

*Aspergillus fumigatus*에 대한 Apolactoferrin의 성장억제 효과

연세대학교 의과대학 내과학교실

이꽃실 · 장경희 · 김명수 · 김영근 · 김자경 · 최성희 · 허애정 · 염준섭 · 송영구 · 김준명

The Fungicidal Effect of Apolactoferrin on *Aspergillus fumigatus*

Kkot Sil Lee, M.D., Kyung Hee Chang, M.D., Myung Soo Kim, M.D., Young Keun Kim, M.D.
Ja Kyung Kim, M.D., Seung Hee Choi, M.D., Ae Jung Huh, M.D., Joon Sup Yeom, M.D.
Young Goo Song, M.D. and June Myung Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Background : The incidence of aspergillosis is rising with the increased use of antimicrobial agents and immunosuppressive drugs for the treatment of malignant diseases, acquired immunodeficiency syndrome, or organ transplant recipients. However, treatment failures are also increasing which brings up the need for the development of new and more effective agents and/or compounds which support the activity of common antifungal agents. Apolactoferrin is one of the nonspecific host defence factors present in saliva that exhibit antifungal activity. We studied the in vitro antifungal effect of apolactoferrin in combination with amphotericin-B against *Aspergillus fumigatus*.

Methods : Preparation of the inoculum and the growth conditions used were those recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards M38-P (Conidium-forming filamentous fungi : proposed standard). *Aspergillus fumigatus* test inoculum was prepared to a concentration of $0.4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ cells/mL. Appropriate concentrations of the antifungal

agents were added to the wells ($50 \mu\text{L}$) and after inoculation, plates were incubated for 48 h at 35°C . Turbidity measurement was performed at 48 h at 630 nm and the MIC was defined as the lowest concentration of antifungal agents that inhibited growth of the organism as detected visually.

Results : In the combination of experiments, we observed pronounced cooperative activity against growth of *Aspergillus fumigatus* by using apolactoferrin and amphotericin-B. The MIC of amphotericin-B was reduced by 1/10 in the presence of apolactoferrin.

Conclusion : The combined use of apolactoferrin and amphotericin-B against severe infections with *Aspergillus fumigatus* is an attractive therapeutic option. Clinical studies to further elucidate the potential utility of this combination therapy have been initiated. (Korean J Infect Dis 33:325~330, 2001)

Key Words : *Aspergillus fumigatus*, Apolactoferrin, Antifungal activity

서 론

최근 광범위 항생제의 사용, 스테로이드제의 장기 복용, 장기이식, 면역억제제 및 항암제의 사용, 후천성 면역 결핍증 환자가 증가함에 따라 진균 감염증의 빈도도 증가하고 있다

접수 : 2001년 월 일, 승인 : 2001년 월 일
교신저자 : 김준명. 연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel : 02)361-5431, Fax : 02)393-6884
E-mail : jmkim@yumc.yonsei.ac.kr

¹⁾. 또한 호중구 감소증 환자에서 칸디다증(candidosis)에 의한 사망률은 60% 이상이며 아스페르길루스증(aspergillosis)과 푸사리오스증(fusariosis)에 의한 사망률도 90% 이상이다

²⁾. 최근에는 후천성 면역 결핍증 환자와 chronic mucocutaneous candidiasis에 있어서 fluconazole과 같은 항진균제의 반복사용으로 내성 균주의 출현이 문제가 되고 있다^{3, 4)}. 현재 사용 중인 항진균제에 대한 부작용으로 약제 사용에 제한과 함께 내성균주가 점차 문제가 되고 있는 현실에서 기존의 항진균제를 보완할 치료제의 필요성이 대두되고 있다. 실

