

Epstein-Barr Virus and Inflammatory Bowel Disease

Attention has recently been focused on the similarities between Crohn's disease (granulomatous ileitis and colitis) and sarcoidosis, an anergic disorder known to be associated with elevated titers of antibody to the Epstein-Barr virus (EBV)¹. The non-caseating granulomata found in both disorders are indistinguishable and there appears to be marked impairment of in vitro transformation of peripheral lymphocytes to several mitogens in Crohn's disease as well as in sarcoidosis². Furthermore, a significant number of patients with Crohn's disease in England are reported to be Kveim positive.^{3,4} In light of these findings a study was undertaken to determine the incidence and distribution of titers of antibody to EBV in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis⁵.

Methods. Serum. Serum specimens were collected from patients demonstrating the clinical, radiological and pathological criteria of Crohn's disease and ulcerative colitis at the Mount Sinai Hospital of New York. Control specimens were collected from healthy age and sex matched normal donors. Samples were allowed to clot, serum removed and the sera were then stored at -20°C until used.

Immunofluorescence. The methods used to determine EBV antibody titers have been described in detail elsewhere⁶. A culture of the P₃J clone of Jijoye cell line, which had previously been demonstrated by electron microscopy to be heavily infected with EBV, was used as a source of antigen. The cells were air dried on slides, fixed for 10 min in acetone at room temperature and then stored at -20°C until use. Four-fold dilutions of sera were reacted with the fixed cells for 1 h at 37°C in a moist chamber. The slides were washed for 5 min in each of two changes of phosphate buffered saline solution (PBS), rinsed in distilled water and allowed to dry. Next, fluorescein-conjugated goat antihuman IgG was applied to each antigen well for 1 h at 37°C. The anti-human IgG preparation (goat) employed was obtained from Hyland Laboratories and diluted 1:30 in PBS before use. The slides were washed again, counterstained for 5 min with 0.005% Evans Blue, and covered with 50% glycerine in PBS. They were viewed with a Zeiss Ultraphot Fluorescence Microscope with a BG 12 excitor filter and a colorless barrier filter.

Results. Anti-EBV antibody titers were determined in 93 normal individuals, 32 patients with Crohn's disease and 17 patients with ulcerative colitis. 81% of the Crohn's disease sera and 82% of the ulcerative colitis sera contained detectable levels of antibody to EBV. There was no apparent difference in overall incidence of anti-EBV antibody in patients with inflammatory bowel disease when compared to 76% positive titers in the normal

controls. Titers of antibody to EBV of 1:640 or greater were found in 24% of the normal sera. 3% of Crohn's disease titers and 11% of the ulcerative colitis sera were 1:640 or greater (Table). These differences are not significant with a *P* value of ≥ 0.5 . Incidence and distribution of anti-EBV antibody appeared to have no relationship to the sex of the individual. Steroid therapy did not significantly influence anti-EBV reactivity. The percentage of individuals in all groups with positive antibody titers increased with age and the length of time that disease was present.

Discussion. The Epstein-Barr virus (EBV) originally found in Burkitt's lymphoma cells maintained in long term tissue cultures⁷, appears to be ubiquitous with antibodies to the virus found in most populations⁸. Higher percentages of patients with antibody to EBV as compared to normal individuals have been reported in an increasing number of diseases including: Burkitt's lymphoma⁹, carcinoma of the posterior nasal space¹⁰, infectious mononucleosis^{6,11,12}, sarcoidosis¹, systemic lupus erythematosus¹³ and leprosy¹⁴. In Crohn's disease, a disorder with many features in common with sarcoidosis, we would expect to find in these patients 100% incidence of anti EBV antibody at high titer. Our data, nevertheless, show that patients with Crohn's disease have an incidence and distribution of antibody to EBV similar to normal individuals. Although some patients with Crohn's disease have been reported to be Kveim positive^{3,4}, many patients are known to be Kveim negative^{15,16}. This is of interest in view of the recent suggestion that Kveim positivity may be related to lymphadenopathy¹⁷. Despite impairment of cell-mediated immunity, patients with Crohn's disease may lack proliferative lymphocyte responses thought to favor EBV replication¹⁸. Indeed a significant number do have an absolute lymphopenia (unpublished

Anti-EBV antibody in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease

Diagnosis	Number tested	Number with detectable antibody (>1:10)	Percentage with detectable antibody	Percentage with EBV antibody titer $\geq 1:640$
Normal	93	71	76	24
Crohn's disease	32	26	81	3
Ulcerative disease	17	14	82	11

