptosis-related genes in children with infectious mononucleosis

Dae Sun Jo, M.D., Ji Hye Han, M.D., Sun Young Kim, Ph.D., Min Sun Kim, M.D.
Ho Keun Yi, Ph.D., Dae-Yeol Lee, M.D. and Pyoung Han Hwang, M.D.

Department of Pediatrics, Medical School, Research Institute of Clinical Medicine*
Department of Biochemistry†, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

Purpose: The aims of this study were to identify the clinical characteristics and determine the changes in the expression of cytokines and apoptosis-related genes in children with infectious mononucleosis.

Methods: Serological examinations of 15 pediatric patients diagnosed with infectious mononucleosis were performed prospectively. Peripheral blood from the patients was used to compare the composition of T cell subsets, cytokines, Epstein-Barr virus (EBV) DNA, and the expression of apoptosis-related genes with those in 10 healthy children.

Results: Mean age of the patient group was 5.7 ± 3.4 (range, 3-9) years, and the male-to-female ratio was 1.5:1. Fever, sore throat, pharyngitis/tonsillitis, and cervical lymph node enlargement were the most common symptoms and signs. The proportions of CD3+ T cells, CD8+ suppressor cells, and CD56+ natural killer (NK) cells were higher in the patient group than in the control group ($P < 0.01$). The IL-2, IL-6, and interferon (IFN)- γ levels were higher in the early symptomatic period ($P < 0.01$). Mean amount of EBV DNA in the patients was $10^{2.38}$ copies/ μ g, and the amount was the highest at the beginning of the symptomatic period and normalized during the convalescent phase. Bcl-2 expression increased during the initial phase, while Bax expression increased during the convalescent phase. Further, FasL expression increased 1 week after symptom presentation and decreased during the convalescent phase. There was no significant change in Fas expression.

Conclusion: We analyzed the clinical characteristics and changes in the expression of cytokines and apoptosis-related genes in the patients with infectious mononucleosis. (*Korean J Pediatr* 2009;52:1348-1357)

Key Words: Infectious Mononucleosis, Cytokines, Apoptosis, Children, Gene

서 론

전염성 단핵구증(infectious mononucleosis)은 Herpesviridae에 속하는 *Epstein-Barr virus* (EBV)의 감염 후 이차적

으로 세망내피계에 변화를 보이며 발열, 인후염, 림프절 종대를 3대 주 증상으로 하는 감염성 질환으로 대부분 양성의 경과를 보이며 자연 치유가 되는 질환이다¹⁾.

EBV는 임상적으로 소아와 사춘기 연령에서 초 감염되어 전염성 단핵구증을 일으키고 성인에서는 비인두 상피종양, 악성 림프종, 위 상피종양 등과 같은 종양 질환 발생에 관여하며, 이외에 혈구탐식 증후군, 류마티스 관절염, 만성 피곤 증후군 등의 발병에도 관여한다²⁾. EBV에 의해 발생하는 질병 발생의 양상은 그 지역의 사회, 경제적 환경에 따라 달라서, 임상 증상도 다르게 나타난다. 즉 저개발 국가나 개발도상국에서의 EBV 초 감염은 대개 일찍 일어나서 6세 이전에 거의 전부 감염되어 증상이 경하게 나타나는데 비하여 선진국에서는 10세 이후의 감염이 상대적으

Received : 13 July 2009, Revised : 19 August 2009

Accepted : 25 September 2009

Address for correspondence: Pyoung-Han Hwang, M.D.

Department of Pediatrics, Chonbuk National University Hospital, 634-18, Keumam-dong, Jeonju, Jeonbuk 561-712, Korea

Tel : +82.63-250-1472, Fax : +82.63-250-1464

E-mail : hwaph@chonbuk.ac.kr

This work was supported by a grant from Research Institute of Clinical Medicine, Chonbuk National University Hospital

로 많아, 전형적인 전염성 단핵구증의 임상 증상을 보이는 예가 많다¹⁾. 또한 EBV는 지역적으로 감염형이 다르고, EBV에 노출된 사람의 면역 또는 병적 상태에 따라 감염형이 다른 것으로 알려져 있다³⁾. EBV 감염형은 세포독성 T 림프구면역(cytotoxic T lymphocyte immunity, CTL 면역)과 연관성이 있는 EBV 잠복감염 유전인자들과 EBV 활동성감염 유전인자들의 유전적 특성에 따라 분류되므로 EBV 감염형에 관한 연구는 EBV의 역학 및 병인연구에 중요하다⁴⁾.

전염성 단핵구증은 여러 가지 특징적인 임상적, 혈액학적, 병리학적 및 혈청학적인 변화를 보이며 일차감염일 경우에는 일시적으로 나타나는 이종친화 항체(heterophil antibody)와 활성화된 T-림프구인 비전형적인 림프구의 증가가 특징적이다¹⁾. 최근의 보고에 의하면 전염성 단핵구증의 환자에서 T 세포의 증식뿐만 아니라 말초혈액내의 T 세포의 세포자멸사의 감수성이 증가하였다는 보고가 있다⁵⁾. 또한 급성 전염성 단핵구증 환자의 말초 T 림프구의 형태학적 특징 외에도 또 다른 특징적인 소견은 환자로부터 혈액을 채취하거나 외부에서 배양할 때 자연적으로 쉽게 세포자멸사를 유도한다는 보고가 있다⁶⁾. 이는 전염성 단핵구증에서는 이러한 말초 혈액내의 T 세포의 역할이 중요하다는 증거이다.

사회 경제적인 발달로 전반적인 위생수준이 향상된 우리나라에서도 EBV의 초감염 연령이 늦어져 전형적인 임상 증상의 발현이 점차 증가하고 있으며 최근 들어서 EBV 항체에 대한 혈청학적 검사법, 분자학적 검사 방법의 발달로 인하여 EBV 감염을 쉽게 진단할 수 있게 되었다. 그러나 지금까지 국내에서는 소아의 전염성 단핵구증의 보고가 매우 적을 뿐만 아니라, EBV 감염 증상이 비전형적인 임상 증상을 나타내는 경우 즉 신경학적 합병증, 비장 파열, 2차 감염, 간기능 부전, 심근염과 같은 치명적인 합병증이 발생하므로 이에 대한 예측과 대책이 절대적으로 필요하나 이 질환에 대한 자세한 정보는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구자들은 전형적인 임상증상과 EBV 혈청항체검사와 EBV 중합효소연쇄반응 양성을 보여 급성 전염성 단핵구증으로 확진된 환자 15명을 대상으로 임상적 특성을 분류하고 EBV 감염형을 알아보고, 생체내 T 세포의 분포, T 세포의 증식능과 세포자멸사 능력(apoptotic activity), 사이토카인의 변화, EBV DNA의 양 측정, 세포자멸사에 관련된 유전자(apoptosis-related genes)에 대한 변화를 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

2006년 3월부터 2007년 2월까지 전북대학교병원에 입원한 환자 중 임상적으로 5일 이상의 발열을 보이며 진찰 소견상 급성 인두염 또는 인두편도염과 림프절 종대 및 간 또는 비장 비대의 소견을 보여 EBV 감염 진단을 위한 혈청학적 검사를 실시한 결과 EBV viral capsid antigen (VCA)에 대한 IgM과 IgG 항체가

양성이고 EBV early antigen (EA)에 대한 항체가 양성이며, EBV nuclear antigen (EBNA)에 대한 항체가 음성소견을 보여 급성 전염성 단핵구증으로 확진된 환자 15명을 대상으로 본 연구를 실시하였다. 위의 실험군 환아로부터 진단 당시, 발병 1주 후, 3주 후의 혈액을 채취하여 혈청과 말초 혈액 단핵구를 기존의 방법⁷⁾으로 분리하여 사용하였다. EBV 감염형의 비교 대조군은 본원에 건강검진을 위하여 방문한 건강한 정상 소아 중 연구 대상 환아와 동일한 연령의 10명을 대상으로 하였다.

