

어류 경구백신 현황과 전망

박은준 · 김미나 · 박주영 · 차재호 · 정화지

Edible vaccine for aquacultured fish: present and prospect

Eun-Joon Park, Mina Kim, Ju Young Park, Jae Ho Cha, Hwa-Jee Chung

Received: 4 August 2010 / Accepted: 17 August 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract As the capture fishing industry has declined, the aquaculture industry has become an important source of seafood. With this tendency all fish farming will be performed by large-scale farms where the fish are cultivated in much high density and as a result the incidence of infectious diseases increases. Therefore, vaccination has become an increasingly important part of aquaculture as a cost effective method of controlling various diseases. The early fish vaccines were the formalin inactivated bacteria or virus cultures, which were administered by either immersion or injection. Recombinant DNA biotechnology allowed us to develop orally administrated DNA and recombinant vaccines. In terms of the manufacturing process and cost, *Lemna* and *Spirodela* is the most efficient and reliable plant expression system for the production of edible vaccine.

서론

수산 자원이 풍부한 우리나라에서는 생선 섭취가 증가하고 있고 활어에 대한 선호도가 높은 편이다. 특히 잡는 어업으로부터 키우는 양식어업으로 전환함에 따라 양식업은 매년 그 기술이 급속히 발달하여 지금은 넙치, 조피볼락, 농어, 돝류 등의 해수어와 뱀장어, 송어류 등의 담수어 양식이 가능하게 되었다. 국내 양식 어류 생산량은 해마다 증가하여, 2010년 3월 현재 양식 수산물 총 생산량은 3,481,384 M/T이며 이중 활어 생산량은 1,804,808

Table 1 시도군별 양식방법에 따른 전체 사육시설 면적 현황 (단위: m²)

행정구역별	해상가두리	육상수조식	축제식	합계
전국	1,614,792	1,605,721	2,192,752	5,413,265
부산광역시	2,102	29,950	0	32,050
인천광역시	0	615	145,600	146,215
울산광역시	1,440	29,047	0	30,487
충청남도	206,588	750	385,000	592,338
전라북도	0	0	1,017,528	1,017,528
전라남도	648,192	696,253	539,355	1,883,800
경상북도	88,110	177,305	66,269	331,684
경상남도	576,422	119,779	39,000	735,201
제주도	86,400	542,797	0	629,197
기타	9,225	0	14,765	5,538

(자료 : 통계청 2010. 3. 11)

M/T에 이른다. 남해안과 서해안 등에 집중되어 있는 전체 양식장 면적은 해상가두리, 육상수조식 및 축제식을 합쳐 약 486.1 ha에 달하며, 이중 육상수조식은 전체 양식 면적의 42%에 이른다 (Table 1). 2009년도 어종별 생산량은 넙치가 54,675톤으로 전체 생산량의 49.9%를 차지하고, 우럭 33,007톤 (30.1%), 참돔 9,223톤 (8.4%) 순으로 전체 생산금액은 9,816 억원에 이른다 (Table 2).

국내 양식장의 규모가 점차적으로 대형화함으로써 높은 밀집사육과 수질의 저하로 어류 감염성 질병 발생률이 증가하는 추세이다. 국내 양식어류 중에서 생산량이 가장 많은 넙치의 경우 문제시되고 있는 질병으로는 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오팀증, 활주세균증 등의 세균성질병과 이리도바이러스, 림포시스티스 바이러스, 버나바이러스, 노다바이러스와 같은 바이러스질병 등이 보고되고 있다 (Table 3). 어류의 세균성질병 발생을 막기

E.-J. Park · M. N. Kim · J. Y. Park · J. H. Cha · H.-J. Chung (✉)
(주) 젠닥스
(Gendocs Inc. 544-1 B-Station 3F Bongmyung-Dong, Yuseong-Gu,
Daejeon 305-301, Korea)
e-mail: hwajee@gendocs.co.kr

Table 2 주요 양식어종의 연도별 생산량 및 생산금액 (단위: 톤, 억원)

구분	연도	어종			
		넙치	우럭	참돔/감성돔	숭어/농어
생산량	2008년	46,426	32,955	8,995	8,147
	2009년	54,675	33,007	10,911	7,965
생산금액	2008년	4,082	2,062	720	461
	2009년	5,458	2,470	950	536

