

L-トリプトファン製品による好酸球増多筋痛症候群(EMS) および変性ナタネ油による有毒油症候群(TOS)

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	米谷, 民雄 齋藤, 博士
巻/号	50巻6号
掲載ページ	p. 279-291
発行年月	2009年12月

総説

L-トリプトファン製品による好酸球増多筋痛症候群 (EMS) および 変性なたね油による有毒油症候群 (TOS) —EMS の大発生から 20 年—

米谷民雄^{1,*} 齋藤博士²

Eosinophilia Myalgia Syndrome (EMS) Caused by L-Tryptophan Product
and Toxic Oil Syndrome (TOS) Caused by Denatured Rape-seed Oil
—20 Years after Outbreak of EMS—

Tamio MAITANI^{1,*} and Hiroshi SAITOH²

¹School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka:
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan;

²Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, Sagamihara National Hospital,
18-1 Sakuradai, Sagamihara, Kanagawa 228-8522, Japan;

* Corresponding author

はじめに

1989 年秋に米国で好酸球増多筋痛症候群 (Eosinophilia Myalgia Syndrome; EMS) と呼ばれる事例が多数発生した。それが昭和電工が製造した L-トリプトファン (以後、トリプトファン) 製品を多量摂取していた人に多発していることが明らかにされ、原因究明のための研究が主に日本と米国で開始された。わが国においては 1990 年に原因究明委員会が設置され、また、厚生科学研究班が組織された。この厚生 (労働) 科学研究の後半期は、今後の同様な食品中毒の発生を防止し、国民の安全な食生活に寄与することを目的として、文献調査が主に実施された。しかし、2004 年度の研究課題「必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究」を最後にこの研究事業も終了し、2005 年度には食品等試験検査費による調査として単年度のみ継続されたが、ついに 2006 年 3 月末をもって、16 年間にわたり継続された研究事業が完全に終了となった。

一方、米国で多発した EMS の症状が 1981 年にスペインで発生したアニリンで変性したなたね油による有毒油症候群 (Toxic Oil Syndrome; TOS) に類似しており、また、EMS の原因物質候補として発見された化合物が TOS の原因物質とも関連するよう思われたため、後半期の厚生 (労働) 科学研究の文献調査においては、EMS と TOS の両方にまたがる文献調査が行われた。

筆者らは 1998 年から最後の 8 年間の研究を担当し、幕引きの場に立ちあったことから、この EMS と TOS について、事件発生の概要と原因究明研究のあらましについて説明させていただくことにした。トリプトファンによる EMS は遺伝子組換え食品の安全性を議論する場合には、厚生労働省の Q&A にも記載されている事例である。なお、トリプトファンによる EMS 事例の概要と国内における研究経過については、原因究明委員会責任者の内山 充先生が事件発生 10 年後の 1999 年に、食衛誌に総説¹⁾を書いておられる。そこで、20 年目となる今年 2009 年に、EMS と TOS に関する研究について、この 10 年の研究を中心に、海外の研究も含めて概説させていただくことにした。当時の状況を詳しく知るためにも、10 年前の総説¹⁾を併せお読みいただければと思う。

I. トリプトファンによる EMS

1. トリプトファンの摂取拡大と昭和電工による製造方法の変更

トリプトファンは必須アミノ酸の 1 つである。5 員環と 6 員環を併せ持つ特異的な構造から、タンパク質のらせん構造には取り込まれにくく、使用頻度が少ないアミノ酸である。遊離のトリプトファンの代謝経路はたいへん複雑であるが、最も関心が高いのはセロトニンやメラトニンに代謝される経路であろう (図 1)。この経路のため、トリプトファンは栄養学的な使用に加えて、抑うつ症や不眠症をはじめとする多くの症状に対して使用され、また、健康食品としても摂取されていた。

EMS 事例が大発生した当時、特に米国でその使用が広がっていた。市場では昭和電工製のトリプトファンが主で

* 連絡先

¹ 静岡県立大学 食品栄養科学部: 〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1

² (独)国立病院機構相模原病院 臨床研究センター: 〒228-8522 相模原市桜台 18-1

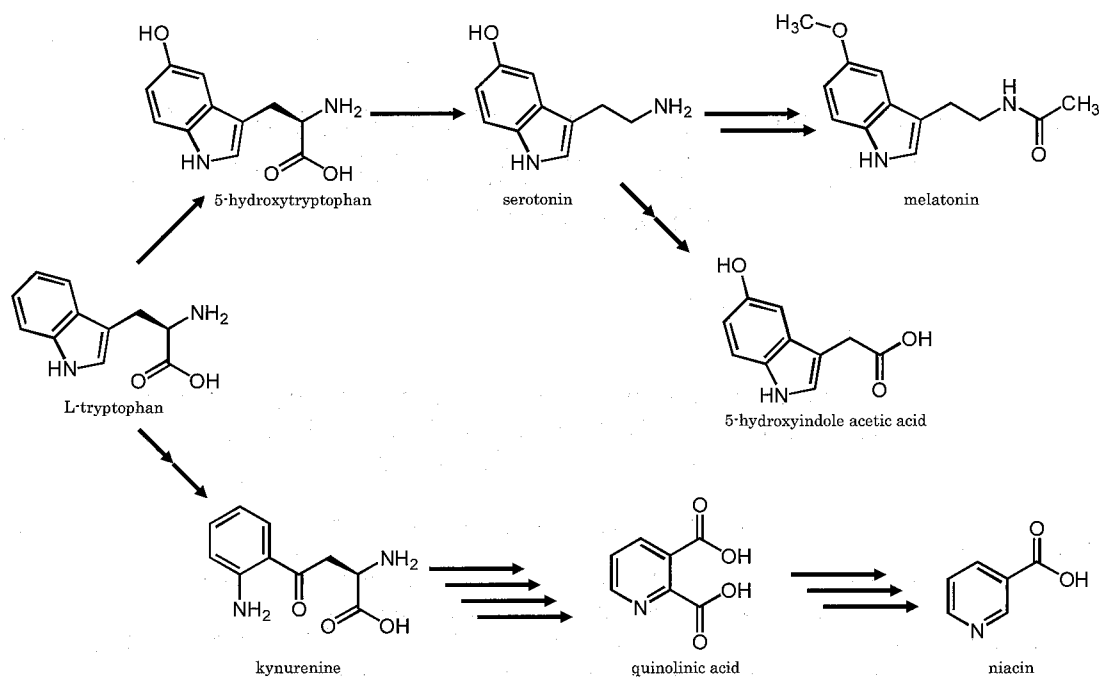


図1. L-トリプトファンの代謝経路

B. amyloliquefaciens IAM-1521 株 (東大応微研 (当時) で維持)

↓ 突然変異

第I株 (5-フルオロトリプトファン耐性)

↓ 第I株のトリプトファンオペロンのクローニング

第II株 (トリプトファンオペロン増強型)

↓ IAM-1521株のプロモーターのクローニング

第III株 (プロモーターの増強型)

↓ 第I株からのセリン遺伝子のクローニング

第IV株 (セリン遺伝子の増強型)

↓ *B. subtilis* の *prs* 遺伝子のクローニング

第V株 (PRPP 遺伝子増強型)

米国トリプトファン問題ワークショップ(1990.3.15~16)資料より作製された文献2の図1を改変

図2. 使用された菌の改良過程

あった。同社はアントラニル酸 (2-アミノ安息香酸) を前駆体とする発酵法 (前駆体法) によりトリプトファンを生産していたが、使用する菌については生産効率を上げるために、順々に改良が加えられていった。具体的な改良過程については、1990年に開催された米国トリプトファン問題ワークショップでの資料をもとに、戸田が報告している²⁾。その報告をもとに、図2に改良過程を示す。

図のように、最初に突然変異を起こさせて5-フルオロトリプトファン耐性菌を得、5-フルオロトリプトファン添加培地を用いて他の菌の生育を抑制する方法が採用されている。そのうえで、トリプトファンの生産性を向上させるために、トリプトファンオペロンやその上流のプロモーターがクローニングされ、さらに生合成経路に関与する化合物を補強するために、セリン遺伝子や *prs* 遺伝子もクローニング導入されている。セリンはトリプトファンが生成する最後の反応 (インドール+セリン) に関与している。 *prs* 遺伝子は、アントラニル酸と反応して *N*-(5'-ホス

ホリボシル)-アントラニル酸を作る5-ホスホリボシル1-ピロリン酸 (PRPP) を合成する酵素ホスホリボシルピロホスフェートシンターゼをコードする遺伝子である。なお、図2の最後の第V株を作製する際には、*Bacillus subtilis* (枯草菌) の *prs* 遺伝子が *Bacillus amyloliquefaciens* 改良菌 (IV株) に組み込まれており、同種とはいえない種の遺伝子が用いられている。

2. トリプトファン事件の発生と米国の行政的対応

1989年10月以降、米国においてEMSと呼ばれる症状が多数報告された^{3,4)}。同年11月に出版された米国疾病予防管理センター (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) の定義によれば、EMSは、