2. 방 법

1) 연구 대상 환자의 임상적 특성 분석 및 말초 혈액 도말 표본 제작

연구 대상 전염성 단핵구증 환아와 대조군 소아들로부터 연령, 성별, 임상 증상, 진찰 소견, 혈액학적 소견, 간기능 검사, EBV 혈청학적 항체 검사, EBV DNA 검사 등을 조사하였다. 말초 혈액 도말표본은 전염성 단핵구증으로 진단된 환자의 말초 혈액 1.5 mL를 EDTA로 항응고시켜 채취 직후와 채취 후 37°C에 4시간 배양한 혈액으로 도말 표본을 제작한 후 통상적인 염색 방법을 한 후 현미경하에서 관찰하였다.

2) T 세포 세군(subset) 분석

전염성 단핵구증에서의 T 세포의 증식을 알아보기 위하여 연구 대상 전염성 단핵구증 환자와 대조군 소아들로부터 헤파린으로 처리된 혈액 6 mL를 채취하여 백혈구연층(buffy coat)을 분리하고 FACSscan 기기의 IMK™-plus kit (Becton Dickinson, Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 분석하였다.

3) 사이토카인 측정

연구 대상 전염성 단핵구증 환아와 대조군 소아들로부터 얻어진 혈청을 이용하여 염증에 관련된 사이토카인(IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α)을 ELISA kit (R&D systems, Inc. Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 모든 검체는 제조사의 지시에 따라 반복 측정하였고 평균값을 이용하였다.

4) DNA 추출

연구 대상 전염성 단핵구증 환아와 대조군 소아들로부터 헤파린으로 처리된 혈액 2 mL를 채취하여 Genomic DNA 분리는 DNaid II 시약(Genotech, Daejeon, Korea)을 이용하여 회사의 사용 설명서에 따라 DNA를 추출하였다. 간략히 기술하면 다음과 같다. 혈액 200 μ L에 동량의 용해 용액을 넣어 50°C에서 50분간 반응시킨 후, 클로로폼 500 μ L를 첨가하여 13,000 rpm, 10분간 원심분리하여 상층의 200 μ L를 새로운 튜브에 취하였다. 동량의 이소프로판올을 첨가하여 DNA를 침전시키고, 정제된 DNA의 분리를 위하여 70% 에탄올로 2회 세정하였다. 멸균 증류수 40 μ L에 녹여서 사용하였으며, 시료 당 2 μ g 정도의 DNA를 정제하여 -70°C에서 동결상태로 실험 전까지 보관하였다가 사용하였다.

5) 중합효소 연쇄 반응(Polymerase chain reaction, PCR)과 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응

연구 대상 전염성 단핵구증 환아와 대조군 소아들로부터 추출된 DNA 검체를 이용하여 EBV 감염을 확인하기 위하여 EBV Primermix Kit (Genotech, Daejeon, Korea)를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하여 247 bp 크기의 band가 나타나면 EBV 감염을 확인하였다. EBV 감염형 분류를 위하여 시발체(sense primer; 5'-TTTCACCAATACATGAACC-3', antisense primer; 5'-TGGCAAAGTGGAGCAA-3')를 제작하여 중합 효소 연쇄반응을 실시하였다. 중합 효소 연쇄반응 혼합액은 추출된 DNA 0.5 μ L Taq polymerases (Takara Ex Taq; Takara company, Japan) 0.25 μ L, 10X Taq buffer (1.5 mM magnesium이 포함된 10X Ex Taq buffer; Takara company, Japan) 5.0 μ L, 2.5 mM 농도로 각각의 핵산이 포함된 dNTP 혼합물 4.0 μ L, sense 및 antisense 시발체를 각각 2.0 μ L, 3차 증류수 36.25 μ L로 구성하여 총 50 μ L로 만들었다. 중합효소 연쇄반응 조건은 일차적으로 5분간 95°C에서 예열하고 92°C에서 5분간 변형(denaturation) 시킨 다음 52°C에서 1분간 결합(annealing), 72°C에서 1분간 연장(extension) 반응을 30회 반복하였고, 72°C에서 최종적으로 7분간 연장시켜 중합효소 연쇄반응을 완료하였다. 중합 효소 반응에 의한 최종 생산물을 2% agarose 겔에서 전기 영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 350 bp (base pair)의 크기는 A형으로, 400 bp의 크기는 B형으로 감별하였다. EBV A형 양성 대조는 EBV 감염 Raji 세포를 사용하였고, EBV B형 양성 대조는 EBV 감염 Jijoye 세포를 사용하였으며 음성 대조는 K-562 세포를 사용하였다.

아울러 전염성 단핵구증 환아군의 진단당시, 1주일, 3주일 후와 대조군 소아들의 말초단핵구로부터 추출된 DNA 250 ng에 10 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 10 nM EDTA, 5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTP 혼합물, 0.2 μ M 시발체 (sense primer: 5'-CGGAAGCCCTCTGGACTTC-3', antisense primer: 5'-CCCTGTTTATCCGATGGAATG-3')와 FastStart Taq DNA polymerase (LightCycler FastStart DNA Master SYBER Green I, Roche)를 첨가하여 LightCycler 1.5 Instrument에서 증폭시켰다. 이 과정은 95°C에서 10분간의 전반응을 거친 다음, 95°C 15초, 62°C 1분, 72°C 1분의 과정을 50회 반복하였다. 반응이 끝난 뒤에도 증폭의 특이도를 확인하기 위하여 온도를 65°C까지 내린 후 점차적으로 0.2°C/초의 속도로 95°C까지 온도를 높여 형성된 중합 효소 연쇄반응 산물의 동일성 여부를 분석하였다.