제로 일부 실험실에서 비스테로이드 항염증제(NSAIDs, ibuprofen)⁵⁾, 키토산(Chitosan)⁶⁾, 사이토카인(IL-1, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α)^{7, 8)}, Calcium-channel blocker(verapamil, diltiazem)^{9, 10)}, 라이소자임(lysozyme)^{1, 11)}, 락토페린(lactoferrin)¹⁾ 등의 항진균 효과에 대한 연구가 진행되고 있다. 그 중 lactoferrin은 포유류의 외분비선과 호중구의 이차 과립(secondary granule)에서 주로 발견되고 숙주의 비특이적 방어기능을 하는 철 결합성 당단백(iron-binding glycoprotein)이다¹²⁾. Lactoferrin 중에서 N-terminal region으로부터 유도된 것을 lactoferricin이라고 하고, iron free form을 apolactoferrin이라고 한다¹³⁾. *Candida spp.*에 있어서 이러한 apolactoferrin에 대한 연구가 있었고, 실제 *Candida albicans*와 *Candida krusei*에서 항진균 효과가 있음을 보고하였고 일부에서는 상승효과까지 보고하였다. 그러나 apolactoferrin의 *Aspergillus spp.*에 대한 항진균효과를 알아보는 연구는 없었다^{1, 14)}. 따라서 저자 등은 침습성인 경우 사망률이 높고 내성균주도 문제가 되고 있는 *Aspergillus spp.*에 있어서 apolactoferrin의 보완효과를 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 미생물

Aspergillus fumigatus (ATCC 26430)을 사용하였고 4°C Sabouraud dextrose agar (SDA)에 보관하였다.

2. 배지

RPMI 1640 medium (with glutamine, without bicarbonate, and with a pH indicator) (Gibco BRL, Paisley, UK)을 사용하였다.

3. 항진균제

Human lactoferrin을 SDS-PAGE법으로 90% 순도로 가공한 iron free lactoferrin (apo-lactoferrin : salt free, lyophilized powder) (Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였고, amphotericin-B (Fungizone; Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ, USA)는 멸균액에 5 mg/mL 농도로 준비한 다음 추후에 실험 농도에 맞춰 배지로 희석하여 사용하였다. 모든 부유액은 멸균된 유리 튜브에 담아서 사용하였다. Amphotericin-B의 농도는 0.01, 0.1, 1, 2, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 사용하였고, apolactoferrin의 농도는 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 사용하였다.

4. 접종

일정 농도의 균 부유액을 얻기 위해 Sabouraud dextrose agar (SDA)에 *Aspergillus fumigatus*를 35°C (in air)에서 24시간 배양한 다음, 배양된 *Aspergillus fumigatus* 균의 접락을 백금이로 채취한 후 10 mL의 RPMI 1640 배지에 희석하였다. 그 후 다시 35°C (in air)에서 18시간 배양한 다음 1 : 10으로 희석하였고 다시 5시간 더 배양하였다. 5분간 무거운 입자를 가라앉힌 후 상층의 균등액을 떠서 필터한 다음 15초간 Vortex mix를 하였다. 균 수를 hemocytometer로 계측하여 균 부유액의 농도를 $0.4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ 로 한 후, 실제 접종시는 1 : 100 희석하여 $0.4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4 \text{ cells}/\text{mL}$ 을 실험에 사용하였다. Sterile 96-well plastic flat-bottom tray를 사용하여 $0.4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4 \text{ cells}/\text{mL}$ 로 희석한 균 부유액 50 μL 와 적정 농도의 항진균제 50 μL 를 넣어 총량이 150 μL 가 되도록 나머지는 배지로 채웠다.

5. 배양, 성장

배양은 35°C (without agitation)에 46~50시간 동안 하였고, 혼탁도는 SPECTRA MAX 340으로 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최소억제농도(MIC)는 The National Committee for Clinical Laboratory Standards M38-P (Conidium-forming filamentous fungi : proposed standard)에 따라 눈으로 보아 균의 성장을 억제하는 항진균제의 최소농도를 최소억제농도로 정의하였다¹⁵⁻¹⁸⁾.

결과

1. *Aspergillus fumigatus*에 대한 amphotericin-B의 성장억제 효과

Amphotericin-B의 0.01, 0.1, 1, 2, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 변화에 따른 630 nm에서 흡광도의 변화는 0.292, 0.094, 0.088, 0.086, 0.083, 0.043, 0.046, 0.042으로 *Aspergillus fumigatus*에 대한 amphotericin-B의 최소억제농도는

Table 1. The Fungicidal Effect of Amphotericin-B on *Aspergillus fumigatus*

Amphotericin-B ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	0.01	0.1	1	2	5	10	50	100
OD630	0.453	0.292	0.094	0.088	0.086	0.083	0.043	0.046	0.042

0.1~1 $\mu\text{g/mL}$ 이다(Table 1, Figure 1).