- 1) 血中好酸球数が1,000個/mm³以上
- 2) 活動不能なほどの筋肉痛
- 3) 感染症やがんの徴候がない

の3つの条件を満たすものとされている。

ちなみに、トリプトファン摂取は条件にはなっておらず、このことが後になって大きな意味を持つことになる。好酸球は大量の塩基性タンパク質を含んでおり、陰性荷電を有するエオジンとよく結合するため、eosinophilの名称がある。この好酸球増加を示す疾患には種々のものがあり、感染症や悪性腫瘍も含まれるため、3)でこれらが除外されている。そのほか、アレルギー性疾患や自己免疫疾患などでも好酸球増加を示す。

その後のCDCによる疫学調査により、EMSとトリプトファンを含む健康食品の摂取が関連づけられた。当時、FDAのDr. F. L. Joe, Jr. が私の研究室で1年間研究をしており、いろいろな情報を入手できた。

トリプトファンはセロトニンの前駆物質であり、不眠症などに対して1974年から処方されていたが、米国におい

ては健康食品としても多量摂取されるようになっていた。EMS 事例大量発生に対して米国 FDA は 1989 年 11 月 17 日に、指示どおりに摂取すると 1 日に 100 mg 以上を摂ることになるトリプトファン製品の回収を命じた。その後、100 mg 未満でも EMS 患者が発生したことから、翌年 3 月 22 日には摂取する量に関係なく対象の範囲を広げると、製造業者に命じた（ただし、乳児用調整粉乳や医療用製品などは除外とされている）^{*1}。この結果、EMS 患者の報告はほとんどなくなった。

米国での EMS 患者数は 1992 年 8 月 1 日当時 1,511 名で、死亡者は 38 名であった²⁾。患者のほとんどは non-Hispanic の白人で、8 割以上が女性であった。主な所見は名前のどおり、好酸球増加を伴う筋肉痛で、死亡理由は神経障害や心肺疾患による。患者は 2 週間から 9 年（中央値 6 か月）にわたり、1 日 500~11,500 mg（中央値 1,250 mg）のトリプトファンを摂取したという^{*2}。

3. わが国の行政的対応

わが国においても、少なくとも三重大学から 2 例、北里大学から 1 例の EMS 様患者の報告がなされている^{5)~7)}。前者では同じ医師から 1 日 1,000 mg のトリプトファンを処方され、同時に抗不安薬（マイナートランキライザー）のジアゼパムも処方されている。後者ではハワイで購入したタブレットを 3 か月服用している。

わが国においても、厚生省は 1990 年 3 月 31 日に厚生省生活衛生局食品保健課新開発食品保健対策室長通知（衛新第 21 号）として、「アミノ酸を含有する健康食品の取扱について」を通知している。その中では、「特定のアミノ酸を高濃度に含有させた健康食品を継続的に摂取するとアミノ酸バランスを損なうおそれがあるので、このような健康食品を継続的に摂取することのないよう注意すること」としている。

また 1990 年 4 月 27 日に、昭和電工と自社製トリプトファンを使用して健康食品や医薬品を製造している国内 5 社に対して、トリプトファン関連商品を回収するよう、指示を出している。その後、わが国では遺伝子組換え技術を応用した食品添加物について、指針（ガイドライン）などが示されている。参考のために、最近のものまでも含めて記しておく。1991 年 12 月 26 日には、「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の製造指針・安全性評価指針について」（衛食第 153 号）が、厚生省生活衛生局長通知で出されている。また、食品安全委員会は平成 16 年 3 月 25 日に「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」^{*3}を、その付帯書「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物のうち、アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価

の考え方」^{*4}を平成 17 年 4 月 28 日に策定している。安全性評価基準には、当然ながら「製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」や「精製方法及びその効果に関する事項」も含まれている。あくまでも遺伝子組換え技術の評価ではなく、得られた食品添加物としての安全性評価のための基準である。

4. 日米における不純物の構造研究

わが国で最初に行われた試験は、トリプトファン製品が日本薬局方および食品添加物公定書の規格に適合するかの試験であった。その結果、事件に関連するとされたロット製品についても、これらの試験に合格した。不純物の量は 0.01~0.02%（100~200 ppm）であり、一方、含量規格は過塩素酸による滴定法で 98.5% 以上（日本薬局方）および 98.0~102.0%（食品添加物公定書）であったため、この程度の量の不純物では規格に適合してしまうためである。現行規格は、一定の品質の製品を供給するためのものと考えるのであろう。筆者の 1 人 (T. M.) は 2004 年に、「錠剤、カプセル状等食品の原材料の安全性に関する自主点検フローチャート」^{*5}をまとめさせていただいたが、本事件のような微量不純物とそのフローに従った安全性点検でチェックできるかは疑問である。

その後の米国での調査で、患者が摂取したトリプトファンのほとんどが昭和電工により 1989 年中頃に製造されたロットと判明した⁸⁾ため、原因究明の初期段階では、特定の不純物を解明するための研究が中心に実施された。

原因究明委員会では、昭和電工から 40 種類のトリプトファン製品ロットを入手したが、そのうち 12 種類は CDC が発症関連ロットと認定したものであった。HPLC により不純物が多数検出されたが、発症関連ロットと対照品ロットとの比較により、2 つの不純物（UV-5 と UV-15）が注目された⁹⁾。UV-5 は、国立衛生試験所（当時）食品添加物部を中心とした 2 年間の研究の末に、3-(phenylamino)alanine (PAA) と構造決定された¹⁰⁾。

一方の UV-15 は、先に米国においてピーク E として構造決定された 1,1'-ethylidenebis(L-tryptophan) (EBT) であった。米国では、精製用活性炭の使用量を減らした時期の製品や第 V 株を使用した製品と統計的に関連するピーク E に注目して、構造解析を進めていたものである^{11), 12)}。この EBT は、トリプトファン 2 分子とアセトアルデヒドから容易に生成する。このほかに、Peak 200: 2-(3-indolylmethyl)-L-tryptophan, Peak C: 3a-hydroxy-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo-[2,-3b]-indole-2-carboxylic acid, Peak FF: 2-(2-hydroxyindoline)-tryptophan などが、EMS 関連化合物として化学構造が報告された^{13), 14)}。図 3 にそれらの構造を示す。

*1 <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00064.html>

*2 <http://emedicine.medscape.com/article/329614-overview>

*3 http://www.fsc.go.jp/senmon/idensi/gm_tenkabutu-kijun.pdf

*4 http://www.fsc.go.jp/senmon/idensi/gm_hitanpaku
http://emedicine.medscape.com/article/329614-overviewtenkabutu_kijyun.pdf

*5 <http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/mhlw/news/2005/050203/050203-9.pdf>

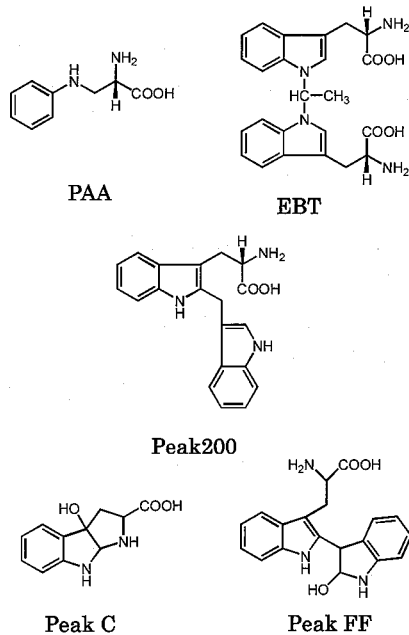


図3. 事故品トリプトファン中に見いだされた特異的不純物の構造

5. 不純物 PAA の生成原因

前述のように、PAA はわが国が最初に構造を発表した不純物である。PAA はアニリンとセリンが縮合した構造である。昭和電工ではトリプトファンの生産効率を上げるために図2のような菌の改良を行っており、第IV株以降においてはセリン遺伝子が増強されている。班会議の場でPAAの構造が示された際に、セリン遺伝子が増強されている事実を指摘すると、すぐさまTOSの原因となったアニリンと結びついて、PAAが有力な原因物質候補となった。班会議では、アニリンの由来や、アニリンとセリンが存在するだけでPAAができるかなどの議論がされた。PAAに関するその後のわが国の研究については、総説¹⁾をお読みいただきたい。その中では、アニリンの由来やアニリンとセリンの反応についても解明できたことが記載されている。

昭和電工では活性炭カラムや逆浸透膜などによる精製工程において、中間製品の脱色度などを肉眼的に判断して選択的に省略などを行っていた。現在のGMPが採用されていなかったということである。遺伝子組換え菌を使用して生産効率を上げた結果起きた事故ではあるが、この事件は遺伝子組換え食品の事故とは考えられていない。遺伝子組換えによって、生成してくる特定の不純物の量も増加したにもかかわらず、活性炭を節約しすぎたなど、精製工程を簡略化したために起きた事故とされている。ただし、「実質的同等性」(既存の対象物との比較において評価)については、大いに考えさせられる事件ではあった。

