

臨床微生物学の「礎」を築いた人々

— 気道関連の微生物研究に携わった研究者達の技術と思索 — 3

Paul EhrlichとHans Christian Gram
(その1)

帝京大学名誉教授
 こんのまさとし
 紺野昌俊
 Masatoshi KONNO

前号では肺炎の起炎微生物に関わる Friedländer と Fränkel の論争は Weichselbaum が多数の肺炎で行った検証により一応の決着が見られるところに到達しましたが、*Diplococcus pneumoniae* という菌名についてはなお異論があって、その後も続いたことを記しました。そして、文末に Fränkel が繰り返した感染動物実験の結果が一様でなかったことは、その後免疫に関わる問題の発展に繋がっていったこと、それから Friedländer は本当に負け犬だったのでしょかということ、さらには次号では Ehrlich と Gram について記述するとしてしました。

Ehrlich と Gram は Pasteur や Koch に始まる細菌発見の黎明期と同時代に生きた臨床家、あるいは研究者であります (註1)。両者を並べて記述することにした理由には以下のようなことがあります。Ehrlich は有り余るほどの才能を駆使して、約 215 篇の論文を発表した研究者ですが、本人は自らを臨床家と称していた時期もありますが、化学者とも細菌学者あるいは免疫学者ともいえる極めて多彩な功績を残した人物です。それに比して Gram は少なくとも細菌学関連の論文としては Gram 染色に関わる 1 篇の論文しか発表していない、細菌学者というより臨床家という方がうなずける人物です。しかし、Gram の名は Gram 染色として、その後いくつかの改良はなされましたが、今日でも極めて大切な検査法として日常診療の会話の中で交わされております。それに比して Ehrlich の名は、彼が展開した華麗な論理

のみが今も医学の底辺に流れていますが、日常の診療においてそれを口にするには殆どありません。何故なのでしょう。そのようなことから、二人の業績を顧みながら、それぞれの研究者としての生き方に視点を当てて考えて見ようと思いました。ただし、Ehrlich の業績は多いだけではなく極めて多彩です。3 篇に分けて記すことにしました。

Ehrlich と Gram の間には特別に親密な関係があったというわけではありません。しかし、共通する部分はありました。それは細菌発見の黎明期とは言うものの、両者は共に新しい細菌の発見には直接関わっていないことです。それでも細菌に関わる重要な研究に関わっておりました。その最大の接点は両者とも色素を扱って医療に役立てようとしていたところにあります。

細菌発見に関わる黎明期に最も重要なことは、往時の Koch の 3 原則に従うと、①特定の伝染性疾患から特定の微生物が見出されること、②その微生物を純粋に分離できること、③分離した微生物の感染実験によって疾患を再現できることにありました。つまり、特定の疾患から分離した菌の形態を観察すること、そして、その菌が病巣内に見出せることが大変重要な課題でありました。そのためには顕微鏡の精度の向上¹⁻⁴⁾ (註2) とともに、組織の包埋や染色技術の精度を高めることが大変重要な要素でありました (註3)。

当時の染色について大きな役割を果たしたものの

註1: Ehrlich は 1854 年生～1915 年没、Gram は 1853 年生～1938 年没、Koch は 1843 年生～1910 年没、北里柴三郎は Koch が結核菌の発見をした 1882 年の 3 年後 (明治 18 年) 32 歳の時に留学しております。

註2: 光の収差を小さくする油浸法を考案したのは天文学者 Amici (1840 年) と言われておりますが、均質な immersion を開発したのは Stephenson (1878 年)、集光器と反射鏡を考案したのは Abbé (1879 年) の業績が大きいです。しかし、プレパラートやカバーガラス、さらには菌の固定法から染色法まで、一連の細菌検査法の基礎を確立したのは Koch (1876, 1877 年) (参考文献 3, 4) です。

