

Ascorbic acid의 항결핵균 작용에 관한 연구

경희대학교 의과대학 미생물학교실

김재오 · 호순태 · 김찬수

—Abstract—

A Study on Antibacterial Effects of Ascorbic Acid against *Mycobacterium tuberculosis*

Jae-Oh Kim, Soon-Tae Ho and Chan-Soo Kim

Department of Microbiology, Kyung Hee University, School of Medicine, Seoul, Korea

Vitamin C is known as an integral element for the formation and maintenance of intercellular supporting structures.

Ascorbic acid has been used for the treatment of certain poisonings and hypovitaminosis(scurvy) but also known as a powerful reducing agent, and can kill a variety of bacteria and detoxify bacterial exotoxins including various clostridial exotoxins in vitro. For viruses, vitamin C inactivates herpes virus, vaccinia virus and influenza virus and has been used for the prevention and treatment of the common cold.

Thus ascorbic acid plays an important role in antimicrobial action.

Scurvy also promotes the development of tubercles in experimentally infected guinea pig and the tuberculosis patients require more vitamin C than normal persons.

However there is no reports that ascorbic acid could inhibit the growth of *M. tuberculosis*.

In this paper, antibacterial effects of ascorbic acid against *M. tuberculosis* were studied.

The results are as follows:

1. The single use of the ascorbic acid exhibited antibacterial effect in vitro against 5×10^3 /ml of *M. tuberculosis* H₃₇ Rv at the concentration of ascorbic acid 0.625mg/ml over 3 hours exposure and 0.05 mg/ml over 9 hours exposure.
2. In vivo mice administered with ascorbic acid 50mg/day for 5, 10 and 15 days respectively were protected from *M. tuberculosis* 2LD₅₀, 3LD₅₀, 4LD₅₀ and 5LD₅₀ given intravenously.

서 론

Ascorbic acid는 1907년 Holst와 Frölich가 기니 피의 괴혈병의 연구에서 음식물중에 어떠한 물질이 결여되면 괴혈병이 발생하는데 이 물질은 수용성이며 가열하면 분해되고 alkali성용액보다 산성용액에서 더 안정하다는 것은 명백히 함으로써 발견되었다¹⁾. 그리고 이 연구는 그 후 괴혈병에 관해 이루어진 몇개의 근대적 연구의^{2), 3), 4)} 계기가 되었다. 1928년 Szent-Györgyi는 소의 부신피질, 오렌지 및 양배추로부터 hexuronic acid를 분리하여 이것이 Vitamin C일지도 모른다고 생각하였고⁵⁾ 1932년 Tillmans, Hirsch들이 먼저 Zilva⁶⁾가 관찰한 신선한

과즙이 청색색소 dichlorophenol indophenol을 환원하여 무색으로 하는 성질이 있는 것에 착안하여 더 연구한 결과 식품중에 함유되어 있는 색소탈색성요소가 Vitamin C의 생리작용과 항상 평행하다는 것을 확인하여 이 요소가 Vitamin C이고 hexuronic acid와 동일물질일 것이다 라고 추정하였다⁷⁾. 또한 King과 Waugh는 레몬즙으로부터 Vitamin C 결정의 분리에 성공하여 이것이 hexuronic acid와 일치한다고 보고하였다^{8), 9)}. 또 이와 거의 동시에 Szent-Györgyi는 기니피에 의한 실험결과 hexuronic acid의 항괴혈병작용이 Vitamin C의 작용인 것을 확인하였고 이것을 항괴혈병의 의미를 상기시키는데 적당하게 ascorbic acid라고 명명하였다¹⁰⁾. 그후 ascorbic acid의 작용은 광범위하다는 것을 알게 되었고

특히 최근에는 장기의 생리, 효소화학의 발전에 따라 각 분야에 더욱 그 중요성이 증명되었고 그 중요한 예로써 혈관, 혈액성분에 대한 작용, 이상색소 침착억제, 골·치아에 대한 작용, 다른 Vitamin 과의 협동 및 길항, 기타 해독작용등이 있다⁸⁾.

Ascorbic acid가 감소되었을 때는 세포간물질의 형성 및 보존에 장애가 생겨 출혈성경향이 증대되고 치아가 빠지며 골절이 생기기 쉽고 소화력의 저하, 창상의 치유등이 지연되며 면역학적으로도 항체생성능의 저하를 위시하여 많은 증세가 일어난다. 또한 ascorbic acid는 herpes virus를 불활성화시키고⁴⁾ 토끼에서는 이 virus의 피부감염에 대한 저항성을 증가시킨다고 알려졌다. ascorbic acid는 vaccinia virus와 influenza virus도 불활성화하며⁶⁾ 감기의 예방과 치료에도 유효하다는 보고도 있다^{14, 17, 18, 24, 26)}.