6. トリプトファンの過剰摂取と自己免疫説

トリプトファンの代謝経路は図1に示すように複数の経路がある。関心が高いセロトニンやメラトニンに代謝される経路もあるが、キヌレニン、キノリン酸に代謝される

経路もある。EMSの原因究明において、最初の研究が事故品と対照品の比較という観点から実施されたため、当初は特定の不純物の存在が注目されていた。しかし、1992年にすでにFDAは“Dear Colleague”^{*6}の中で、

①EMS患者の3~5%は明確には昭和電工製品との関連に結びつかなかったこと、

②少なくとも8例のEMS症状を示す事例が植物起源の5-ヒドロキシトリプトファン(5-OH Trp)製品と関連づけられること、

③1989~90年の大発生以前にもEMS患者が見られること、

以上から、特定の不純物はEMSの引き金を引いた未確認物質の単なるマーカーかもしれない可能性に言及し、トリプトファンの過剰摂取や、患者の免疫などの特異な性質の関与も示唆している。

実際、CDCによるEMSの定義を満たす1,345例のうち、26例(2%)はトリプトファンを使用しておらず、これらの患者は使用した事例に比べ有意に若く、大発生の時期よりも以前に発症していた可能性が高いと報告されている¹⁵⁾。また、191例(14%)のトリプトファン使用者は、大発生時期以前にすでに症状が始まっていたという。これら両群では好酸球数の増加は相対的に少なく、死亡例はない。そのため、不純物以外の原因が考えられる。

ここで筆者の1人(H.S.)が得た最近のデータを紹介させていただきたい。免疫学における近年の研究成果の1つに、免疫応答を“負”に調節することに特化した制御性T細胞(regulatory T cells; Treg)による末梢レベルでのトレランスの成立および維持の機序解明がある。自己抗原応答性T細胞は胸腺内でのnegative selectionによりおおむね除去されるが、潜在的な自己免疫惹起抗原のすべてを除去するには十分とはいえない。胸腺内で生来的に分化誘導されるnaturally-occurring Treg(nTreg)に加え、末梢で抗原特異的に分化誘導されるinducible Treg(iTreg)が相補って“トレランス”を誘導することで免疫学的恒常性が保たれていることが分かった。さらに、末梢でiTregが分化誘導されるにはトリプトファンからキヌレニンへの代謝を律速する酵素、indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO)が正常に機能することが決定的に重要である(図1参照)。マクロファージや樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞(antigen-presenting cells; APC)は免疫応答の監視員であり、IDO発現を亢進して抗原特異的なTregを誘導することで免疫病理発生を未然に防いでいる。EMS同様、著明な好酸球増多をきたす原因不明な全身性壊死性血管炎(Churg-Strauss syndrome; CSS)は重症気管支喘息患者が好酸球性肺炎(chronic eosinophilic pneumonia; CEP)を繰り返した後に発症することがあるが、CEPを繰

*6 <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/ds-ltr3.html>

“Dear Colleague” letter regarding the Research on Eosinophilia-Myalgia Syndrome and Current Regulatory Status of L-Tryptophan (Sept. 3, 1992).

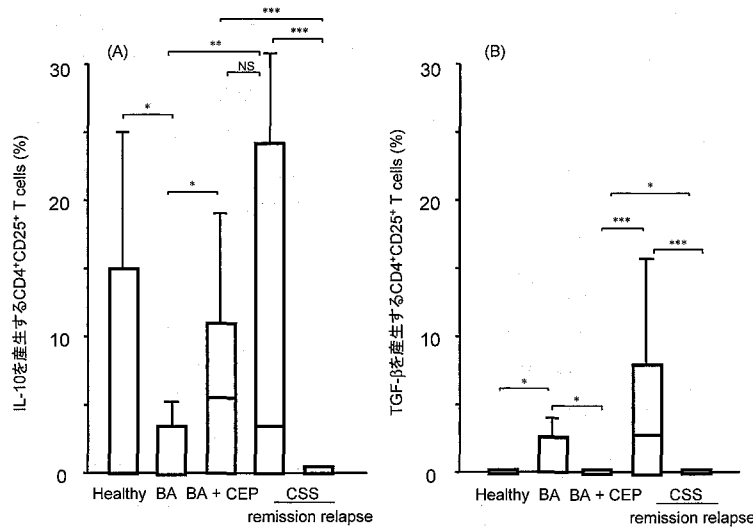


図4. Relapse期CSS患者のCD4⁺CD25⁺T cellsのIL-10, TGF-β産生能
(A) IL-10産生細胞, (B) TGF-β産生細胞, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

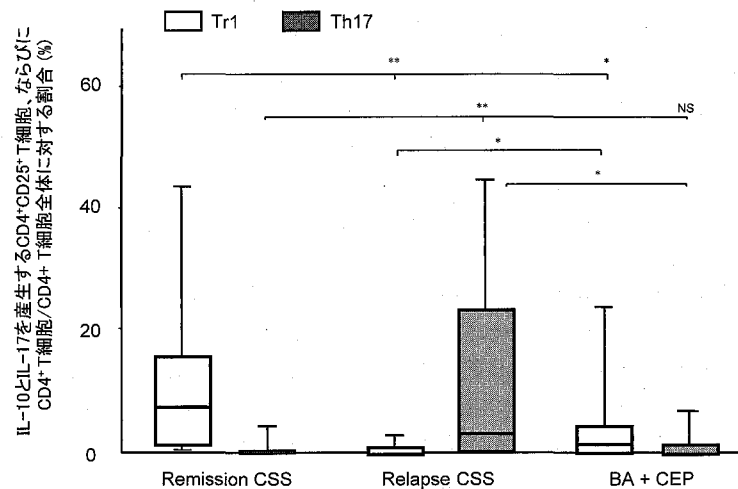


図5. CSSならびにBA+CEP患者末梢血中のTr1細胞とTh17細胞

Tr1 cellsの検出頻度はremission CSS患者で最も高く, relapse CSS患者で最低値を示した. 一方, Th17 cellsでは逆であり, BA+CEP患者ではTr1 cellsレベルはrelapse CSSに比べ有意に高かった. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

り返すもCSSを発症しない喘息患者もいる. 転写因子, forkhead box P3 (FoxP3)を発現するCD4⁺CD25⁺T cellsとして規定されるnTregの末梢血中の数を比較検討した結果, CEPを合併しない喘息(BA)患者(10.2 ± 3.5 cells/ μ L)やすべてのCSS患者(6.5 ± 2.8 cells/ μ L)に比べ, CSSを発症しなかったCEPを合併するBA患者(BA+CEP, 18.5 ± 8.5 cells/mL)が有意に多くのnTregを血中に含んでいた. しかし, CSS患者の疾患活動性を血管炎症の有無でremission期(5.2 ± 2.5 cells/ μ L)とrelapse期(7.8 ± 2.7 cells/ μ L)に分けたとき, 有意差を認めなかった. この結果は, BA+CEPやrelapse期CSS患者群での血中nTreg数の減少が好酸球増多にリンクする可能性を示唆するものの, CSSの疾患活動性を説明できないことを意味した.

次に, Interleukin (IL)-10やTGF-βを主として産生するiTregの一種であるType 1 Treg (Tr1)の疾患活動性

への関与を調べた. BA+CEP(血中検出頻度, $11.5 \pm 8.0\%$)やremission期CSS($24.5 \pm 7.3\%$)患者双方のIL-10産生能は健常人と同等であったが, relapse CSS患者ではTr1の検出頻度($0.3 \pm 0.1\%$)が激減していることを見いだした(図4)¹⁶⁾ また, CD4⁺CD25⁻エフェクターT細胞から産生されるIL-2と血中nTreg, iTreg検出割合との間には強い正の相関($n = 102$, $r_s = 0.316$, $p < 0.001$)があることやrelapse CSS患者のIL-2産生能が極めて低い($1.3 \pm 0.5\%$)こと, さらにremission期CSS患者($36.3 \pm 13.0\%$)とBA+CEP患者($26.8 \pm 8.0\%$)間には有意差がないことも分かった. この知見は, エフェクターT細胞のIL-2産生能力低下に起因するTregとりわけTr1への分化誘導抑制がCSSの病態形成に関与することを示唆する. 従前, Th1疾患と考えられていた多発性硬化症, 炎症性腸疾患や乾癬のようなヒト自己免疫疾患が新規に同定された第3のCD4⁺エフェクターT細胞(Th17)からのIL-17

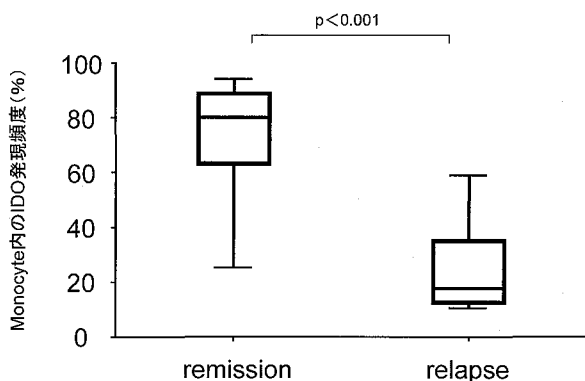


図6. CSS患者の疾患活動性と monocyte 内でのインドールアミンの発現

血管炎症の有無を基にして CSS 患者を remission ($n=12$) と relapse ($n=6$) に分け、末梢血中 monocyte 内での indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 発現を FACS で解析した。