註3: 1800 年代は植物由来の医薬品の活性成分の分析や合成が盛んに行われていた年代です。例えばキニーネの原木 (logwood) からの抽出物を金属イオンと結合させると発色したヘマトキシリンなどがあります。ヘマトキシリンは病理組織の染色に活用されました。また、当時の細菌染色には、フクシン、メチレンブルー、サフラニン、ビスマルクブラウ、メチルグリーン、ゲンチアナバイオレット、メチルバイオレット、クリスタルバイオレットなどが試されております。酸性アニリン色素としてもエオジン、酸性フクシン、フローレクセン、コンゴなど試されております。

一つに石炭（コールタール）から得られるアニリンがあります（図1参照）（註4）。アニリンにアルコールを添加すると紫色に変る（aniline purple）、無水酢酸を加えると芳香を発する（acetanilide）など、当時においては化学合成に無限の可能性を秘めていた物質でした。このアニリンを顕微鏡用の組織標本に初めて試みたのは Ehrlich の母方の従兄弟に当たる Weigert⁵⁾（1875年）でした（註5）。Ehrlich もまた Weigert の助言を得てアニリンを学生時代より試みたことが、その後の彼の研究生活の中を一貫として流れている“side-chain theory”となりました^{6~7)}（註6）。

Ehrlich はユダヤ系の家庭に生まれたドイツ人です。当時のドイツにはユダヤ人に対する偏見と社会

的制限がありました。ただ、Ehrlich 自身は家系的には相当な社会的地位を保っていたこともあって、何度かの挫折はあったとも思われますが、科学者としては最も成功した一人であることに違いはありません。彼の業績は自らを臨床医と称したように、正に臨床医学の分野に新しい理念を吹き込んだものであったというべきでしょう。その業績は途中でいくつかの派生的な出来事に遭遇します。それは、大きくは三つに分けられます。一つ目は色素を駆使して血球に関わる研究を開拓したことです。二つ目はジフテリア抗毒素の精製と標準化、さらには免疫に関わる緻密な分析方法を展開したことです。それはノーベル賞に値するものでした。三つ目は晩年サルバルサンの開発に成功し、梅毒に対する臨床効果を

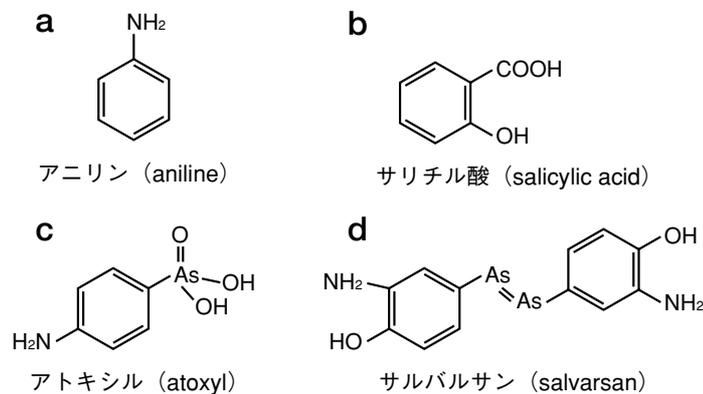


図1

図aのアニリンはその誘導体あるいはアニリン・バイオレットとして、組織内の細菌を識別するために好んで使用された化合物です。その化学構造はベンゼン環の水素原子の一つをアミノ基に置換した単純なもので、Ehrlich が“side-chain theory”の例とした図bのサルチル酸、あるいはサルバルサンの開発に当たって参考とした図cのアトキシルと対比すると興味深いところがあります。また、図cと図dのサルバルサンを対比することも興味あるところです。ただし、サルバルサンは実際にはこの3量体と5量体の混合物であることが判明しております。“side-chain theory”は図bの中心にあるベンゼン環 (Leistungs-Kern: 能力のある核) は、その側鎖に COOH あるいは OH などの化学物質 (Radicle: 遊離基) を付けて、別の性質を有する化合物になるというのが、その大意です。Ehrlich はジフテリアや破傷風の毒素と抗体との関係、あるいは細菌と色素との関係を、総てこの theory で説明しようとした。ことに細菌については、色素が結合することによって細菌は活性を失うというのが、Ehrlich の化学療法の考え方の始まりであります。