6) Western hybridization

연구 대상 전염성 단핵구증 환아와 대조군 소아들로부터 얻어진 혈구세포의 용해질로부터 총 단백질을 분리하였다. 간략히 기술하면 다음과 같다. 세포를 2-3회 차가운 PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후 100 mm 배양용기에 1 mL의 PBS-TDS (PBS, 1% Triton X-100, 0.05% sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.5 μ g/mL leupeptin, 1 mM EDTA, 1 μ g/mL

pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가, 15분간 얼음 위에서 방치 후 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 단백질 농도는 우혈청 알부민을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량 하였다. 분리한 20 μ g의 용해질을 7.5% mini gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 니트로셀룰로스 막(Hybond-C Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 60 V로 2시간 동안 전기적으로 이동하였다. 막의 블로킹은 5% 탈지유가 함유된 TBS (TBS+ 0.1% Tween 20)용액에서 상온에서 1시간동안 실시한 후 Bcl-2을 비롯하여 Bax, Fas, FasL, actin 등 여러 단백질의 발현을 측정하기 위한 1차 항체를 1:1,000으로 TBS 용액에 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하였다. TBS로 3회 세척 후 ECL 기질 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)과 30-60초간 반응 후 LAS-3000 imaging system (FUJIFILM, Japan)을 통해 immunoreactive bands의 상대적 강도가 정량화 되었다.

7) 통계처리

통계 방법 처리는 Student's t-test와 Mann-Whitney U-test를 사용하여 P 값을 구하였으며 P 값은 0.05 미만일 때 통계학적인 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 연구 대상 환자의 임상적 특성

평균 연령은 5.7 \pm 3.4세(3-9세)이었고, 성별은 남아 9명, 여아 6명으로 남녀비는 1.5:1.0이었다. 임상적으로 전례에서 간헐적 발열 증상이 관찰되었고, 이외에도 인두통(11례), 무기력과 권태감(8례), 경한 상기도염 증상(5례), 두통(5례), 복통(5례), 구토(3례), 호흡곤란(1례)의 순으로 임상 증상이 나타났다. 진찰 소견 상 전례에서 급성 인두염 또는 편도염 소견이 발현되었고 이중 80% (12례)에서는 회백색의 막성 삼출물이, 2례에서는 연구개에 출혈 반점이 관찰되었고 87% (13례)에서 경부 임파선 종대가 동반되었다. 이외에도 환아의 53% (8례)에서는 간 비종대, 피부 발진 13% (2례), 황달 7% (1례) 등이 관찰되었다.

검사 소견으로는 93% (14례)에서는 말초 혈액 도말소견에서 비정형 림프구의 증가 소견을 보였고, 80% (12례)에서 비 정상적인 AST, ALT치 상승 소견이 관찰되었다. EBV 검출 중합 효소 연쇄반응에서는 100% (15례)에서 양성 소견을 보였고, 종대된 경부 임파선으로 시행된 미세침흡입생검술에서 13% (2례)에서 비정형 림프구를 관찰할 수 있었다. EBV 혈청 항체 검사는

15례 모두 EBV-viral capsid antigen (VCA) IgM 항체 양성으로 초감염 소견을 보였다. 6례(40%)에서는 EBV-VCA IgM 항체에만 양성, 3례(20%)에서는 EBV-VCA IgM과 Early antigen (EA) 항체에서 양성, 6례(40%)에서는 EBV-VCA IgM, EBV-VCA IgG 및 EA 항체에 양성을 보였다. 10명의 건강한 소아의 EBV 혈청 항체 검사는 4례(40%)에서 EBV-VCA IgG 항체가 양성을 나타냈으며, EB nuclear antigens (EBNA) 항체도 3례

(30%)에서 양성을 나타내었다(Table 1).

2. 전염성 단핵구증의 림프구 세군(subset)의 변화

전염성 단핵구증 감염 동안 전반적인 림프구 수의 증가뿐만 아니라 림프구의 subpopulation에서도 유의한 변화가 관찰되었다. 진단 후 3주에 걸쳐 CD3+ T 세포와 CD8+ suppressor T 세포는 대조군에 비하여 현저히 증가되었으며, 시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였으나, 반면 CD4+ helper T 세포는 별 다른 영향이 없었다. 특히 CD4+ helper T 세포의 수의 약간의 증가에 비하여 CD8+ suppressor T 세포수의 현저한 증가로 인하여 T4/T8 ratio의 역전을 보였다. CD56+ NK 세포수는 대조군에 비하여 환자군에서 역시 유의하게 증가하였다($P < 0.01$, Table 2).

3. 전염성 단핵구증의 혈중 사이토카인의 변화

전염성 단핵구증 환자의 혈청내 사이토카인 IL-2, IL-6, IFN- γ 수치는 대조군에 비하여 현저히 증가하였다($P < 0.01$). 혈청 내 IL-2, IL-6 수치는 임상 발현 후 첫 주에 최고 농도를 보이다가 회복기에 들어서면 IL-2는 서서히 감소되나 IL-6는 현저히 감소하는 경향을 보였다. IFN- γ 도 임상 발현 후 첫 주에 최고 농도를 보이다가 회복기에 현저히 감소하여 거의 정상치로 감소하였다. 반면 TNF 농도는 별다른 차이를 보이지 않았다(Table 3).

3. 전염성 단핵구증 환자의 말초 혈액 단핵구로부터 EBV의 검출

전염성 단핵구증이 의심되는 15명의 환아들로 부터 얻은 말초 혈액의 단핵구에서 DNA를 분리하여 중합효소연쇄반응을 실시하여 반응물을 agarose gel에 확인하여 247 bp 위치에 있는 띠를 확인하여 모든 환아들의 말초혈액 DNA에서 EBV를 증명할 수 있었다. EBV가 양성이었던 전염성 단핵구증 환자에서 중합효소연쇄반응을 이용하여 EBV 감염형을 분석한 결과 15명 연구 대상 환자 15명 중 A형은 13명(86.7%) 이었으며, B형은 1명(6.7%), A형이나 B형 모두 아닌 경우가 1명(6.7%) 발견되었다(Fig. 1).

Table 1. Clinical Characteristics of Study Patients with Infectious Mononucleosis (N=15)

	No. of patients (%)
Age (yr)*	5.7±3.4
Sex (M:F)	1.5:1.0
Symptoms	
Fever	15 (100)
Sore throat	11 (73)
Malaise/Fatigue	8 (53)
URI symptoms	5 (33)
Headache	5 (33)
Abdominal pain	5 (33)
Vomiting	3 (20)
Respiratory difficulty	1 (7)
Physical findings	
Pharyngotonsillitis	15 (100)
Cervical lymphadenitis	14 (93)
Tonsillar exudate	12 (80)
Hepatosplenomegaly	8 (53)
Skin rash	2 (13)
Jaundice	1 (7)
Laboratory findings	
Atypical lymphocytosis	14 (93)
Elevated AST/ALT	12 (80)
Anti VCA IgM	15 (100)
EBV PCR	14 (93)
Atypical lmyphocyte in FNAB	2 (13)

*Mean ±SD

Abbreviations : URI, upper respiratory infection; VCA, viral capsid antigen; EBV, Epstein-Barr virus; FNAB, fine needle aspiration biopsy

Table 2. Lymphocyte Subpopulations in the Blood of Patients with Infectious Mononucleosis

