

# Expression and Clinical Relevance of Intracellular MxA Protein in Childhood Infectious Disease

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9295">http://hdl.handle.net/2297/9295</a>

# 正 誤 表

金沢大学十全医学会雑誌 第106巻 第2号 204-213 (1997)

## 小児期感染症におけるリンパ球内 MxA 蛋白発現と その臨床的意義に関する検討

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 小泉晶一教授)  
齋 藤 友 治

209頁 Table 1.

Table 1. Patterns of inflammatory protein expression in febrile illnesses

Febrile illnesses	Expression of				
	CRP	IL-6	IFN- $\alpha$	2-5 AS	MxA
Normal control	-	-	-	-	-
Viral infection	±	+	-~+	#	
Infectious mononucleosis	-	-	-~+	#	±
Bacterial infection	#	#	-	+~#	±
Mycoplasma infection	+	#	-~+	+~#	±
MCLS	#	#	-	+	-

Patterns of expressions of various inflammatory proteins are summarized. #, very strong; #, strong; +, moderate; ±, weak; and -, negative.

Table 1. Patterns of inflammatory protein expression in febrile illnesses

Febrile illnesses	Expression of				
	CRP	IL-6	IFN- $\alpha$	2-5 AS	MxA
Normal control	-	-	-	-	-
Viral infection	±	+	-~+	#	#
Infectious mononucleosis	-	-	-~+	#	±
Bacterial infection	#	#	-	+~#	±
Mycoplasma infection	+	#	-~+	+~#	±
MCLS	#	#	-	+	-

Patterns of expressions of various inflammatory proteins are summarized. #, very strong; #, strong; +, moderate; ±, weak; and -, negative.

正

正



## 小児期感染症におけるリンパ球内 MxA 蛋白発現と その臨床的意義に関する検討

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 小泉晶一教授)

齋 藤 友 治

急性感染症は小児期における主要な疾患群であり、その原因検索を速やかに行なうことは極めて重要である。早期に適切な治療を開始するためには、細菌感染症とウイルス感染症を的確に鑑別することが必要となるが、これらを明確に区別することが困難なことがしばしばある。最近、ウイルス感染の特異的指標としてインターフェロン (interferon, IFN) - $\alpha$  ならびにそれにより誘導される蛋白が注目されている。なかでも MxA はウイルス増殖を制御することにより感染抵抗性を高める作用があるとされており、また IFN- $\alpha$  により特異的にその産生が誘導され、半減期も長いことが知られている。さらに、MxA 蛋白は細胞質内に多量にかつ急速に産生が誘導されるため、個々の細胞レベルでの蛋白産生を定量的に評価することが可能となる。本研究では、小児期における種々の発熱性疾患において末梢血単核細胞 (mononuclear cell, MNC) の MxA 産生を、フローサイトメトリー法を用いて比較検討した。試験管内で MNC を IFN- $\alpha$  により刺激すると、速やかに MxA 産生が誘導されたが、IFN- $\gamma$  刺激ではこのような MxA 産生誘導は観察されなかった。同様に、C 型肝炎患児に IFN- $\alpha$  を投与すると、急速に末梢血 MNC の MxA 産生が誘導された。正常対照の未刺激末梢血 MNC では MxA は全く産生されていなかった。細菌感染症患児の MNC では極くわずかの MxA 産生が認められた。これに対して、急性期突発性発疹症患児では極めて強い MxA 発現が観察された。他のウイルス疾患でも有意に高い MxA 産生が認められた。伝染性単核症で増加しているリンパ球のほとんどは MxA 産生を認めなかったが、単球、ならびに極く一部のリンパ球では明かに MxA 産生が観察された。血清中 IFN- $\alpha$  濃度は明らかなウイルス感染症急性期であっても低値を示したり、全く検出されないなど、一定の傾向を示さなかった。血清 2-5 A 合成酵素 (2',5' oligoadenylate synthetase, 2-5 AS) 値はウイルス感染症のすべてで上昇していたが、細菌感染症でも有意に高値を示した。原因不明の急性熱性疾患として知られる川崎病急性期では、末梢血 MNC の MxA 産生は常に低値を示し、細菌感染症と同様の傾向を示した。以上の結果より、MxA 蛋白が IFN- $\alpha$  による細胞刺激の鋭敏な指標となること、さらに末梢血 MNC による MxA 産生をフローサイトメトリー法により解析することが、小児期急性熱性疾患の病態形成に果たす IFN- $\alpha$  の役割を評価する有用な手段となることが示された。また、複数パラメーターを用いたフローサイトメトリー法を駆使することにより、特定のウイルス感染症に対する白血球亜集団の反応性の違いを、経時的に解析することが可能であると考えられた。最後に、MxA 産生の解析により原因不明の種々の炎症性疾患における IFN- $\alpha$  の関与を検討することも有用であることが示唆された。

**Key words** interferon- $\alpha$ , MxA, flow cytometry, infectious disease

乳幼児期ならびに小児期においては、急性感染症の頻度が極めて高く、この時期の主要な疾患となっている。したがって、感染症を示唆する症状を認めたときこれを的確に診断し、適切に治療することが重要となる。しかし、乳幼児期感染症は発熱や軽度の上気道症状のみで始まることが多く、その原因も多岐に亘るためしばしば診断に苦慮する。特に、この時期にはウイルス感染症と細菌感染症の鑑別が重要であり、抗生物質の投与の是非や経過観察、管理方針の決定に際して、末梢血白血球数や赤血球沈降速度、C 反応性蛋白 (C-reactive protein, CRP) などの従来の臨床検査データや臨床症状のみでは判断が困難な症

例にしばしば遭遇する<sup>1) 3)</sup>。さらに、乳幼児期における発熱性疾患はその多くは自然治癒傾向の強いウイルス感染症によるものであるが、時には髄膜炎や敗血症などの重症感染症の初期例や尿路感染症などと紛らわしく、よりきめ細かい臨床診断の指標が求められている。また、EB ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) の感染を契機として発症する慢性活動性 EBV 感染症やウイルス関連血球貪食症候群など、個体の免疫応答やウイルス感染様式の特異性に起因して発症する疾患も知られており、これらの疾患の病態形成におけるウイルス感染の関与を客観的に評価する適切な指標も乏しかった。

平成8年12月18日受付、平成9年2月4日受理

Abbreviations : APAAP, alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase; CRP, C-reactive protein; CVID, common variable immunodeficiency; EBV, Epstein-Barr virus; FITC, fluorescein isothiocyanate; IFN, interferon; IL-6, interleukin-6; MFI, mean fluorescence intensity; MNC, mononuclear cell; 2-5 AS, 2',5'-oligoadenylate

ウイルス感染症急性期の血清診断には従来よりインターフェロン (interferon, IFN) - $\alpha$  の定量が用いられているが、血中半減期が短いため明らかなウイルス感染症においても上昇を認めないものも多く、必ずしも信頼できる指標とはなっていない<sup>9)</sup>。一方、MxA, 2-5 A合成酵素 (2', 5' oligoadenylate synthetase, 2-5 AS) など、IFN- $\alpha$  により誘導される種々の血清蛋白をウイルス感染の非特異的指標として用いることも検討されている<sup>7) 9)</sup>。なかでもMxAはIFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  などのI型IFNにより特異的に誘導され、また半減期も比較的長いため血中濃度の測定が有用であるとの報告を多く認めるようになった<sup>10) 11)</sup>。さらに最近、試験管内の検討ではあるが、このような細胞内MxA蛋白産生をフローサイトメトリーにより高感度で測定できることが報告されている<sup>12)</sup>。

本研究では、小児期感染症において末梢血リンパ球によるMxA蛋白産生をフローサイトメトリーにより測定、その臨床的意義を考察した。特に、代表的なウイルス感染症ならびに種々の急性発熱性疾患に関して、血清中IFN- $\alpha$ , 2-5 AS, インターロイキン6 (interleukin-6, IL-6) などの代表的な炎症反応の指標を同時に測定し、細胞内MxA発現と比較検討した。