2. *Aspergillus fumigatus*에 대한 apolactoferrin의 성장억제 효과

Apolactoferrin 단독으로 사용한 경우에도 *Aspergillus fumigatus*에 대한 억제 효과가 있었다. Apolactoferrin의 농도를 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 로 증가시켰을 때 630 nm에서 흡광도의 변화는 0.36, 0.378, 0.357, 0.345, 0.375, 0.312, 0.288으로 control에 비해 현저히 감소함을 볼 수 있었다. 또한 저농도의 apolactoferrin에서도 *Aspergillus*

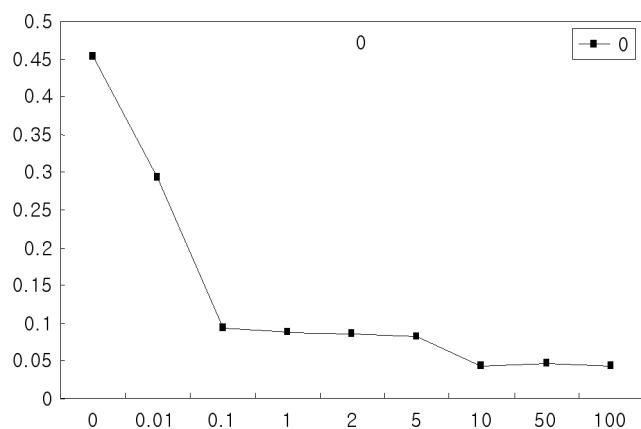


Figure 1. The MIC was defined as the lowest concentration of the antifungal agent that substantially inhibited the growth of *Aspergillus fumigatus* after 48h. MIC of amphotericin-B for *Aspergillus fumigatus* was 0.1~1 $\mu\text{g/mL}$.

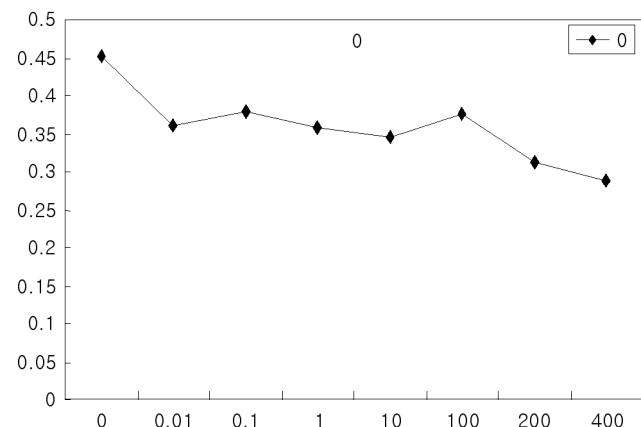


Figure 2. Apolactoferrin only inhibited the growth of *Aspergillus fumigatus* after 48 h.

*fumigatus*에 대한 억제 효과가 있음을 볼 수 있었다(Figure 2, Table 2).

3. *Aspergillus fumigatus*에 대한 apolactoferrin과 amphotericin-B의 병합시 억제 효과

Apolactoferrin과 amphotericin-B의 병합요법시 amphotericin-B 단독으로 사용한 경우보다 억제 효과가 커으며, 최소 억제농도도 단독 사용시 보다 1/10 가량 감소함을 볼 수 있었다(Figure 3).

고찰

*Aspergillus fumigatus*는 aspergilloma로부터 invasive aspergillosis까지 다양한 임상 양상이 있으며 최근 내성 균주 문제가 되고 있다¹⁹⁾. 또한 진균 감염증 환자의 경우 대부분 혈액증상이나 면역억제 및 항암제의 사용, 또는 면역부전 상태인 경우가 많아 기초질환 자체로도 약제의 사용에 제한이 있다.

기존에 사용하는 항진균제의 사용을 감소시켜 부작용을 줄일 수 있는 보조적인 치료에 대한 많은 연구가 있어 왔다. 비스테로이드 항염증제(NSAIDs, ibuprofen)⁵⁾, 키토산(Chitosan)⁶⁾, 사이토카인(IL-1, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α)^{7, 8)}, Calcium-channel blocker (verapamil, diltiazem)^{9, 10)}, 라이소자임(lysozyme)^{1, 11)}, 락토페린(lactoferrin)¹⁾, neutrophil²⁰⁾, calprotectin²¹⁾ 등이 그것이다. 비스테로이드 항염증제(NSAIDs)인