In vitro에서 ascorbic acid는 여러 종의 세균을 치사시킬 수 있고 *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus*, *Clostridium*의 외독소를 무독화시킬 수 있다고 하며²³⁾ ascorbic acid가 감소되면 세균감염에 대한 저항력이 감소된다.

McConkey와 Smith¹⁰⁾는 기니픽에서 ascorbic acid의 결핍으로 괴혈병이 생기면 *Streptococcus pneumoniae*에 대한 감수성이 증가되고 tubercle의 발생도 증가된다고 하였으며 ascorbic acid의 함량이 항상 저하되어 있는 성인에서는 결핵의 이병률이 높다고 한다¹⁾.

이와같이 ascorbic acid는 여러 방면에서 광범위하게 작용하고 있지만 결핵에 대한 작용은 알려져 있지 않다. 최근 항결핵제로서 Isoniazid(Isonicotinic acid hydrazide, INH), PAS(Paraamino salicylic acid), Ethambutol, Streptomycin, Rifampin등 여러 강력한 항균력을 가진 항생물질이 발견되어 사용되고 있으나 결핵은 아직도 난치의 병이고 이와같은 항생물질의 내성문제, 장기복용에 따르는 부작용 및 비용문제등 미해결의 중대사가 남아 있다는 것은 주지의 사실이다.

Ascorbic acid는 거의 부작용없이¹¹⁾ 일상생활에서 항상 염가로 손쉽게 사용될 수 있고 또 음식물로서도 획득하기 용이한 물질이나 아직 *Mycobacterium tuberculosis*에 대한 ascorbic acid의 항균력에 관한 보고는 없다. 저자들은 이에 ascorbic acid의 항결핵균작용을 세균학적으로 검토하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 재료 및 방법은 다음과 같다.

1. 균 주

본 실험에 사용된 결핵균은 본 교실에서 Ogawa 배지에 배양하여 보관하였던 *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv주이다.

2. Ascorbic acid

Ascorbic acid분말을 일본 관동화학제품으로 특급 시약을 사용하였고 주사용 용액으로 할 때는 BPC (British Pharmaceutical Codex) 1973의 처방으로 조제하였다. 즉 ascorbic acid 10.0 gm, sodium bicarbonate 4.8 gm, distilled water 100 ml의 비율로 조제하였으며 증류수는 재증류한 것을 사용하였고 사용시의 pH는 6.5~7.4이었다. 멸균은 millipore filter (GSO 0.22 μ m)로 하였다.

3. 배 지

결핵균 배지는 Ogawa 배지를 관용법에 따라 준비하여 사용하였다. 이때 용기는 결핵균 분리배양에서 사용하는 screw cap 병을 사용하였다.

4. 동 물

In vivo에서의 결핵균 감염에 대한 ascorbic acid의 작용에 관한 실험에는 체중 18~20 gm의 마우스(ICR계)를 암수 구별없이 사용하였다. 결핵균은 정맥내로 주사하였고 ascorbic acid는 복강내로 주사하였다.

5. In vitro에서 ascorbic acid의 *Mycobacterium tuberculosis* 발육억제시험

Ogawa 배지상의 결핵균을 채취하여 Dubos 배지 1~2적과 glass beads가 들어있는 작은 유리병에 넣고 vortex에서 잘 섞어 균피를 유제로 한 다음 식염수로 균부유액을 만들어 이것의 균등액을 spectrophotometer (Junior II, Coleman, model 6/35, U.S. A)에서 예비실험으로 정한 파장 640nm, O.D. 0.1 (균수 5×10^6 /ml)에 조정하여 다시 식염수로 10^3 배 희석하여 1 ml씩 취해 각각 1.25 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.06 mg/ml이 함유된 ascorbic acid용액 1 ml과 섞어 ascorbic acid의 농도가 0.625 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.03 mg/ml이 되게하고 이들 시험관을 밀전하여 실온에서 각각 3, 6, 9, 12시간 작용시킨 후 각 시험관을 원침하여 상청을 버리고 침전된 균체를 Dubos 배지 적당량으로 2회 세척하여 ascorbic acid 잔량을 제거하고 다시 Dubos 배지 0.5 ml에 부유시켜 micropipette으로 0.02 ml씩 취해 각각 6 vials의

Table 1. In vitro antibacterial action of ascorbic acid against *M. tuberculosis* H₃₇Rv

Ascorbic acid concentration (mg/ml)	No. of colony*			
	Exposure time to ascorbic acid			
	3	6	9	12 hours
0.625	98.1±3.46**	75.4±3.18**	73.3±2.89**	50.4±4.21**
0.3	103.0±2.77	97.3±3.59**	91.2±2.54**	84.8±2.67**
0.1	103.3±2.29	100.8±3.02**	96.2±1.34**	90.0±1.63**
0.05	103.5±2.50	103.8±1.95	99.3±1.37**	98.0±2.38**
0.03	105.0±2.71	105.2±3.29	105.3±1.97	104.0±2.16
0 (Control)	106.0±2.24	107.2±3.48	107.8±2.03	107.3±2.98