#### 対象および方法

##### I. 対 象

対象は金沢大学医学部附属病院小児科外来を受診した患児とした。正常対象は定期健康診断などの際に貧血の精査の為に採血した乳幼児、あるいは低身長の子供の為に採血した小児 (計19名) とし、発熱、咳嗽、鼻汁などの気道感染を示唆する症状がなく、薬剤投与歴もないものとした。細菌感染症 (計14名) は、細菌性肺炎、細菌性髄膜炎、尿路感染症など、培養や臨床所見から細菌感染の証拠が明らかなものに限り、発熱のみの症例やウイルスとの混合感染が疑われる症例は除外した。ウイルス感染症 (計14名) は水痘、麻疹などの発疹性疾患や流行性耳下腺炎など、臨床症状からその診断が明らかなものを選び、検査所見から細菌の混合感染が疑われる症例は除外した。特に、突発性発疹症 (計14名) は典型的な発熱、発疹のエピソードを認める症例とし、白血球増加や強い炎症所見を有する症例は除外した。伝染性単核症 (計7名) はいずれも急性期の症例で、発熱、扁桃炎、頸部リンパ節腫大、肝脾腫等の典型的な臨床症状を示し、さらにリンパ球増加とリンパ球表面抗原検索によりリンパ球活性化を確認し、EBV関連抗体価が急性期のパターンを示す症例に限った。マイコプラズマ感染症 (計5名) は発熱、咳嗽、胸痛などの下気道感染の臨床症状を示し、かつ血清学的にマイコプラズマ抗体価の有意な上昇と血沈の亢進を示す症例を選択した。さらに川崎病 (計7名) は急性期の臨床症状を満たし、回復期に典型的な指趾末端の落屑を認めた症例とした。いずれも発熱を伴う急性期に採血し、解析した。C型肝炎患者のIFN- $\alpha$  療法開始にあたり、初回投与前、投与開始3, 6, 12, および24時間後に末梢静脈血をヘパリン加採血した。これらの検体の採取にあたっては、患者ないし保護者に説明をし承諾を得た後に施行した。

##### II. 末梢血単核細胞の分離ならびに培養

末梢血単核細胞 (mononuclear cell, MNC) はヘパリン加静脈

血よりフィコール・ハイパーク (Ficoll-Hypaque) 比重遠心法により単離した。単離したMNCはリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS, pH7.2) にて洗浄、10% 非働化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS), 25mM HEPES,  $2 \times 10^{-5}$  M 2-メルカプトエタノール, 0.3mg/ml グルタミン, 200U/ml ペニシリンG, 10mg/ml ゲンタマイシンを含むRPMI1640培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, USA) に再浮遊した。一部の実験では  $1 \times 10^6$ /ml に調整した細胞をポリプロピレン・チューブ (Falcon No. 2053, Becton Dickinson, Lincoln Park, USA) を用いて一定期間培養した。培養開始時に種々の濃度のIFN- $\alpha$  (シミフェロン, 住友製薬, 大阪) あるいはIFN- $\gamma$  (イミノマックス- $\gamma$ , シオノギ製薬, 大阪) を添加した。

##### III. フローサイトメトリーによる細胞質内MxAの解析

分離MNCないし培養後PBSにて2回洗浄したMNCはポリプロピレン・チューブ中に再浮遊し、500 G 3分間遠心した。細胞ペレットにPBSに溶解した4%パラホルムアルデヒドを1ml添加し、室温にて15分間固定した。固定した細胞はPBSにて2回、500 G 3分間遠心し洗浄した。細胞ペレットにさらに0.1% ウシ血清アルブミンおよび0.1% トリトンX-100を添加したトリス緩衝液pH 7.2を1ml加え、室温に5分間放置、細胞膜を浸透化した。1% FCS, 0.1% アジ化ナトリウムを添加したPBS (洗浄液) にて2回洗浄、トリス緩衝液100mlに再浮遊した。固定、ならびに浸透化した細胞浮遊液にコントロール抗体あるいは抗MxA単クローン抗体 (KM1135, 協和メディックス, 東京) を2.5 mg/mlの最終濃度で添加し氷中にて20分間反応させた。洗浄液にて2回洗浄の後、1000倍に希釈したフルオレッセン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗マウス抗体 (Zymed, San Francisco, USA) を添加し氷中さらに20分間反応させた。洗浄液にて2回洗浄の後、再浮遊しフローサイトメーター (Cytoron Absolute, Ortho Diagnostic System, 東京) にて解析した。抗MxA抗体により得られた平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) とコントロール抗体により得られたMFIの差を $\Delta$  MFIとして算出した。

##### IV. ウェスタンブロット法によるMxA蛋白の同定

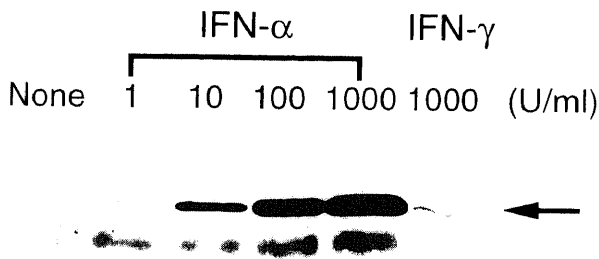
患者および正常コントロール末梢血より分離したMNC  $1 \times 10^6$ 個を10mlの1%トリトンX100, 10mM トリス (pH 8.0), 50 mM 塩化ナトリウム, 5mM エチレンジアミン四酢酸, 30mM リン酸第二水素ナトリウム, 100mM オルソ酸ナトリウム, 50 mM フッカナトリウム, 1mg/ml ロイペプチン, 1mg/ml アプロチニン, 1mM フェニルメチルスルフォニルフッ素を含む細胞溶解液で4 $^{\circ}$ C, 30分処理後、15,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30分にて遠心、可溶性分画と上清を得た。以下のウェスタンブロット法に使用するまで検体は-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。可溶性分画と上清は同量のLaemmli緩衝液と混和、3分間煮沸し、10% ドデシル酸ナトリウム (Sigma Chemical, St Louis, USA) -ポリアクリルアミド (polyacrylamide, Sigma Chemical) ゲルにて電気泳動した後、ニトロセルロース膜 (Hybond-ECL, Amersham, Amersham, UK) に垂直型転写装置 (HOLIZBLOT; アトー, 東京) にて転写した。ニトロセルロース膜はPBSにて洗浄し、非特異的結合部位を阻害するため5% スキムミルク加PBSにて室温で1時間処理後、0.05% ツイーン20 (Tween 20, Sigma Chemical) 含有PBS (PBS

with Tween 20, PBS-T) にて 2mg/ml に希釈した抗 MxA 抗体と室温で 1 時間反応させた。PBS-T にて 5 分間ずつ 3 回洗浄後、PBS-T にて 1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識マウス IgG 抗体 (Zymed) と室温で 1 時間反応させ、PBS-T にて 10 分ずつ 3 回洗浄後、ECL ウェスタンブロッティング検出試薬 (Amersham) を用い、高感度ケミルミネッセンスフィルム (HYPERFILM-ECL, Amersham) 上に可視化した。