註4: インジゴ(青藍: ジーンズなどの染料)を蒸留してアニリンを抽出したのは Unverdorben (1826年)、コールタールを蒸留して抽出したのは Friedlieb (1834年)とされています。アニリンにさまざまな酸化剤を加えると特異的な発色物質を作り出す上に、顕微鏡用色素としては metachromatic な色調を呈するものとしてさまざまな誘導体が試されました。

註5: 組織標本を最初に作製したのは Chon FJ (1828~1898)で1854年頃です。Chon は Breslau のユダヤ人居留区に生まれ、さまざまな制限を受けながら大学を卒業しております。卒後、愛国的な社会団体に所属して、その議長に就任、議長の地位を保つことによって研究所を設立したという逸話があります。この間に石炭やコロイジンあるいはクロロホルム-パラフィン等で組織を包埋して、標本切片を作ることを考案しました。染色には主としてヘマトキシリンを使用していますが、ほとんどが藻に関するもので、細菌に関わる原著は見当たりません。ただし、彼の書いた“Untersuchung uber Bacterien. in Beitrage zur Biologie der Pflanzen. (1872年、改訂版が数冊あります)に部分的に細菌のことが書かれています。なお、1876年に Koch は Chon の研究所を訪れ、自らの破傷風に関する論文の是非を尋ねております。以来、Koch は Chon の研究所を数多く尋ね、Chon もまた Koch の研究に協力したことは、よく知られていることです。

註6: Ehrlich が学生時代にアニリンを染色に活用したとして紹介されている論文には参考論文7)が該当するとしている成書もありますが、発表年代からは参考論文6)がアニリンについて記述した最初の論文です。

実証したことです。それは感染症に対する化学療法の始まりでありました。

派生的な出来事としたことの第一は、1882年に Ehrlich は Koch の結核菌発見に関する講演⁸⁾を聞きに行き、その際に Koch が提示していた結核の肺組織標本が鮮明でないことから、自らも早速その検討を始め、そこで得られた結果を持って Koch に会いに行ったことです。Koch との接点はここから始まっておりまゝ(註7)。また、この染色法は Ziehl や Neelsen による結核菌の染色法開発への大いなる刺激となりました^{9~10)}。

第二の派生的な出来事としては、1889年から1890年にかけて Ehrlich は個人的に小さな研究所を開設したことが挙げられます。その理由は後述しますが、Ehrlich はここで植物毒 ricin (ヒマの種子) と abrin (トウアズキの種子) に対する抗毒素を小動物で作成しています^{11~12)}。そして、その抗毒素で被検マウスを救命できることや、抗毒素を与えたマウスの母乳で育った仔マウスに上記の植物毒を与えても生存することなどを確かめております^{13~14)}。

当時 Koch の研究所では Behring と Kitasato がジフテリアや破傷風の抗血清療法の開発に取り組んでおりました¹⁵⁾。ことに Behring はその業績から多くの関係者の注目を浴びておりました。Ehrlich の研究はこれらの研究に刺激されたものと思われまゝですが、Ehrlich の研究は後に抗毒素と赤血球を混合すると、その抗毒素の濃度に応じて赤血球の溶血に強弱が生じ、破傷風やジフテリアの抗毒素の定量測定に役立つことに繋がっていきまゝ^{16~17)}。

第三の派生的な出来事としては、1901年に Ehrlich がある財団の要請を受けてマウスの乳房に発生する

腫瘍の研究を始めたことが挙げられます。腫瘍細胞液の微量をマウスに注射すると腫瘍に対する免疫の高まりが見られますが、腫瘍そのものも肉腫に変化していることを確かめております。しかし、それ以上の研究は続けることなく終わっております¹⁸⁾。後にこの研究が実験的腹水癌¹⁹⁾(註8)として癌の基礎研究に広く用いられたことはご存知のとおりです。