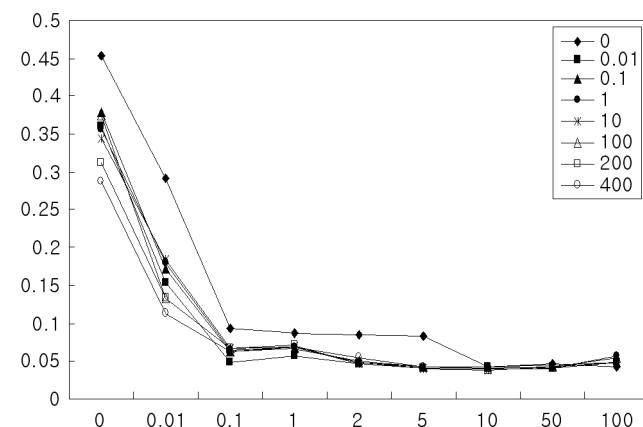


Figure 3. Combined inhibitory effects of apolactoferrin and amphotericin-B on the growth of *Aspergillus fumigatus*.

Table 2. The Fungicidal Effect of Apolactoferrin on *Aspergillus fumigatus*

Apolactoferrin ($\mu\text{g/mL}$)	0	0.01	0.1	1	10	100	200	400
OD630	0.453	0.36	0.378	0.357	0.345	0.375	0.312	0.288

ibuprofen의 경우 *Candida albicans* NCYC610에 대해 fluconazole과 함께 투여할 경우 상승효과가 있다고 밝혀졌고, miconazole의 경우도 상승효과가 있다고 보고되었다^{22, 23)}. 사이토카인(IL-1, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α)의 경우 다형백세포의 수와 기능을 상승시키고 식세포의 기능을 강화시켜서 항진균 효과를 보인다고 알려졌다^{2, 7, 24)}. 실제로 124명의 급성 백혈병 환자에서 GM-CSF를 사용하여 사망률이 감소하였다는 보고도 있다. *Aspergillus species*에 관한 연구도 있는데 1997년 Nguyen 등이 azithromycin에 의해 amphotericin-B의 항진균 효과가 강화되는 것을 보고하였다²⁵⁾.

Lactoferrin은 1939년 소의 젖에서 처음 발견되었고, 1960년 사람의 모유에서 분리하였다. 또한 눈물, 침, 담즙, 췌장액 등에서도 발견하였으며 immunoglobulin A, lysozyme, histatin과 같이 숙주 방어와 관련된 역할을 하는 비특이적 당단백이다. Lactoferrin은 692개의 아미노산으로 구성되어 있으며 80 kDa의 분자량과 N-, C-terminal lobes을 가지고 있으며 각각 N1, N2, C1, C2의 domain으로 나뉘어 있다^{9, 12, 26)}. Lactoferrin 생성의 조절은 조직 특이적(tissue specific)이며, 호르몬 의존적(hormone dependent)인 것으로 여겨지며, 파괴는 수용체를 통한 세포내이입(endocytosis)과 Kupffer cell, 간세포에 의해 제거되는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 사람의 모유와 초유에서 lactoferrin의 농도는 각각 1 mg/mL, 7 mg/mL이며 질 점막에는 0.5~1.0 mg/mL 눈물에는 0.4~1.2 mg/mL이며, 염증이 있는 이하선의 경우 14 mg/mL 까지 발견된다¹²⁾. 실제로 후천성 면역결핍증의 경우 구강 캔디다증을 비롯한 진균감염이 많은데 혈청 lactoferrin의 수치가 현저히 낮음을 관찰할 수 있었다. 이로 lactoferrin은 점막의 숙주 방어와 관계가 있음을 간접적으로 알 수 있다^{1, 24)}.

