

膠原病，乾燥症候群および正常人における 抗 Rheumatoid Arthritis Nuclear Antigen (RANA) 抗体の検討

岡山大学第三内科（主任：太田善介教授）

古 田 嘉 男

（昭和57年1月27日受稿）

Key words: 抗 RANA 抗体，抗 EBNA 抗体
EB ウイルス感染

緒 言

1975年 Alspaugh らは，培養ヒトリンパ球株細胞，WiL-2の0.25Mショ糖抽出液と乾燥症候群患者血清との間に3本の未知の沈降線，すなわちSS-A，SS-B，SS-C沈降線を報告している¹⁾。その後，SS-A，SS-B系の沈降線が乾燥症候群と密接な関係にあることは国内外の報告で再確認され²⁾³⁾⁴⁾，臨床的に大いに活用されて今日に至っている。

一方SS-C沈降線は，rheumatoid arthritis precipitin (RAP) と呼ばれ，当初は慢性関節リウマチ (RA) を伴う乾燥症候群に特異的に出現するとされていたが¹⁾²⁾，後にはリウマチ因子陽性のRAにも特異性があると報告された⁵⁾。さらにRAPの対応抗原はrheumatoid arthritis nuclear antigen (RANA) と呼ばれ⁶⁾，培養Bリンパ球株細胞にしか存在しない⁵⁾ことから，Epstein-Barr virus (EBV)感染によって誘導されるEpstein-Barr nuclear antigen (EBNA)との関係が注目されるようになってきた⁶⁾。その後の正常人における抗RANA抗体の検討により，本抗体は抗EBNA抗体と密接な関係を有することが推測され⁷⁾⁸⁾⁹⁾，その結果抗RANA抗体が高頻度に出現するRAにおいても，EBV感染の役割が再評価されるところとなりつつある¹⁰⁾¹¹⁾。いずれにしろ，本邦において今日までにこの面に関する報告は全く見当たらない。そこで今回，自験の膠原病，乾燥症候群，ならび

に正常人血清を用いて，日本人における抗RANA抗体の臨床的意義を検討し，またRANAとEBNAの関係についても検討を加えたので，以下に報告する。

対象および方法

1. 血清

当科を受診したRA60例，全身性エリテマトーデス45例，多発筋炎または皮膚筋炎10例，sclerodermatomyositis 6例，強皮症17例，mixed connective tissue disease (MCTD)21例，undifferentiated connective tissue disease (UCTD) 32例，乾燥症候群45例，正常人44名，以上の血清を用いた。RAはアメリカリウマチ協会の診断基準¹²⁾の確診例以上の症例であり，全身性エリテマトーデスは同協会の診断基準¹³⁾を4項目以上満たし，多発筋炎または皮膚筋炎はMedsgerの基準¹⁴⁾の確診例，強皮症はMedsgerの基準¹⁵⁾の確診例に各々該当する症例である。sclerodermatomyositisは強皮症と多発筋炎，または皮膚筋炎の基準の確診例を同時に満足する症例とした。MCTDは既報のごとくSharpらの報告に準じて診断した¹⁶⁾¹⁷⁾。UCTDは以上のいずれの膠原病の診断基準も満たさず，かつ抗RNP抗体が陽性の膠原病様症状を示す症例群とした。乾燥症候群は厚生省シェーグレン病調査研究班の診断基準¹⁸⁾の確実例で，確診膠原病を合併しない症例である。なお乾燥症候群の

中で抗 RNP 抗体の陽性者は UCTD の範ちゅうに入れた。

血清は56℃30分間非働化した後、-20℃に保存されたものを用いた。

2. 抗原

オクタロニー法に用いる抗原液は、Raji細胞²⁷⁾より得た。すなわち10%牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI 1640(GIBCO)を用いてRaji細胞を培養し、培養液を交換後、1週間以内の細胞を回収し、-40℃に保存した。抗原抽出に際しては、融解した細胞に、等容積のphosphate buffered saline (PBS: 0.01M phosphate, 0.14 M NaCl, pH=7.2)を加え、Sonicator (Heat Systems-Ultrasonics, Inc)のマイクロチップを用い、最大出力で1分間超音波処理した。得られた液を105,000 G 60分間遠沈し、その上清を粗抗原(CRE)とした。これを後述する理由から、80℃10分間熱処理し、遠沈して得た上清を熱精製抗原(HRE)とした。その他に对照として、Bリンパ球由来のB95-8¹⁹⁾、BL²⁰⁾、またTリンパ球由来のMT-1²¹⁾の各株細胞をRajiと同様に培養し、PBS抽出抗原を作製した。なお、Raji, B95-8, BL, MT-1は岡山大学第2内科三好勇夫博士の御好意により供与されたものである。また従来非ヒストン核蛋白抗体の検出に用いられてきた、家兎胸腺アセトン粉末(Pelfreeze)、ラット肝、仔牛胸腺、ヒト脾臓、ヒト肝の各々生食可溶抗原液も对照として用いた。抗原液の蛋白濃度はFolin-Lowry法にて測定した²²⁾。