産生に関連して発症することが指摘されている¹⁷⁾。さらに、これらの疾患は Treg と Th17 によって作られる機能的バランスからの“ずれ”をもとに発症するとの新たなパラダイムが提唱されている。BA+CEP, remission CSS, ならびに relapse CSS 患者群で調べた結果、Tr1 は remission 期 CSS で、Th17 は relapse 期 CSS で最も高く、逆に Th17 は remission 期 CSS で、Tr1 は relapse 期 CSS 患者で低かった¹⁸⁾ (図5)。

次に、疾患活動性との関連を調べるために同一 CSS 患者で調べた結果、relapse 期には Tr1 が極小値を示すとともに、Th17 は最高値を示し、remission 期 CSS 患者では Tr1 が最高値、Th17 が最低値を示した。同一患者における Treg と Th17 のバランスは APC 内の IDO 発現頻度に関連して形成され、発現亢進は Treg 優位に、その低下は Th17 へのシフトをもたらす¹⁹⁾。実際、remission 期の CSS 患者では relapse 期に比べ APC 内での IDO 発現が亢進し、Treg 優位となっていることも突き止めている^{*7} (図6)。CSS のような自己免疫様疾患の病態に関する H.S. による知見や近年のヒト自己免疫疾患の病態形成機序への理解の向上に鑑み、IDO 発現をメルクマールとしたトリプトファンからキヌレニンへの代謝不全が重篤な免疫病理を惹起しうることを付記しておきたい。

7. 代謝異常

EMS に類似した臨床像を呈する多発性硬化症や好酸球増多筋膜炎のような自己免疫疾患患者に、トリプトファンの代謝異常が報告されている。Gross ら²⁰⁾はラットにトリプトファンやその代謝物を投与した後に、トリプトファン水酸化酵素阻害剤の *p*-chlorophenyl alanine (*p*-CPA) を腹腔内投与し、5-OH Trp への代謝をブロックする実験を行った。高濃度のトリプトファンを長期間投与したラット

の肺や脾臓では結合組織の増殖に加えて炎症細胞の浸潤が拡大しており、*p*-CPA 投与がキヌレニンへの代謝経路を亢進して組織傷害を惹起した結果、EMS 様症状を増悪させたと説明した。

一方、Smith and Garrett²¹⁾は EMS の病態形成にヒスタミン分解に関する代謝異常が関連する可能性を指摘した。すなわち、この異常はさまざまな要因で起こりうるが、Sattler and Lorenz²²⁾の“histaminosis”説を論拠にして、トリプトファンの過剰摂取がギ酸塩やインドリル代謝物の過剰生成を起こすことで、ヒスタミンの正常な分解が阻害され、結果として形成されるヒスタミン濃度の不均衡により筋肉痛を伴う好酸球増多 (EMS) が惹起された可能性があるとした。自己免疫説²³⁾や代謝異常など、不純物以外の要因説の詳細については、総説¹⁾をお読みいただきたい。

8. 5-OH Trp 中の不純物と EMS

6章で述べたように、1992年にFDAはトリプトファンに類似した5-OH Trp (植物起源)によって、少なくとも8例のEMSが起こっていたと発表した。

FDAがトリプトファンの店頭販売を禁じたため、代替品として5-OH Trpが肥満、不眠、頭痛やセロトニン欠損症に効果があると喧伝されることになった。5-OH Trp摂取に起因すると考えられるEMS様の事例が1980年²⁴⁾と1991年²⁵⁾に発生し、caseロット中からはPeak Xと命名された不純物が検出された。RochesterとNew Yorkの健康栄養品販売店から入手した6種類の5-OH Trp製品を分析したMayo Clinicの研究グループは、すべての製品からcaseロット中レベルの約3~15%のPeak Xを検出するとともに²⁶⁾、Peak Xが同じMH⁺(*m/z*=235)を有するX1~X4の4つの混合物であること、また主要な不純物X1が4,5-tryptophan-dione (Trp-4,5D)である可能性が高いとしたうえで、不定愁訴を軽減するために必要であると推奨された300~500 mg/dayの5-OH Trpの摂取量でEMS様症状が起きる可能性があるとの警鐘を鳴らした²⁷⁾。後に、Klarskov ら²⁸⁾によってPeak X1がTrp-4,5Dであると確認され、サンプリングされた6製品中にはcaseロットから検出できたTrp-4,5Dの0.5~10.3%が混入していることが判明した。しかし、その後の調査で、1991年にカナダ人女性に発症したEMS様疾患と5-OH Trp製品との関連は否定され、本症例が、好酸球増多筋膜炎であったとの診断が確定した。Das ら²⁹⁾はこの結果を受け、Trp-4,5Dと同定されたPeak Xの市販品中の含有量がごく微量であることに加え、分子それ自体が不安定であるために市販品に安定して存在する可能性は低く、5-OH Trp製品の安全性には問題はないと結論づけた。

9. メラトニン中の不純物

メラトニンは、睡眠障害や時差ボケに対して処方される睡眠調節機能を有する化合物である。本剤摂取に起因すると思われる副作用が報告された。すなわち、不眠を訴えた

*7 齋藤博士, 釣木澤尚実, 粒来崇博, 押方智也子, 秋山一男: Churg-Strauss syndrome 患者末梢血 monocyte 内のインドールアミン発現は疾患活動性に関与する。第59回日本アレルギー学会秋季学術集会抄録 (2009)。

がん患者への投与が末梢血好酸球増多を起した例がそれであり、Mayo Clinic のグループ³⁰⁾が店頭販売されている3種のメラトニン製品を分析した結果、7種の不純物が検出され、製品中の含有割合は0.1~0.5%であることが分かった。さらに興味を持たれたのは検出された6種類の不純物がEMS 関連ロットで見つかったトリプトファン中不純物に構造が類似していた点であり、これらは hydroxymelatonin の2つの isomer, hydroxymelatonin の C2 位酸化物、メラトニンとホルムアルデヒドの縮合物であった。トリプトファン中の Peak E や 5-OH Trp 中で検出された Peak X の構造類似体である。しかし、時差ボケで摂取されるメラトニンの量は7日間で5 mg/day 程度であり、この量と不純物の存在比(0.1~0.5%)は、EMS 患者が数か月間にかかって摂取したであろう0.5~4.0 g/day、もしくは、トリプトファン関連ロット中 Peak E の存在比0.05~0.1%と比べた場合、極めて微量であるとし、実際にもメラトニンによるEMS 様疾患発症例は報告されなかった。

10. EMS と線維筋痛症との類似

従前から、EMS と自己免疫性疾患である線維筋痛症(fibromyalgia syndrome; FMS)が臨床的、血清学的に、類似性を持つことが指摘されていた。Barth らは、慢性期の16名のEMS 患者と100名のFMS 患者を対象に、両疾患の臨床学的ならびに免疫学的パラメーターを比較し、その類似性を検証した³¹⁾。また彼らは、トリプトファンがFMS のような機能的な身体症候群(Functional Somatic Syndrome; FSS)患者によって摂取されていた事実から、EMS がFSS 患者における Peak E に対するアレルギー反応により発生したのではないかと仮説を立てた。それぞれ12名のFMS 患者、健常者および他の慢性疾患患者のPBMC(末梢血単核球)を純粋なL-tryptophan や peak E と7日間培養して、産生されるサイトカインを測定した。FMS 患者の7/12名ならびに対照者の3/24名に由来するPBMC が Peak E との培養でサイトカインを産生した($p < 0.05$)。興味あることに、Peak E と反応したFMS 患者の6/7がIL-5やIL-10(Th2型)のいずれかまたは両者を産生したのに対し、ほかの慢性疾患患者と健常者ではそれぞれ1名にのみ認められただけであった。この知見はFMS 患者において免疫原性がほかより強い Peak E に反応してTh2型のサイトカイン産生が惹起されたことを意味しており、EMS が一種の薬剤アレルギーとして発生した可能性を指摘した³²⁾。

11. EMS に関する食品衛生学的考察

10年前の本誌総説¹⁾の中で明確に述べられているように、食品衛生の観点からは、過剰摂取の抑制と不純物の監視がきちんと行われれば、同種の事故は再発しないと考えられる。トリプトファン事故品ロット中の不純物量は0.01~0.02%と低レベルで監視するのはたいへんであるが、総説中で提案されている評価原則⑤においては、「不純物への配慮は通常0.1%を目標に行われるが、食品の摂

取量が医薬品などに比べて多いことを考慮すると、0.01%を目標とすべきであること」が提案されている。さらに、評価原則②では、「一般に製造方法のクリティカルな部分が変わったり、又はバイオテクノロジーにおける使用組換え体に変化したときは特に不純物のトータルプロファイルの変化に注目すべきであること」が提案されている。EMS 事件を振り返ると、これくらいまで実施しないと防げなかったということである。ただし、十分な精製が実施されておれば、事故は起きなかったと考えられる。

12. 単行本

事件発生から10年後の1999年に“Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: Basic Aspects and Application”³³⁾と題する書籍がAdvances in Experimental Medicine and Biology 誌の467巻として刊行され、それまでのEMS 関連の研究成果がまとめられている。20年後の今年はどうであろうか。