*Mean± standard deviation of number of colony per 0.02 ml of *M. tuberculosis* suspension

**P < 0.05

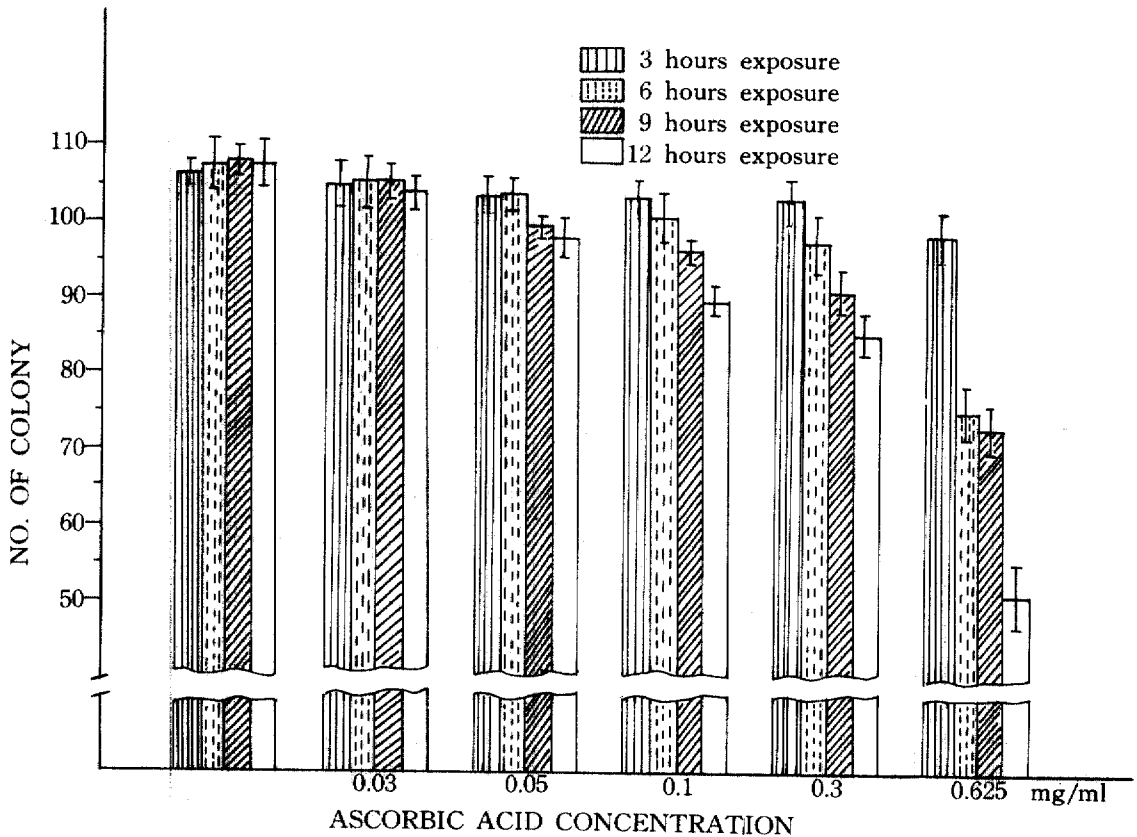


Fig. 1. The number of surviving *M. tuberculosis* with the concentration of ascorbic acid and exposure time.

Ogawa배지 사면에 도달하여 37°C에서 배양하였다. 대조군으로서는 ascorbic acid가 함유되지 않은 용액내에서 같은 방법으로 균을 처리하여 배양하였다. 배양후 출현하는 집락의 계산은 2주 전후부터 시작하여 3주까지로 하였다.

6. *M. tuberculosis* H₃₇Rv의 마우스에서의 LD₅₀

M. tuberculosis H₃₇Rv 10⁸, 10⁷, 10⁶을 체중 18~20 gm의 마우스(ICR계)에 정맥내로 주사하여 2주

일내에 치사하는 50% 치사량(LD₅₀)을 Reed-Muench의 방법¹⁵⁾으로 계산하였다.

7. In vivo에서 ascorbic acid의 *M. tuberculosis* 감염억제시험

체중 18~20 gm의 마우스(ICR계)의 정맥내로 *M. tuberculosis* H₃₇Rv의 2 LD₅₀, 3 LD₅₀, 4 LD₅₀, 5 LD₅₀을 주사하기 1시간 전으로부터 시작하여 ascorbic acid 50 mg(1 일분)을 2분하여 조석으로

25 mg 씩 복강내로 주사하였다. 이때 다섯마리씩으로 된 제 1군의 마우스에는 5일간, 제 2군에는 10일간, 제 3군에는 15일간 투여하면서 5일, 10일, 15일에 마우스가 결핵균 감염에 의한 치사로부터 방어되는 정도를 검토하였다. 대조군으로서는 같은 양의 *M. tuberculosis* 만 주사하였다.

