

해조류 유래 Fucoidan의 어류용 백신 항원보조제로서의 가능성에 대한 고찰

민은영 · 김광일 · 조미영 · 정승희 · 한현자*

국립수산과학원 병리연구과

Potential of Fucoidan Extracted from Seaweeds as an Adjuvant for Fish Vaccine

Eun Young Min, Kwang Il Kim, Mi Young Cho, Sung-Hee Jung, Hyun-Ja Han*

Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Corresponding Author

Hyun-Ja Han

Pathology Division, National Institute of
Fisheries Science, Busan 46083, Korea

E-mail : jxheart@korea.kr

Received : April 11, 2019

Revised : April 23, 2019

Accepted : June 04, 2019

Fucoidan(후코이단)은 주로 갈조류에서 추출되는 fucose를 함유한 함황 다당류의 일종으로, 항균, 항바이러스 및 항종양 효과와 함께 다양한 경로로 면역력을 향상시키는 생리 기능성물질로 알려져 있다. 최근 연구에 따르면, 인체 백신 분야에서는 fucoidan의 백신 adjuvant(항원보조제)로서의 가능성이 제시되었다. 수산업 분야에서는, 보조사료로서의 fucoidan의 기능에 관한 연구는 보고되고 있으나, 수산용 백신 개발을 위한 adjuvant 연구는 전무한 실정이다. 동물세포에서 fucoidan의 adjuvant에 대한 긍정적인 검토와 함께 안전성을 증명한 연구는 많이 있지만, fucoidan을 어류 백신용 adjuvant로 사용하기 위해서는 어류에서도 이를 확인할 필요가 있다. 또한 fucoidan의 분자량에 따라 세포 내 흡수율이 각기 다르다는 점과 병원체의 인위감염에 따른 항체 생성을 포함한 어류의 특이면역 반응 시스템에 대한 연구가 많이 부족하다는 제약이 있다. 따라서 이러한 분야에 대한 적극적인 연구가 뒷받침 된다면 안전하고 효과적인 adjuvant로 사용할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 fucoidan이 사람과 동물을 포함하여 어류의 면역자극 즉 체액성 및 세포성 면역에 미치는 영향에 대한 연구를 검토하고, 수산업 분야에서 fucoidan의 사용과 어류 백신용 adjuvant로서의 가능성을 고찰하였다.

Fucoidan is a physiologically functional ingredient extracted from seaweed brown algae, which is a sulfated polysaccharide containing fucose as a main molecule backbone. Fucoidan has a variety of immune-modulating or -stimulating effects, including promoting antigen uptake and enhancing anti-bacterial, anti-viral and anti-tumor effects. In addition, recent studies have suggested the possibility of use of fucoidan as a vaccine adjuvant in the field of human vaccine. Use of fucoidan as supplementary feeds have already been studied, but the development of fucoidan as an adjuvant of fish vaccine is still premature. However, the intracellular uptake of fucoidan differs depending on the molecular weight of fucoidan, and there is a limit to the study on specific immune response including the production of antibodies to fish caused by an artificial infection of pathogen. Although the safety of fucoidan has been demonstrated in animal cells, there is a need to confirm the safety of fucoidan in fish. Therefore, active research in this field is needed to use fucoidan as a vaccine adjuvant. This study discussed the effects of fucoidan on immune stimulation, humoral- and cellular- immunity including humans and animals. The prospect of fucoidan as a vaccine adjuvant in fisheries also reviewed.

Keywords: Fucoidan(후코이단), Brown seaweeds(갈조류), Fish vaccine(어류 백신), Adjuvant(항원보조제), Immune-stimulators(면역증강제)

서론

최근 들어 양식 어종의 편중화에 의한 가격 하락과 양식장 노후화 및 오염된 어장환경, 질병 발생 증가, 고수온 등의 자연재해로 인하여 국내 양식산업의 미래를 긍정적으로만 바라볼 수는 없다. 이로 인하여 정부는 지속 가능한 양식산업을 위한 친환경 양식정책을 추진하고자 노력하고 있다. 현재 양식산업에서 친환경 양식방법의 일환으로, 항생제 및 합성화학물질을 대체하기 위하여 질병을 예방할 수 있는 백신의 사용을 장려하고 있다(Hastein et al., 2005; Jung, 2006). 현재 양식현장에서는 백신투여 대상 품종이 대부분 넙치에 한정되어 있으며, 주로 주사법으로 백신을 사용하고 있다. 그러나 주사법은 어류, 특히 치어기에 상당한 스트레스를 유발하여 면역력을 저하를 초래할 뿐만 아니라 개체 접촉에 따른 인건비 상승 및 장시간 소요 등의 단점이 있다. 이러한 주사법의 한계를 극복하기 위하여 수산용 경구 백신 및 백신의 장기 면역원성을 증가시키기 위한 adjuvant(항원보조제) 혼합 백신 연구 개발이 이루어지고 있다(Villumsen et al., 2015; Cho et al., 2017).