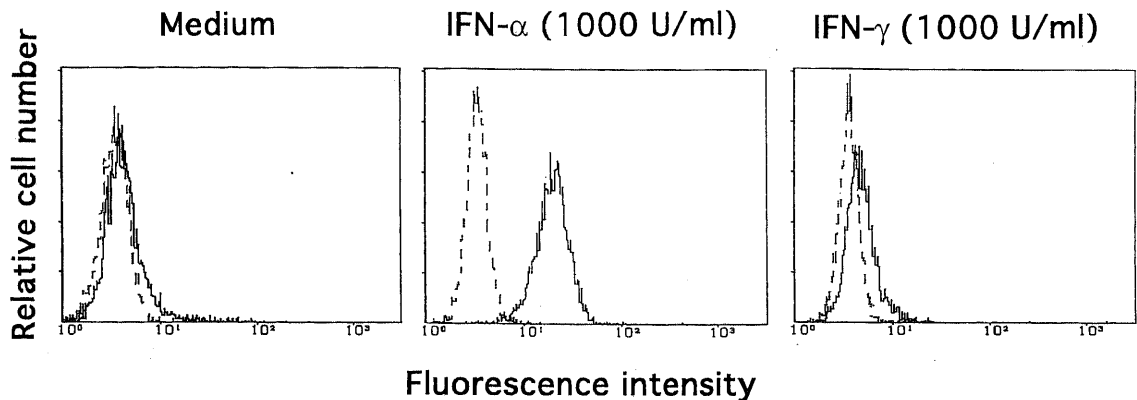
#### V. 酵素抗体法による MxA 蛋白の免疫染色

分離した MNC ないし培養後の細胞は、PBS にて洗浄後 3% FCS を添加した PBS に  $5 \times 10^5$ /ml の濃度にて再浮遊し、その再浮遊液 50ml を細胞遠心沈殿装置 (Cytospin 2, Shandon Southern Products, Cheshire, UK) を用いスライドグラス上に遠沈し (6 分間, 800 回転), 塗沫標本を作成した。標本は、ただちに冷風にて十分に風乾 (20~30 分間, 室温) した後、アルミホイルに密封し  $-20^\circ\text{C}$  にて凍結保存した。免疫染色施行時には、凍結保存した標本を冷風にて速やかに解冻および十分に風乾の後、冷アセトン ( $4^\circ\text{C}$ ) にて固定した。さらに冷風にて数分間風乾した標本をトリス緩衝生理食塩水 (tris-buffered saline, TBS, pH 7.2) にて洗浄後、25 倍希釈正常ウサギ血清 (Dako Co., Copenhagen, Denmark) で 30 分間ブロック、さらに 10 倍 (2 mg/ml) に希釈した抗 MxA 単クローン抗体 (KM1135) を加えて室温にて 60 分間反応させた。TBS にて洗浄後、ウサギ抗マウス免疫グロブリン (Dako) と室温にて 60 分間反応させた。TBS にて洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗アルカリフォスファターゼ抗体 (Alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase, APAAP (Dako) 試薬と 60 分間反応させた。さらに TBS にてよく洗浄の後、Fast red TR salt (Sigma Chemical) にて赤色に発色させ、最後にカラッチヘマトキシリン核染色液にて核染色を行なった。

A



B



#### VI. 血清中 IFN- $\alpha$ , IL-6, 2-5 AS の定量

血清中 IFN- $\alpha$  および IL-6 の測定は共に市販の ELISA キットを用いて行なった。IFN- $\alpha$  はヒト IFN- $\alpha$  測定キット (大塚製薬, 東京) を、IL-6 の測定にはインターロイキン 6 測定 ELISA キット (富士レビオ, 東京) を用いた。2-5 AS の定量は当院中央検査部にて栄研化学 (東京) 製 2-5 AS 測定キットを用いて行なった。

#### 成 績

##### I. IFN による末梢血 MNC MxA 産生誘導

培養細胞における MxA 産生をウェスタンブロッティングによって検討した場合、濃度依存性に MxA が増加、1,000 U/ml の IFN- $\alpha$  添加により最大となった。これに対して、IFN- $\gamma$  添加では極くわずかの MxA 蛋白誘導が観察されたのみであった (図 1A)。一方、フローサイトメトリーによる検討でもほぼ同様の結果が得られた。すなわち、無刺激培養の場合には MxA 産生は全く誘導されなかったが、IFN- $\alpha$  1000 U/ml と共に 18 時間培養した場合には、細胞内に強い MxA 産生が認められた (図 1B)。これに対して、IFN- $\gamma$  添加による MxA 産生誘導はほとんど認められなかった。

##### II. IFN- $\alpha$ 治療による末梢血単核細胞の MxA 蛋白産生誘導

C 型肝炎ウイルス感染による慢性活動性肝炎患児に対して、IFN- $\alpha$  の週 3 回定期筋注を導入した。初回の治療開始直前、ならびに治療開始後の末梢血 MNC MxA 産生を経時的に検討した。まず、単離した MNC を用いて、細胞内 MxA 量をウェスタンブロッティングにより検討すると、MxA 蛋白量は IFN- $\alpha$  投与開始直後より経時的に増加、投与後 12 時間でピークを示し、24 時間では減少傾向を示した (図 2A)。次にフローサイトメトリー法により、単球およびリンパ球内の MxA 蛋白量の経時的変動を定量的に検討した。患者末梢血 MNC においては、IFN-

Fig. 1. MxA protein in peripheral blood MNC induced by interferons. Peripheral blood MNC were freshly isolated and cultured for 18 hours with or without interferons. (A) Immunoblotting of cytokine-induced MxA. Cell lysates were electrophoresed and blotted on nitrocellulose membrane, reacted with anti-MxA monoclonal antibody. Arrow indicates the size of MxA. (B) Flow cytometry of intracytoplasmic MxA. FITC fluorescence of lymphocytes was determined by a flow cytometer. Dotted lines and solid lines indicate the staining profiles obtained with control mAb and anti-MxA mAb, respectively.

$\alpha$  投与前にすでに MxA 産生がわずかながら認められた。さらに、初回 IFN- $\alpha$  投与後3時間より急速に MxA 発現の増加が認められ、投与後約12時間でピークに達した。MxA 産生は投与後24時間後にはピーク値の60~70%に低下した。このような MxA 量の変化は、リンパ球、単球共に同様な時間経過で変動した。また観察した期間中、単球における MxA 産生がリンパ球における MxA 産生を常に上回った。同時に測定した血清中 IFN- $\alpha$  は投与後6時間で頂値を示し、以後速やかに低下した(図2B)。さらにサイトスピン標本を用いて免疫組織染色を施行すると、フローサイトメトリーで確認された通り、IFN- $\alpha$  投与前から患児 MNC に軽度の MxA 産生が認められ、IFN- $\alpha$  投与後24時間では全ての細胞に著明な MxA 産生が誘導されることが明らかにされた(図2C, D)。

### Ⅲ. 急性感染症における末梢血 MNC MxA 産生の検討

次に、種々の急性感染症において MNC による MxA 産生を解析し、MxA 測定の臨床的意義を検討した。急性ウイルス感染症の典型例として水痘、ならびにヒトヘルペスウイルス(human herpes virus, HHV) 6型感染症である突発性発疹症を、急性細菌感染症の典型例としてインフルエンザ桿菌による肺炎症例を検討した。さらにヘルペス属ウイルス感染症ではあるが、特異な感染経過と臨床像で知られる EBV の初感染による伝染性単核症の症例を比較検討した。ウエスタンブロッティング法による検討では、突発性発疹症に比しレベルは低下するが、水痘の症例においても明らかな MxA 蛋白産生が確認された。興味深いことに、伝染性単核症の末梢血リンパ球においてはこのような MxA 産生はほとんど検出されなかった(図3A)。フローサイトメトリーによる検討では、正常対照では MxA 産生を全

く認めなかった。これに対して突発性発疹症では著明な MxA 産生を認め、リンパ球のみならず単球においても強い MxA 産生誘導が観察された。対照的に、細菌性肺炎の症例ではごくわずかに MxA 産生が認められるのみであり、突発性発疹症における MxA 産生量に比し著しい低値を示した(図3B)。サイトスピン標本を用いた免疫組織染色でも同様の結果が得られた。すなわち、正常対照では単球様細胞、リンパ球いずれにおいても MxA 産生は全く観察されなかった(図3C)。突発性発疹症では単球、リンパ球の全てに強い MxA 産生が認められた(図3D)。一方細菌性肺炎の症例では、極めてわずかではあるが正常対照に比し有意な MxA 産生が観察された(図3E)。伝染性単核症では増加している異型リンパ球のほとんどは MxA 産生を示さなかったが、単球では MxA 産生が有意に増強(白抜き矢印)、さらにリンパ球の一部にも比較的強い MxA 産生が認められた(矢印、図3F)。