성 적

1. In vitro 에서 ascorbic acid 의 *M. tuberculosis* H₃₇Rv 에 대한 항균력

인체에 적용시킬 수 있는 ascorbic acid 의 농도를 고려하여 저농도의 ascorbic acid 에서 *M. tuberculosis* 를 장시간 작용시키어 얻을 수 있는 항균력을 검토하였던 바 ascorbic acid 농도 0.625mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.03 mg/ml 에 *M. tuberculosis* 를 상기의 방법과 같이 각각 3, 6, 9, 12 시간 작용시킨 후 배양하였을 때 출현하는 집락표의 통계를 취하였던 바 표 1 과 같았다. 즉 ascorbic acid 가 함유되어 있지 않은 대조군에서는 3, 6, 9, 12시

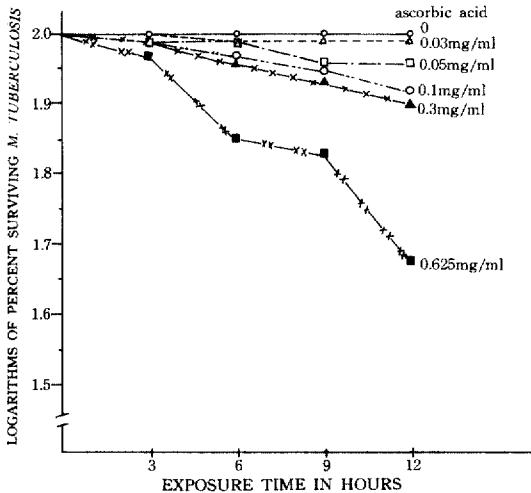


Fig. 2. In vitro antibacterial action of ascorbic acid against *M. tuberculosis* with time of exposure.

간 노출에서 출현하는 집락수는 각각 평균 106.0, 107.2, 107.8, 107.3이었으나 ascorbic acid 농도 0.625 mg/ml에서는 각각 평균 98.1, 75.4, 73.3, 50.4 이었고 0.3 mg/ml에서는 각각 평균 103.0, 97.3, 91.2, 84.8이었으며 0.1mg/ml에서는 각각 평균 103.3, 100.8, 96.2, 90.0이었고 0.05 mg/ml에서는 각각 평균 103.5, 103.8, 99.3, 98.0이었고 0.03 mg/ml에서는 각각 평균 105.0, 105.2, 105.3, 104.0이었다(그림 1). 이것을 대조군과 비교해 보면 항균력의 유의성을 나타내는 것(P < 0.05)은 ascorbic acid 농도 0.625 mg/ml에서는 3, 6, 9, 12 시간 노출, 0.3 mg/ml에서는 6, 9, 12시간 노출, 0.1mg/ml에서는 6, 9, 12시간 노출, 0.05 mg/ml에서는 9, 12시간 노출의 경우이다. 이 colony forming unit를 기준으로 한 대조군에서 관찰되는 집락표를 100%로 하였을 때 ascorbic acid 농도 0.625mg/ml에서는 3, 6, 9, 12시간 노출에 각각 7.45%, 29.66%, 32.00%, 53.03%의 감소를 보였고 ascorbic acid 농도 0.3 mg/ml에서는 각각 2.83%, 9.24%, 15.40%, 20.97%의 감소를 보였으며 ascorbic acid 농도 0.1mg/ml에서는 각각 2.55%, 5.97%, 10.76%, 16.12%의 감소를 보였고 ascorbic acid 농도 0.05 mg/ml에서는 각각 2.36%, 3.17%, 7.88%, 8.67%의 감소를 보였으며 ascorbic acid 농도 0.03 mg/ml에서는 각각 0.94%, 1.87%, 2.32%, 3.08%의

Table 2. Death rate of mice according to inoculated doses of *M. tuberculosis* H₃₇Rv

Days after inoculation	Inocula		
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
5	0/5*	1/5	3/5
10	1/5	2/5	3/5
15	0/5	3/5	5/5

*A denominator means the number of inoculated mice

A numerator means the number of dead mice

Table 3. Survival rate of mice infected with *M. tuberculosis* after administration of ascorbic acid

Period of administration of ascorbic acid (50mg/ days)	Inocula											
	2 LD ₅₀			3 LD ₅₀			4 LD ₅₀			5 LD ₅₀		
	5	5	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15 days*
5	5/5**	4/5	4/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	2/5	5/5	4/5	2/5
10	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	2/5
15	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	2/5
Control	5/5	4/5	2/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	1/5	5/5	3/5	1/5

*Period of observation

**A numerator means the number of surviving mice

감소를 보였다. 이것들을 average percentage surviving *M. tuberculosis*의 대수로 취하면 그림 2와 같은 거의 직선의 사멸곡선이 얻어진다. 이 곡선에 의하면 저농도의 ascorbic acid에서 *M. tuberculosis*의 노출시간이 길어짐에 따라 생존균수도 점차로 감소되었다.