Lymphocyte subpopulation	Duration of clinical symptoms of EBV infection (No./ μ L)			Controls (No./ μ L)	P
	At diagnosis	1st week	3rd week		
Total lymphocyte	6,910±5,720	5,260±3,860	3,740±2,980	2,510±360	<0.01
CD3 ⁺	4,872±4,032	3,711±2,723	2,516±2,005	1,497±216	<0.01
CD4 ⁺	2,019±981	1,163±393	1,245±411	1,231±98	NS
CD8 ⁺	3,387±1,672	3,030±592	1,698±722	659±86	<0.01
Total NK (CD16 ⁺ /CD56 ⁺)	369±175	522±318	445±329	124±53	<0.01
T4/T8 ratio	0.59±0.87	0.38±0.26	0.73±0.91	1.87±0.35	<0.01

Values are given as means±standard deviations

P is given for all patients compared with healthy controls

Statistical significance test was done by Mann-Whitney U-test

Abbreviation : NS, not significant

전염성 단핵구증으로 확진된 환아로부터 얻어진 말초혈액의 단핵구에서 EBV DNA의 양을 실시간 증합효소연쇄반응으로 정량적 비교 분석하였다. 전염성 단핵구증 환아의 말초혈액의 단핵구내의 EBV DNA의 평균 부하량은 $10^{2.38}$ copies/ μg 이었으며 이는 대조군에 비해 유의하게 증가하는 경향을 나타내었다($P < 0.05$). 15명의 환아로부터 얻어진 일련의 시료에서는 내원 당시 EBV DNA의 평균 부하량은 $10^{2.91}$ copies/ μg 이었으며 1주째의 시료에서는 $10^{2.72}$ copies/ μg 로 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 발병 3주째에는 $10^{1.37}$ copies/ μg 로 내원당시에 비하여 현저히 감소하였으며($P < 0.05$), 모든 환자에서 진단 당시 EBV DNA의 양이 회복 당시보다는 높았다(Fig. 2).

4. 전염성 단핵구증 환아의 말초 혈액 림프구의 세포자멸사 관찰 및 관련 유전자의 발현

전염성 단핵구증으로 진단된 환자의 말초 혈액을 채취 직후와 채취 후 37°C에 4시간 배양한 혈액의 도말 표본을 통상적인 염색을 한 후 현미경하에서 세포 용적의 감소, 세포막에 싸여 있으면서 염색질 응축(chromatin condensation), 핵 분절(nuclear fragmentation)을 보이는 apoptotic 림프구를 검토했⁸⁾ 결과 채취 직후 염색한 T 림프구보다는 37°C에 4시간 배양한 후 염색한 T 림프구에서 apoptotic 림프구가 현저히 증가하였다(Fig. 3).

분자생물학적 검증을 위하여 apoptotic related protein의 발현을 알아본 결과 처음 내원 당시에는 세포자멸사를 억제하는

Bcl-2는 증가하다가 점차 회복되는 과정에서 시간 의존적으로 현저히 감소하며, 세포자멸사를 유도하는 Bax는 Bcl-2의 발현과는 다르게 거의 변화를 보이지 않다가 회복기에 약간 증가하는 경향을 보였다. 반면 세포자멸사를 유도하는 Fas의 발현은 거의 변화가 없으나 FasL는 발병 1주 후에 현저히 증가하고 회복기에 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

고 찰

1889년 Pfeiffer⁹⁾가 전염성 단핵구증의 임상 증상을 처음 기술하여 이 병을 전열(glandular fever)이라 하였다. 1920년 Spunt와 Evans¹⁰⁾가 전염성 단핵구증으로 처음 명명하였다. 1923년 Downey와 McKinlay¹¹⁾는 비정형 림프구에 대해 기술하였고, Helen 등¹²⁾이 EBV로 명명하였다. 그 후 전염성 단핵구증의 임상 증상을 보인 환자의 혈청에서 EBV 항원의 혈청학적 변화가 증명되어 EBV가 전염성 단핵구증의 원인 바이러스임이 증명되

Table 3. Cytokine Level in the Serum of Patients with Infectious Mononucleosis

Duration of clinical symptoms (Weeks)	Cytokine (pg/mL)			
	IL-2	IL-6	IFN- γ	TNF- α
At diagnosis	17.6 \pm 8.1	12.4 \pm 8.7	63.7 \pm 47.6	155.3 \pm 79.7
1st week	16.8 \pm 9.2	12.2 \pm 9.5	27.8 \pm 34.3	138.2 \pm 81.9
3rd week	12.2 \pm 4.6	3.5 \pm 3.8	20.4 \pm 12.5	121.6 \pm 63.2
Controls	<10	<3	<10	117.6 \pm 74.5

Values are given as means \pm standard deviations $P < 0.01$ for all patients versus healthy controls for IL-2, IL-6, IFN- γ
Statistical significance test was done by Mann-Whitney U-test

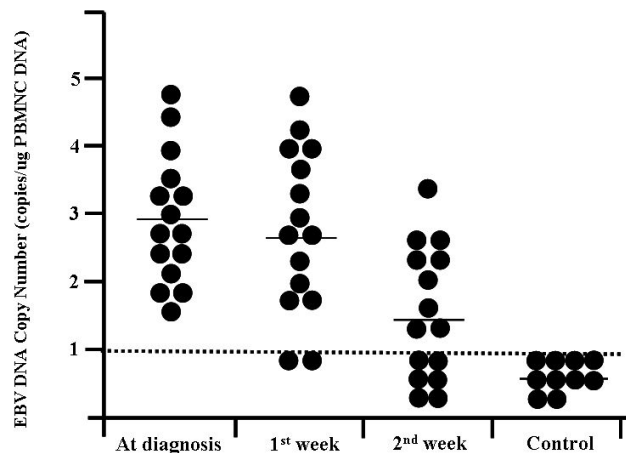


Fig. 2. Quantification of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by real-time polymerase chain reaction (PCR). DNA was extracted from the peripheral blood mononuclear cells of patients with symptomatic EBV infections or controls without EBV-related diseases. For the real-time PCR, 250 ng of DNA was used, and the EBV DNA copy numbers per μg of DNA are shown. Bars indicate the means of each group, and the dotted line indicates the detection limit of the assay.

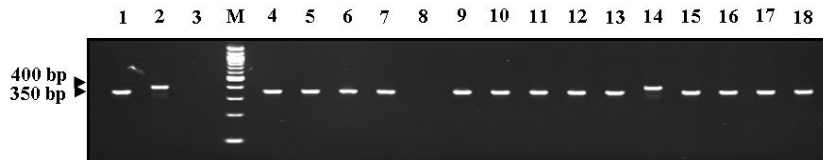


Fig. 1. The results of Epstein-Barr virus (EBV) typing of the DNA extracted from the peripheral blood mononuclear cells of the children with infectious mononucleosis. Lane 1: EBV-infected Raji cell: type A-positive control 2: EBV-infected Jijoye cell: type B-positive control 3: K-562 cell: negative control M: molecular weight marker 4-7, 9-13, and 15-18: patient cases: type A-positive results 8: patient case: negative result: 14: patient case: type B-positive result.