### Ⅳ. フローサイトメトリーによる MNC MxA 産生の測定

種々の感染症あるいは急性熱性疾患症例の末梢血 MNC を単離、MxA 産生をフローサイトメトリーで測定、平均蛍光強度の差を  $\Delta$  MFI で示し、定量的な評価を試みた。正常対照ではリンパ球、単球共に MxA 産生は極めて低値を示した。これに比し、突発性発疹症ではいずれの症例においても著明な MxA 産生を認めた(図4A, B)。水痘、麻疹など他のウイルス感染症でも MxA 産生は概ね高値を示したが、突発性発疹症のような強い MxA 産生を認める例は少なく、中にはほとんど MxA 産生を認めない症例が少なからず存在した。明らかな細菌感染症ではリンパ球における MxA 産生は極めて低値を示した。しかしながら、一部の症例では単球における MxA 産生が高値を示した。

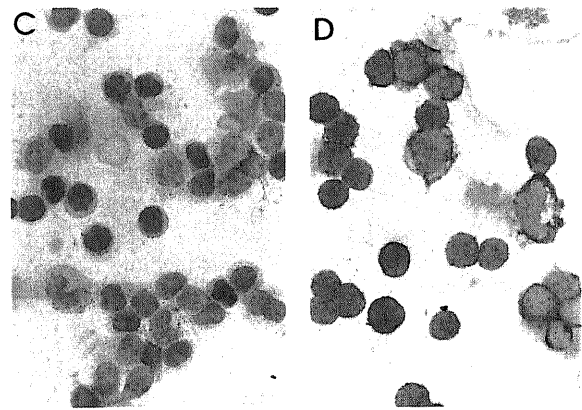
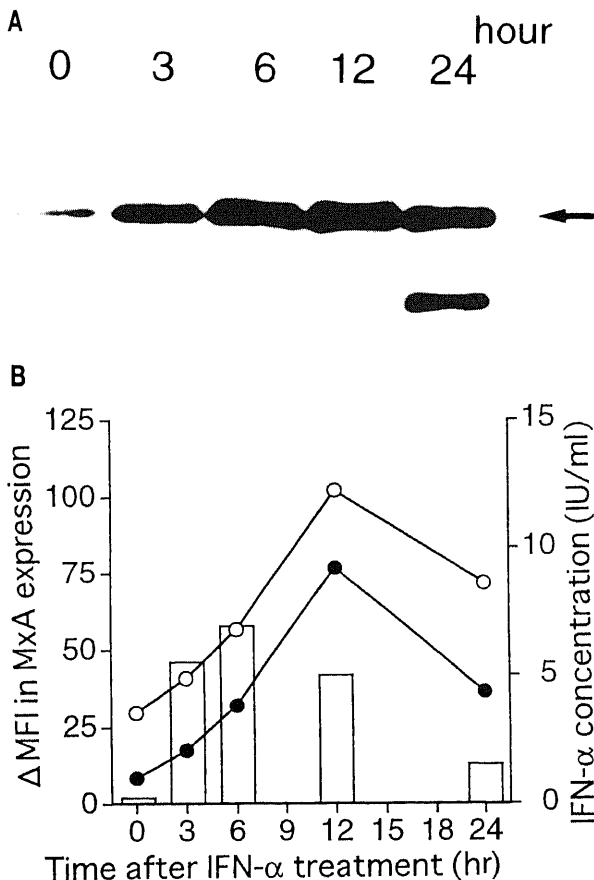


Fig. 2. Induction of MxA protein in vivo in circulating MNC by interferon- $\alpha$  treatment. A patient with chronic hepatitis C was treated with repeated intramuscular injections of interferon- $\alpha$ . MxA protein expression within peripheral blood MNC in this patient was examined sequentially by flow cytometry, immunostaining and immunoblotting. (A) Immunoblotting analysis of cellular MxA expression. Arrow indicates the size of MxA protein. (B)  $\Delta$  MFI was obtained by flow cytometry. Open bars indicate serum interferon- $\alpha$  levels simultaneously determined by a sandwich ELISA assay. MxA levels within lymphocytes ( $\bullet$ ) and monocytes ( $\circ$ ) are shown in the figure. (C) (D) Immunostaining of cytospin preparations obtained before (C) and 24 hours after (D) the initial dose of IFN- $\alpha$ .

A

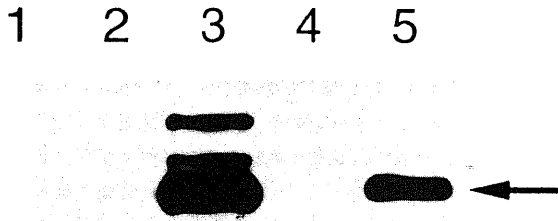
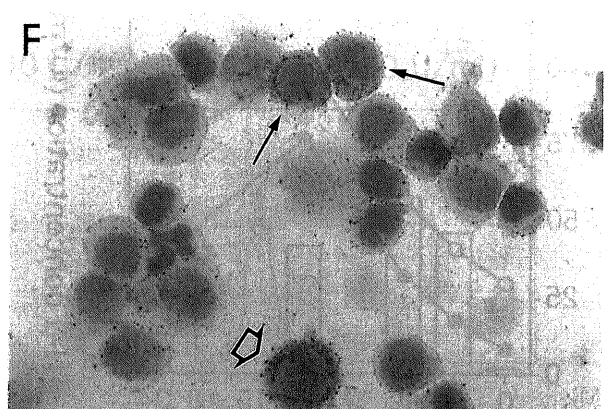
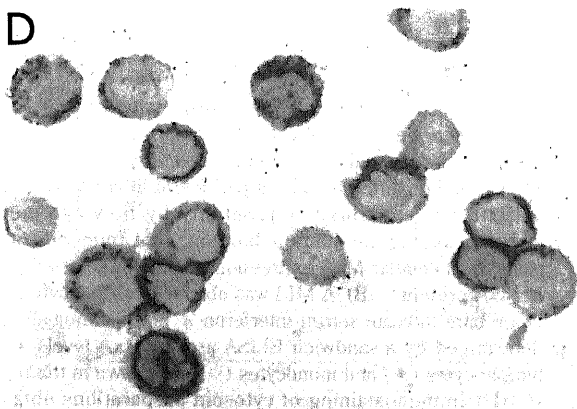
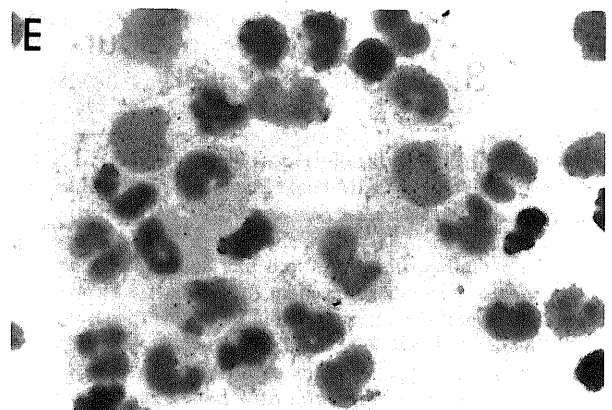
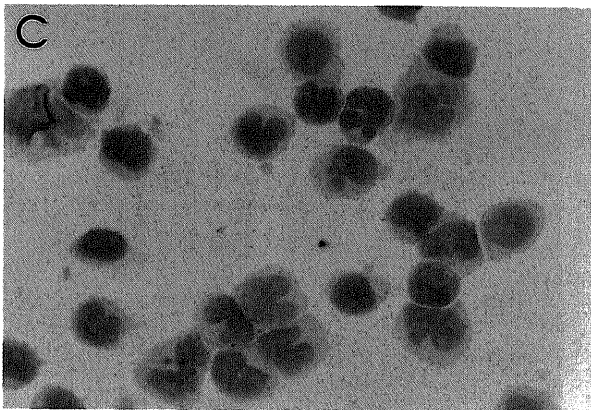
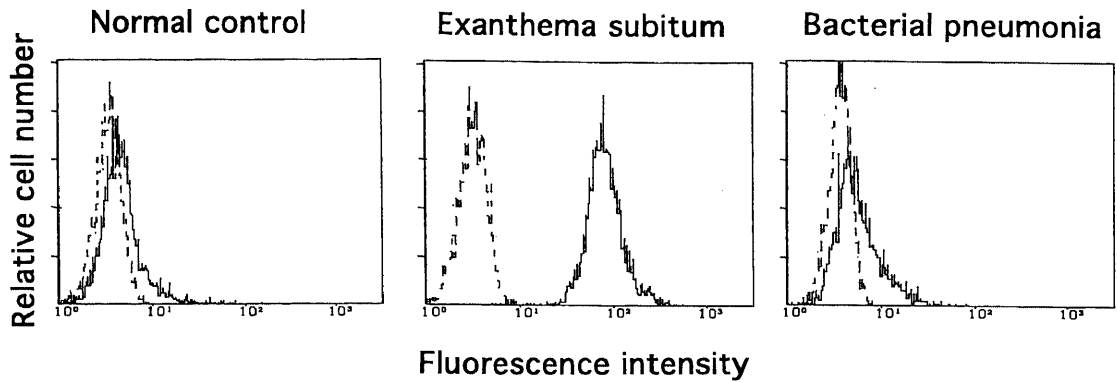