2. In vivo에서 ascorbic acid의 *M. tuberculosis*에 대한 항균력

유독주 *M. tuberculosis* H₃₇Rv에 대한 ascorbic acid의 마우스에서의 항균력을 검토하기 위하여 먼저 본균에 대한 마우스의 LD₅₀을 구하고 이것에 대한 ascorbic acid의 항균력을 검토하였다.

1) 마우스에 대한 *M. tuberculosis* H₃₇Rv의 LD₅₀

마우스 다섯마리씩을 한 군으로 하여 *M. tuberculosis*를 10⁶, 10⁷, 10⁸을 각군에 정맥내로 주사하여 15일간 관찰하였던 바 표 2와 같은 성적을 얻었다. 이 성적에서 Reed-Muench의 방법에 의해 얻은 LD₅₀은 10^{4.7} (약 5 × 10⁴)이었다.

2) Ascorbic acid 투여 마우스에서의 항균력

Ascorbic acid 50 mg을 체중 18~20 gm의 마우스군에 1 회 25 mg씩 조식으로 2회에 걸쳐 복강내로 주사하였고 투여기간은 5 일, 10일, 15일의 3 군이었다. ascorbic acid를 투여하고 1시간 후에 *M. tuberculosis*의 2 LD₅₀, 3 LD₅₀, 4 LD₅₀, 5 LD₅₀을 각각 정맥내로 주사하여 5 일, 10일, 15일간 관찰하였던 바 이 기간중 생존한 마우스의 수는 표 3과 같았다.

M. tuberculosis 2 LD₅₀으로 감염시킨 마우스에서 매일 ascorbic acid 50 mg씩 15일간 투여하였을 경우 감염후 15일에도 80%가 생존하였으나 ascorbic acid 50 mg을 5 일, 10일간 투여한 경우에도 80%가 생존하였고 3 LD₅₀으로 감염시킨 경우에도 ascorbic acid를 15일간 투여하였을 경우 감염후 15일에는 80%가 생존하였으나 ascorbic acid를 5일, 10일간 투여한 경우에는 각각 60%, 40%가 생존하였다. 4 LD₅₀으로 감염시킨 경우에도 ascorbic acid를 15일간 투여하였을 경우 감염후 15일에는 80%가 생존하였으나 ascorbic acid를 5일, 10일간 투여한 경우에는 각각 40%, 40%가 생존하였다. 5 LD₅₀으로 감염시킨 경우에도 ascorbic acid를 15일간 투여하였을 경우 감염후 15일에는 40%가 존재하였으나 ascorbic acid를 5일, 10일간 투여한 경우에는 각각 40%, 40%가 존재하였다. ascorbic acid를 투여하지 않고 *M. tuberculosis* 2 LD₅₀, 3 LD₅₀, 4 LD₅₀, 5 LD₅₀으로 각각 감염시킨 15일 후에는 각각 40%, 40%, 20%, 20%만 생존하였다. 이것으로 보아 균

접종량과 ascorbic acid의 방어량 사이에는 타의 약제와 마찬가지로 일정한 관련성이 있다고 보겠다.

고 찰

Ascorbic acid는 여러 분야에서 널리 사용되고 있으나 그 대부분은 항균이외의 목적에 사용되고 있다. 항생물질의 강력한 살균작용 또는 정균작용이 발견된 이래 감염병의 치료에는 항생물질이 주로 사용되고 있어 항생물질이 아닌 항균제에 대하여는 거의 연구가 이루어지지 않는다. 그러나 항생물질도 작용여하에 따라 많은 문제점이 있다. 특히 수개월 이상 장기간 항생물질을 복용해야 하는 결핵 치료에서는 이것에 뒤따르는 부작용문제, 내성문제, 난치결핵문제등이 있기 때문에 부작용도 없고 염가로 또는 자연에서도 얻을 수 있으며 손쉽게 사용할 수 있는 항결핵제가 개발되면 결핵치료에 큰 도움이 될 것이다.