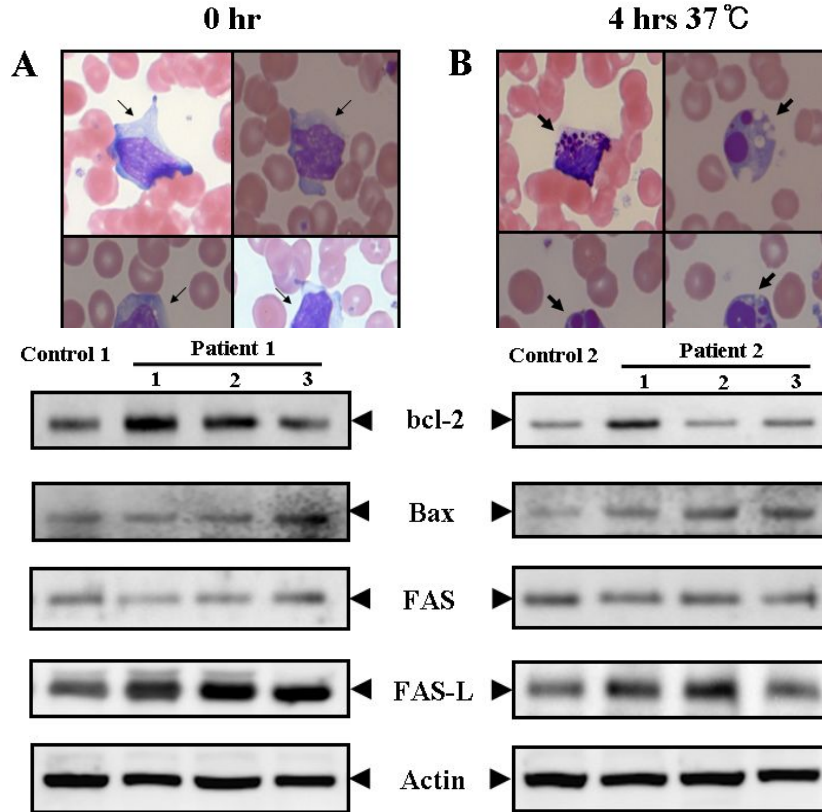


Fig. 4. Change in the expression of apoptosis-related proteins in the patients with infectious mononucleosis. Protein was extracted from sequential peripheral blood mononuclear cells obtained from pediatric patients with symptomatic infectious mononucleosis at the time of diagnosis (lane 1) and at 1 (lane 2) and 3 weeks (lane 3) after the diagnosis or from controls without Epstein-Barr virus (EBV)-related diseases. Expression profiles of Bcl-2, Bax, Fas, and FasL were analyzed by western blot analysis using specific antibodies. To ensure equal levels of protein, the same blot was used for immunoblotting with anti-actin antibody.

었다¹³⁾. EBV는 herpes DNA 바이러스 중 감마 헤르페스 바이러스로 선형의 이중쇄(linear double-stranded)로 172 kilobase pair DNA를 포함하는 핵소체를 직경 100-110 nm의 핵막이 싸고, 이를 다시 직경 150-220 nm의 외피가 싸고 있으며, A형과 B형의 감염형으로 세분 된다¹⁴⁾. EBV의 감염형은 지역적으로 많은 차이를 보여 A형은 유럽, 아메리카, 중국 및 일본을 포함한 동아시아 지역에서 주된 감염형으로 알려져 있고, B형은 아프리카, 파푸아 뉴기니아 지역에서 많이 분리되는 것으로 알려져 있다³⁾. EBV 감염의 역학적 특성이 한국과 매우 비슷한 일본의 경우에는 A형이 약 90% 정도로 우세하여 주된 감염형으로 확인되었으며, 혼합 감염형도 없는 것이 특징이다¹⁵⁾. 본 연구의 대상 환자 15명 중에서 A형은 13명(86.7%)으로 일본의 연구 결과¹⁵⁾와 Han 등³⁾의 국내 연구 결과와 유사하였다.

EBV는 인체 내에 침투하여 구강의 상피세포에서 증식하며 이차적으로 말초 혈액이나 세망내피계에서 선택적 B 림프구에 침투하여 증식한 후 발병에 관여하며, 증식 감염이 끝난 다음에는 잠복상태로 영구히 인체내에 상주한다. 특히 초감염 후 18개월까

지 구강인두를 통하여 배출된다. EBV 혈청 항체 양성인 정상 성인의 타액에서 약 20% 정도로 배출되고 면역 억제된 상태에서는 50% 이상 배출되며, 소아에서는 이보다 낮은 비율로 배출된다³⁾. EBV는 주로 타액으로 감염되지만 드물게는 수혈로 감염된다

잠복기 후 EBV에 감염된 B 세포는 순환하는 B 세포의 10-20%까지 증가하게 되고, 증식된 B 세포는 첫 2주 이내에 자연 살해(natural killer cell, NK) 세포, IFN- γ , 활성화된 CD8 T 세포, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)와 같은 활발한 세포 반응에 의하여 빠르게 억제 된다⁴⁾. 특히 NK 세포는 감염된 B 세포를 제거하여 바이러스 증식이나 전파를 감소시키므로 EBV 초기 감염을 조절하는 중요한 역할을 하며 NK 세포의 반응의 정도가 EBV 초기 감염의 임상적 결과를 결정한다¹⁶⁾. 또한 형태학적으로 비정형 림프구로 알려진 활성화된 CD8 T 세포는 전염성 단핵구증의 모든 임상 증상을 보이는 급성기에 말초 단핵구의 약 60% 이상으로 출현 한다¹⁷⁾.

감염의 급성기에 CD8 T suppressor 세포가 증가하여 T4/T8 (helper/suppressor) 림프구의 비가 낮거나 역전된다. 본 연

구에서도 대조군에 비하여 환아군에서는 CD4 T helper 세포수가 약간 증가하는 것에 비하여 CD8 T suppressor 세포수가 현저히 증가하여 인하여 T4/T8 림프구의 비가 역전을 보였다.

사이토카인은 전염성 단핵구증의 병태생리학의 중요한 역할을 담당 한다¹⁸⁾. 여러가지 사이토카인이 EBV 감염된 B 세포뿐만 아니라 CD4 T 세포, 자연살해세포, 대식세포, 단핵구, 호중구 등 다른 면역 세포에서도 분비되지만 주된 분비 양상은 활성화된 CD8 T 세포의 증폭에 의존한다. EBV에 감염되면 T 세포 혹은 대식세포로부터 유래된 사이토카인인 IL-2, IFN- γ , IL-12와 IL-6가 정상인에 비하여 유의하게 증가하였다가 회복기에 감소한다¹⁹⁾. B 세포에서는 lymphotoxin, TNF α , 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)을 분비하며, 감염 24시간 내에 NK 세포나 B 세포에서 IFN- α 가 분비되며, 감염 8일 후에 IL-1, IL-2의 존재 하에서 T 세포로부터 IFN- γ 가 최대로 분비 된다¹⁸⁾. 또한 호중구, 단핵구와 상호관련이 있어 EBV가 단핵구의 표면에 결합하여 IL-6 발현은 증가, TNF α 의 발현은 감소시키며, IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra)의 생산을 도와 호중구의 IL-1 평형을 조절하며, 동시에 호중구의 세포자멸사를 유도 한다²⁰⁾. EBV의 결합효과는 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)에 의해 IL-8, macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) 생성이 더 증가 된다²¹⁾. 본 연구에서는 IL-2, IL-6, IFN- γ 가 급성기에 의미있게 증가하다가 회복기에 감소되는 경향을 보여 이전 보고의 결과와 비슷하였으나 TNF- α 농도는 이전의 다른 연구의 결과와 다르게 환자와 대조군에서 별다른 차이를 보이지 않았다. 위와 같이 전염성 단핵구증의 급성 감염동안 사이토카인의 변화 양상이 증상의 범위 정도를 아직 설명할 수 없어 보다 더 많은 연구 결과를 지켜봐야 할 것으로 생각된다.