Lactoferrin의 기능에 관한 연구로, 박테리아에 대한 항균역할은 미생물이 살아가는데 꼭 필요한 영양소인 철과 lactoferrin이 결합함으로써 생체내의 대사 활동을 방해하여 항균역할을 하고, 그림 음성 박테리아의 경우 세포벽의 lipo-polysaccharide에 직접적으로 결합하여 세포벽으로부터 lipo-polysaccharide를 이탈시키는 역할을 하고 있다고 생각하고 그림 양성의 경우 teichoic acid에 결합하는 것으로 알려졌다⁸⁾. 항진균 효과에 대해서는 전자현미경으로 관찰한 결과 진균 세포막의 구조적 변화를 일으켜 투과도를 변화시키고, 일부 균종에 대해서는 직접적으로 세포표면에 결합하여 lethal effect를 보이는 것으로 생각한다^{5, 14, 27)}. 그 외 효소 활성의 간접적인 역할, 미생물의 철과의 결합 등이 복합적으로 작용할 것으로 생각한다. 또한 azole-resistant *Candida*의 경우도 lactoferrin이 Cdr1 같은 multidrug efflux transporters

의 활동을 억제시켜 항진균 효과를 나타낸다고 보고하고 있다^{3, 19)}.

저자 등의 실험에서 *Aspergillus fumigatus*에 대한 lactoferrin의 작용을 살펴본 바, amphotericin-B의 작용이 세포막의 ergosterol과 결합하여 주로 작용한다면, apolactoferrin의 세포막의 작용에 비호의적인 효과를 가져올 수 있다고 생각할 수 있으나, 결과에서는 병합요법시 성장억제 효과가 좋음을 관찰할 수 있었다. 이는 같은 세포막에 작용을 한다 하더라도 결합하는 부위에 차이가 있을 것으로 생각하고 있으며 amphotericin-B의 작용기전 중 일부에서는 산화적 파괴(oxidative damage) 작용이 항진균 효과와 관련이 있다고 생각한다. 또한 진균내에서도 apolactoferrin의 항진균 효과에 차이가 있는데 이는 효소 활성의 민감도의 차이나 세포벽의 미세한 구성성분의 차이, 철 성분의 필요도의 차이 등이 관여할 것으로 생각한다^{1, 4, 19, 27)}.

본 연구에서는 lactoferrin과 apolactoferrin에 대해 *Aspergillus fumigatus*의 항진균 효과를 비교하였는데 lactoferrin보다 apolactoferrin의 효과가 우월함을 확인할 수 있었다. 이는 iron free form인 apolactoferrin이 iron saturation form 보다 철과 결합능이 커 항진균 효과가 큰 것으로 여겨진다.

그 외 기생충이나 바이러스에 대한 lactoferrin의 효과²⁸⁾, 염증반응의 조절, 그리고 전신성 홍반성 낭창이나 류마티스 관절염과 혈관염 등의 자가면역질환에서 lactoferrin에 대한 항체의 발견, fibrosarcoma와 melanoma의 NK-cell을 통한 암세포 성장억제도 보고하고 있다^{29, 30)}.

실제 생체내 치료적 용량에 대해서도 많은 연구가 있었다. 발 무좀의 경우 lactoferrin 600~2,000 mg을 사용하여 증상의 호전을 본 연구가 있으며³¹⁾, *Helicobacter felis*의 경우 lactoferrin 10 mg을 사용하여 amoxacillin을 포함한 기준의 병합사용과 치료효과가 비슷하였다는 보고가 있다³²⁾. 그 외의 몇 가지 결과들을 종합해 볼 때 1~1,000 mg/mL의 단위 정도가 치료적 용량이 될 것으로 생각한다.

칸디다의 경우 apolactoferrin의 농도를 5, 10, 20 μ g/mL로 증가시 용량 의존적(dose-dependent)으로 항진균 효과가 나타남을 보고하였다²⁷⁾. 본 연구에서는 apolactoferrin의 용량의존적인 항진균 효과와 apolactoferrin 자체의 최소억제농도를 측정할 수는 없었다. 이로 인해 FIC index (fractional inhibitory concentration index)와 병합효과 또는 상승효과를 구분하지는 못하였다. 이는 실험하는데 vortex mix를 하지만 미생물의 well 당 균등한 분할을 하기가 어렵고, 배양을 함에 있어서도 well의 가장자리로 주로 자라기 때문에 탁도를 측정하기 전에 pipetting과 shaking을 하지만 균등함을 유지

하는데 어려움이 있었다. 이런 요인들이 실험의 오차로 작용할 수 있다고 생각된다. *Aspergillus fumigatus*에 대한 치료시 기존의 항진균제에 대한 부작용으로 약제의 사용에 제한이 있는 경우 apolactoferrin과 같은 보완치료(Adjuvant therapy)의 병합이 하나의 치료적 선택이 될 수 있고, 이로써 기존의 항진균제의 용량을 현저히 줄여서 사용할 수 있으며 내성균주의 출현을 늦출 수 있을 것으로 생각된다. 추후 amphotericin-B에 대한 최소억제농도가 높은 *Aspergillus spp.*와 내성균주에 대한 apolactoferrin의 연구가 필요하겠다.