Fig. 3. MxA expression in MNC from patients with infectious diseases. Peripheral blood MNC from patients with various infectious diseases were isolated and analyzed for MxA expression. (A) Immunoblotting of MxA protein. Samples from normal control (1), and patients with bacterial pneumonia (2), exanthema subitum (3), infectious mononucleosis (4) and varicella (5) are shown. The arrow indicates the size of MxA protein. (B) Flow cytometry of MxA protein in MNC from normal control, exanthema subitum and bacterial pneumonia. Dotted lines and solid lines indicate the staining profiles obtained with control mAb and anti-MxA mAb, respectively. (C-F) Immunostaining of cytopsin preparations. (C) normal control, (D) exanthema subitum, (E) bacterial pneumonia and (F) infectious mononucleosis.

B



伝染性単核症では増加しているリンパ球におけるMxA産生は全体としては極めて低値を示したが、単球においては正常対照に比し明らかにMxA産生が亢進していた。マイコプラズマ肺炎も症例は少ないが伝染性単核症と同様の傾向を示した。川崎病急性期では、細菌感染症と同様MxA産生はリンパ球、単球共に低値を示した。

V. 血清中IFN- $\alpha$ 、IL-6ならびに2-5 AS値の測定

これらの疾患に関してMxA産生誘導因子であるIFN- $\alpha$ 、ならびにMxAと同様、IFN- $\alpha$ により誘導されることが知られている2-5 AS、さらに単球などにより産生されることが知られている炎症性サイトカインであるIL-6を測定し、比較した(図5)。

正常対照ではいずれも低値を示した。細菌感染症ではIFN- $\alpha$ は正常同様低値を示したが、IL-6は全ての例で高値を示した。2-5 AS濃度は症例によりばらつきがあったがいずれも正常に比し高い傾向を示した。突発性発疹症ではMxAと同様、全ての症例で2-5 ASが高値を示した。IFN- $\alpha$ は高値を示す症例が多か

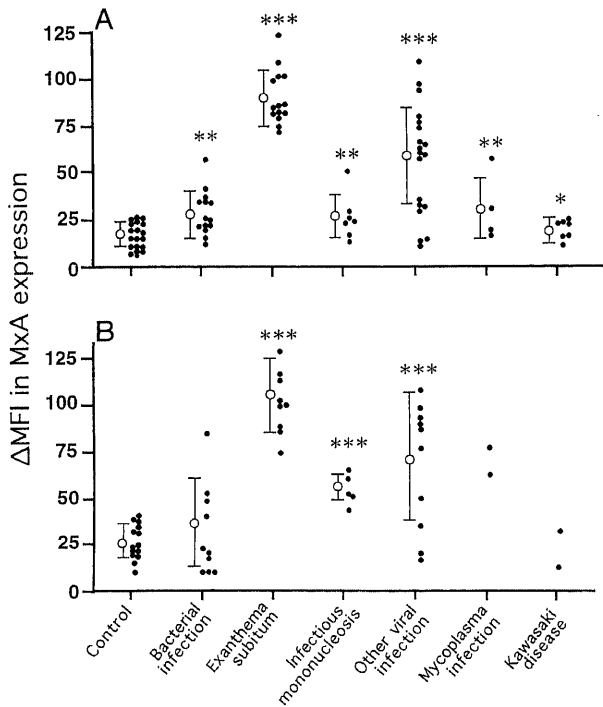


Fig. 4. Flowcytometric measurement of MxA protein expression in lymphocytes and monocytes from various febrile illnesses. MxA protein levels in lymphocytes (A) and monocytes (B) were expressed as  $\Delta$  MFI and shown in the figure. Open circles and horizontal bars indicate means  $\pm$  SD. \*\*\* p < 0.001; \*\* p < 0.01; \* p < 0.05.

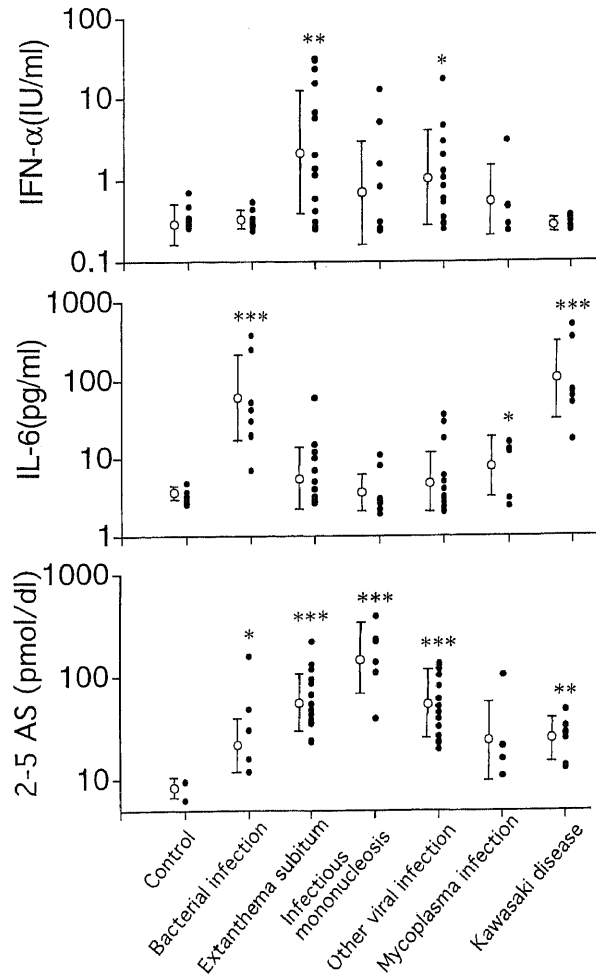


Fig. 5. Measurement of serum IFN- $\alpha$ , IL-6 and 2-5 AS levels in patients with febrile illnesses. Open circles and horizontal bars indicate means  $\pm$  SD. \*\*\* p < 0.001; \*\* p < 0.01; \* p < 0.05.

Table 1. Patterns of inflammatory protein expression in febrile illnesses

Febrile illnesses	Expression of				
	CRP	IL-6	IFN- $\alpha$	2-5 AS	MxA
Normal control	-	-	-	-	-
Viral infection	±	+	- ~ +	#	-
Infectious mononucleosis	-	-	- ~ +	#	±
Bacterial infection	#	#	-	+ ~ #	±
Mycoplasma infection	+	#	- ~ +	+ ~ #	±
MCLS	#	#	-	+	-

Patterns of expressions of various inflammatory proteins are summarized. #, very strong; #, strong; +, moderate; ±, weak; and -, negative.