II. アニリンで変性されたナタネ油による TOS

1. 事件の概要

EMS の症状は、1981年5月にスペインで発生したTOS の症状に類似していた。TOS も筋肉痛症、好酸球増加、肺浸潤の症状を示す疾患である。TOS は、2%のアニリンで変性した工業用ナタネ油がスペインに輸入されて精製され、行商人によりオリーブ油と偽って販売され、調理に使用されたことで大発生した中毒症であった。患者数は1997年5月時点での公式報告によれば、19,904名(女性11,897名、男性8,007名)³⁴⁾であり、死亡者はどの時点で数えるかにもよるが、最初の2年間で416名が亡くなっている。特に若い女性の死亡者が多かったが、多量のオリーブ油を摂取したためか、あるいは原因物質に対し女性の感受性が高いことが考えられた³⁵⁾。

肺炎疾患が見られたが、抗生物質が奏効しないことから、感染症ではないことはすぐに明らかになった。有機リン剤などの農薬も調べられたが、原因ではなかった。その後の研究により、原因物質は変性ナタネ油に含まれていたアニリン誘導体と考えられてきたが、TOS の発生機序は未解明である。ちなみに、アニリン自体はTOS を引き起こさない。

この事件が発生して30年近くになるが、近年では毎年発表される研究論文数はEMS よりも多くなっている。スペイン政府のThe Institute of Health Carlos III とWHO の協力によるThe WHO/CISAT Scientific Committee for the Toxic Oil Syndrome が組織され、継続して活動してきた結果と考えられる。一方、EMS に関しては米国Mayo Clinic and Foundation のグループなどが現在も研究している可能性があるが、厚生労働省予算では最後まで残っていた継続的な文献調査も終了している。

2. 原因・症状の調査研究

事件はスペイン中部(マドリードなど)や北西部で起きた。症状としては、初期には呼吸困難、肺泡浸潤などを2

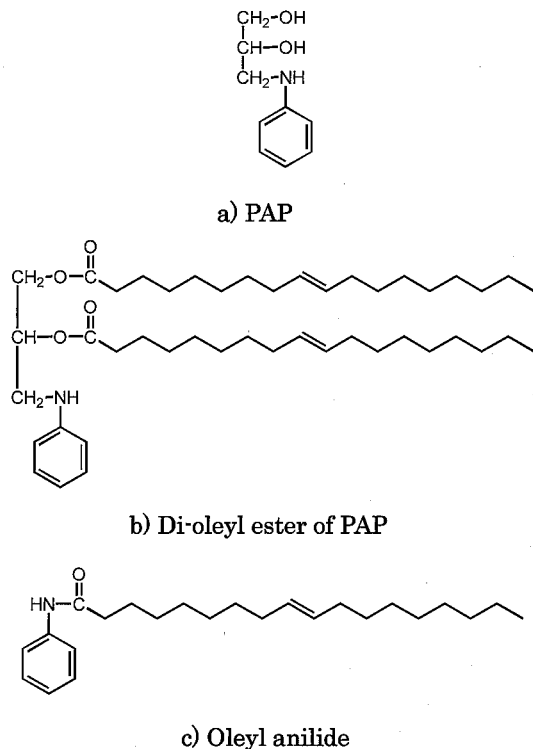


図7. TOSの代表的な原因化合物候補

か月ほど呈し、その後の中期には、知覚神経障害、無力症、好酸球増多などが見られる。半数以上が慢性化する。死因は急性期では呼吸不全、中期には大血管血栓症や肺高血圧症、慢性期には大部分が拘束性呼吸不全である³⁶⁾。スペイン政府は安全なオリーブ油と交換する形で事故油を回収して分析を続け、1984年時点でグリセロールのOHがアニリンに置換した3-phenylamino-1,2-propanediol (PAP)やそのモノオレイン酸エステル(OPAP)、ジオレイン酸エステル(OOPAP)を検出しており³⁷⁾、オレイン酸をはじめとした脂肪酸アニリドをも加えての起因物質同定に向けての分析が実施されている。それらの構造を図7に示す。

1981~95年の間に発症し、生存している全患者を対象にした予後決定因子、好発疾患、とりわけ手根管症候群(carpal tunnel syndrome)との関連性が調べられた。20,084名のTOS患者集団における男女比は1:1.5であり、死亡例の1,799名においても958名が女性であった。さらに、TOS関連で死亡した356名で見ても、女性が男性のほぼ2倍を占めていた。40歳以下の女性患者の生存期間が最も短く、合併疾患発症危険率(相対危険率, RR)も、肝疾患(RR, 3.8)、肺高血圧症(RR, 3.19)、運動神経障害(RR, 2.24)、肺感染(RR, 1.54)、および好酸球増多(RR, 1.14)の順に高かった。これらは、全TOS患者の中で40歳以下の女性の予後が最も悪く、肝疾患や肺高血圧症で死亡する危険率が高いことを意味していた³⁸⁾。

1981~2001年の間に発症したTOS患者89名を、非発症TOS患者638名と比較調査したところ、手根管症候群が神経障害を有するTOS患者に好発する、との報告も

された³⁹⁾。

また、肺疾患を有するTOS患者のパラフィン包埋肺組織からRNAを抽出し、RT-PCR法によりmRNA発現を調べたところ、IL-4やIL-5のようなTh2サイトカインの発現が優先的に亢進していることも認められた⁴⁰⁾。

3. 変性油の精製工程

アニリンで変性した事故油を精製するに際し、250~300℃に加熱して脱臭する工程があるが、さまざまなPAPエステルがこのときに劇的に生成され、300℃に達した段階で消失することが分かった。この不純物は、非常に限定した実験的条件でのみ生成⁴¹⁾することから、事故品は特定の精製所で生産された1つのバッチに限定された。

4. 原因化合物としてのPAPのエステル

TOSの起因物質として当初から注目されたのはPAPの脂肪酸エステルであり、PAPの1,2-dioleyl esterもすでに1984年には確認されていた³⁷⁾。PAPの1,2-dioleyl ester(OOPAP)の本症発症へのリスクを推測統計的に解析したPazらは、同じく候補物質と目されていたオレイン酸アニリドと比較した場合、odds ratioで6.4倍高いことを明らかにしており、OOPAPが事故油中にだけ存在するという事実に鑑み、TOSの起因物質である可能性が極めて高いとの指摘をした⁴²⁾。PAPとそのエステルの体内代謝については、Ladonaらによって感受性の高いマウス種を用いて詳しく検討されており、A/JやC57BL/6といったhigh responderマウスの腹腔内にPAPを投与すると、ほとんどは尿中に排泄されたが、主な代謝物は2-hydroxy-3-(phenylamino)propanoic acidであること、高度に極性の高い3-[N-(4'-hydroxyphenyl)amino]propane-1,2-diolや2-hydroxy-3-[(4'-hydroxyphenyl)amino]propanoic acidも検出されることから、PAPが生体内で代謝され、より反応性に富む分子種が生成する可能性があるとした⁴³⁾。また、PAPの代謝パターンを調べた結果、(R)-PAPのほうが(S)-PAPに比べ極性が高い化合物に代謝される割合が高いことや、芳香環化合物はquinoneimineを経て4-aminophenolを生成すると報告した⁴⁴⁾。

Martínez-Cabotら⁴⁵⁾によって図8に示すような代謝経路が提示された。すなわち、quinoneimine 2は転位反応によりシッフ塩基を形成、それが容易に加水分解を受け、最終的にp-aminophenolとなって尿中に排泄されるとした。また、4-aminophenolが検出されたことから、間接的に中間体2が生成された可能性も示唆した。彼らはその後、3-[N-(4'-hydroxyphenyl)amino]propane-1,2-diolをGSHの存在下でラットとヒトの肝ミクロゾームと培養し、quinoneimine代謝物のGSH包合体を生成させることに成功している⁴⁶⁾。

AP-1(activating protein-1)は細胞の分化、増殖、炎症、アポトーシスや免疫反応に関与する転写因子である。外部からの有害な刺激を受けた際に早期に発現する前初期