요약

목적 : 최근 광범위 항생제의 사용, 스테로이드제의 장기복용, 장기이식, 면역억제제 및 항암제의 사용, 후천성 면역결핍증 환자가 증가함에 따라 진균 감염증의 빈도가 증가하고 있다. 그리고 현재 사용 중인 항진균제에 대한 부작용으로 약제 사용에 제한과 함께 내성균주가 점차 문제가 되고 있는 현실에서 기존의 항진균제를 보완할 치료제의 필요성이 대두되고 있다. 그 중 lactoferrin은 포유류의 외분비선과 호중구의 이차 과립(secondary granule)에서 주로 발견되고 숙주의 비특이적 방어기능을 하는 철 결합성 당단백(iron-binding glycoprotein)이다. Lactoferrin 중에서 iron free form 을 apolactoferrin이라고 한다. *Candida spp.*에 있어서 이러한 apolactoferrin에 대한 연구가 있었으나, *Aspergillus spp.*에 대한 항진균 효과를 알아보는 연구는 없었다. 따라서 저자 등은 침습성인 경우 사망률이 높고 내성균주도 문제가 되고 있는 *Aspergillus spp.*에 있어서 apolactoferrin의 보완효과를 보고자 하였다.

방법 : 4°C Sabouraud dextrose agar (SDA)에 보관한 *Aspergillus fumigatus*와 RPMI 1640 배지를 사용하였다. Human lactoferrin을 SDS-PAGE법으로 90% 순도로 가공한 iron free lactoferrin 각각 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 200, 400 µg/mL 농도와 amphotericin-B 각각 0.01, 0.1, 1, 2, 5, 10, 50, 100 µg/mL 농도를 사용하였다. 일정 농도의 균 부유액을 얻기 위해 균 수를 hemocytometer로 계측하여 $0.4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ cells/mL을 실험에 사용하였다. Sterile 96-well plastic flat-bottom tray를 사용하였고 혼탁도는 SPECTRA MAX 340으로 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최소억제농도 (MIC)는 The National Committee for Clinical Laboratory Standards M38-P (Conidium-forming filamentous fungi: proposed standard)에 따라 눈으로 보아 균의 성장을 억제하는 항진균제의 최소농도를 최소억제농도로 정의하였다.

결과 : *Aspergillus fumigatus*에 대한 amphotericin-B의 최소억제농도는 0.1~1 µg/mL였고, apolactoferrin 단독으로 사용한 경우에도 *Aspergillus fumigatus*에 대한 억제 효과가 있었으며, apolactoferrin과 amphotericin-B의 병합요법시 amphotericin-B 단독으로 사용한 경우보다 억제 효과가 커으며, 최소억제농도도 단독 사용시 보다 1/10 가량 감소함을 볼 수 있었다.

결론 : *Aspergillus fumigatus*에 대한 치료시 기존의 약제에 대한 부작용으로 사용에 제한이 있는 경우 apolactoferrin과 같은 보완치료(Adjuvant therapy)의 병합이 하나의 치료적 선택이 될 수 있고, 이로써 기존 약제의 사용을 줄이고 내성균주의 출현을 늦출 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Kuipers ME, DE Vries HG, Eikelboom MC, Meijer DKF, Swart PJ: Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2635-2641, 1999
- Roilides E, Dignani MC, Anaissie EJ, Rex JH: The role of immunoreconstitution in the management of refractory opportunistic fungal infections. *Med Mycol* 36: 12-25, 1998
- Wakabayashi H, Abe S, Teraguchi S, Hayasawa H, Yamaguchi H: Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1587-1591, 1998
- Kirkpatrick CH, Green I, Rich RR, Schade AL: Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: Relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. *J Inf Dis* 124:539-544, 1971
- Scott EM, Tariq VN, McCrory RM: Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate, or propylparaben against *Candida albicans* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2610-2614, 1995
- Roller S, Covill N: The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int J Food Microbiol* 47:67-77, 1999
- De Bernardis F, Santoni G, Boccanfusa M, Spreghini E, Adriani D, Morelli L, Cassone A: Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect Immun* 68:3297-3304, 2000
- Palma C, Cassone A, Serbousek D, Pearson CA,