つたが、中には全く正常値を示す症例もあった。IL-6濃度は正常に比しわずかに高値を示した。伝染性単核症ではIFN- $\alpha$ は軽度増加していたが、IL-6はほぼ正常値を示した。2-5 AS濃度は突発性発疹症と同程度かそれ以上の高値を示した。他のウイルス感染症もほぼ突発性発疹症と同様の傾向を示した。マイコプラズマ感染症ではウイルス感染症に比し、2-5 ASならびにIFN- $\alpha$ は低値を示す傾向にあった。川崎病ではIFN- $\alpha$ は全く正常値を示し、2-5 ASも極く軽度の上昇を示すのみであった。しかし、IL-6は全例で特徴的な高値を示した。

### 考 察

MxAは主としてインフルエンザや麻疹ウイルス、小水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus) などの二重鎖RNAウイルス感染に際して急速にその産生が誘導され<sup>12)16)</sup>、試験管内の検討では、最適の刺激条件下でMxA蛋白は細胞質内蛋白の1%にも達することが知られている<sup>17)</sup>。さらに最近、MxAはこれらRNAウイルス感染のみでなく、水痘帯状疱疹ウイルスなど種々のウイルス感染症においてもその産生が誘導されることが明らかとなり、一般的なウイルス感染症の診断とその病態評価の有用な指標となると考えられつつある<sup>18)・20)</sup>。同様に、MxAがインフルエンザなどのRNAウイルスに対する感染抑制機能を示すことは良く知られているが<sup>21)・25)</sup>、最近ではインフルエンザウイルスのみでなく広範なウイルス感染においてその感染防御活性が認められている<sup>26)27)</sup>。またMxAはIFN- $\alpha$ やIFN- $\beta$ などのI型IFNのみによりその産生が特異的に誘導され、IL-1、IL-6、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) など他の種々の炎症性サイトカインの影響を全く受けないことから、これらのサイトカイン産生が亢進する細菌感染症や慢性炎症性疾患による非特異的産生亢進は起こらないと予想される<sup>28)</sup>。一方、IFN- $\alpha$ 産生を欠損する細胞株を用いた試験管内の検討では、ウイルス感染により直接MxAの産生が誘導されることは殆どなく、IFN- $\alpha$ を介して間接的にMxA産生が起こることが示唆されている<sup>29)</sup>。これらの事実は、MxAが生体内でのIFN- $\alpha$ 産生動態を直接に鋭敏に反映している可能性を示唆している。今回の試験管内の検討でも、IFN- $\alpha$ 刺激により濃度依存性に速やかに細胞質内MxA産生が誘導された一方、高濃度のIFN- $\gamma$ 添加によってもその効果はほとんど認められなかった。また、IFN- $\alpha$ 投与時の生体内でのMxA産生を検討したものは少ないが<sup>30)31)</sup>、今回のC型肝炎症例の検討より、IFN- $\alpha$ 投与開始直後より経時的に速やかにMxA産生が誘導されたことから、生体内においてもリンパ球によるMxA産生が直接IFN- $\alpha$ により強く誘導されることが示唆された。

急性ウイルス感染症ではウイルス感染に伴い急速に末梢血中、あるいは感染局所においてIFN- $\alpha$ 産生が起こるとされている<sup>4)6)</sup>。IFN- $\alpha$ 自体は急速に消失すると考えられるが、一時的に高濃度のIFN- $\alpha$ 刺激を受け産生誘導されたMxAは、比較的長時間に亘り細胞質内にとどまり抗ウイルス活性が持続すると予想される<sup>11)・19)</sup>。また、IFN- $\alpha$ 刺激によりリンパ球や単球など、末梢血中MNCのほとんどでMxA産生が誘導されることから<sup>19)</sup>、フローサイトメトリーにより細胞質内の蛋白量を検討することで、鋭敏にMxA産生を評価できると考えられる。このように高感度にMxA産生を評価することにより、血清中のMxA濃度測定とは異なりいくつかの新たな臨床的意義が生じる。第一に、感染症診断の手段の一つとして、特に細菌感染症

とウイルス感染症の鑑別診断の指標として有用である。乳児期における発熱性疾患のなかには自然治癒傾向の強いウイルス感染症と重症細菌感染症が臨床的に類似した発症を示すことがあり、これらの鑑別診断の補助としての意義は大きい。第二に、膠原病や原因不明の発熱性疾患など種々の炎症性疾患の病因病態解明の一助として期待され、特にウイルス感染やIFN- $\alpha$ 産生が発症の契機となることが示唆されるいくつかの疾患において、その関与の是非を判断するための新たな知見が与えられる可能性がある。

表1に本研究の結果を総括した。今回の検討で明らかになったように、急性の発熱性ウイルス感染症である突発性発疹症では典型的なMxA産生亢進が認められた。他のウイルス感染症でも、程度の差はあれ大部分の症例で細胞質内MxAがフローサイトメトリーにより検出され、ウイルス感染症に対する感度が極めて優れていると考えられた。これに比し、IFN- $\alpha$ はMxA産生の顕著な突発性発疹症においても低値を示す例が多く、また2-5 ASはウイルス感染症以外の細菌感染症やマイコプラズマ感染症の一部でも高値を示し、それぞれ感度や特異性に難点があると考えられた。他のウイルス感染症に比し、突発性発疹症においてMxA産生が常に亢進している理由は不明であるが、HHV6型あるいはHHV7型感染後突発性発疹症発症までの潜伏期間が比較的短いことから、MxAは急性期のウイルス血症の程度を最も強く反映しているのかも知れない<sup>32)33)</sup>。これに関して新谷は、突発性発疹症の急性期で高率にウイルス血症を確認できること、また発症後極く短期間のみ末梢血中CD16陽性ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞の活性化をCD69抗原発現により確認できるとしている<sup>34)</sup>。これに比し他のウイルス感染症では、臨床的には急性期であるが、ウイルス血症のピークを過ぎ、MxA蛋白産生も下降し始めた時点で臨床症状が発現していると考えられる。これに関して、Roersらは、黄熱病ウイルスの生ワクチンを用いた感染実験でワクチン接種後2日目よりMxA蛋白を検出、7日目に最高値となり、11日目には急速に下降することを報告している<sup>19)</sup>。

一方、やはり急性発熱性ウイルス感染症である伝染性単核症では、リンパ球内のMxA産生が極めてわずかであり、著増しているT細胞自体はIFN- $\alpha$ の刺激を殆ど受けていない可能性が示された。他の急性ウイルス感染症と異なり、伝染性単核症ではウイルス血症の著明な感染初期ではなく、ウイルス感染細胞に対するT細胞反応の亢進した時期に特徴的な臨床像を取ることが知られている<sup>35)</sup>。したがって、臨床症状の局期にはウイルス感染としてはむしろ急性期を過ぎていたために、MxA産生が低下しているとも考えられる。しかし、今回検討した伝染性単核症は多くの症例でIFN- $\alpha$ は上昇、2-5 ASも殆どの症例でその濃度が上昇しており、従来の指標で見るとかぎりむしろ急性ウイルス感染に一致する所見を示している。さらにサイトスピン標本を用いた免疫染色の結果を検討すると、興味深いことに単球のMxA産生はむしろ増加しており、CD4陽性細胞の一部にも比較的強いMxA産生が認められる。Tamaruらは、急性期伝染性単核症では著増しているCD8陽性T細胞がbcl-2蛋白を欠如するために容易にアポトーシスに陥るとしている<sup>36)</sup>。すなわち伝染性単核症ではEBV感染が持続し、IFN- $\alpha$ の刺激によりMxA産生が誘導される少数の細胞と、急速に増殖しながら活性化し活発にアポトーシス死に陥るCD8陽性細胞を中心としたT細胞とが混在し、特徴的な末梢血液像を構成していること

が示唆される。したがって、突発性発疹症では末梢血 MNC が一様に IFN- $\alpha$  反応し MxA を多量に産生するのに対して、伝染性単核症では異なるリンパ球亜集団がそれぞれ異なる MxA 産生パターンを示すと考えられる。このような症例では、多重染色による解析を施行し、特定のリンパ球亜集団毎の MxA 産生を経時的に比較検討することにより、さらに病態評価に有用な情報が得られると考えられる。