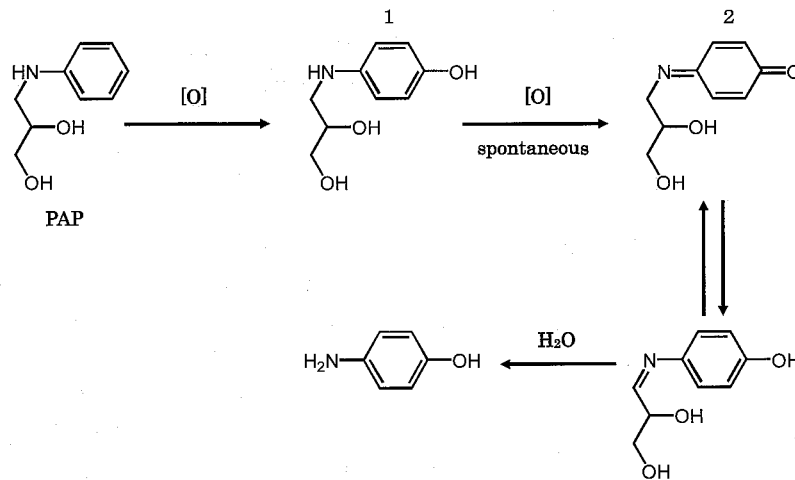


図8. PAPから4-アミノフェノールへの代謝経路⁴⁵⁾

遺伝子を統括する転写因子の1つである。AP-1は*c-jun*や*c-fos*などに関与しているが、*c-fos*が最もよく研究されている遺伝子である。PAPエステルはその構造上の類似性からリン脂質と同様の経路で吸収・代謝される可能性がある。リン脂質の代謝物は核内転写因子の調節に関与する重要なメディエーターであり、ことに、フォスホリパーゼD活性は*c-fos*活性化を誘導できるので、PAPエステルの代謝物がAP-1を含む転写因子の調節に関与している可能性が考えられたので、ヒト肺由来線維芽細胞を用いて、PAPエステルの*c-fos*活性化誘導効果の有無が調べられた。迅速かつ、濃度依存的な*c-fos*活性化とブタノール、プロプラノロールによる阻害効果が誘導でき、フォスホリパーゼDの関与が強く示唆されたことから、AP-1の様な転写因子の調節機能不全が、TOSの病態形成に関与している可能性があるとした⁴⁷⁾。

5. 原因化合物としてのオレイン酸アニリド

事故油中にはオレイン酸、リノレン酸、パルミチン酸などの脂肪酸アニリド (FAAs) も検出されるが、TOS発症との関連で注目されているのはオレイン酸アニリドであり、ラットにアニリン塩酸塩を2 mmol/kg 経口投与すると、体内で脂肪酸アニリドが形成されることも報告されている⁴⁸⁾。

オレイン酸アニリドを投与したA/Jマウスの組織におけるNF- κ B系の関与を調べた研究では、A/Jマウスの大動脈や腸由来の組織および脾臓由来のT細胞、腹腔マクロファージにおけるNF- κ B (p50/p65 dimer) 活性の著明な増加とそれに伴うI κ -B (NF- κ Bと結合する抑制因子) の濃度依存的な減少が起こるとともに、本転写因子の標的遺伝子であるIL-1 β 、IL-6、TNF- α 発現の一過性の亢進をも認めることができた。この知見は化学物質で惹起された急性型自己免疫疾患としてもとらえることができるTOSの病態形成にNF- κ B/Rel systemが関与することをうかがわせ、同時に治療法の確立につながる可能性もあるとしている⁴⁹⁾。

最近では、自己免疫疾患のモデルマウスMRL+/+の

メスに、0.8 mmol/kgのオレイン酸アニリド、アニリン、オレイン酸を週2回、6週間腹腔内投与した後で、血清中の免疫グロブリンレベルと抗核抗体の出現の有無を調べ、オレイン酸アニリド投与により50%の割合で強い抗核抗体の出現が観察されている⁵⁰⁾。

6. TOS発症の遺伝的要因

EMSと同様、有毒油症候群においても、その発症の有無に遺伝学的な背景が存在する可能性は以前から指摘されている。Cardabaら⁵¹⁾はHLA class II抗原であるDR-DQ (DR3, DR4, DR2およびDQ8) 抗原を発現する個体が事故油摂取を契機にして高頻度で本症を発症したとする報告を、265名を対象として再検証している。慢性期を迎えている有毒油症患者 (117名)、発症した患者の未発症家族 (71名) および本症に無関係の疾患を有する対照患者 (77名) の3群に加えて、有毒油症を原因とする死亡者 (34名) および別の疾患による死亡者 (13名) におけるHLA class II抗原の発現状況を調べ、有毒油症発症との関連が検討された。生存する有毒油症患者にはHLA class II抗原発現の偏りを認めなかったが、本症で死亡した患者の73.5%がDR2抗原を発現していることが分かった。ちなみに、生存有毒油症患者、未発症の家族、無関係な疾患を有する患者およびそれら疾患を原因とした死亡者でのDR2抗原陽性割合は、それぞれ25.6%、28.5%、23.9%および38.4%であった。

生体異物 (Xenobiotics) が体内に入ったときの代謝酵素活性とTOS発症との間の薬理遺伝学的な関係を検討したLadonaらから興味深い報告がなされている。TOSの長期生存者と被害を受けなかった家族や同一地域に居住している親族でない人‘友人群’とを比較して、phase Iとphase IIの酵素活性と酵素多型について調査した。その結果、家族と比較した場合には有意差はなかったが、‘友人群’との比較ではNAT2 (arylamine *N*-acetyltransferase-2) slowアセチル化対立遺伝子の増加、結果的にはslow acetylator遺伝子型を呈する頻度が有意に高いことが見いだされた⁵²⁾。

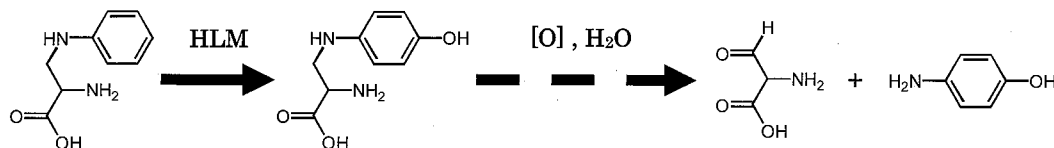


図9. PAA から4-アミノフェノールへの代謝経路⁵⁹⁾

HLA クラス II 遺伝子座が位置する第 6 染色体全ゲノムを対象に連鎖マッピングによる研究が実施され、発症に関連する遺伝子座が調べられている。HLA 遺伝子座近傍に位置する D6S422 マイクロサテライトが TOS 患者との関連を示したことを受け、周辺の詳細なマッピングが行われ、より TOS に関連する 4 つのマイクロサテライト、すなわち、D6S1584, D6S1567, D6S2439 および D6S1050 が明らかにされた。これら 4 つのマーカーと TOS の臨床上の 14 の表現型 (phenotype) との関連が調べられた結果、D6S1050 が肺胞浸潤、肝疾患ならびに強皮症と関連することが明らかになった。これらの知見は、TOS の発症に自己免疫反応が関与していることを示唆した⁵³⁾。

実験動物においても、遺伝的要因による応答の違い (系統差) が調べられている。例えば、オレイン酸アニリドを C57BL/6, A/J, B10.S マウスに投与し、T 細胞の応答などが比較されている^{54), 55)}。

自己免疫様疾患を自然に発症するマウス (MRL/lpr マウス) への有毒油の影響を調べた結果では、急性期の TOS 症状に類似する徴候の出現を有意に早めるが、化学物質の投与で自己免疫を発症し自然発症することがない A.SW 系統 (H-2s) マウスへの投与では、無影響であった。この結果は、事故油のマーカーである脂肪酸アニリドが TOS の起因物質ではなく、遺伝的感受性を持つ対象者における、増悪因子であることを示唆しているのかもしれない^{56), 57)}。

7. EMS と TOS の起因物質の類似

有毒油中に検出される PAP (3-phenylamino-1,2-propanediol) はトリプトファン事故品中に検出された不純物 PAA (phenylamino-aniline) と化学的によく似ていることから、EMS と TOS の疾患に共通した起因物質があるのではと考えられている。実際、PAA はラット肝細胞、ヒト肝臓組織において、PAP に生体変換されることが証明されている⁵⁸⁾。また、最近 Martínez-Cabot らは、図 8 に示した PAP から 4-aminophenol に代謝される経路と同様に、PAA が 4-aminophenol に代謝される経路を提示している⁵⁹⁾ (図 9)。

8. 単行本

TOS 発生後の 3 年目³⁵⁾、10 年目⁶⁰⁾、20 年目⁶¹⁾に当たり、WHO がその時点での知見を集めた書籍を刊行している。執筆者は、The WHO/CISAT Scientific Committee for the Toxic Oil Syndrome のメンバーである。

おわりに

TOS 発生から 20 年が経過した 2002 年に、WHO の欧

州地域事務局とスペイン政府の Carlos III 健康研究所の合同による科学委員会 (WHO/CISAT Scientific Committee on the Toxic Oil Syndrome) のメンバーが、それまでのまとめを論文として報告している⁵⁸⁾。それによると、①TOS 発症後期での死亡率の上昇はない、②生存者では強皮症をはじめとする慢性症状が優位に発現する、③実験動物での再現はできていない、④血清中の可溶性 IL-2 受容体濃度上昇などから自己免疫機構が示唆される、⑤疫学研究から PAP の脂肪酸エステルも検出できたが最終的な結論にはいまだ至っていない、とされており、現在に至っている。

EMS に関しては、トリプトファンを摂取していない事例も相当数あるため、原因はより複雑である。トリプトファン摂取により EMS が大発生した時期の事例に限っても 1992 年の FDA の見解⁶⁶⁾から基本的には変わっていない。トリプトワンの過剰摂取と特定の不純物 (何かは確定していない) と患者の生理的要因が重なって発症したと考えられる⁶⁷⁾が、発症機構は未解明のままである。