3. オクタロニー法

0.4%のagarose (Seakem, HGT(P))板を作製し、直径6 mm、間隔2 mmの穴を7個作り、中心の穴に抗原を入れ、周辺穴に標準血清と被検血清を入れて、室温にて48~72時間反応させた。反応の終了したゲルは5%クエン酸ナトリウム液にて12時間洗浄後、沈降線を観察した²³⁾。なお、抗RANA、抗SS-A、抗SS-B抗体の標準血清はDr. AlspaughおよびDr. Tanより供与された。

4. 蛍光抗体法

抗RANA抗体はAlspaughらの方法⁵⁾に基づき、蛍光抗体間接法(FAT)で検出した。培養液交換後4日以内の新鮮なRaji細胞を回収し、

サクラオートスマアーを用いて、cytocentrifugeによる標本を作製し、室温にて風乾後、37℃30分間乾熱固定し、核材に用いた。被検血清と30分間反応させた後、fluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗ヒトγグロブリン (MBL, FP ratio=1.5)にて30分間染色し、オリンパス落射式蛍光顕微鏡にて判定を行なった。

抗EBNA抗体はHenleらの3段法²⁴⁾による蛍光補体法(ACIF)にて検出した。Raji細胞の塗末標本を風乾後、acetone/methanol (1/1 v/v)にて3分間室温で固定し、核材とした。塗末標本をまず、balanced salt solution (BSS: 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.257% Na₂HPO₄·12H₂O, 0.02% KH₂PO₄, 0.02145% MgCl₂·6H₂O, 0.01% CaCl₂, pH=7.3)に5分間ひたした後、被検血清と30分間反応させ、次いでBSSで10倍に希釈したヒト補体と45分間反応させた。その後、FITC標識抗ヒトC3(Behring, FP ratio=1.9)にて30分間染色し、蛍光顕微鏡にて判定した。なお、ヒト補体として、抗EBNA抗体陰性の正常人新鮮血清を用いた。また、抗RANA、抗EBNA共に、MT-1の塗末標本を陰性コントロールとした。

5. 統計学的方法²⁵⁾

Fisherの直接確率計算法、Wilcoxonの順位和検定、Spearmanの順位相関を用い、計算はマイクロコンピュータ(NEC PC-8001)にて行なった。

結 果

RA血清を用いて、CREに対する沈降性抗体を検討すると、多数の血清に1本の未知の沈降線を認めた。これはDr. Alspaughらより供与された抗RANA標準血清の沈降線と一致したため、抗RANA沈降線と同定された。抗RANA沈降線はコントラストが弱いため、抗SS-A、SS-B等の非ヒストン核蛋白抗原による強い沈降線によって干渉され、検出不可能となる血清が多数存在した。そこで、CREを80℃10分間加熱精製したHREを用いると、非ヒストン核蛋白抗原が失活し、写真のようにRANA系の沈降線のみとなり、明瞭に抗RANA抗体の有無を決定することが可能になった(Fig. 1)。



Fig. 1. Immunodiffusion study showing nonidentity of SS-A, SS-B and RANA systems. CRE: crude extract from Raji cells. HRE: partially purified extract from Raji cells by heating at 80°C for 10min. RANA was heat stable. SS-A and SS-B antigens were destructed by heating at 80°C for 10min. The hazy line between two serum wells was considered to be a non-specific one.

HRE を抗原とするオクタブロー法を用いて, 各種膠原病, 乾燥症候群, および正常人の抗RANA 抗体を検討した (Table 1). 抗 RANA は RA の60例中59例(98%), 全身性エリテマトーデス45例中の43例(96%), 多発筋炎または皮膚筋炎の10例全例(100%), sclerodermatomyositis 6 例の全例(100%), 強皮症17例中の16例(94%), MCTD の21例中20例(95%), UCTD の32例全例(100%), 乾燥症候群45例中の44例

Table 1. Incidence of anti RANA antibody detected by immunodiffusion in patients with connective tissue diseases, sicca complex and in normal subjects.