Fisher 등²²⁾은 27명의 전염성 단핵구증 환자의 88.9%에서 80명의 정상인(3.75%)에 비하여 말초혈액 도말검사서 쉽게 apoptotic 림프구를 발견할 수 있어 말초혈액 도말검사서 apoptotic 림프구의 발견이 전염성 단핵구증의 진단 단서가 될 수 있다고 하였으며 Taga 등⁶⁾의 연구에서는 전염성 단핵구증 환자에서 채취한 말초혈액 도말표본에서 총 백혈구 중에서 비전형 림프구는 12.3 \pm 4%, 세포자멸사중인 세포는 0.0 \pm 0.1%를 보이고 있으나 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양 후 말초혈액도말표본에서는 비전형 림프구는 10.3 \pm 4.1%, 세포자멸사중인 세포는 9.0 \pm 4.2%를 보였다. 환자와 다르게 정상인에서는 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양 후 말초혈액도말표본에서는 림프구의 세포자멸사가 0.9 \pm 0.5%로 거의 일어나지 않았다. 이는 전염성 단핵구증의 환자에서는 37 $^{\circ}$ C에 배양하는 동안 림프구의 감소와 함께 림프구의 세포자멸사가 증가하였다는 증거이다.

전염성 단핵구증에서는 말초 혈액내의 T 세포의 역할이 중요한데, 활성화된 T 세포의 대량 증식과 말초혈액내의 T 세포의 세포자멸사의 감수성이 증가하였다는 보고들이 이를 뒷받침 한다⁵⁾. 실제로 전염성단핵구증의 T 세포는 림프 조직 내에 존재하는

동안 세포자멸사에 의해 많은 수가 제거되는데 이러한 소견들은 전염성단핵구증 T 세포가 생체 밖에서 단기간 배양되면 세포자멸사에 매우 민감해 지며, 전염성단핵구증 환자의 말초혈액에서 T 세포의 세포자멸사가 일어난다는 보고와 일치 한다²³⁾.

전염성단핵구증 환자의 편도 림프조직에서 관찰되는 세포자멸사하는 T 세포 보다는 말초혈액 내에서 세포자멸사하는 T 세포의 검출은 낮았지만, 이는 림프조직 내에서 주요 T 세포 제거가 일어나며 림프조직을 떠나 살아있는 T 세포는 말초 혈액 내에 순환하다 세포자멸사가 일어나는 것으로 추정할 수 있다⁵⁾. 이렇게 확장된 T 세포 개체에서 세포자멸사가 많이 일어나는 것과 일치하여 세포자멸사를 억제하는 Bcl-2는 감소하고 세포자멸사를 유도하는 FasL는 현저히 증가하였다. 그러나 Bax와 Fas의 발현의 증가는 보이지 않았다. 본 연구에서도 세포자멸사를 억제하는 Bcl-2는 처음에는 증가하였다가 점차 회복되는 과정에서 시간의 의존적으로 현저히 감소하며 세포자멸사를 유도하는 Bax는 Bcl-2의 발현과는 다르게 거의 변화를 보이지 않다가 회복기에 약간 증가하는 경향을 보인다. 반면 세포자멸사를 유도하는 Fas의 발현은 거의 변화가 없으나 FasL는 발병 1주 후에 현저히 증가하고 회복기에 감소하는 경향을 보여 Verbeke 등⁵⁾의 결과와 비슷하였다. 결론적으로 전염성단핵구증 T 세포의 대량 확장은 EBV의 T 세포에 대한 직접 감염에 의한 것이 아니고, 단지 격렬한 면역반응에 의한다는 가능성을 시사하고 있다. Bcl-2/Bax와 Fas/FasL의 발현의 변화를 통하여 활성화된 T 세포는 림프조직에 존재하는 동안에 세포자멸사가 증가하며 이는 결국 강력한 손상을 일으키는 T 세포반응을 억제하게 된다⁵⁾.

전염성 단핵구증의 임상 증상은 어린 소아에서는 대개 무증상이거나 경한 상기도 감염, 인두편도염, 림프절염, 지속되는 열성 질환 등과 같은 경한 비 특이적 증상으로 나타나지만 청소년기 소아는 2-7주의 잠복기 후에 권태감, 식욕부진, 오한 등 전구증상이 2-5일간 선행되고, 발열, 인두통, 피로, 무력감을 동반한 인두편도염, 림프절 종대 등 보다 전형적인 증상을 나타낸다. 1-2주 지속되는 고열과 수 주 내지 수개월간 지속되는 미열 및 피로감이 나타나기도 한다. 림프절 종대는 대개 동통이 없으며, 주로 경부 림프절을 침범하나 전 림프절에도 나타난다. 인두통은 30% 이상에서 나타나며 인두편도염은 흰색의 삼출성 분비물을 보이고 막이 끼이기도 한다. 때로는 연구개에 점막진(enanthem) 및 점상 출혈을 보인다. 발병 3주에 많이 나타나는 비종대는 50%, 간종대는 30-50%에서 볼 수 있다. 그러나 연령이 어릴수록 간비종대나 림프절 종대의 증상은 잘 나타나지 않는다²⁴⁾. 약 5% 이하에서 점상구진상 발진이 나타나며 특히 ampicillin 혹은 amoxicillin이 함유된 항생제를 처음 투여 후 7-10일에서 사이에 90-100%에서 발진이 일어난다. 그 외에도 두통, 안구주위의 부종, 황달 등도 나타난다²⁵⁾. 본 연구 결과에서도 인두통, 무기력과 권태감, 경한 상기도염 증상, 두통, 구토, 호흡곤란 등의 임상 증상이 나타났으며, 이학적 소견 상 전례에서 급성 인두염 또는 편도염 소견이 발현되었고 이중 80%에서는 회백색의 막성 삼출물

이, 87%에서 경부 림프절 종대가 동반되었고, 이외에도 간 비종대, 피부 발진, 황달 등도 관찰되었다.

위와 같은 여러 가지 임상 증상은 3가지 구성요소로 발생하는 것으로 알려져 있다. 첫째, 구강인두(oropharynx)에서 복제되는 바이러스에 의해 매개되는 세포 손상에 의한 증상, 둘째, B 세포 내에서 잠복 감염된 바이러스에 의한 B세포 림프세포 증식과 사이토카인 발현에 의한 증상, 셋째, 현저한 면역 반응에 의한 2차적인 면역병리학적 반응에 의한 증상이다. 이들 중의 대부분의 임상 증상은 면역병리학적 반응에 의한 것으로 생각되며²⁶⁾ 임상 증상의 중등도는 EBV에 대한 숙주면역반응, 즉 T 세포의 활성화와 사이토카인 생성의 정도에 깊은 관련이 있다¹⁹⁾.