(자료 : 통계청 2010. 3. 11)

Table 3 해산어류에서 발생하는 감염성 질병

질병	감염균/바이러스	감염어종
에드워드병	<i>Edwardsiella tarda</i>	넙치
연쇄구균증	<i>Streptococcus iniae</i> <i>S. parauberis</i>	넙치
비브리오증	<i>V. harveyi</i> <i>V. ichthyenteri</i>	넙치
바이러스성 출혈성폐혈증	VHSV	넙치
림포시스티스병	LCDV	넙치, 방어, 농어 등 해산어종
이리도바이러스	iridovirus	돌돔, 참돔, 감성돔, 농어
버나바이러스	virnavirus	넙치, 조피볼락, 방어
상피증생증	herpesvirus	넙치, 조피볼락
랩도바이러스	rhabdovirus	넙치, 방어
신경괴사증	nodavirus	능성어, 조피볼락, 넙치, 민어

(자료: 바이오희학 2005, 국립수산물학원)

위해서 항생제가 사용되지만 바이러스성 질병은 수평감염뿐만 아니라 수직감염에 의한 수직감염이 되기 때문에 한번 발생되면 치료가 불가능하고 대량폐사를 일으키는 경우가 많다. 특히 8-9월 고수는 환경이 되면 용존산소가 감소함에 따라 바이러스 발병률이 높아지므로 예방차원의 방역조치가 중요하다.

양식 어류의 감염 질병을 방지하기 위한 항생제의 지속적인 사용은 내성균을 유발시키며 환경 오염 등의 문제를 일으키고 있어 이에 대한 대책으로 수산 선진국인 노르웨이, 영국, 미국, 캐나다 등에서는 항생제 사용을 제한하는 대신 백신 개발을 적극적으로 추진하고 있다. 최초의 어류백신으로는 1942년 *Aeromonas salmonicida*를 포르말린에 불활화한 백신으로 실험실내에서 사용한 예가 있다. 1976년 미국에서 포르말린으로 처리한 비브리오 (*Vibrio anguillarum*) 침지백신이 개발되어 1980년대 초부터 양식 산업에 적용되기 시작하였다. 이후 부스럼병, 에드워드병, 콜롬나리스병, 비브리오병, 연쇄구균증 및 구적병 백신 등이 개발되어 유럽, 미국, 일본, 캐나다 등에서 상용화되었다 (수산동물방역센터 자료 2007). 국내에

서 사용이 승인되거나 개발된 수산용 백신은 연쇄구균증, 에드워드병, 이리도바이러스 예방백신이며, 최근 넙치의 연쇄구균증의 원인균인 베타-용혈성의 스트렙토코커스 이니에 (*Streptococcus iniae*)와 감마-용혈성의 스트렙토코커스 파라우베리스 (*Streptococcus parauberis*) 균주를 불활성화시킨 혼합 주사백신이 국내에서 개발되었다 (http://kocd.nfrda.re.kr/bbs?id=jj_insmaterial). 향후 국내외 양식산업의 확대에 따라 백신의 수요는 점차 증가할 것으로 예상되며, 이에 따라 우리나라도 백신 개발에 집중적인 투자가 필요하다.

어류 백신 개발 현황 및 투여법

어류백신의 종류는 크게 불활화백신 (inactivated vaccines), 약독화백신 (live attenuated vaccines), DNA 백신, 재조합단백질백신 (recombinant vaccines) 등이 있다 (RUMA guidelines 2006; Toranzo et al. 2009). 불활화백신은 주로 박테리아나 바이러스를 포르말린이나 특정 화학품으로 처리한 것으로 항원보강제 (adjuvant)와 함께 투여해야 면역 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Caipang et al. 2006a). 약독화백신 경우는 병원성을 일으키지 않고 숙주 세포내에서 면역반응을 유도하며 항체를 생산하는 장점이 있으나, 간혹 질병을 유발할 가능성이 있다. DNA 백신은 면역을 유도할 수 있는 항원단백질의 유전자를 직접 어류에 투여하여 어류의 세포내에서 항원단백질이 발현됨으로써 면역반응을 유도하는 방법이다. 대부분의 DNA 백신은 항원단백질 유전자 발현을 위해 어류 cytomegalovirus (CMV) 혹은 β -actin 프로모터를 이용한다 (Caipang et al. 2006b; Kurath 2008; Lorenzen and LaPatra 2005). DNA백신은 항원보강제를 사용하지 않는 대신 DNA 플라스미드 내에 CpG-S 혹은 CpG-N motif를 포함시켜 면역을 유도한다 (Chen et al. 2007; Jorgensen et al. 2003; Pedersen et al. 2006). 아울러 항원단백질 전체 혹은 일부를 대장균이나 효모 등에서 대량 생산하여 투여하는 재조합단백질 백신도 있다 (Fu et al. 2008; Jha et al. 2007; Ning et al. 2009; Poobalan et al. 2010; Sommerset et al. 2005; Zhu et al. 2009)