¹ Y. HIRSHAUT, P. GLADE, L. O. B. VIERRA, E. AINBENDER, B. DVO-
RAK and L. E. SILTZBACH, *N. Engl. J. Med.* 283, 502 (1970).
² S. M. BROWN, R. N. TAUB, D. H. PRESENT and H. D. JANOWITZ,
Lancet 1, 1112 (1970).
³ D. N. MITCHELL, P. CANNON, N. H. DYER, K. F. W. HINSON and
J. M. T. WILLOUGHBY, *Lancet* 2, 571 (1969).
⁴ D. N. MITCHELL, P. CANNON, N. H. DYER, K. F. W. HINSON and
J. M. T. WILLOUGHBY, *Lancet* 2, 496 (1970).
⁵ H. GROTSKY, P. R. GLADE, Y. HIRSHAUT, D. SACHAR and H. D.
JANOWITZ, *Lancet* 2, 1256 (1970).
⁶ Y. HIRSHAUT, P. GLADE, H. MOSES, R. MANAKER and L. CHESIN,
Am. J. Med. 47, 520 (1969).
⁷ M. A. EPSTEIN, B. G. ACHONG nad Y. M. BARR, *Lancet* 1, 702
(1964).
⁸ W. HENLE, G. HENLE, H. C. HO, P. BURTIN, V. CACHIN, P. CLIF-
FORD, A. SCHRYVER, G. DE-THE, V. DIEHL and G. KLEIN, *J. natn.*
Cancer Inst. 44, 225 (1970).
⁹ G. HENLE and W. HENLE, *J. Bact.* 91, 1248 (1966).
¹⁰ L. J. OLD, E. A. BOYSE, H. F. OETTGEN, E. DEHARVEN, G. GEE-
RING, B. WILLIAMSON and P. CLIFFORD, *Proc. natn. Acad. Sci.* 56,
1699 (1966).
¹¹ G. HENLE, W. HENLE and V. DIEHL, *Proc. natn. Acad. Sci.* 59, 94
(1968).
¹² J. C. VIEDERMAN, R. W. MCCOLLUM, G. HENLE and W. HENLE, *J.*
Am. med. Ass. 203, 205 (1968).
¹³ A. S. EVANS, N. F. ROTHFIELD and J. C. NIEDERMAN, *Lancet* 1, 167
(1971).
¹⁴ P. PAPAGEORGIOU, C. SOROKIN, K. KAUZOUTZAKOGLU and P. R.
GLADE, *Nature* 237, 47 (1971).
¹⁵ L. SILTZBACH and J. C. EHRLICH, *Am. J. Med.* 16, 790 (1954).
¹⁶ W. J. WILLIAMS, *Gut* 6, 503 (1965).
¹⁷ H. L. ISRAEL and R. A. GOLDSTEIN, *N. Engl. J. Med.* 284, 345 (1971).
¹⁸ P. R. GLADE and K. HIRSCHHORN, *Cell. Immun.* 7, 359 (1970).

data). We suspect that both lymphoreticular proliferation as well as impaired delayed-type hypersensitivity are required for elevated EBV antibody titers.

KANE and NYE¹⁹ have recently confirmed our preliminary report that the EBV antibody titers in Crohn's disease patients in England are also normal. It would be of interest to correlate the titers of anti-EBV antibody in this group of Crohn's disease patients with Kveim reactivity. We suspect that those patients with Crohn's disease who are Kveim positive will have higher levels of anti-EBV antibody than Kveim negative patients.²⁰

Zusammenfassung. Die Häufigkeit und der Antikörpertiter gegen Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde in Patienten mit Ulkus-Colitis und Crohn's Krankheit, eine granulomatische Abnormalität ähnlich zur Sarkoidose, untersucht und normale Häufigkeit und Antikörpertiter gegen EBV bei ihnen gefunden.

H. W. GROTSKY²¹, Y. HIRSHAUT²²,
C. SOROKIN, D. SACHAR, H. D. JANOWITZ
and P. R. GLADE²³

Division of Infectious Diseases, Department of Pediatrics, Division of Gastroenterology, Department of Medicine, The Mount Sinai School of Medicine of the City University of New York, 3 East 100th Street, New York, (N.Y. 10029, USA), and Division of Cell Biology, Sloan Kettering Institute for Cancer Research, New York (N.Y., USA), 14 June 1971.

¹⁹ S. P. KANE and F. J. NYE, *Lancet* 1, 233 (1971).

²⁰ Supported by Research Contract No. NIH-69-2078 within the Special Virus Cancer Program of the National Cancer Institute, National Institutes of Health, USPHS, National Institutes of Health Grant No. AM 05126 and the National Foundation for Ileitis and Colitis, Inc., New York, New York.

²¹ Dr. GROTSKY is a recipient of a National Institutes of Health Graduate Training Grant in Gastroenterology, No. AM 05126.

²² Dr. HIRSHAUT is a recipient of a National Cancer Institute Grant No. CA 08748 and a grant from the New York Cancer Research Institute.

²³ Dr. GLADE is a recipient of a Research Career Development Award No. A1-46371 of the USPHS.