- Djeu JY: Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. *Infect Immun* 60:4604-4611, 1992
- 9) Sun XL, Baker HM, Shewry SC, Jameson GB, Baker EN: Structure of recombinant human lactoferrin expressed in *Aspergillus awamori*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55:403-407, 1999
 - 10) Praveen RJ, Subramanyam C: Requirement of Ca^{2+} channel blockers on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Lett Appl Microbiol* 28:85-88, 1999
 - 11) Samaranayake YH, Samaranayake LP, Wu PC, So M: The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *APMIS* 105:875-883, 1997
 - 12) Vorland LH: Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein. *APMIS* 107:971-981, 1999
 - 13) Vorland LH, Ulvatne H, Andersen J, Haukland HH, Rekdal O, Svendsen JS, Gutteberg TJ: Antibacterial effects of lactoferricin B. *Scand J Infect Dis* 31:179-184, 1999
 - 14) Wakabayashi H, Abe S, Okutomi T, Tansho S, Kawase K, Yamaguchi H: Cooperative anti-Candida effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. *Microbiol Immunol* 40:821-825, 1996
 - 15) Espinel-Ingroff A: Clinical utility of in vitro antifungal susceptibility testing. *Revista Espanola de Quimioterapia* 13:161-162, 2000
 - 16) Pfaller MA, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, et al.: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; proposed standard. *NCCLS* 18, 1998
 - 17) Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Hazen KC, Martinez-Suarez JV, Scalise G: Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. *Med Mycol* 36: 68-78, 1998
 - 18) Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Knapp C, Rennie RP, Rex JH, Rinaldi MG: Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol* 38:3457-3459, 2000
 - 19) Latge JP: *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12:310-350, 1999
 - 20) Wakabayashi H, Okutomi T, Abe S, Hayasawa H, Tomita M, Yamaguchi H: Enhanced anti-Candida activity of neutrophil and azole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. *Adv Exp Med Biol* 443:229-237, 1998
 - 21) Okutomi T, Tanaka T, Yui S, Mikami M, Yamazaki M, Abe S, Yamaguchi H: Anti-*Candida* activity of calprotectin in combination with neutrophil or lactoferrin. *Microbiol Immunol* 42:789-793, 1998
 - 22) Tariq VN, Scott EM, McCain NE: Use of decimal assay for additivity to demonstrate synergy in pair combinations of econazole, nikkomycin z, and ibuprofen against *Candida albicans* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2615-2619, 1995
 - 23) Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovuo J, Hamada T: The effect of antifungal agents on the in vitro susceptibility of *Candida albicans* to apo-lactoferrin. *Arch Oral Biol* 39:921-923, 1994
 - 24) Abe S, Yamaguchi H: Host defense mechanisms against fungal infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 41:77-81, 2000
 - 25) Nguyen MH, Clancy CJ, Yu YC, Lewin AS: Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by azithromycin against *Aspergillus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16:846-848, 1997
 - 26) Moore SA, Anderson BF, Groom CR, Haridas M, Baker EN: Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8A resolution. *J of Mol Biol* 274:222-236, 1997
 - 27) Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T: The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch Oral Biol* 38:1057-1063, 1993
 - 28) Puddu P, Borghi P, Gessani S, Valenti P, Belardelli F, Seganti L: Antiviral effects of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Int J Biochem Cell Biol* 30:1055-1062, 1998
 - 29) Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, Furmanski P: Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res* 54:2310-2312, 1994
 - 30) Yoo YC, Watanabe S, Watanabe R, Hata K, Shima-zaki K, Azuma I: Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. *Jpn J Cancer Res* 88:184-190, 1997
 - 31) Yamauchi K, Hiruma M, Yamazaki N, Wakabayashi H, Kuwata H, Teraguchi S, Hayasawa H, Suegara N, Yamaguchi H: Oral administration of bovine lactoferrin for treatment of tinea pedis. A placebo-controlled, double-blind study. *Mycoses* 43:197-202, 2000
 - 32) Dial EJ, Romero JJ, Headon DR, Lichtenberger LM: Recombinant human lactoferrin is effective in the treatment of *Helicobacter felis*-infected mice. *J Pharm Pharmacol* 52:1541-1546, 2000