미생물에 대한 ascorbic acid의 생리에 대하여는 거의 알려져 있지 않다. *Serratia marcescens*와 같은 세균은 ascorbic acid를 필요로 하며 또 이것을 합성할 수 있다고 하나 미생물에 대한 항균작용은 별로 알려져 있지 않다. 전기한 것과 같이 감기와 약간의 세균감염등에 유효하다는 보고가 있고^{14,15,24,25} 항 virus 작용기전에 대해 1945년 Kleig은 Cu⁺⁺의 촉매하에 ascorbic acid의 산화과정중 생기는 H₂O₂에 의해 이루어진다고 하였으며²⁶ 항균작용에 대하여는 1953년 Marcus 등은 기니피오로부터의 neutrophil의 식균작용을 다소 증강시킨다고 하였으며²⁷ 1954년 Myrvik과 Volk는 in vitro에서 감염균과 독소에 대하여 대부분 환원제로서 작용한다고 하였다²⁸. 그러나 생체내에서는 환원제로서 작용하는 높은 농도를 유지할 수 없기 때문에 생체내에서의 효과는 더 복잡한 작용에 의하여 이루어진다고 한다²⁹. 1975년 Matsuo등은³⁰ *Mycobacterium leprae*에서 ascorbic acid가 β-glucuronidase를 억제하여 항균작용을 한다고 보고하였으나 이것이 결핵균에 대해서도 적용되는지는 확실치 않다.

Ascorbic acid는 내복에 의하여 완전히 빠르게 흡수되어 변중에서는 거의 증명되지 않는다. 흡수되면 혈장중의 농도가 속히 상승되고 다음에 혈구를 비롯하여 전신의 조직 특히 선조직중에서도 부신, 뇌하수체, 표피등에 많이 이행된다³¹. 그러나 체내에서 ascorbic acid는 고농도로 장시간 머물지 않고 일정농도 이상은 배설된다³². 조직과 체액의 ascorbic acid함량은 각기 다르며 ascorbic acid 75~100 mg (또는 250 mg 함유식품)을 섭취하는 사람은 혈

장농도가 1~1.4 mg%로 된다고 한다³⁾. 만일 일일 1,000 mg을 섭취하여 14 mg%로 된다면 높은 혈중 농도를 유지할 것이다.

본 실험성적으로 보면 in vitro에서 0.05 mg/ml에서의 항균활성은 서서히 진행되어 9시간 이상 작용시켰을 경우 대조군에 비해 유의성($P < 0.05$)을 나타내므로 ascorbic acid 500 mg을 섭취하여 혈장 농도가 5 mg% 이상 유지된다면 항결핵작용을 기대할 수 있을 것이다. 그러나 ascorbic acid의 혈중 농도가 1~1.2 mg%를 넘으면 노로 배설되므로 일정한 간격으로 계속 투여하여야 일정한 농도로 유지할 수 있을 것이다.

그리고 항균력을 나타내는 ascorbic acid의 농도는 결핵균의 수에 따라 차이가 난다. 본 실험은 in vitro에서 균수 5×10^3 /ml을 대상으로 한 실험이다. In vivo에서는 마우스에 2 LD₅₀, 3 LD₅₀, 4 LD₅₀, 5 LD₅₀의 결핵균을 정맥내로 접종하고 15일 후에 관찰하였을 때 ascorbic acid 50 mg을 5일간 투여한 군이나 10일, 15일간 투여한 군에서 모두 대조군에 비해 높은 생존율을 나타내었다. 따라서 ascorbic acid를 5일만 투여하여도 항균력이 있다는 것을 의미한다.

본 실험은 마우스에서 LD₅₀을 구할 때 같은 마우스를 사용하였기에 실험동물간에는 차이가 없다. *M. tuberculosis*의 LD₅₀을 3주 이후에서 정하고 보다 저농도의 ascorbic acid를 장기간 투여하면 저농도에서의 ascorbic acid의 항균력이 얻어질 것이다.

Young과 Rettger²⁷⁾는 ascorbic acid는 장내세균에 의하여 잘 파괴되지만 이 세균에 의해 더 잘 분해되는 glucose와 같은 합수탄소가 있으면 분해되지 않는다고 하였다.

Ascorbic acid는 산화력이 강하기 때문에 증류수나 배지에 혼합하여 역가의 저하없이 장기간 사용할 수 없다. 따라서 고형결핵배지나 액체결핵배지에 혼합하여 사용할 때 결핵균이 발육할 때까지 37°C 부란기에 방치하는 사이에 배지는 변하고 또 37°C에서 ascorbic acid는 속히 산화되기 때문에 이 방법으로는 결핵균에 대한 항균력을 검사할 수 없다. 따라서 ascorbic acid가 함유되어 있는 표본과 함유되어 있지 않은 대조표본에 결핵균을 일정시간 노출시킨 후 균에 부착된 ascorbic acid를 제거하여 O-gawa배지에 접종 배양하였다.

결핵균은 고온에서보다 저온에서 더 강한 저항성을 나타내기 때문에 실온에서 실시된 본 실험에서의 살균효과는 생체내에서 저농도로도 같은 효과를 나타낼지도 모른다. 또 결핵균은 타세균과 비교할 때 대단히 저항력이 강해 일반적으로 사용되는 소독약

에서도 약 3시간 생존할 수 있다.