Über eine Synthese von Ecdyson-³H und Ecdysteron-³H aus Cholesterin-³H in geschnürten Abdomina von *Mamestra brassicae*-Raupen

In einer früheren Untersuchung hatte sich ergeben, dass die Prothoracaldrüsen durch das Gehirnhormon bzw. den Aktivationsfaktor erwartungsgemäss zwar zu erhöhter RNS-Synthese stimuliert wurden, dass aber entgegen den Erwartungen das Häutungshormon Ecdyson bzw. Ecdysteron nicht nachzuweisen war¹. Statt dessen trat eine signifikante Erhöhung an ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu nicht-stimulierten Drüsen auf.

Im Hinblick auf die allgemein angenommene Vorstellung von der Bedeutung der Prothoracaldrüse als Bildungsort des Häutungshormons² ist zunächst die Annahme zur Erklärung des unerwarteten Ergebnisses am wahrscheinlichsten, dass die hier produzierte Hormonmenge unter der mit der angewandten Technik erfassbaren Nachweisgrenze liegt. Generell muss aber auch die Denkmöglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Bildung des Häutungshormons nicht allein in der Prothoracaldrüse stimuliert wird. Für eine solche Schlussfolgerung lassen sich die Befunde von PIEPHO³ an *Galleria mellonella* und von CHADWICK⁴ an *Periplaneta americana* anführen. Bei beiden Objekten erfolgten auch nach experimenteller Exstirpation der Prothoracaldrüsen weitere Häutungen, in einigen Fällen sogar bis zur Imago. Diese Befunde standen bisher stets am Rande der Diskussionen, weil sie sich schwer in das allgemeine Vorstellungsschema einordnen liessen und weil daher eine gewisse Skepsis gegenüber der in den Experimenten erzielten totalen Exstirpation der Drüsen bestand.

Eigene Nachuntersuchungen sowohl an *Galleria mellonella* als auch an *Periplaneta americana* führten an einem verhältnismässig umfangreichen Material zur uneingeschränkten Bestätigung der genannten Ergebnisse. Von 158 operierten Raupen von *Galleria mellonella* häuteten sich 44 trotz der Drüsenexstirpation zur Puppe, wovon sich weiterhin 4 darüber hinaus zum Falter entwickelten. Von 187 operierten Larven von *Periplaneta americana*, die die Exstirpation gut überstanden, entwickelten sich 76 zu Imagines. Von diesen durchliefen dabei 23 Tiere zunächst eine Larven- und dann später die Imaginalhäutung, bei einem Tier gingen der Imaginalhäutung

zwei Larvenhäutungen voraus, und 52 Larven häuteten sich direkt zur Imago. Von den übrigen 111 Larven durchschritten 23 eine Larvenhäutung, ein Tier sogar 4 Larvenhäutungen, während sich 87 nach der Drüsenexstirpation nicht mehr häuteten⁵. Auf Grund der älteren und dieser Ergebnisse erschien eine weitere experimentelle Überprüfung der Funktion der Prothoracaldrüse in ihrer Beziehung zu den Häutungsprozessen und somit die Frage des Produktionsortes des Häutungshormons erwägenswert.

Material und Technik. Als Material wurden Raupen von *Mamestra brassicae* verwendet. Vor der kritischen Periode des 5. Stadiums wurde den Tieren eine Ligatur zwischen Thorax und 1. Abdominalsegment angelegt. 10 Tage danach wurde jeweils 5 Halbpuppen in das Hinterende 30 µC Cholesterin-³H (spez. Aktivität 3,6 C/mM, The Radiochemical Centre, Amersham) in 10% Äthanol enthaltender Ringer-Lösung appliziert. 6 Tage nach der Injektion wurden die Hämolymphe und die hämolymphefreien Hinterenden mit Äthanol extrahiert und die Extrakte dünnenschichtchromatographisch (Kieselgel G Merck, Darmstadt) aufgetrennt. Die mittels reinem, unmarkiertem Ecdyson bzw. Ecdysteron gekennzeichneten Bereiche der Häutungshormone wurden extrahiert und wiederholt chromatographiert. Nacheinander wurde mit den Laufmitteln Chloroform/Äthanol (36:9), Chloroform/Methanol/25%iger Ammoniak/Wasser (24:14:2:1) und Chloroform/Äthanol/Eisessig (6:3:1) chromatographiert. Die Radiochromatogramme wurden mit dem

¹ M. GERSCH und J. STÜRZEBECKER, *J. Insect Physiol.* 16, 1813 (1970).

² M. GERSCH, *Vergleichende Endokrinologie der wirbellosen Tiere* (Akademische Verlagsgesellschaft, Gust und Portig G.m.b.H., Leipzig 1964).

³ H. PIEPHO, *Naturwissenschaften* 35, 94 (1948).

⁴ L. E. CHADWICK, *J. exp. Zool.* 131, 291 (1956).

⁵ M. GERSCH, noch unveröffentlicht.