このように、EMS と TOS は症状が似ているのみならず、原因究明の経過や未解決であることも似ている。本論文のベースとなった厚生 (労働) 科学研究の報告書では、入手した論文で総説や症例報告、スペイン語の文献などを除き、1998 年以降の約 100 報についてその内容を報告した。本稿では紙面の制約もあり、その半数も引用できなかったが、現状を理解するうえで重要と思われる論文について、その後報告された論文も含めて、総説としてまとめた。報告される論文数では TOS の方は現在でもコンスタントに出ており、最近では EMS よりも多い。研究組織と予算が確立しているためであろうか。一方の EMS に関しては、昭和電工による賠償もあり、原因究明研究は小規模になっている。

以上、いまだ原因究明ができていない 2 つの事件についての解説であるため、すっきりしない終わり方になっている。いつの日か両事件の発症機構が解明されることを願っている。

謝辞 原稿をご高閲いただき、ご助言を賜りました、薬剤師認定制度認証機構代表理事の内山 充先生 (L-トリプトファン問題原因究明委員会委員長) に深謝いたします。

参考文献

- 1) Uchiyama, M. Progress report of the studies in Japan on eosinophilia-myalgia syndrome caused by L-

- tryptophan product. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **40**, 335-355 (1999).
- 2) 戸田 清. 昭和電工トリプトファン食品公害事件⑤ 製造過程に潜む危険. 消費者レポート (日本消費者連盟), 第828号, p. 2-3 (1992).
 - 3) Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic Notes and Reports Eosinophilia-Myalgia Syndrome—New Mexico, MMWR (November 17), **38**, 765-767 (1989).
 - 4) Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic Notes and Reports Eosinophilia-Myalgia Syndrome and L-Tryptophan-Containing Products—New Mexico, Minnesota, Oregon, and New York, MMWR (November 24), **38**, 785-788 (1989).
 - 5) Mizutani, T., Mizutani, H., Hashimoto, K., Nakamura, Y., Kishida, M., Taniguchi, H., Murata, M., Kuzuhara, S., Shimizu, M. Simultaneous development of two cases of eosinophilia-myalgia syndrome with the same lot of L-tryptophan in Japan. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **25**, 512-517 (1991).
 - 6) Mizutani, T., Mizutani, H., Hashimoto, K., Kishida, M., Taniguchi, H., Okada, H., Murata, M., Nakamura, Y., Shimizu, M. Two cases of L-tryptophan ingestion induced eosinophilia-myalgia syndrome. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi*, **101**, 561-566 (1991).
 - 7) Ishikawa, A., Akahosi, T., Okada, J., Kondo, H., Kasiwazaki, S. A case of the eosinophilia-myalgia syndrome. *Ryumachi*, **32**, 327-330 (1992).
 - 8) Slutsker, L., Hoesly, F. C., Miller, L., Williams, L. P., Watson, J. C., Fleming, D. W. Eosinophilia-myalgia syndrome associated with exposure to tryptophan from a single manufacturer. *JAMA*, **264**, 213-217 (1990).
 - 9) Toyo'oka, T., Yamazaki, T., Tanimoto, T., Sato, K., Sato, M., Toyoda, M., Ishibashi, M., Yoshihira, K., Uchiyama, M. Characterization of contaminants in EMS-associated L-tryptophan samples by high-performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 820-822 (1991).
 - 10) Goda, Y., Suzuki, J., Maitani, T., Yoshihira, K., Takeda, M., Uchiyama, M. 3-Anilino-L-alanine, structural determination of UV-5, a contaminant in EMS-associated L-tryptophan samples. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2236-2238 (1992).
 - 11) Belongia, E. A., Hedberg, C. W., Gleich, G. J., White, K. E., Mayeno, A. N., Loegering, D. A., Dunnette, S. L., Pirie, P. L., MacDonald, K. L., Osterholm, M. T. An investigation of the cause of the eosinophilia-myalgia syndrome associated with tryptophan use. *N. Engl. J. Med.*, **323**, 357-365 (1990).
 - 12) Mayeno, A. N., Lin, F., Foote, C. S., Loegering, D. A., Ames, M. M., Hedberg, C. W., Gleich, G. J. Characterization of "peak E," a novel amino acid associated with eosinophilia-myalgia syndrome. *Science*, **250** (4988), 1707-1708 (1990).
 - 13) Williamson, B. L., Johnson, K. L., Tomlinson, A. J., Gleich, G. J., Naylor, S. On-line HPLC-tandem mass spectrometry structural characterization of case-associated contaminants of L-tryptophan implicated with the onset of eosinophilia-myalgia syndrome. *Toxicol. Lett.*, **99**, 139-150 (1998).
 - 14) Naylor, S., Johnson, K. L., Williamson, B. L., Klarskov, K., Gleich, G. J. Structural characterization of contaminants in commercial preparations of melatonin by on-line HPLC-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **467**, 769-777 (1999).
 - 15) Sullivan, E. A., Staehling, N., Philen, R. M. Eosinophilia-myalgia syndrome among the non-L-tryptophan users and pre-epidemic cases. *J. Rheumatol.*, **23**, 1784-1787 (1996).
 - 16) Saito, H., Tsurikisawa, N., Tsuburai, T., Akiyama, K. Involvement of regulatory T cells in the pathogenesis of Churg-Strauss syndrome. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **146** (Suppl. 1), 73-76 (2008).
 - 17) Zheng, Y., Danilenko, D. M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., Ouyang, W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, **445** (7128), 648-651 (2007).
 - 18) Saito, H., Tsurikisawa, N., Tsuburai, T., Oshikata, C., Akiyama, K. Cytokine production profile of CD4⁺ T cells from patients with active Churg-Strauss syndrome tends toward Th17. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **149** (Suppl. 1), 61-65 (2009).
 - 19) Chung, D. J., Rossi, M., Romano, E., Ghith, J., Yuan, J., Munn, D. H., Young, J. W. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood*, **114**, 555-563 (2009).
 - 20) Gross, B., Ronen, N., Honigman, S., Livne, E. Tryptophan toxicity—Time and dose response in rats. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **467**, 507-516 (1999).
 - 21) Smith, M. J., Garrett, R. H. A heretofore undisclosed crux of eosinophilia-myalgia syndrome: Compromised histamine degradation. *Inflamm. Res.*, **54**, 435-450 (2005).
 - 22) Sattler, J., Lorenz, W. Intestinal diamine oxidases and enteral-induced histaminosis: Studies on three prognostic variables in an epidemiological model. *J. Neural. Transm. Suppl.*, **32**, 291-314 (1990).
 - 23) Amor, B., Rajzbaum, G., Poiraudou, S., Haas, C., Kahan, A. Eosinophilia-myalgia linked with L-tryptophan. *Lancet*, **335** (8686), 420-421 (1990).
 - 24) Sternberg, E. M., Van Woert, M. H., Young, S. N., Magnussen, I., Baker, H., Gauthier, S., Osterland, C. K. Development of a scleroderma-like illness during therapy with L-5-hydroxytryptophan and carbidopa. *N. Engl. J. Med.*, **303**, 782-787 (1980).
 - 25) Michelson, D., Page, S. W., Casey, R., Trucksess, M. W., Love, L. A., Milstien, S., Wilson, C., Massaquoi, S. G., Crofford, L. J., Hallett, M., Gold, P. W., Sternberg, S. An eosinophilia-myalgia syndrome related disorder associated with exposure to L-5-hydroxytryptophan. *J. Rheumatol.*, **21**, 2261-2265 (1994).
 - 26) Williamson, B. L., Klarskov, K., Tomlinson, A. J., Gleich, G. J., Naylor, S. Problems with over-the-counter 5-hydroxytryptophan. *Nature Med.*, **4**, 983 (1998).