一方、川崎病は乳幼児期に特異的な急性熱性疾患である<sup>39)</sup>。当初は予後良好な全身性炎症疾患と考えられていたが、その本態が全身の極めて強い血管炎であり、それによる重篤な合併症により時に致死的な疾患であることが明かとなり<sup>40)</sup>、病因検索が精力的になされている。しかし種々の病因論が展開される中で、いまだに感染症であるか否か、個体の免疫学的特徴を背景とした一種の自己免疫疾患なのか否かなど不明な点が多い。強い炎症反応と好中球の比較的增加や特徴的な皮膚、粘膜反応は細菌感染症やその産生する外毒素に対する生体反応を示唆する。他方、いかなる培養も陰性であることから、未知のウイルス感染とウイルス抗原の刺激による炎症反応であるとの仮説も提出されている<sup>41)</sup>。Ueno らの検討では、川崎病急性期には IL-6 が著増し、CRP の高値、血小板の増加を認めることよりウイルス感染症よりも急性細菌感染症の臨床検査所見に近いと考えられた<sup>42)</sup>。一方、伝染性単核症様の症状と混在していたり<sup>43)</sup>、急性期患者ではすべて EBV 関連抗体価が低値を示すこと<sup>44)</sup>など、EBV 感染との関連を示唆する所見も数多くある。今回の MxA 蛋白発現の解析では、川崎病急性期には MxA 蛋白産生の誘導は全く認められず、2-5 AS 濃度の上昇のみがわずかに認められた。MxA 蛋白産生パターンのみから判断すれば、川崎病は細菌感染症と同様の反応を示していると考えられた。少なくとも、急性ウイルス感染症に伴うような IFN- $\alpha$  産生の増強と MxA 蛋白産生の誘導は全く認められず、病態形成にこれらの関与は全くないと考えられる。

MxA 蛋白のフローサイトメトリーによる解析は、鋭敏で IFN- $\alpha$  特異性が高いことから、IFN- $\alpha$  の関与が明らかな種々感染症や治療の評価のみでなく、病態の不明な種々の疾患の解析に有用であることが示された。今回は特に検討の対象としなかったが、IFN- $\alpha$  は種々の自己免疫疾患においても血中や病変局所での産生亢進が示されている<sup>45)46)</sup>。また分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency, CVID) の一部ではむしろ MxA の産生不全が指摘されており<sup>47)</sup>、自己免疫疾患の発症におけるウイルス感染、IFN- $\alpha$ 、MxA 蛋白の関与も検討すべきと考える。さらに、フローサイトメトリーによる検討は血清中濃度の検討やウエスタンブロッティングによる検討と異なり、個々の細胞レベルで MxA 産生を測定できるため、一部の細胞集団のみに MxA 産生が誘導されているような特殊な病態の解析にも有用であることが示された。先に述べたように、そのような症例では多重染色法を駆使したフローサイトメトリーにより末梢血 MNC 亜集団による MxA 産生を定量的に比較検討することが可能であり、病態評価が容易となると推定される。今後は経時的に MxA 蛋白発現を比較検討し、個々の疾患における MxA 発現の意義に関してさらに解析する必要があると考える。

## 結 論

小児期における種々の急性発熱性疾患に関して、主としてフローサイトメトリー法を駆使して末梢血 MNC の MxA 産生を

検討し、以下の結果を得た。

1. 試験管内の検討では末梢血 MNC に IFN- $\alpha$  を添加し培養することにより急速に MxA 産生が誘導された。IFN- $\gamma$  にはそのような効果はほとんど認められなかった。
2. C 型肝炎患児に IFN- $\alpha$  を投与すると経時的に速やかに MxA 産生が誘導された。リンパ球、単球の双方に蛋白発現が確認された。
3. 急性ウイルス感染症の多くでは末梢血 MNC で細胞内 MxA 産生が確認された。特に、突発性発疹症ではその産生が著明に亢進していた。伝染性単核症ではリンパ球の一部と単球に MxA 産生が認められたが、異型リンパ球のほとんどは MxA 発現を示さなかった。
4. 細菌感染症や川崎病急性期では MxA 産生は極めて低値を示した。
5. 同時に測定した血清中 IFN- $\alpha$  はウイルス感染症でも低値を示すものが多く、一定の傾向を示さなかった。2-5 AS はウイルス感染症では高値を示したが、細菌感染症のほとんどでも上昇していた。
6. 以上、MxA は IFN- $\alpha$  により特異的に誘導され、ウイルス感染と IFN- $\alpha$  の関与する病態に特徴的な指標となると考えられた。さらに、フローサイトメトリーを併用した MxA 産生の検討は、ウイルス疾患の病態評価だけでなく、IFN- $\alpha$  の関与する種々の炎症性疾患の解析にも有用であると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部医学科小児科学教室谷口 昂名誉教授ならびに小泉晶一教授に心から謝意を表します。さらに直接御指導、御協力を頂きました谷内江昭宏助教授、第二研究室の皆様、現富山医科薬科大学小児科学教室宮脇利男教授に深謝致します。また血清中 2-5 AS の測定を快く施行して下さいました当院中央検査部橋本琢磨教授に心よりお礼申し上げます。なお、本論文の一部は第 24 回日本臨床免疫学会総会 (東京 1996) において発表した。

## 文 献

- 1) McCarthy PL, Jekel JF, Dolan Jr TF. Comparison of acute phase reactants in paediatric patients with fever. *Pediatr* 62: 716-720, 1978
- 2) Peltola H, Jaakkola M. C-reactive protein in early detection of bacteremic versus viral infections in immunocompetent and compromised children. *J Pediatr* 113: 641-646, 1988
- 3) Ruuskanen O, Putto A, Starkkinen H, Meurman O, Irjala K. C-reactive protein in respiratory virus infection. *J Pediatr* 107: 97-100, 1985
- 4) Yamazaki S, Kuramoto K, Matsuo E, Hosoi K, Hara M, Shimizu H. Highly sensitive enzyme immunoassay of human interferon-beta 1. *J Immunoassay* 10: 57-73, 1989
- 5) Andersson G, Lundgren E, Ekre HP. Application of four anti-human interferon-alpha monoclonal antibodies for immunoassay and comparative analysis of natural interferon-alpha mixtures. *J Interferon Res* 11:53-60, 1991
- 6) Staeheli P. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv Virus Res* 38: 147-200, 1990
- 7) Sen GC, Ransohoff RM. Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* 42: 57-102, 1993
- 8) Emodi G, Just M, Hernandez R, Hirt HR. Circulating