第四の派生的な出来事には、1901年に北里柴三郎に替わって留学してきた志賀潔の助力を得て、アフリカで流行しているトリパノソーマ症 (sleeping sickness) に対する治療薬として trypanrot を見出したことが挙げられます²⁰⁾(註9)。Trypanrot は染料です。当時の Ehrlich には彼の理念であった“side-chain theory”に対して多数のクレームが寄せられていました。Ehrlich の脳裏には、色素でトリパノソーマを死滅させることが実証できれば、“side-chain theory”をも実証できる絶好の機会との考えがあったと思われまゝ(註10)。Ehrlich は当時の化学製品企業 Cassella Fabwerk 社に委託して100種を越える染料を受領して、極めて緻密で膨大な動物感染実験を繰り返して、trypanrod という治療薬として最高の効果がえられる色素に辿りつきました。しかし、trypanrot 抗菌活性には弱点がありました。それは動物感染実験において trypanrot の投与で血中のトリパノソーマを消失させることはできても、何日かの後に再発する例があることでした。そのため Ehrlich は投薬開始後72日頃まで被検動物の血中における原虫の有無を追跡し、その途上で再度トリパノソーマに感染させて、trypanrot を再投与しなくても生存可能かというところまで追跡調査を実施しております。極めて多くの労力を必要とする緻密な

註7: Koch は標本の染色には古くなったメチレンブルーが優れていることを見出し、それには大気中のアンモニアが関与していると考え、メチレンブルーに苛性カリを加えた染色法を考案しております(参考文献4)。結核の標本にはアルカリ-メチレンブルーで長時間染色した後にビスマルクブラウンでカウンター染色をしております。これに対し Ehrlich はアニリンにメチルバイオレットを加えた飽和水中で染色し、稀硝酸で脱色して標本を加熱すると結核菌が明瞭に識別できるとしております。この記録は題名なしで“Dtsch Med Wocheschr. 1882; 19: 269-270”に記載されています。また、Koch が Ehrlich の染色法で結核菌を容易に識別できたとする発言も“Kritische Besprechungen der gegen die Bedeutung der Tuberkelbazillen gerichteten Publikationen. Dtsch Med Wocheschr. 1883; 9: 137-141”に収録されています。

註8: Ehrlich 腹水癌とは Ehrlich らが実験の対象にしたマウスの乳房腫瘍を、1932年に Loewenthal らが腹腔内に移植することによって他のマウスに効率よく移植できるようにした変異株です(参考文献19)。

註9: 志賀潔は北里柴三郎の門下生で、1897年、日清戦争後の日本で全国に原因不明の疫病が発生し、約9万人が罹患、2万人以上が死亡したということがありました。その原因は赤痢菌であることを見出したのが志賀潔で、当時においてもその業績は諸外国の研究者にも知られていたと思われまゝ。志賀はその後の1901年にドイツに留学しております。そして Ehrlich の trypanrot 開発の原動力として緻密で過酷な動物実験を担当して成功に導いております。志賀はこの実験の成功と同時に1904年に帰国しております。

註10: Ehrlich には1891年にマラリアの患者にメチレンブルーを投与するなど、色素を治療薬として応用する経験を持っており、志賀との共著による trypanrot に関わる原著の冒頭にも、Ehrlich はこれら色素の効能について記述しております(参考文献20)。

Tabelle X.