	Patient number	Positive number	Per cent
Rheumatoid arthritis	60	59	98 #
Systemic lupus erythematosus	45	43	96 #
Polymyositis (Dermatomyositis)	10	10	100 #
Sclerodermatomyositis	6	6	100 #
Scleroderma	17	16	94 #
Mixed connective tissue disease	21	20	95 #
Undifferentiated connective tissue disease *	32	32	100 #
Sicca complex	45	44	98 #
Normal subjects	44	40	91

No significant difference from normal subjects ($P > 0.05$).

* Patients positive for anti RNP antibody.

(98%)および正常人44名中の40名(91%)に陽性であった。以上の本抗体の発現頻度は各疾患群の間で有意差を認めず, RA に対する疾患特異性もなかった。しかし, RA と正常人を比較すると, RAの抗RANA 沈降線の方が明瞭に観察されやすい傾向が存在した。そこで, RAと正常人における抗RANA抗体の力価を測定してみた(Fig.2)。その結果RAにおける本抗体の力価の幾何平均は24.8倍であり, 正常人の14.6倍より有意に高力価であった($P < 0.05$)。しかし, 力価のメディアンは両群ともに16倍と等しく, また分布から見ても, 臨床的に有用な差とは考えられなかった。

次にRANA の有無を各種臓器, および培養株細胞の抽出液において検討した (Table 2)。RANA は, 従来より非ヒストン核蛋白抗原に対する抗体の検出に用いられてきた, 家兔胸腺, ラット肝, 仔牛胸腺, ヒト脾臓およびヒト肝の抽出液には認められなかった。一方, 今回検討したりンパ球株細胞のうち, Raji と B95-8の2種類に認められたが, MT-1 と BL には認められなかった。

培養されたBリンパ球株細胞には, EBV の持続感染があり, EBNA が陽性であることが従来より知られているので²⁶⁾, RANA と EBNA の関係につき検討を加えた。まず形態学的に比較すると, RANA は Raji 細胞を核材とするF-AT によって, 核および細胞質に分布する, 疎な斑点状の抗原として認められた (Fig. 3)。

この蛍光所見は輝度が低いいため, 400倍以上の強拡大で観察する必要があった。一方, EBNA は ACIF によって, Raji細胞の核にのみ限局した明瞭な speckled pattern を示し(Fig. 4), RANA の蛍光所見と明らかに異っていた。なお, F-AT では EBNA に相当する核の蛍光は見られず, 逆に ACIF では RANA に相当する疎な斑点は認められなかった。

次いで, 蛍光抗体法における固定法の面から, RA-

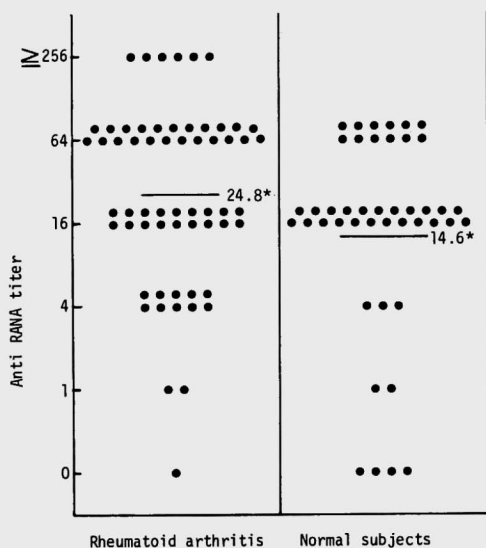


Fig. 2. Anti RANA titers determined by immunodiffusion in 60 patients with rheumatoid arthritis and in 44 normal subjects.

* Significant difference in geometric mean titers ($P < 0.05$, Wilcoxon's rank sum test).

NA と EBNA の性状の差を検討した (Table 3). RANA は 37°C 熱固定によって、比較的弱い蛍光として認められたが、acetone/methanolで固定すると蛍光は全く消失した。一方 EBNA は acetone/methanol 固定によって強く陽性で

Table 2. Presence of SS-A, SS-B antigens and RANA in extracts from various organs or cell lines.

	SS-A	SS-B	RANA
Rabbit thymus (15.1)*	-	+	-
Rat liver (46.3)	-	+	-
Calf thymus (42.0)	+	+	-
Human spleen (43.8)	+	+	-
Human liver (33.3)	+	+	-
Raji (17.5)	+	+	+
B95-8 (13.3)	+	+	+
MT-1 (13.8)	+	+	-
BL (17.3)	+	+	-

* Protein concentration (mg/ml).