- interferon in man after administration of exogenous human leukocyte interferon. *J Natl Cancer Inst* 54: 1045-1049, 1975
- 9) Schattner A, Wallach D, Merlin G, Hahn T, Levin S, Revel M. Assay of an interferon-induced enzyme in white blood cells as a diagnostic aid in viral diseases. *Lancet* 2: 497-499, 1981
- 10) Forster J, Schweizer M, Schumacher RF, Kaufmehl K, Lob S. MxA protein in infants and children with respiratory tract infection. *Acta Paediatr* 85: 163-167, 1996
- 11) Staeheli P, Danielson P, Haller O, Sutcliffe JG. Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol Cell Biol* 6: 4770-4774, 1986
- 12) Goetschy JF, Zeller H, Content J, Horisberger MA. Regulation of the interferon-inducible IFI-78K gene, the human equivalent of the murine Mx gene, by interferons, double-stranded RNA, certain cytokines, and viruses. *J Virol* 63: 2616-2622, 1989
- 13) von Wussow P, Jakschies D, Hochkeppel HK, Fibich C, Penner L, Deicher H. The human intracellular Mx-homologous protein is specifically induced by type I interferons. *Eur J Immunol* 20: 2015-2019, 1990
- 14) Towbin H, Schmitz A, Jakschies D, von Wussow P, Horisberger MA. A whole blood immunoassay for the interferon-inducible human Mx protein. *J Interferon Res* 12: 67-74, 1992
- 15) Ronni T, Sareneva T, Pirhonen J, Julkunen I. Activation of IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MxA, and IFN regulatory factor 1 genes in influenza A virus-infected human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 154: 2764-2774, 1995
- 16) Roers AK, Hochkeppel K, Horisberger MA, Hovanessian A, Haller O. MxA gene expression after live virus vaccination: a sensitive marker for endogenous type I interferon. *J Infect Dis* 169: 807-813, 1994
- 17) Horisberger MA. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol* 66: 4705-4709, 1992
- 18) Fah J, Pavlovic J, Burg G. Expression of MxA protein in inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem* 43: 47-52, 1995
- 19) Baca LM, Genis P, Kalvakolanu D, Sen G, Meltzer MS, Zhou A, Silverman R, Gendelman HE. Regulation of interferon- $\alpha$  inducible cellular genes in human immunodeficiency virus-infected monocytes. *J Leukocyte Biol* 55: 299-309, 1994
- 20) Jakschies D, Zchoval R, Muller R, Manns M, Nolte KU, Hochkeppel HK, Horisberger MA, Deicher H, von Wussow P. Strong transient expression of the type I interferon-induced MxA protein in hepatitis A but not in acute hepatitis B and C. *Hepatology* 19: 857-865, 1994
- 21) Schnorr J, Schneider SS, Simon-Jodike A, Pavlovic J, Horisberger M, Ter Meulen V. MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stable transfected human monocytic cell line. *J Virol* 67: 4760-4768, 1993
- 22) Krug RM, Shaw M, Broni B, Shapiro G, Haller O. Inhibition of influenza-viral mRNA synthesis in cell expressing the interferon-induced MX-gene product. *J Virol* 56: 201-206, 1985
- 23) Pavlovic J, Zurcher T, Haller O, Staeheli O. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J Virol* 64: 3370-3375, 1990
- 24) Horisberger MA. Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus. *Am J Crit Care Med* 152: S67-S71, 1995
- 25) Ronni T, Melen K, Malygin A, Julkunen I. Control of IFN-inducible MxA gene expression in human cells. *J Immunol* 150: 1715-1726, 1993
- 26) Pavlovic J, Arzet HA, Hefti HP, Frese M, Rost D, Ernst B, Kolb E, Staeheli P, Haller O. Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol* 69: 4506-4510, 1995
- 27) Frese M, Kochs G, Feldmann H, Hertkorn C, Haller O. Inhibition of bunyavirus, phlebovirus, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol* 70: 915-923, 1996
- 28) Simon A, Fah J, Haller O, Staeheli P. Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines. *J Virol* 65: 968-971, 1991
- 29) Bazzigher L, Pavlovic J, Haler O, Staeheli P. Mx genes show weaker primary response to virus than other interferon-regulated genes. *Virology* 186: 154-160, 1992
- 30) Cheng Y-SE, Becker-Manley MF, Rucker RG, Borden EC. Accumulation of guanylate binding proteins in patients treated with interferons. *J Interferon Res* 8: 385-391, 1988
- 31) Jakschies D, Hochkeppel H, Horisberger M, Deicher H, von Wussow P. Emergence and decay of the human Mx homolog in cancer patients during and after interferon- $\alpha$  therapy. *J Biol Response Mod* 9: 305-312, 1990
- 32) Pellett PE, Black JB. Human herpes virus 6. In BN Fields, DM Knipe, PM Howley, RM Chanock, JL Melnick, TP Monath, B Roizman, SE Straus (eds), *Fields Virology*, 3rd ed, p2587-2608, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996
- 33) Frenkel N, Roffman E. Human herpesvirus 7. In BN Fields, DM Knipe, PM Howley, RM Chanock, JL Melnick, TP Monath, B Roizman, SE Straus (eds), *Fields Virology*, 3rd ed, p2609-2622, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996
- 34) 新谷尚久 乳幼児におけるヒトヘルペスウイルス - 6 (HHV-6) 初感染の臨床免疫学的研究. 十全医会誌 104: 133-142, 1995
- 35) Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In BN Fields, DM Knipe, PM Howley, RM Chanock, JL Melnick, TP Monath, B Roizman, SE Straus (eds), *Fields Virology*, 3rd ed, p2397-2446, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996
- 36) Tamaru Y, Miyawaki T, Iwai K, Tsuji T, Nibu R, Yachie A, Koizumi S, Taniguchi N. Absence of bcl-2 expression by activated CD45RO+ T lymphocytes in acute infectious mononucleosis supporting their susceptibility to programmed cell death. *Blood* 82: 521-527, 1993
- 37) Kawasaki T, Kosaki F, Okawa S. A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) prevailing in Japan. *Pediatrics* 54: 271-276, 1974
- 38) Yanagisawa M, Kobayashi N, Matsuya S. Myocardial infarction due to coronary thromboarthritis, following acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) in an

infant. *Pediatrics* 54: 277-281, 1974

39) 高橋理明 病因論 ウイルス説 川崎病 (川崎富作, 重松逸造, 濱島義博, 柳川 洋, 加藤裕久編) 303-310頁, 南江堂, 東京, 1988

40) Ueno Y, Takano N, Kanegane H, Yokoi T, Yachie A, Miyawaki T, Taniguchi N. The acute phase nature of interleukin 6: studies in Kawasaki disease and other febrile illnesses. *Clin Exp Immunol* 76: 337-342, 1989

41) Kanegane H, Tsuji T, Seki H, Yachie A, Yokoi T, Miyawaki T, Taniguchi N. Kawasaki disease with a concomitant primary Epstein-Barr virus infection. *Acta Paediatr Jpn* 36: 713-716, 1994

42) Iwanaga M, Takada K, Osato T. Kawasaki disease and

Epstein-Barr virus. *Lancet* 1: 938-939, 1981

43) Preble OT, Black RJ, Friedmann RM, Klippel JH, Vilcek J. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid labile leukocyte interferon. *Science* 216: 429-431, 1982

44) Belardelli F, Gresser I. The neglected role of type I interferon in the T-cell response: implications for its clinical use. *Immunol Today* 17: 369-372, 1996

45) Rump JA, Jakshies D, Walker U, Schlesier M, von Wussow P, Peter HH. Common variable immunodeficiency (CVID) and MxA-protein expression in blood leucocytes. *Clin Exp Immunol* 101: 89-93, 1995

**Expression and Clinical Relevance of Intracellular MxA Protein in Childhood Infectious Disease** Tomoji Saito, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. J. J. Med Soc., **106**, 204 - 213 (1997)

**Key words** interferon- $\alpha$ , MxA, flow cytometry, infectious disease

#### Abstract

Acute infectious diseases compose a large proportion of childhood illnesses. Therefore, it is important to identify the etiologic agents as quickly as possible. Although the distinction between bacterial and viral infections is necessary to initiate the most appropriate treatment, it is often difficult to make a clear distinction promptly. Interferon (IFN)- $\alpha$  and the derived proteins have recently been used as an indicator of viral infection. Among these, it has been shown that MxA is specifically and rapidly induced by IFN- $\alpha$  and has a long half-life. It has a potent anti-viral effect and functions as a regulator of viral replication. In this study, MxA production within peripheral blood mononuclear cells (MNC) was examined by flow cytometry and compared among various acute febrile illnesses. In vitro stimulation of MNC with IFN- $\alpha$ , but not with IFN- $\gamma$  resulted in rapid induction of MxA. Similarly, MxA protein was immediately induced after IFN- $\alpha$  injection, within MNC from patient with hepatitis C. Freshly isolated MNC from controls expressed little MxA. MNC from patients with bacterial infection expressed only trace amounts of MxA. On the contrary, MxA can be expressed at an extremely high level in patients with acute episodes of exanthema subitum. Patients with other viral infections also showed lower, but significant, levels of MxA. The majority of lymphocytes from infectious mononucleosis patients expressed little MxA. However, monocytes and a minor fraction of lymphocytes from these patients expressed significantly high level of MxA. Serum concentrations of IFN- $\alpha$  were variable and they were often low or undetectable even in cases with proven acute viral infections. Serum 2-5 AS concentrations were elevated in all cases of viral infections, but the levels were also high in bacterial infections. MNC from patients with Kawasaki disease, an acute febrile illness of unknown etiology, showed characteristically little MxA, as did the cells in bacterial infection. These results indicated that MxA serves as a rapid indicator of IFN- $\alpha$  induced cell stimulation and that flowcytometric measurement of peripheral blood MNC is a useful method of evaluating the effect of IFN- $\alpha$  in the pathogenesis of childhood acute febrile illnesses. Multiparameter flowcytometric analysis may provide novel information with regard to the different leukocyte subpopulations in response to certain viral infections. Furthermore, MxA measurement may shed light on the understanding of various inflammatory disorders of unknown etiology