전염성 단핵구증의 검사실 진단은 환자의 약 75%에서 말초혈액 도말검사에서 절대 림프구 증가(림프구 50% 이상, 절대 림프구 수 $>5,000/\text{mm}^3$), 비정형 림프구 증가(전체 백혈구의 10% 이상)와 이종 항체 검사 양성이면 가능하다²⁷⁾. 이종 항체검사는 청소년기와 어린 환자에서는 85% 양성을 보이거나 어린 소아에서는 이종항체반응이 잘 일어나지 않는다²⁸⁾. 그러나 이종접합 항체가 증명되지 않더라도 EBV 혈청 항체 검사법으로 쉽게 전염성 단핵구증 진단이 가능하다. EBV VCA에 대한 IgM 항체는 더 특이적이고 예민한 검사방법으로 급성기에 증가하여 1-2개월 정도 지속되다 소실되나 IgG 항체는 평생 지속된다. EA 항체는 감염 초기에 나타나 3-6개월 사이에 소실되며, EBNA 항체는 증상 발현 후 2-4주까지는 나타나지 않다가 회복기에 증가하여 거의 평생 지속된다. 그 외 진단 방법으로 EBV 단백 항원에 대한 단일 항체 측정법, ELISA에 의한 EBV DNA 측정법, 중합효소연쇄반응이 있다¹⁾.

중합효소연쇄반응은 배양이 불가능한 어떤 면역상태라도 무관하게 바이러스라도 검출이 가능하여 배양보다 더 높은 민감도로 단시간 내에 결과를 얻을 수 있다. 또한 적은 양의 어떠한 검체라도 DNA만 존재하면 증폭이 가능하며, 감염된 바이러스 양을 정량화 할 수 있다. 이상의 유용성으로 최근에는 민감도가 가장 높은 중합효소연쇄반응으로 EBV DNA나 EBV-encoded RNA를 측정하는데 많이 이용되고 있다²⁹⁾. Kimura 등³⁰⁾은 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용하여 EBV 감염 질환에서 EBV 부하량을 정량적으로 분석하여 말초혈액 단핵구의 DNA 1 μg 에서 $10^{2.5}$ copies를 증상이 있는 EBV 감염의 진단 조건으로 잡으면 특이성이 매우 높아(양성 예측치 93%) 이 방법이 EBV 감염의 진단과 바이러스 부하량을 모니터링 하는데 매우 예민하고 특이적인 방법으로 보고하였다. 일반적으로 증상 발현 1주 후 정량적 실시간 중합효소연쇄반응법에 의하여 말초혈액 단핵구에서 EBV-DNA의 10^{3-4} copies 정도가 검출이 되어³⁰⁾ 가장 많은 바이러스 DNA copies수를 보이며 환자가 회복되는 발병 15일째에서 약 50%에서 거의 정상에 가깝도록 감소하는 경향을 보이거나, 증상이 심하거나 계속되는 증상이 남으면 장기간동안 증가되어 있다고 보고하였다³¹⁾. 본 연구에서도 전염성 단핵구증 환자의 말초혈액의 단핵구내의 EBV DNA의 평균 부하량은 대조군에 비해 의의

있게 증가하였으며 발병 3주째에는 내원당시에 비하여 현저히 감소하여 다른 연구와 비슷한 결과를 나타내었다.

전염성 단핵구증의 특이적인 치료는 없으나 심한 인두 종창, 급성 기도 폐쇄에 의한 호흡곤란, 복통, 용혈성 빈혈, 혈소판 감소증, 신경학적 후유증을 보이는 경우 등에 스테로이드를 투여하면 증상이 완화될 수 있다. 일부 연구에서는 스테로이드는 고열과 편도인두염 증상을 빨리 호전되게 하나 림프절 종대나 간비종대에는 별 효과가 없다고 하였으며¹⁾, 또 다른 연구자들은 뇌염, 심근염의 발생 가능성 및 EBV에 대한 장기 면역의 역영향 때문에 스테로이드 사용에 대하여 경고하고 있다³²⁾. 최근 항바이러스 약물치료가 시도되고 있으나 확실한 약제는 없다³³⁾. 비경구 혹은 고용량의 경우 acyclovir는 인두에서 분비되는 바이러스를 감소시킬 수 있으나³⁴⁾, 잠복된 EBV를 없앨 수 없어 궁극적인 치료효과는 기대할 수 없으며 특히 합병증이 없는 급성 전염성 단핵구증에는 임상적 효과가 없다는 견해도 있다³⁵⁾. 스테로이드와 병용 투여 시 더 효과적이라는 보고도 있지만 acyclovir의 개별 효과인지는 상세하게 묘사되지 않아³²⁾ 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 대부분의 경우에는 후유증이 없이 회복되지만 드물게는 합병증이 나타나기도 한다. 혈액학적 합병증으로는 자가면역성 용혈성 빈혈이 오지만 1-2개월 후에 약 95%에서 회복이 되며, 혈소판이나 과립구의 감소는 3-6주 후에 회복이 된다. 신경학적 후유증으로는 뇌신경 마비와 뇌염으로 환자의 1%에서 발생하며, 증상이 심하여도 약 85%에서 자발적으로 회복된다. 환자의 80%에서 간 효소치의 상승을 보이는 무증상의 간염을 보이거나 사망을 초래하는 전격성 간 기능 부전을 초래할 수 있다¹⁾.

결론적으로, 소아뿐만 아니라 성인을 포함한 더 많은 대상 수를 통하여 국내 급성 전염성 단핵구증 환자에서 주된 EBV 감염형의 분포를 확인하고 이러한 다양한 증상의 차이, 그들과의 상관관계를 파악하여 치명적인 합병증에 대한 예측과 이에 대한 대책에 대한 자세한 정보를 얻어야 하며 아울러 국내 급성 전염성 단핵구증 환자에 대한 분자 생물학적 관점에서의 병인 및 분자학적 치료에 접근할 수 있는 기회가 되도록 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

목적: 소아 전염성 단핵구증 환자의 임상적 특성과 EBV 감염과 관련된 사이토카인과 세포자멸사 연관 유전자의 발현에 대해 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

방법: 2006년 3월부터 2007년 2월까지 전북대학교병원에 입원한 전형적인 임상 증상을 보이면서 혈청학적 검사로 전염성 단핵구증으로 확진된 15명을 대상으로 임상적 특성을 조사하고, 진단 당시, 발병 1주 후, 3주 후에 각각 말초혈액에서의 T세포 세군, 사이토카인, EBV DNA, 세포자멸사 연관 유전자 발현을 측정하여 건강한 대조군 10명과 비교하였다.