あったが、 37°C 熱固定では輝度が減弱した。

ヒトおよびマーマセットに由来する 4 種のリンパ球株細胞を用いて、RANA と EBNA の抗原分布を比較した (Table 4). RANA は、F-AT によっても Bリンパ球由来の Raji と B95-8 にのみ検出され、Tリンパ球由来の MT-1 には陰性であった。しかも日本人 Burkitt リンパ腫由来の Bリンパ球株細胞 BL にも RANA は認められなかった。他方 EBNA は ACIF によって Raji と B95-8 に陽性で、MT-1 と BL には陰性であった。すなわち、RANA の抗原分布は EBNA の抗原分布と完全に一致した。

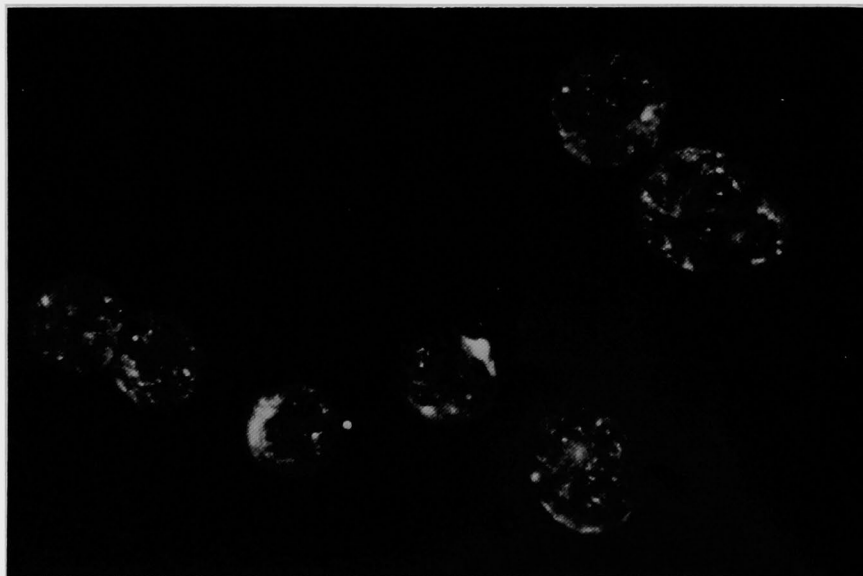


Fig. 3. Indirect immunofluorescence on Raji cells with anti RANA serum showing discrete speckled staining distributed in both nucleus and cytoplasm.

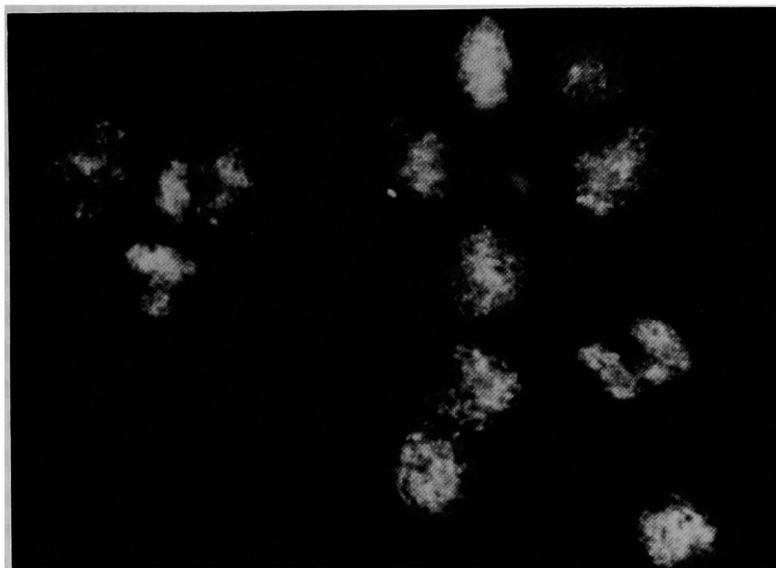


Fig. 4. Anti complement immunofluorescence on Raji cells showing speckled nuclear staining with anti EBNA serum.

Table 3. Intensity of immunofluorescent staining for RANA and EBNA on Raji cells fixed with acetone/methanol or heat.

Staining method	Raji cells fixed with	heating at 37°C for				
		acetone/methanol	heating at 37°C for			
			0 min.	15 min.	30 min.	60 min.
RANA FAT*	-	+	++	++	++	
EBNA ACIF**	+++	+	+	+	±	

* Indirect fluorescent antibody technique.

** Anticomplement immunofluorescence.

Table 4. Presence of RANA and EBNA in 4 lymphoblastoid cell lines derived from humans and a marmoset.