본 실험에 의하면 in vitro에서 ascorbic acid농도 0.625 mg/ml에서는 3시간 이상, 0.3mg/ml과 0.1mg/ml에서는 6시간 이상, 0.05mg/ml에서는 9시간 이상 *M. tuberculosis*를 노출시켰을 때 대조군과 비교시 유의성($P < 0.05$)을 나타냈다. 또한 ascorbic acid농도가 감소됨에 따라 살균력이 감소되었으며 ascorbic acid 농도 0.03mg/ml에서는 *M. tuberculosis*를 12시간 노출시켜도 대조군과 비교시 유의성을 나타내지 못했다. 이와같이 고농도의 ascorbic acid에서 얻을 수 있는 살균력은 저농도의 ascorbic acid에서 얻을 수 있는 살균력보다 강하지만 인체에 사용할 때를 고려한다면 고농도의 ascorbic acid에서 단시간내에 사멸되는 것보다는 저농도에서 장시간 노출시켜 사멸시키는 경우가 더 바람직하다. 이는 인체에서 혈중농도를 고농도로 유지하려면 대량의 ascorbic acid를 섭취하여야 하기 때문이다. 따라서 본 실험성적으로 보아 ascorbic acid 농도 0.05 mg/ml에서 *M. tuberculosis*를 9시간 이상 노출시킨다면 ascorbic acid의 항결핵작용을 기대할 수 있을 것이다.

항균물질이 미생물세포를 불활성화하기 위하여 사용될 때 사용약제 농도와 일정한 세균집단을 살균하는데 필요한 시간과의 관련성은 본 실험에서도 곡선으로 나타난다. 즉 ascorbic acid가 고농도로 됨에 따라 살균시간이 단축된다.

결핵환자는 ascorbic acid를 포화상태로 유지하기 위하여는 정상인보다 100% 더 ascorbic acid를 필요로 한다³⁾. 이것은 대사의 정상화 때문인 것 같지만 본 실험에서 볼 때 결핵균의 살균에 관계되는 것이기도 하다. 대사적으로 불활성인 결핵균의 persist-er는 화학요법에 대한 감수성이 없다. 따라서 항균의 기전을 달리하는 항균제가 새로 나타나면 결핵치료에 크게 도움이 될 것이다.

In vitro에서 ascorbic acid 0.05 mg/ml에 결핵균 5×10^3 /ml이 노출되는 시간의 경과에 따라 점차치사율이 높아지는 것으로 볼 때 이보다 저농도에서 다른 항결핵제와 병용하여 장시간 ascorbic acid의 활성의 변화없이 작용시키면 항균작용의 상승이 나타날 것이 예상된다.

Ascorbic acid의 항균작용의 기전은 현재로서는 규명되어 있지 않으나 기존의 화학요법제와 ascorbic acid를 병용하여 사용한다면 결핵치료에 큰 도움이 될 것으로 기대된다.

결 론

Ascorbic acid는 일반적으로 대사관계에 많이 사

용되고 있는데 이의 항결핵균작용을 구명하기 위하여 in vitro에서 ascorbic acid농도 0.625 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.03 mg/ml에 의한 항균작용을 *M. tuberculosis* H₃₇Rv 5 × 10⁸/ml에 대해 실험함과 아울러 in vivo에서는 마우스에 ascorbic acid 50 mg을 5, 10, 15일간 각각 복강내로 투여한 3군의 마우스에 *M. tuberculosis* H₃₇Rv 2 LD₅₀, 3 LD₅₀, 4 LD₅₀, 5 LD₅₀을 각각 정맥내로 주사하여 그 치사에 대한 방어력을 검토한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. In vitro에서 ascorbic acid농도 0.625 mg/ml 0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.03 mg/ml에서 *M. tuberculosis* 5 × 10⁸/ml이 6시간 노출에 각각 29.66%, 9.24%, 5.97%, 3.17%, 1.87% 감소하였고 9시간 노출에 각각 32.00%, 15.40%, 10.76%, 7.88%, 2.32% 감소하였으며 12시간 노출에 각각 53.03%, 20.97%, 16.12%, 8.67%, 3.08% 감소하였다. 또한 ascorbic acid농도 0.625 mg/ml에서는 3시간 이상, ascorbic acid농도 0.3 mg/ml에서는 6시간 이상, ascorbic acid농도 0.1 mg/ml에서는 6시간 이상, ascorbic acid농도 0.05 mg/ml에서는 9시간 이상 *M. tuberculosis* 5 × 10⁸/ml을 노출시켰을 때 대조군에 비해 항균력의 유의성(P < 0.05)을 나타냈다.

2. In vivo에서 ascorbic acid 농도 50 mg/day 를 5일, 10일, 15일간 각각 복강내로 투여한 마우스군에서 15일간 관찰한 결과 *M. tuberculosis* H₃₇Rv 2 LD₅₀을 접종한 군에서는 각각 80%, 80, 80%가 생존하였고 3 LD₅₀을 접종한 군에서는 각각 40%, 60%, 80%가 생존하였으며 4 LD₅₀을 접종한 군에서는 각각 40%, 40%, 80%가 생존하였고 5 LD₅₀을 접종한 군에서는 각각 40%, 40%, 40%가 생존하였다.