백신을 투여하는 방법으로는 크게 주사법, 침지법 및 경구투여법 등이 있다 (Fig. 1). 이 중에서 주사법은 투여량이 정확하고 백신의 양도 적게 소요되며 또한 면역보강제의 첨가가 가능하여 어류에 확실한 면역능력을 부여하는 장점이 있지만, 노동력이 많이 소요되는 단점이 있어 실용화하기가 어려운 단점이 있다. 침지법에는 고농도로 백신이 첨가된 용기에 어류를 단시간 침지시키는 표준법과, 사육수조에 백신을 직접 저농도로 첨가하여 침지시키는 저농도법이 있다. 표준법은 소요되는 백신의 양은 적지만 처리작업이 번거로운 반면, 저농도법은 작

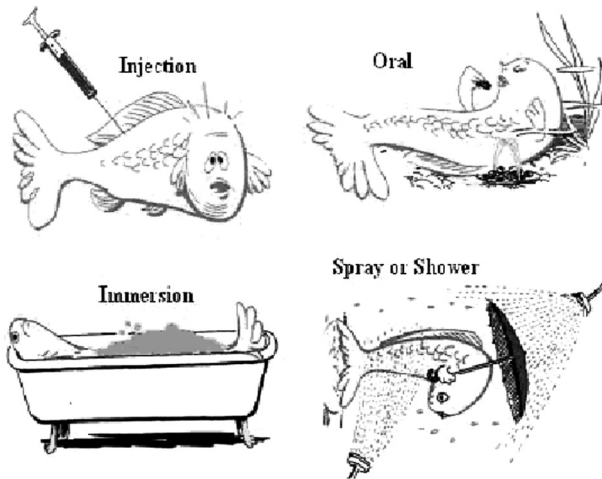


Fig. 1 Fish vaccination strategies. Cartoons courtesy of Cor Lamers, Wageningen University

업이 간편한 대신 백신 사용량이 많다. 주사법과 표준침지법은 처리시 스트레스를 많이 받기 때문에 어린 어류에게는 사용하기 어렵다. 경구투여법은 사료에 백신을 혼합한 후에 사용하므로 투여방법이 가장 간편하지만 다량의 백신을 장기간 투여하여야 하며 예방효과도 떨어지는 단점이 있다 (문진산 외 2007; Komar et al. 2004). 따라서 어류의 스트레스를 줄이는 동시에 백신의 생산비용, 대량 생산 시스템 및 안전한 저장과 운반 시스템 등을 고려한다면 경구백신의 단점을 보완한 백신을 개발하는 것이 한층 효과적이다.

어류 경구백신 개발

어류 경구백신은 사료와 함께 투여되도록 제조하는 것이 바람직하며 일반적으로 대장균, 효모 및 바실러스와 같은 미생물에서 대량생산하여 사료와 함께 투여한다 (Allnutt et al. 2007; Fu et al. 2008; Lin et al. 2005). 사료형태로 제조할 경우 백신 항원을 식용 오일을 사용하여 사료 표면에 코팅을 하거나, 사료배합재료와 함께 혼합한 후 펠렛으로 만든다. 그러나 펠렛 과정 동안 고온과 고압에도 백신항원이 안정한 제조 조건을 고려해야만 하는 문제점이 있다. 또한 pH가 산성이며 많은 protease, nuclease가 존재하는 어류 소화관의 전장(前腸)을 통과하여 후장(後腸) 근처에 있는 면역세포에 의해 인식될 때까지 경구투여된 항원이 안정한 형태로 운반될 수 있는 기술이 필요하다 (RUMA guidelines 2006).