	Lymphocyte population	RANA detected by immunofluorescence	EBNA detected by anti complement immunofluorescence
Raji	B	+	+
B95-8	B	+	+
MT-1	T	-	-
BL	B	-	-

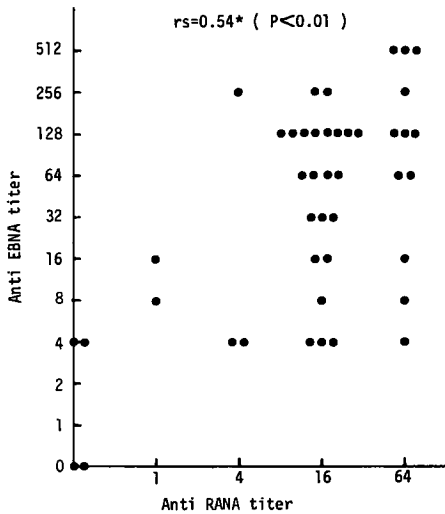


Fig. 5. Correlation between anti EBNA titers and anti RANA titers in 44 normal subjects.

* Spearman's rank correlation coefficient.

以上のように、RANA と EBNA が密接に関連した抗原であることが明らかとなったため、次に、抗 RANA 抗体と抗 EBNA 抗体の関係を正常人44名の血清を用いて検討した(Fig.5)。その結果、抗 RANA と抗 EBNA の力価は $rs = 0.54$ ($P < 0.01$) という正の相関を示した。

考 察

RANA は、従来同定されてきた SS-A, SS-B 抗原等の非ヒストン核蛋白抗原と異なり、培養リンパ球株細胞、しかも EBNA 陽性の B リンパ球株細胞にのみ認められた。なお、日本人 Burkitt リンパ腫由来の B リンパ球株細胞 BL には EBNA は陰性とされているが²⁰⁾、今回 EBNA と同様に RANA も陰性であることが確認された。Alspaugh らによると、RANA は培養リンパ球株細胞、Raji と WiL-2 にのみ存在し、各種臓器には検出されず⁵⁾、さらに B リンパ球株細胞である、WiL-2, HCL-3/B95-8, 531-H, B95-8, 1605-S に各々 RANA と EBNA が同時に存在し、T リンパ球株細胞 MLC-1 には両者とも陰性であるとしているが⁶⁾、今回の検討の結果とよく一致していた。

今回、抗 RANA 抗体の検出に用いた Raji 細胞は、Burkitt リンパ腫由来の株細胞であり²⁷⁾

viral capsid antigen (VCA)²⁸⁾を持たず、また通常の培養状態では early antigen²⁹⁾も産生しないが、EBNA 陽性の細胞であり²⁶⁾、しかも EBV の DNA を有することが明らかにされている³⁰⁾。EBNA は EBV virion の有無にかかわらず、EBV genome 陽性のリンパ球株細胞に出現し、細胞レベルでの EBV 感染のマーカーと考えられている²⁶⁾。

以上より、RANA も EBNA と同様に、EBV 感染に関連して、培養 B リンパ球に誘導される抗原と考えられる。これは、正常人の末梢血リンパ球に *in vitro* で EBV 感染を起こした時のみ、RANA が発現するという報告で確認されている⁶⁾。

RANA は 56°C 60 分間の熱処理に耐えるとされているが¹⁾、今回さらに、本抗原は 80°C 10 分間の処理でも抗原性を失わないことが判明した。一方 EBNA に関しては、80°C 10 分間の熱処理でも安定であり³¹⁾、80°C 30 分間の熱処理で 6 ~ 9 倍に精製されると報告されており³²⁾、両抗原の耐熱性はきわめて類似していた。

しかし、RANA はオクタロニー法と FAT で検出される抗原であり⁵⁾、一方 EBNA は ACIF で検出される抗原である²⁶⁾。形態学的にも、RANA は核と細胞質に分布する discrete speckle であり⁵⁾、EBNA は核に局限した fine speckled pattern を示す²⁶⁾。しかも RANA は 37°C 熱固定によってのみ認められる抗原であり⁵⁾、一方 EBNA は acetone²⁶⁾ または acetone/methanol 固定した核材に検出される。また、37°C 熱固定は ACIF による EBNA の輝度を低下させることが知られており³³⁾、FAT による RANA の所見は、EBNA の一部が変化して、蛍光が増強したものとは考えにくい。以上の蛍光抗体法による RANA と EBNA に関する知見は、今回の検討の結果とよく一致していた。

なお Slovin らは、WiL-2 と Raji の同調培養を行ない、EBNA は S 期に最も強く、RANA は G1 期に最も強く表現される抗原であり³⁴⁾、また、Raji, Daudi, RPMI 4098 をネズミの株細胞と融合させ、EBNA のみ陽性または RANA のみ陽性の細胞を作るのに成功したという³⁵⁾。以上のように、RANA と EBNA は共に EBV