Lauf. No.	Maus gr		T a g																																
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
1	17,0	Parasit.	T.-I.	0	†	††	†††	††	0	0	—	T.-I.	0	0	—	0	T.-I.	0	—	0	T.-I.	0	†	††	††	0	0	—	T.-I.	0	0	0	0	—	
		Farbstoff					0,4																		0,2	0,2									
2	29,0	Parasit.	T.-I.	—	—	††	†††	††	0	0	T.-I.	0	T.-I.	0	T.-I.	0	†	†	††	†††	††	††	†	†	†	0	T.-I.	0	T.-I.	0	T.-I.	—	0	T.-I.	—
		Farbstoff					0,4				0,2														0,3	0,4									
3	22,5	Parasit.	T.-I.	—	—	††	†††	†††	OT.-I.	0	T.-I.	0	T.-I.	0	T.-I.	0	T.-I.	0	T.-I.	0	0	T.-I.	†	††	†	0	T.-I.	0	T.-I.	0	†	nicht an			
		Farbstoff					0,3	0,4																	0,4										
4	25,0	Parasit.	T.-I.	—	—	††	†††	††	†	0	T.-I.	0	0	T.-I.	0	T.-I.	—	0	T.-I.	0	T.-I.	0	†	nicht an											
		Farbstoff					0,3																												
5	20,0	Parasit.	—	—	—	T.-I.	†	††	†††	†																									
		Farbstoff				0,5																													
6	25,0	Parasit.	—	—	—	T.-I.	†	††	†††	†																									
		Farbstoff				0,5																													

Lauf. No.	T a g																																																																		
	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72																											
1	0	T.-I.	0	0	T.-I.	0	0	T.-I.	0	—	T.-I.	0	T.-I.	0	T.-I.	†	†	0	T.-I.	0	†	†	††	†	†	†	0	0	T.-I.	0	0	T.-I.	—	0	T.-I.	0	—	0	†																												
2	0	†	††	†	an Cadèra gestorben.																																																														

Anm.: Hier wurde eine grössere Menge Trypanosomenblut (0,5—1,0 com einer etwa 10 proc. Verdünnung) zur Infection (T.-I.) unterzogen.

図 2

Ehrlich と志賀潔の共著による論文“Berlin Klin Wschr. 1904 ; (参考文献 20) に掲載されているマウスを用いたトリパノゾーマの感染治療実験結果を示す 10 枚の表のうちの最後の表です。表は 2 段になっているので多少見難いのですが、上段は感染開始後 32 日までの表、下段はそれに続く 33 日から 72 日までの期間の表です。ただし、2 例の対照例を含む 6 例のうち 4 例は上段の表の期間内で死亡していますから、下の表には記載されていません。表に記載されている略号の意味は以下のとおりです。
 Parasiten = 血中の Trypanosomat T.I. = Trypanosoma 感染 † = 少数 †† = 多数 ††† = 極めて多数
 0 = 陰性 — = 検査せず Farbstoff = Trypanrot の投与 ··· = 飼料に混入して投与 † = 死亡
 Cadèra. = Mal de Cadèras (カデラス病)
 この 10 番目の表は Trypanrot の投与で血中の原虫が消失したことを確認した後に、再度感染を起こさせ、再度の Trypanrot の投与なしで治癒したかという経過 (免疫との関係) を 72 日まで追った過酷な実験です。

実験であります。加えて、極めて大量の動物をも必要としました。志賀はこの実験を担当しておりました (図 2 参照)。

Ehrlich はこの動物実験の過程において、再発した症例には Atoxyl が有効であることを知りました。Atoxyl は砒素が結合したアニリン誘導体で (図 1 参照)、そのことが、Ehrlich に異常なまでの関心を持たせた最大の理由と思われます (註 11)。Ehrlich の研究は毒性の低い砒素製剤を開発することに大きく傾いていきました。そして、そのことが梅毒への治療薬開発の導線にも繋がって行きました。

生涯を通じての Ehrlich の多彩な研究業績を評するなら、Ehrlich は派生的な研究を派生的なままに終わらせずに偉大な研究に結びつけて行ったという

ことができそうです。世俗的な言い方をすれば、そこには努力も必要であったが運もあったということになりますが、その運を引き寄せた原動力は何であったのかということもあります。それには、Ehrlich の多彩な研究の裏には挫折することはなかったのかということも触れなければなりません。

そのような視点から、改めて Ehrlich の研究者としての生涯を整理しますと、大きくは 4 つの時期に分けられます。一つは 1878 年から 1888 年までの臨床家としてベルリンの Charite 病院で過ごした時代、二つ目は 1889 年から 1895 年頃までの研究者としての充実はしていたが辛抱をも必要とした時代、三つ目は 1897 年から 1905 年頃の他の研究者からの “side-chain theory” の批判に対する対応に追われて