주로 주사법으로 투여를 하던 DNA백신을 경구투여가 가능하도록 DNA 백신운반 시스템 개발 연구가 최근 활발하게 진행되고 있다. Rajeshkumar 등 (2008)은 새우의 white spot syndrome virus (WSSV)의 VP28 유전자를 pcDNA 3.1 진핵세포 발현벡터로 도입하여 키토산 나노입자 형

태로 만든 후 이를 사료배합재료와 혼합하여 제조한 백신을 경구투여 하였다. 이 연구결과에 따르면 VP28 유전자가 내장, 아가미, 간췌장, 지느러미 등의 조직에서 경구투여 후 30일간 유지되었으며 공격접종 시 약 65%의 생존율을 보였다. 키토산으로 캡슐화한 LCDV의 캡시드 단백질 유전자 플라스미드를 도다리에 경구투여 하면 캡시드 단백질 유전자가 10-90일까지 조직에 남아 있었으며, 또한 공격접종 후 경구백신을 투여 받은 실험구는 50-85% 생존율을 보였다는 연구결과도 보고되었다 (Tian et al. 2008). 키토산 이외에도 항원 DNA를 alginate로 캡슐화한 백신이 경구투여된 후에도 그 면역효과를 지속한다는 연구결과 또한 보고되었다 (Heras et al. 2010; Rodrigues et al. 2006; Romalde et al. 2004; Tian et al. 2008). 이상의 연구결과로 키토산과 alginate에 의해 항원이 소화관을 통과하는 동안 안전하게 보호된다는 것을 알 수 있다. 또한 Tian 등 (2008)은 alginate 입자가 혈액을 통해 면역조직으로 확산되어 항체 생산을 유도한다는 것을 제시함으로써 경구백신의 단점을 보완할 계기를 마련하였다. 그러나 어류 경구백신 개발에 대한 많은 연구가 진행되었음에도 불구하고 현재 상용화되고 있는 경구백신은 메기의 에드워드병, 새우와 연어의 비브리오행균, 방어 및 방어속의 연쇄구균증, 그리고 잉어과 어류 (tilapia) 연쇄구균증의 경구백신 뿐이며, 현재까지 개발 상용화된 재조합단백질 항원 경구백신 제품은 없다 (www.spaquaculture.com.).

식물발현시스템을 이용한 어류 경구백신개발

최근 식물을 이용한 외래단백질 생산시스템이 개발되기 시작하여 인체 혹은 동물 질병 치료를 위한 항체 및 백신 등을 생산하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 동물세포나 미생물 발현시스템과는 달리 식물 발현시스템으로 생산된 외래단백질은 분리 정제과정 없이도 바로 경구투여용으로 사용할 수 있어 경제적이고 편리한 장점을 지니고 있다 (Aviezer et al. 2009; Davoodi-Semiromi et al. 2010; Floss et al. 2007; Floss et al. 2010; Frutos et al. 2008; Lai et al. 2010; Lombardi et al. 2009; Martinez et al. 2010; Medrano et al. 2010; Nochi et al. 2009; Shaaltiel et al. 2007; Wu et al. 2009).

어류 경구백신용 항원단백질을 발현하는 타겟 식물로는 주로 벼, 옥수수, 상치, 토마토 및 당근 등이 있으나 좁개구리밥 (*Lemna*)과 개구리밥 (*Spirodela*)만큼 매력적인 식물은 없다. 좁개구리밥과 개구리밥 (이하 개구리밥)은 단자엽인 *Lemnaceae*에 속하며 잎과 줄기가 미분화된 엽상체 (frond)와 뿌리로 구성되어 있다. 개구리밥은 종자로 번식하기보다는 대부분 모엽상체로부터 새로운 엽상체를 형성하는 영양번식 방법으로 개체를 증식하며 생육환