- 27) Johnson, K. L., Klarshov, K., Benson, L. M., Williamson, B. L., Gleich, G. J., Naylor, S. Presence of peak X and related compounds: The reported contaminant in case related 5-hydroxy-L-tryptophan associated with eosinophilia-myalgia syndrome. *J. Rheumatol.*, **26**, 2714-2716 (1999).
- 28) Klarskov, K., Johnson, K. L., Benson, L. M., Cragun, J. D., Gleich, G. J., Wrona, M., Jiang, X. R., Dryhurst, G., Naylor, S. Structural characterization of a case-implicated contaminant, "Peak X," in commercial preparations of 5-hydroxytryptophan. *J. Rheumatol.*, **30**, 89-95 (2003).
- 29) Das, Y. T., Bagchi, M., Bagchi, D., Preuss, H. G. Safety of 5-hydroxy-L-tryptophan. *Toxicol. Lett.*, **150**, 111-122 (2004).
- 30) Naylor, S., Johnson, K. L., Williamson, B. L., Klarskov, K., Gleich, G. J. Structural characterization of contaminants in commercial preparations of melatonin by on-line HPLC-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **467**, 769-777 (1999).
- 31) Barth, H., Berg, P. A., Klein, R. Is there any relationship between eosinophilia-myalgia syndrome (EMS) and fibromyalgia syndrome (FMS)? An analysis of clinical and immunological data. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **467**, 487-496 (1999).
- 32) Barth, H., Klein, R., Berg, P. A. L-Tryptophan contaminant 'peak E' induces the release of IL-5 and IL-10 by peripheral blood mononuclear cells from patients with functional somatic syndrome. *Clin. Exp. Immunol.*, **126**, 187-192 (2001).
- 33) Huether, G., Kochen, W., Simat, T. J., Steinhart, H., eds. Tryptophan, serotonin and melatonin: Basic aspects and applications (Advances in Experimental Medicine and Biology), Springer, 1999. (ISBN-10: 0306462044, ISBN-13: 978-0306462047)
- 34) Philen, R. M., Posada de la Paz, M., Terracini, B., Kilbourne, E. "Epidemiology of toxic oil syndrome: advances since 1992." Toxic oil syndrome ten years of progress, Terracini, B., ed. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 2004. (ISBN 92-890-1063-0)
- 35) Grandjean, P., Tarkowski, S., eds. Toxic Oil Syndrome: Mass food poisoning in Spain. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 1984, 92p. (ISBN 9289010215)
- 36) Abaitua Borda, I., Posada de la Paz, M. "Clinical findings." Toxic oil syndrome: Current knowledge and future perspectives. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 1992, p. 25-35. (ISBN 9289013052)
- 37) Vazquez Roncero, A., Maestro Duran, R., Ruiz Gutierrez, V. New aniline derivatives in toxic oil syndrome: Toxicity in mice of 3-phenylamino-1,2-propanediol and its fatty acid mono- and diesters. *Grasas Aceites*, **35**, 330-331 (1984).
- 38) Sanchez-Porro, P., Posada de la Paz, M., de Andres Copa, P., Gimenez Ribota, O., Abaitua Borda, I. Toxic oil syndrome: Survival in the whole cohort between 1981 and 1995. *J. Clin. Epidemiol.*, **56**, 701-708 (2003).
- 39) Estirado de Cabo, E., Posada de la Paz, M., de Andrés Copa, P., Plaza Cano Mdel, M., García de Aguinaga, M. L., Suarez Alvarez, C., Braun Saro, B. Carpal tunnel syndrome. A new feature in the natural history of TOS? *Eur. J. Epidemiol.*, **18**, 983-993 (2003).
- 40) del Pozo, V., de Andres, B., Gallardo, S., Cardaba, B., de Arruda-Chaves, E., Cortegano, M. I., Jurado, A., Palomino, P., Oliva, H., Aguilera, B., Posada, M., Lahoz, C. Cytokine mRNA expression in lung tissue from toxic oil syndrome patients: A TH2 immunological mechanism. *Toxicology*, **118**, 61-70 (1997).
- 41) Ruiz-Mendez, M. V., Posada de la Paz, M., Abián, J., Calaf, R. E., Blount, I., Castro-Molero, N., Philen, R., Gelpi, E. Storage time and deodorization temperature influence the formation of aniline-derived compounds in denatured rapeseed oils. *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 91-96 (2001).
- 42) Posada de la Paz, M., Philen, R. M., Schurz, H., Hill, R. H., Ribota, O. G., Camara, A. G., Kilbourne, E. M., Abaitua, I. Epidemiologic evidence for a new class of compounds associated with toxic oil syndrome. *Epidemiology*, **10**, 130-134 (1999).
- 43) Ladona, M. G., Bujons, J., Messeguer, A., Ampurdances, C., Morato, A., Corbella, J. Biotransformation and clearance of 3-(phenylamino)propane-1,2-diol, a compound present in samples related to toxic oil syndrome, in C 57BL/6 and A/J mice. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 1127-1137 (1999).
- 44) Bujons, J., Ladona, M. G., Messeguer, A., Morato, A., Ampurdanes, C. Metabolism of (R)- and (S)-3-(phenylamino)propane-1,2-diol in C 57 BL / 6- and A / J-strain mice. Identification of new metabolites with potential toxicological significance to the toxic oil syndrome. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1097-1106 (2001).
- 45) Martínez-Cabot, A., Morato, A., Messeguer, A. Synthesis and stability studies of the glutathione and N-acetylcysteine adducts of an iminoquinone reactive intermediate generated in the biotransformation of 3-(N-phenylamino)propane-1,2-diol: Implications for toxic oil syndrome. *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 1721-1728 (2005).
- 46) Martínez-Cabot, A., Morató, A., Commandeur, J. N., Vermeulen, N. P., Messeguer, A. *In vitro* bioactivation of 3-(N-phenylamino)propane-1,2-diol by human and rat liver microsomes and recombinant P450 enzymes. Implications for toxic oil syndrome. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1218-1224 (2007).
- 47) Serrano-Mollar, A., Fernandez-Zabalegui, L., Bulbena, O., Gelpi, E., Closa, D. Induction of *c-fos* messenger RNA by 3-(N-phenylamino)-1,2-propanediol esters, compounds related to toxic oil syndrome. *Chem.-Biol. Inter.*, **149**, 117-123 (2004).
- 48) Kaphalia, B. S., Khan, M. F., Ansari, G. A. S. Fatty acid anilides: *In vivo* formation and relevance to toxic oil syndrome. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **13**, 269-277 (1999).
- 49) Bell, S. A., Page, S., Baumgartner, B., Berking, C., Haas,

- M., Eisele, T., Neumeier, D., Brand, K. Involvement of nuclear factor-kappa B in a murine model for the acute form of autoimmune-like toxic oil syndrome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **157**, 213-221 (1999).
- 50) Cai, P., Khan, M. F., Kaphalia, B. S., Ansari, G. A. Immunotoxic response of oleic acid anilide and its hydrolysis products in female MRL (+/+) mice. *J. Immunotoxicol.*, **2**, 231-236 (2005).
- 51) Cardaba, B., Ezendam, J., Gallardo, S., del Pozo, V., Izquierdo, M., Martin, C., Cortegano, I., Aceituno, E., Rojo, M., Arrieta, I., Palomino, P., Posada, M., Lahoz, C. DR2 antigens are associated with severity of disease in toxic oil syndrome (TOS). *Tissue Antigens*, **55**, 110-117 (2000).
- 52) Ladona, M. G., Izquierdo-Martínez, M., Posada de la Paz, M. P., de la Torre, R., Ampurdanés, C., Segura, J. Sanz, E. J. Pharmacogenetic profile of xenobiotic enzyme metabolism in survivors of the Spanish toxic oil syndrome. *Environ. Health Perspect.*, **109**, 369-375 (2001).
- 53) Cardaba, B., del Pozo, V., Gallardo, S., Palomino, P., Posada, M., Lahoz, C. Genetic approaches in the understanding of toxic oil syndrome. *Toxicol. Lett.*, **161**, 83-88 (2006).
- 54) Berking, C., Hobbs, M. V., Chatelain, R., Meurer, M., Bell, S. A. Strain-dependent cytokine profile and susceptibility to oleic acid anilide in a murine model of the toxic oil syndrome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **148**, 222-228 (1998).
- 55) Bell, S. A., Kuntze, I., Caputo, A., Chatelain, R. Strain-dependent *in vitro* and *in vivo* effects of oleic acid anilides on splenocytes and T cells in a murine model of the toxic oil syndrome. *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 19-24 (2002).
- 56) Koller, L. D., Stang, B. V., Hall, J. A., Posada de la Paz, M., Ruiz Mendez, M. V. Immunoglobulin and auto-antibody responses in MRL/lpr mice treated with 'toxic oil'. *Toxicology*, **178**, 119-133 (2002).
- 57) Weatherill, A. R., Stang, B. V., O'Hara, K., Koller, L. D., Hall, J. A. Investigating the onset of autoimmunity in A. SW mice following treatment with 'toxic oil'. *Toxicol. Lett.*, **136**, 205-216 (2003).
- 58) Mayeno, A. N., Benson, L. M., Naylor, S., Colberg-Beers, M., Puchalski, J. T., Gleich, G. J. Biotransformation of 3-(phenylamino)-1,2-propanediol to 3-(phenylamino)alanine: A chemical link between toxic oil syndrome and eosinophilia-myalgia syndrome. *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 911-916 (1995).
- 59) Martínez-Cabot, A., Messeguer, A. Generation of quinoneimine intermediates in the bioactivation of 3-(*N*-phenylamino)alanine (PAA) by human liver microsomes: A potential link between eosinophilia-myalgia syndrome and toxic oil syndrome. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1556-1562 (2007).
- 60) WHO. Toxic Oil Syndrome, Current Knowledge and Future Perspectives. European Series No. 42. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 1992, 163 p. (ISBN 9289013052)
- 61) WHO. Toxic Oil Syndrome, Ten Years of Progress. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 2004. (ISBN 92-890-1063-0) (<http://www.euro.who.int/document/e84423.pdf>)
- 62) Gelpi, E., de la Paz, M. P., Terracini, B., Abaitua, I., de la Camara, A. G., Kilbourne, E. M., Lahoz, C., Nemery, B., Philen, R. M., Soldevilla, L., Tarkowski, S. The Spanish toxic oil syndrome 20 years after its onset: A multidisciplinary review of scientific knowledge. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 457-464 (2002).