感染に関連しているが, 現時点では異なる抗原と考えられた。

さて, 抗 RANA 抗体は RA の98%を初めとして, 各種膠原病, 乾燥症候群に全て90%以上の高頻度に出現し, さらに正常人の91%にも検出され, 従来の非ヒストン核蛋白抗体の疾患分布¹⁷⁾²³⁾³⁶⁾とは全く異っていた。この抗 RANA 抗体の出現様式は, 米国および英国における, 本抗体の報告と全く異なっている。特に欧米における正常人での頻度に注目してみると, オクタロニー法では6/71(8%)⁵⁾, 12/48(25%)⁷⁾, 8/34(23%)⁹⁾, 3/53(6%)¹⁰⁾, 1/16(6%)または6/71(8%)¹¹⁾と全て低率であった。これらの報告が低頻度なものは, オクタロニー法において1.0%という高濃度の agarose を使用しているため⁵⁾⁷⁾¹¹⁾, 弱い沈降線を見逃している可能性が考えられる。今回も0.4%の agarose 板を用いて, 明らかに認められる沈降線が, 1.0%では消失することを経験している。また使用する抗原にも問題があり, Alspaughらは6 mg/mlという低濃度の抗原を使用しているため¹¹⁾, 正常人で検出力が低いことも考えられる。一方, FATによる正常人での抗 RANA 抗体の検討では, Ngらは8/50(16%)と低頻度であるが³⁷⁾, Catalanoらは26/34(76%)⁹⁾というやや高い値を報告している。ただし, Catalano自身が指摘しているように³⁸⁾, FATのパターンのみで, 抗 RANA 陽性とするのは, 疑問が残るところである。

一方, 抗 RANA の力価を, RA と正常人において比較すると, オクタロニー法でも¹⁰⁾, FATでも³⁷⁾, 共に RAの方が有意に高力価であったと報告されている。しかし, 今回の日本人における検討では, 力価の平均値に関してはRAの方が正常人よりも高力価であったが, メディアンでは両群とも等しく, 分布も大部分が重複しており, 臨床的に有用な差とは考えられなかった。また抗 RANA は抗 EBNA と同様に, 伝染性単核症患者の血清に出現する抗体であり, さらに抗 VCA 抗体とも有意の関連を示しているという⁸⁾。FATによる抗 RANA の力価は, 抗 EBNA のそれと正の相関を示すとされているが⁹⁾, 今回のオクタロニー法による抗 RANA と抗 E-

BNA の力価の間にも, 同様に正の相関が認められた。

以上のように, 本邦において, 抗 RANA 抗体は, RA またはその他の膠原病に何ら臨床的意義を持たず, 単に過去の EBV 感染を示しているにすぎないと考えられた。さて, EBV は抗 VCA 抗体を指標にして検討すると, 日本人において, 3~4才までに約80%の正常人に感染するとされている³⁹⁾。一方米国では, 大学新生で26~38%, 在学生48%, 卒業生64%と感染の機会が遅いという⁴⁰⁾。結局, 日本人の抗 RANA 抗体の陽性頻度が, 従来の欧米の報告よりもきわめて高いのは, 検出方法の差もあるが, 主として EBV 感染の民族差によるところが大きいと考えられた。

結 論

蛍光抗体法とオクタロニー法を用いて, 抗 RANA 抗体について検討した結果, 以下のことが判明した。

1. 抗 RANA 抗体は, RA 60例中59例(98%)に出現した他, 各種膠原病にもすべて90%以上の高頻度で認められ, さらに正常人44名中40名(91%)の血清にも陽性であった。
2. RAにおける, 抗 RANA 抗体の平均力価は24.8倍であり, 正常人の14.6倍よりも有意に高力価であったが ($P<0.05$), メディアンは両群とも16倍と等しく, 分布も重複しているため, 臨床的に有意な差とは考えられなかった。
3. 正常人血清を用いて, 抗 RANA と抗 EBNA の関係を検討すると, $rs=0.54$ ($P<0.01$)という正の相関が得られた。
4. RANA は, 従来の非ヒストン核蛋白抗体の検出に用いられてきた, 各種臓器抽出液には含まれず, EBNA 陽性の培養 B リンパ球株細胞にのみ認められた。
5. RANA と EBNA は, EBV によって誘導される, 2種類の抗原と考えられた。
6. 抗 RANA 抗体は, 抗 EBNA 抗体と同じく, EBV 感染の1つの指標と考えられた。

稿を終るにあたり, 終始御指導と御校閲を頂いた, 大藤真学長, 太田善介教授ならびに宮脇昌二講師に

深謝いたします。

(本論文の要旨は昭和56年第25回日本リウマチ学会において発表した。)