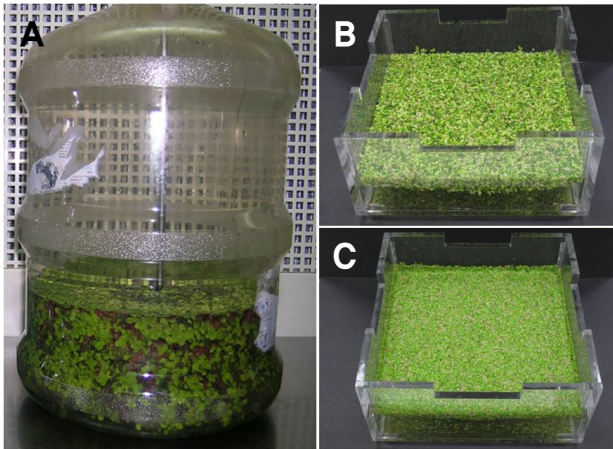


Fig. 2 Large-scale liquid culture of *Lemna* and *Spirodela*. A. *Spirodela* cultivated in 20L aseptic container. B and C. *Spirodela* and *Lemna* cultivated in 5L aseptic container, respectively

경이 불리하면 잠아 (turion)를 형성한다 (Stomp 2005). 생육조건과 종에 따라 차이가 있지만 증식속도가 매우 빨라 1-2일 내에 두 배로 증식하여, 최적 액체배양 조건하에서 10-20개의 엽상체로부터 2-3주일 동안 생중량 700-900 g/L까지 배양이 가능하다 (Fig. 2). 개구리밥은 배양배지 조성이 매우 간단하고 비용이 저렴하며 또한 무균상태로 대량배양 할 수 있는 장점이 있다. 또한 아시아지역에서는 개구리밥을 동물들의 사료로 사용하기도 하는데, 이러한 특징으로 인해 어류 백신항원을 발현한 후 사료형태로 제조하면 경구투여가 가능할 것이다.

개구리밥이 지니고 있는 여러 장점에도 불구하고 개구리밥 발현시스템을 이용한 고부가가치 단백질 및 항체 등을 생산하는 연구는 현재 극히 제한적이다 (Vunsh et al. 2007; Rival et al. 2008; Yamamoto et al. 2001; Stomp et al. 2004). 그 주요 원인은 개구리밥의 형질전환 효율이 매우 낮기 때문일 것이다. 국내에서는 (주)젠닥스가 어류 바이러스 예방 백신을, 한국생명공학연구원은 고부가가치 단백질을 생산하는 연구를 수행하고 있다. 국외의 경우 Biotech Therapeutics 사가 개구리밥 발현시스템 (LEX system)으로 치료용 단백질인 인터페론 알파 (Locteron), 혈전용해제인 Recombinant Plasmin (BLX-155) 및 Anti- CD20 antibody (BLX-301)을 개발하였고, 개발된 Locteron은 2005년에 인체 임상 1상을 마치고 현재 임상 2상 시험을 수행 중이다 (<http://www.pharmaceuticaltechnology.com/projects/biotech/>).

어류 경구백신의 향후 전망

인체 혹은 동물 임상시험에 비해 비교적 짧은 시간과 임상동물을 손쉽게 구할 수 있다는 점에서 단기간 내에 상용화가 가능한 식물유래 경구백신으로는 어류 질병에

방 백신일 것이다. 물론 어류 백신제조를 위해서는 복잡한 과정이 요구된다. 즉 질병 원인체의 특성을 고려하여 백신 종류와 적용 방법을 결정하여야 하며, 그 후 공격접종 모델을 개발하고, 시험백신 개발 및 테스트를 거친 후 백신을 생산하는 과정을 거친다. 또한 백신의 제조 승인을 받기 위해서는 실험실과 야외 양어장에서 유효성, 안전성 및 안정성 (유효기간) 평가를 받아야 한다. 기업의 경우는 백신 개발 전에 면밀한 사업성 검토를 필요로 하며, 백신 개발 후에는 제품 출시 및 마케팅 등의 준비가 필요하다. 이러한 과정을 거쳐 백신을 상용화하기까지는 약 5년 정도의 기간이 소요된다 (어류백신 품질관리 지침서 2007).