결과: 환자의 평균 연령은 5.7 ± 3.4 세(3-9세)였으며, 남녀비

는 1.5:1이었다. 발열(100%)과 인두통(73%), 무기력과 권태감(53%)이 흔한 임상 증상이었고, 인두염 및 편도염(100%), 경부 림프절 비대(87%)와 간비종대(53%)가 흔하게 나타났다. 환자의 말초혈액에서 CD3+ T세포와 CD8+ suppressor T세포, CD56+ NK세포가 대조군에 비하여 증가하였다($P<0.01$). 환자의 혈청 IL-2, 6, INF- γ 가 증상 초기에 대조군에 비하여 증가하였다($P<0.01$). 환자의 말초혈액 단핵구내 EBV DNA 양은 평균 $10^{2.38}$ copies/ μ g이었으며 진단 당시 최고치를 보이다가 회복기에는 정상화되는 양상이었다. 환자의 말초혈액 단핵구의 세포자멸사 연관 유전자 발현은 Bcl-2는 증상 초기에 증가하다가 감소하였고 Bax는 회복기에 약간 증가하였으며, Fas는 거의 변화가 없었으나 FasL은 발병 1주 후에 현저히 증가하였다가 회복기에 감소하였다.

결론: 본 연구를 통해 급성 전염성 단핵구증 소아 환자에서 다양한 임상 증상과 말초혈액에서 T세포 세군의 변화 및 세포자멸사 연관 유전자 발현의 변화를 확인하였다. 앞으로 분자 생물학적 관점에서의 병인 및 치료 방법에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

- 1) Peter J, Ray CG. Infectious mononucleosis. *Pediatr Rev* 1998; 19:276-9.
- 2) Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in human. *Int J Hemtol* 2000;71:108-17.
- 3) Hahn SH, Shin WS, Han H, Kang JH. A study of Epstein Barr virus, and human leukocyte antigen typing in children with acute infectious mononucleosis. *Korean J Pediatr* 2003; 46:467-73.
- 4) Rickison AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte response to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 1997;15:405-31.
- 5) Verbeke CS, Wenhe U, Bergler WF, Zentgraf H. Characterization of the expanded T cell population in infectious mononucleosis: apoptosis, expression of apoptosis-related genes, and Epstein-Barr virus (EBV) status. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:294-300.
- 6) Taga K, Yoshida M, Kaneko M, Asada M, Okada M, Taniho M, et al. Contribution of automated hematology analysis to the detection of apoptosis in peripheral blood lymphocytes. *Cytometry* 2000;42:209-14.
- 7) Hwang DJ, Yang JW, Kim SY, Yi HK, Lee DY, Hwang PH. Diagnostic approach of Wiskott-Aldrich syndrome. *Korean J Pediatr* 2004;47:726-34.
- 8) Kerr JF, Gobé GC, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 1995;46:1-27.
- 9) Bulgarelli R, Moscatelli P. Infectious mononucleosis and its classification as compared with various acute benign lymphadenopathies with mononucleosis and Pfeiffer's glandular fever. *Minerva Pediatr* 1968;20:2445-79.
- 10) Sprunt ThP, Evans FA. Mononuclear leukocytosis in reaction to acute infections (infectious mononucleosis). *Bull John Hop-*

- kins Hosp 1920;31:410-7.
- 11) Downey H, McKinlay CA. Acute lymphadenosis compared with acute lymphatic leukemia. *Arch Intern Med* 1923;32: 82-112.
- 12) Henle G, Henle W. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* 1966;91:1248-56.
- 13) Evans AS, Niederman JC, McCollum RW. Seroepidemiological studies of infectious mononucleosis with EB virus. *N Engl J Med* 1968;279:1121-7.
- 14) Rickinson AB, Kieff EE. Epstein-Barr virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:2397-46.
- 15) Oshima M, Azuma H, Okuno A. High prevalence of Epstein Barr virus type A strain with the 30 bp deletion of latent membrane protein-1 gene in a Japanese population. *Acta Pediatr Int* 1999;41:490-5.
- 16) Williams H, McAulay K, Macsween KF, Gallacher NJ, Higgins CD, Harrison N, et al. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol* 2005;129:266-74.
- 17) Khanna R, Burrows SR. Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein/Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:19-48.
- 18) Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;44:203-15.
- 19) Hornef MW, Wagner HJ, Kruse A, Kirchner H. Cytokine production in a whole-blood assay after Epstein-Barr virus infection in vivo. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:209-13.
- 20) Larochelle B, Flamand L, Gourde P, Beauchamp D, Gosselin J. Epstein/Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood* 1998;92:291-9.
- 21) Roberge CJ, McColl SR, Larochelle B, Gosselin J. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhances EBV-induced synthesis of chemotactic factors in human neutrophils. *J Immunol* 1998;160:2442-8.
- 22) Fisher MS Jr, Guerra CG, Hickman JR, Hensley RE, Doe RH, Dunn CD, et al. Peripheral blood lymphocyte apoptosis: a clue to the diagnosis of acute infectious mononucleosis. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:951-5.
- 23) Uehara T, Miyawaki T, Ohta K, Tamaru Y, Yokoi T, Nakamura S, et al. Apoptotic cell death of primed CD45RO+ T lymphocytes in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *Blood* 1992;80:452-8.
- 24) Sumaya CV, Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. Clinical and general laboratory findings. *Pediatrics* 1985;75:1003-10.
- 25) Moon WY, Oh SH, Ko TS, Park YS, Moon HN, Hong CY, et al. Infectious mononucleosis in children. *Korean J Pediatrics* 1994;37:822-31.
- 26) Vetsika EK, Callan M. Infectious mononucleosis and Epstein Barr virus. *Expert Rev Mol Med* 2004;6:1-16.
- 27) Paul JR, Bunnell WW. The presence of heterophile antibody in infectious mononucleosis. *Am J Med Sci* 1932;183:91-104.
- 28) Fleisher GR, Collins M, Fager S. Limitations of available tests for diagnosis of infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol* 1983;17:619-24.
- 29) Meerbach A, Gruhn B, Egerer R, Reischl U, Zintl F, Wutzler

- P. Semiquantitative PCR analysis of Epstein-Barr virus DNA in clinical samples of patients with EBV-associated diseases. *J Med Virol* 2001;65:348-57.
- 30) Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:132-6.
- 31) Bai X, Hosler G, Rogers BB, Dawson DB, Scheuermann RH. Quantitative polymerase chain reaction for human herpesvirus diagnosis and measurement of Epstein-Barr virus burden in posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clin Chem* 1997;43:1843-9.
- 32) Tynell E, Aurelius E, Brandell A, Julander I, Wood M, Yao QY, et al. Acyclovir and prednisolone treatment of acute infectious mononucleosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis* 1996;174:324-31.
- 33) Torre D, Tambini R. Acyclovir for treatment of infectious mononucleosis: a meta-analysis. *Scand J Infect Dis* 1999;31:543-7.
- 34) Speck P, Haan KM, Longnecker R. Epstein-Barr virus entry into cells. *Virology* 2000;277:1-5.
- 35) Chodosh J, Gan Y, Holder VP, Sixbey JW. Patterned entry and egress by Epstein-Barr virus in polarized CR2-positive epithelial cells. *Virology* 2000;226:387-96.