文 献

1. Alspaugh, M.A. and Tan, E.M.: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 55, 1067—1073, 1975.
2. Alspaugh, M.A., Talal, N. and Tan, E.M.: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 19, 216—222, 1976.
3. Alspaugh, M.A., Buchanan, W.W. and Whaley, K.: Precipitating antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome, rheumatoid arthritis, and other organ and nonorgan-specific autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 37, 244—246, 1978.
4. 宮脇昌二, 小豆沢秀夫, 古田嘉男, 他: シェーグレン症候群—抗核抗体を中心として—。免疫と疾患 1, 477—481, 1981.
5. Alspaugh, M.A. and Tan, E.M.: Serum antibody in rheumatoid arthritis reactive with a cell-associated antigen. *Arthritis Rheum.* 19, 711—719, 1976.
6. Alspaugh, M.A., Jensen, F.C., Rabin, H. and Tan, E.M.: Lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus. Induction of nuclear antigen reactive with antibody in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 147, 1018—1027, 1978.
7. Catalano, M.A., Carson, D.A., Slovin, S.F., Richman, D.D. and Vaughan, F.H.: Antibodies to Epstein-Barr virus-determined antigens in normal subjects and in patients with seropositive rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 5825—5828, 1979.
8. Catalano, M.A., Carson, D.A., Niederman, J.C., Feorino, P. and Vaughan, J.H.: Antibody to the rheumatoid arthritis nuclear antigen. Its relationship to in vivo Epstein-Barr virus infection. *J. Clin. Invest.* 65, 1238—1242, 1980.
9. Catalano, M.A., Carson, D.A., Stastny, P., Freer, S. and Vaughan, J.H.: Correlation between anti-RANA and anti-EBNA titers in normal subjects with and without HLA-DRw4. *Arthritis Rheum.* 23, 1049—1052, 1980.
10. Ferrell, P.B., Aitchison, C.T., Pearson, G.R. and Tan, E.M.: Seroepidemiological study of relationships between Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 67, 681—687, 1981.
11. Alspaugh, M.A., Henle, G., Lennette, E.L. and Henle, W.: Elevated levels of antibodies to Epstein-Barr virus antigens in sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 67, 1134—1140, 1981.
12. Ropes, M.W., Benett, G.A., Cobb, S., Jacox, R. and Jessar, R.A.: Revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. *Bull. Rheum. Dis.* 9, 175—176, 1958.
13. Cohen, A.S., Raynold, W.E., Franklin, E.C., Kuluka, J.P., Ropes, M.W.: Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull. Rheum. Dis.* 21, 643—648, 1971.
14. Medsger, T.A., Dawson, W.N. and Masi, A.T.: The epidemiology of polymyositis. *Am. J. Med.* 48, 715—723, 1970.
15. Medsger, T.A. and Masi, A.T.: Epidemiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Ann. Intern. Med.* 74, 714—721, 1971.
16. Sharp, G.C., Irvin, W.S., Tan, E.M., Gould, R.G. and Holman, H.R.: Mixed connective tissue disease—an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody: an extractable nuclear antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52, 148—159, 1972.