지금까지 상용화된 어류 백신의 대부분은 북유럽, 칠레, 캐나다 및 미국의 대단위 양식연어와 송어 질병예방 백신들이며, 주로 주사 혹은 침지법으로 투여하는 불활화, 약독화 백신에 국한되어 있다. 최근 해수어, 담수어 및 열대어를 포함한 양식관상어 시장이 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 급성장 하는 추세에 있다. 세계 관상어 시장규모는 2010년 기준 약 25조원 규모로 추정되며 유통되는 관상어는 약 2,000여종으로 그 종류가 다양하다 (<http://blog.daum.net/sciensea/206>). 향후 어류 경구백신 분야에 있어 어류질병 조기진단 시장뿐만 아니라 관상어 질병백신 시장을 함께 고려한다면 그 시장성과 연구방향은 새롭게 조명될 필요가 있다.

사 사

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업 (108166-03; 609004-05) 및 중소기업청 신기술사업화지원사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Allnutt FC, Bowers RM, Rowe CG, Vakharia VN, LaPatra SE, Dhar AK (2007) Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast. *Vaccine* 25:4880-4888
- Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Mizrahi S, Liberman Y, Freeman A, Zimran A, Galun E (2009) A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme—a preclinical and phase I investigation. *PLoS One* 4(3):e4792
- Caipang CMA, Hirono I, Aoki T (2006a) Immunogenicity, retention and protective effects of the protein derivatives of formalin-inactivated red seabream iridovirus (RSIV) vaccine in red seabream, *Pagrus major*. *Fish Shellfish Immunol* 20:596-609
- Caipang CMA, Takano T, Hirono I, Aoki T (2006b) Genetic vac-

- cines protect red seabream, *Pagrus major*, upon challenge with red seabream iridovirus (RSIV). *Fish Shellfish Immunol* 21:130-138
- Chen Y, Xiang LX, Shao, JZ (2007) Construction of a recombinant plasmid containing multi-copy CpG motifs and its effects on the innate immune responses of aquatic animals. *Fish Shellfish Immunol* 23:589-600
- Davoodi-Semiromi A, Schreiber M, Nalapalli S, Verma D, Singh ND, Banks RK, Chakrabarti D, Daniell H (2010) Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnol J* 8:223-242
- Floss DM, Falkenburg D, Conrad U (2007) Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res* 16:315-332
- Floss DM, Schallau K, Rose-John S, Conrad U, Scheller J. (2010) Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends Biotechnol* 28:37-45
- Frutos R, Denise H, Vivares C, Neuhaus JM, Vitale S, Pedrazzini E, Ma J, Dix P, Gray J, Pezzotti M, Conrad U, Robinson D (2008) Pharmaceutical proteins in plants. A strategic genetic engineering approach for the production of tuberculosis antigens. *Ann N Y Acad Sci* 1149:275-280
- Fu LL, Li WF, Du HH, Dai W, Xu ZR (2008) Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles. *Lett Appl Microbiol* 46:581-586
- de las Heras AI, Saint-Jean SR, Pérez-Prieto SI (2010) Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish Shellfish Immunol* 28:562-570
- Jha RK, Xu ZR, Bai SJ, Sun JY, Li WF, Shen J (2007) Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using recombinant oral vaccine expressed in *Pichia pastoris*. *Fish Shellfish Immunol* 22:295-307
- Jorgensen JB, Johansen LH, Steiro K, Johansen A (2003) CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Virol* 77:11471-11479
- Komar C, Enright WJ, Grisez L, Tan Z (2004) Understanding fish vaccination. *AQUA Culture AsiaPacific Magazine* Nov/Dec
- Kurath G (2008) Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev Sci Tech* 27:175-196
- Lai H, Engle M, Fuchs A, Keller T, Johnson S, Gorlatov S, Diamond MS, Chen Q (2010) Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:2419-2424
- Lin JH, Yu CC, Lin CC, Yang HL (2005) An oral delivery system for recombinant subunit vaccine to fish. *Dev Biol (Basel)* 121:175-180
- Lombardi R, Circelli P, Villani ME, Buriani G, Nardi L, Coppola V, Bianco L, Benvenuto E, Donini M, Marusic C (2009) High-level HIV-1 Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the P19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinckle Virus. *BMC Biotechnol* 9:96
- Lorenzen N, LaPatra SE (2005) DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev Sci Tech* 24:201-213
- Martinez CA, Topal E, Giuliotti AM, Talou JR, Mason H (2010) Exploring different strategies to express Dengue virus envelope protein in a plant system. *Biotechnol Lett* 32:867-875
- Medrano G, Dolan MC, Stephens NT, McMickle A, Erf G, Radin D, Cramer CL (2010) Efficient plant-based production of chicken interleukin-12 yields a strong immunostimulatory cytokine. *J Interferon Cytokine Res* 30:143-154
- Ning JF, Zhu W, Xu JP, Zheng CY, Meng XL (2009) Oral delivery of DNA vaccine encoding VP28 against white spot syndrome virus in crayfish by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine* 27:1127-1135
- Nochi T, Yuki Y, Katakai Y, Shibata H, Tokuhara D, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nakanishi U, Ono F, Mimuro H, Sasakawa C, Takaiwa F, Terao K, Kiyono H (2009) A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing antibodies but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J Immunol* 183:6538-6544
- Pedersen GM, Johansen A, Olsen RL, Jorgensen JB (2006) Stimulation of type I IFN activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leukocytes: synergistic effects of cationic proteins and CpG ODN. *Fish Shellfish Immunol* 20:503-518
- Poobalane S, Thompson KD, Ardo L, Verjan N, Han HJ, Jeney G, Hirono I, Aoki T, Adams A (2010) Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. *Vaccine* 28:3540-3547
- Rajeshkumar S, Venkatesan C, Sarathi M, Sarathbabu V, Thomas J, Basha A, Hameed ASS (2008) Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish Shellfish Immunol* 26:429-437
- Rival S, Winsniewski J-P, Langlais A, Kaplan H, Freyssinet G, Vancanneyt G, Vunsh R, Perl A, Edelman M (2008) *Spirodela* (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study, aprotinin. *Transgenic Res* 17:503-513
- Rodrigues AP, Hirsch D, Figueiredo HCP, Logato PVR, Moraes AM (2006) Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination. *Process Biochem* 41:638-643
- Romalde J, Luzardo-Alvarez A, Ravelo C, Toranzo AE, Blanco-Méndez J (2004) Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture* 236:119-129
- RUMA guidelines (2006) Responsible use of vaccines and vaccination in fish production. Supported by the National Office of Animal Health (NOAH)
- Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G, Dym O, Boldin-Adamsky SA, Silman I, Sussman JL, Futerman AH, Aviezer D (2007) Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J* 5:579-590
- Sommerset I, Skern R, Biering E, Bleie H, Fiksdal IU, Grove S, Nerland AH (2005) Protection against Atlantic halibut

- nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol* 18:13-29
- Stomp A-M (2005) The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing. *Biotechnol Annu Rev* 11:69-99
- Stomp A-M, Dickey L, Gasdaska J (2004) Expression of biologically active polypeptide in duckweed. US patent 6815184
- Tian J, Yu J, Sun X (2008) Chitosan microspheres as candidate plasmid vaccine carrier for oral immunisation of Japanese flounder (*Paralichthys livaceus*). *Vet Immunol Immunopathol* 126:220-229
- Toranzo AE, Romalde JL, Magariños B, Barja JL (2009) Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Opinions Méditerranéennes, A* 86:155-176
- Vunsh R, Li J, Hanania U, Edelman M, Flaishman M, Perl A, Winsniewski J-P, Freyssinet G (2007) High expression of transgene protein in *Spirodela*. *Plant Cell Rep* 26:1511-1519
- Wu H, Scissum-Gunn K, Singh NK, Giambone JJ (2009) Toward the development of a plant-based vaccine against reovirus. *Avian Dis* 53:376-381
- Yamamoto YT, Rajbhandari N, Lin X, Bergamann BA, Nishimura Y, Stomp A-M (2001) Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. *In Vitro Cell Dev Biol* 37:349-353
- Zhu F, Du H, Miao ZG, Quan HZ, Xu, ZR (2009) Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using inactivated WSSV. *Fish Shellfish Immunol* 26:685-690
- 문진산, 장환, 김지연, 정병렬, 김연희, 조성준, 최준구, 손성완, 정태성 (2007) 어류 백신 품질관리 지침서. 국립수의과학검역원