이상의 실험성적으로 보아 ascorbic acid는 결핵균에 대하여 항균력이 있음을 알 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) Getz HR, Long ER and Henderson HJ: A study of the relation of nutrition to the development of tuberculosis. Influence of ascorbic acid and vitamin A. *Amer. Rev. Tuberc.* 64 : 381, 1951.
- 2) Gilman AG, Goodman LS and Gilman A: The Pharmacological Basis of Therapeutics. The McMillan Company, 6Ed., New York, 1980.
- 3) Goldstein ML: High dose ascorbic acid thera-

- py. *JAMA.* 216 : 332, 1971.
- 4) Holden M and Resnick R: The in vitro action of synthetic crystalline vitamin C(ascorbic acid) on herpes virus. *J. Imm.* 31 : 455, 1936.
- 5) King DG and Waugh WA: The chemical nature of vitamin C. *Science.* 75 : 357, 1932.
- 6) Klein M: The mechanism of the virucidal action of ascorbic acid. *Science.* 101 : 587, 1945.
- 7) Marcus S, Esplin DW and Hill GA: Effects of cortisone, ascorbic acid and piromen on phagocytosis in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.* 84 : 565, 1953.
- 8) Martin, GR and Mecca DE: Studies on the distribution of ascorbic acid in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 93 : 110, 1961.
- 9) Matsuo E, Skinsnes OK and Chang PHC: Acid mucopolysaccharide metabolism in leprosy. 3. Hyaluronic acid mycobacterial growth enhancement and growth suppression by saccharic acid and vitamin C as inhibitors of beta-glucuronidase. *Intl. J. Leprosy.* 43 : 1, 1975.
- 10) McConkey M and Smith DT: The relation of vitamin C deficiency to intestinal tuberculosis in the guinea pig. *J. Exp. Med.* 58 : 503, 1933.
- 11) Mayler, LD: Side effects of drugs as reported in the medical literature of the world. 4Ed., Excerpta Medical Foundation, New York, 1964.
- 12) Myrvik ON and Volk WA: Comparative study of the antibacterial properties of ascorbic acid and reductogenic compounds. *J. Bact.* 68 : 622, 1954.
- 13) Oser BL: Hawk's physiological chemistry, 14 Ed., p. 691, McGraw-Hill Inc., 1965.
- 14) Pauling L: Vitamin C and the common cold. San Fransisco, Freeman WH & Publisher DD, 1970.
- 15) Reed LJ and Muench HA: Simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27 : 493, 1938.
- 16) Schrauzer GN and Rhead WJ: Ascorbic acid abuse: Effects of long-term ingestion of excessive amounts on blood levels and urinary excretion. *Int. J. Vitam. Nectr. Tes.* 43 : 201, 1973.
- 17) Spero LM and Anderson TW: Ascorbic acid and common colds. *Br. Med. J.* 2 : 354, 1973.
- 18) Spero L and Toulis G: Blood levels of ascorbic acid associated with a large daily intake of

- vitamin C (submitted for publication).
- 19) Svrbely JL and Szent-Györgyi A: Chemical nature of vitamin C. *Biochem. J.* **26** : 865, 1932.
 - 20) Szent-Györgyi A : Observations on the function of peroxidase system and the chemistry of the adrenal cortex. *Biochem. J.* **22** : 1387, 1928.
 - 21) The United Pharmacopeia. The National Formula NFXV. Twentieth Revision. United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1980.
 - 22) Tillmans J, Hirsch P and Hirsch W : Das Reduktionsvermögen pflanzlicher Lebensmittel und seine Beziehung zum vitamin C. I. Der reduzierende Stoff des citronensaftes. *Z. Unters. Lebensmittel.* **63** : 1, 1932.
 - 23) Wilson GS and Miles AA : Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 6Ed., Edward Arnold., 1975.
 - 24) Walker GH, Bynoe ML and Tyrell ADJ : Trial of ascorbic acid in prevention of colds. *Br. Med. J.* **1** : 603, 1967.
 - 25) Waugh WA and King DG : Isolation and identification of vitamin C. *J. Biol. Chem.* **97** : 325, 1932.
 - 26) Wilson CWM, Loh HS and Foster FG : The beneficial effect of vitamin C on the common cold. *Europ. J. Clin. Pharmacol.* **6** : 26, 1973.
 - 27) Young RM and Rettger LF : Decomposition of vitamin C by bacteria. *J. Bact.* **46** : 351, 1943.
 - 28) Zilva SS : The antiscorbutic fraction of lemon juice. *V. Biochem. J.* **21** : 689, 1927.