註 11 : Atoxyl (Arsanilic acid) は 1859 年に Bechamp によって合成された砒素を含むアニリン誘導体です。原著ではなく、“Comptes rendus de l’Academie des sciences” の 1859 年版に記録として記されています。毒性は砒素そのものに比して弱いことから Atoxyl と呼ばれました。Atoxyl がトリパノゾーマ症に有効とした報告は Thomas と Breinl の共同報告として 1905 年度の Memoir xvi, Liverpool school of Tropical Medicine に “Trypanosomes, Trypanosomiasis, and Sleeping Sickness” と題して記載されていますが、実際には大量投与を必要とし、毒性 (貧血) が強く有用ではありませんでした。

いた時代、最後にはサルバルサンの開発という栄光とその裏側にある苦悩の時代であります。次号では、これらの時代における Ehrlich の研究の有り方について記したいと考えます。

文 献

- 1) Stephenson JW. On a large-angle immersion objective, without adjustment collar ; with some observation on "Numerical aperture". J Roy Microscop Soc, **1** : 51-56, 1878.
- 2) Abbe E. On new methods for improving spherical correction applied to the construction of wide-angled object-glasses. J Roy Microscop Soc, **2** : 812-824, 1879.
- 3) Koch R. Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis. Beitr Biol Pflanzen. **2** : 277-311, 1876.
- 4) Koch R. Verfahren zur Untersuchung, zum Conserviren und Photographiren der Bacterien. Beitr Biol Pflanzen. **2** : 399-434, 1877.
- 5) Weigert C. Über Bacterien in der Pockehaut. Centralbl Med Wchenschr. **9** : 609-611, 1871.
- 6) Ehrlich P. Über eine Mykose bei einen neugeborenen Kinde (Bakterienfärbung mit Anilinfarben). Jahr Schlesisch Gesell vaterland Cultur. **63** : 229-230, 1876.
- 7) Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik," Arch Mikroskop Anat, **13** : 263-277, 1877.
- 8) Koch R. Die Aetiologie der Tuberkulose. Berliner Klin Wochenschr. **19** : 221-230, 1882.
- 9) Ziehl F. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. Dtsch Med Wochenschr. **8** : 451-452, 1882.
- 10) Neelsen F. Ein casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. Centrabl med Wiss. **28** : 497-501, 1883.
- 11) Ehrlich P. Experimentelle Untersuchung über Immunität. I. Ueber Ricin. Dtsch Med Wochenschr. **17** : 976-979, 1891.
- 12) Ehrlich P. Experimentelle Untersuchung über Immunität. II. Ueber Abrin. Dtsch Med Wochenschr. **17** : 1218-1219, 1891.
- 13) Ehrlich P, Briger L. Ueber die Uebertragung von Immunität durch Milch. Dtsch Med Wochenschr. **18** : 393-394, 1892.
- 14) Ehrlich P. Bemerkungen über die Immunität durch Verebung und Säugung. Dtsch Med Wochenschr. **18** : 511, 1892.
- 15) Behring EA, Kitasato S. Ueber des Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Theiren. Dtsche Med Wochenschr. **16** : 1113-1114, 1890.
- 16) Ehrlich P. Zur Kenntniss der Anttoxinwirkung. Fortschr Med. **15** : 41-43, 1897.
- 17) Ehrlich P. Die Werthbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. Klin Jahrbuch. **6** : 299-326, 1898.
- 18) Ehrlich P, Apolant H. Ueber spontane Mischtumoren der Maus. Berliner Klin Wochenschr. **44** : 1399-1401, 1907.
- 19) Loewenthal H, Jahn G. Übertragungsversuche mit carcinomatoser Mause-Asciteflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen. Ztschr Krebsforsch. **37** : 439-447, 1932.
- 20) Ehrlich P, Siga K. Farbtherapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankung. Berliner Klin Wochenschr. **41** : 329-332, 362-365, 1904.