17. 河本紀一, 宮脇昌二, 倉田典之, 大藤真: MCTD の臨床免疫学的研究. *リウマチ* 19, 310—319, 1979.
18. 厚生省特定疾患・シェーグレン病調査研究班: シェーグレン病診断基準. 昭和52年度研究業績 6, 1978.
19. Miller, G. and Lipman, M.: Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70, 190—194, 1973.
20. 永瀬恵, 濃野信, 榎原幸二, 他: パーキットリンパ腫腹水細胞からの培養細胞株樹立. *小児科臨床* 33, 602, 1980.
21. Miyoshi, I., Kubonishi, I., Sumida, M., Yoshimoto, S., Hiraki, S., et. al: Characteristics of a leukemic T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 9 (suppl), 485—494, 1979.
22. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265—275, 1951.
23. Kurata, N. and Tan, E.M.: Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counter immunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum.* 19, 574—580, 1976.
24. Henle, G., Henle, W. and Horwitz, C.A.: Antibodies to Epstein-Barr virus associated nuclear antigen in infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 130, 231—239, 1974.
25. 柏木力: 統計ライブラリー; 医学統計解析. 朝倉書店, 東京, 1979.
26. Reedman, B.M. and Klein, G.: Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer* 11, 499—520, 1973.
27. Pulvertaft, R.J.V.: A study of malignant tumors in Nigeria by short-term tissue culture. *J. Clin. Pathol.* 18, 261—271, 1965.
28. Henle, G. and Henle, W.: Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.* 91, 1248—1256, 1966.
29. Henle, G., Henle, W. and Klein, G.: Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus-infected cells. *Int. J. Cancer* 8, 272—282, 1971.
30. Zur Hausen, H. and Schulte-Holthausen, H.: Presence of EB virus nucleic acid homology in a "virus-free" line of Burkitt tumor cells. *Nature (Lond.)* 227, 245—248, 1970.
31. Matsuo, T., Nishi, S., Hirai, H. and Osato, T.: Studies on Epstein-Barr virus related antigens. II. Biochemical properties of soluble antigen in Raji Burkitt lymphoma cells. *Int. J. Cancer* 19, 364—370, 1979.
32. Baron, D. and Strominger, J.L.: Partial purification and properties of the Epstein-Barr virus associated nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 253: 2875—2881, 1978.
33. Favart, A.M., Lamy, M.E. and Burtonboy, G.: Epstein-Barr virus (EBV) intracellular antigens: Factors affecting the patterns of immunofluorescence. *Arch. Virol.* 65, 337—346, 1980.
34. Slovin, S.F., Vaughan, J.H. and Carson, D.A.: Changes in the expression of two Epstein-Barr virus associated antigens, EBNA and RANA, during the cell cycle of transformed human B lymphoblasts. *Int. J. Cancer* 26, 9—12, 1980.
35. Slovin, S.F., Glassy, M.C., Catalano, M.A., Curry, R and Ferrone, S.: Dissociation of two Epstein-Barr virus-associated transformation antigens, EBNA and RANA, in human-rodent somatic cell hybrids. *Arthritis Rheum.* 23, 748, 1980.
36. Notmann, D.D., Kurata, N. and Tan, E.M.: Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann. Intern. Med.* 83, 464—469, 1975.
37. Ng, K.C., Brown, K.A., Perry, J.D. and Holborow, E.J.: Anti-RANA antibody: A marker for seronegative and seropositive rheumatoid arthritis. *Lancet* 1, 447—449, 1980.

38. Catalano, M.A., Slovin, S.F. and Freer, S.S.: Anti-RANA antibody and rheumatoid arthritis. *Lancet* 1, 824, 1980.
39. Hinuma, Y., Ohta-Hatano, R., Suto, T. and Numazaki, Y.: High incidence of Japanese infants with antibody to a herpes-type virus associated with cultured Burkitt lymphoma cells. *Jpn. J. Microbiol.* 13, 309—311, 1969.
40. Niederman, J.C., Evans, A.S., Subrahmanyam, L. and McCollum, R.W.: Prevalence, Incidence and persistence of EB virus antibody in young adults. *N. Engl. J. Med.* 282, 361—365, 1970.

**Antibodies to rheumatoid arthritis nuclear antigen (RANA)
in patients with collagen diseases, sicca complex and in normal subjects.**

Yoshio FURUTA

The Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School.

(Director : Prof. Z. Ota)

Antibodies to rheumatoid arthritis nuclear antigen(RANA) were detected with a double immunodiffusion technique in 0.4% agarose using saline soluble extract from cultured Raji cells as a cellular antigen.

Anti RANA antibody was found in 59 of 60(98%) sera from patients with rheumatoid arthritis(RA), 43 of 45(96%) with systemic lupus erythematosus, all 10(100%) with polymyositis or dermatomyositis, all 6(100%) with sclerodermatomyositis, 16 of 17(94%) with scleroderma, 20 of 21(95%) with mixed connective tissue disease, all 32(100%) with undifferentiated connective tissue disease having anti RNP antibody, 44 of 45(98%) with sicca complex and 40 of 44(91%) from normal subjects. There was no significant difference among the prevalence of this antibody.

Anti RANA titers were compared between RA patients and normal persons. The geometric mean titer in RA patients was 24.8 and that in normal subjects was 14.6. The former was significantly higher than the latter($P < 0.05$). The median of the titers, however, was 16 in both groups and the difference of the titers between two groups was not considered to be useful in clinical diagnosis. The correlation coefficient between anti RANA titers and the titers of antibodies to Epstein-Barr nuclear antigen(EBNA) was 0.54($P < 0.01$) in 44 normal subjects.

RANA was detected in extracts from B lymphoblastoid cell lines, Raji and B95-8, and was not present in extracts from B lymphoblastoid cell line, BL, or T lymphoblastoid cell line, MT-1. Raji and B95-8 contained EBNA but BL and MT-1 did not.

The present study suggests that anti RANA antibody is closely related to anti EBNA antibody. The presence of anti RANA antibody might suggest prior infection with Epstein-Barr virus.