백신 개발에는 크게 유효 항원 개발, adjuvant, 백신전달 관련 기술이 필요하다. 그 동안은 약독화 생균, 복제 또는 비복제 병원체 및 subunits을 이용한 항원 개발 기술 위주로 이루어져 왔다. 생백신(live-attenuated)은 뛰어난 효과에 반해 부작용의 위험성을 최소화하는데 한계가 있어 보다 안전한 사백신(killed/inactivated)이나 병원균의 일부만을 사용하여 안전성이 월등한 subunit 백신으로 대체되는 추세이다. 양식산업에서도 생백신은 안전상의 이유로 사용 승인을 받지 못하는 경우가 있으며, 사백신은 자가복제가 불가능하고 정상적인 감염경로를 거치지 않기 때문에 백신의 효과가 상대적으로 감소될 수 밖에 없다. Subunit 백신도 사백신과 마찬가지로 정상적인 감염경로를 거치지 않는다는 점과, 미생물이 내재하고 있는 microbe-associated molecular patterns (MAMPs)을 가지고 있지 않기 때문에 그 자체만으로는 백신의 효과가 현저히 떨어진다는 단점이 있다. 따라서 아직 백신이 개발되지 않은 질병을 포함하여 고효능 백신 개량을 위해서는 보다 합리적인 접근방법으로 백신 설계 단계를 거쳐야 한다. 이에 따라 면역반응을 강화시킬 수 있는 백신 adjuvant의 필요성이 강력히 대두되었다(Pasquale et al., 2015). Adjuvant의 가장 중요한 요소는 백신의 효과를 극대화하고 안전성을 확보하는 것이며, 백신 제작 시 항원의 양을 감소시키더라도 면역효과는 유지되며, 추가 백신 접종 횟수를 줄여 백신 접종에 들어가는 시간과 비용을 절약할 수 있다면 더욱 좋은 후보물질이 될 수 있을 것이다. 일반적으로 백신에 의한 면역반응은 주로 항체성 반응으로, 항체에 반응하는 항원 부분이 T 세포에 비해 변이가 활발하다는 단점이 있다. 백신 접종 시 adjuvant를 사용하면 세포성 면역반응, 특히 T 세포성 면역반응을 더 효과적으로 유도하여 보다 광범위한 보호효과를 얻을 수 있다(Palm and Nedzhitov, 2009). 즉, 적합한 항원과 맞춤형 adjuvant 조합을 이용한다면 보다 효과적인 면역반응을 유도할

수 있는 백신 개발이 가능할 것이다.

어류 면역 체계에 대해서는 여전히 알려지지 않은 부분도 있지만, 22,000종의 어류도 "면역 특이성(immune peculiarities)"이 있어 선천성 면역(innate immunity)과 획득면역(adaptive immunity)으로 질병에 대항할 수 있다. 또한 현재 사용되는 대부분의 adjuvant는 농양형성, 장기손상 및 발열 등의 부작용이 발견되고 있어 효과적이고 새로운 백신 adjuvant의 필요성이 야기되고 있다(Stills, 2005). 따라서 본 논문에서는 수산용 백신 개발에 있어 fucoidan의 adjuvant로서의 가능성을 알아보기 위하여 수산용 vaccine adjuvant, 자연유래 물질인 fucoidan의 특징, 수산양식에서 fucoidan 사용 및 한계점 그리고 동물 백신에서의 활용 등도 함께 검토해보고자 한다.

1. 수산용 백신 adjuvant

최근 백신 연구 분야에서는 후천성 면역(adaptive immunity)만 연구하던 경향에서 벗어나 선천성 면역 시스템(innate immune system)이 염증반응을 일으키는 기전과 더불어 adaptive immune 조절반응에 대한 방향으로 확대되었다(Pulendran et al., 2011). 면역반응을 촉진시킬 수 있는 adjuvant의 주요 기전은 B-cell과 T-cell 등 다양한 경로를 통한 항원의 면역반응 향상, 혈중 내 항원의 잔류시간 증가, 항원 제시세포(antigen presenting cells)에 항원의 흡수 촉진, 대식세포(macrophage)와 임파구(lymphocyte)의 활성화 및 cytokines의 생성 촉진 등 이다(Marrack et al., 2009). 특히, Toll-like receptors (TLRs), pattern recognition receptors (PRRs)와 ligand인 MAMPs의 발견은 미생물에 의해 면역반응이 어떻게 시작되는지에 대한 결정적인 열쇠를 제공하였다(Pulendran et al., 2011). Adjuvant는 주로 사람을 대상으로 한 연구가 많이 진행되고 있으나, 상용화된 adjuvant의 상당량은 동물 백신용이며, aluminum hydroxide 또는 aluminum salts와 mineral oil이 주성분인 oil adjuvant가 가장 일반적이다(Park, 2008; Knight-Jones et al., 2014).

수산용 백신 adjuvant도 인체용 백신과 마찬가지로 항원 제시에 효과적인 종류와 B-cell 및 T-cell 활성화에 따른 2차 추가 면역반응을 유도하는 종류로 구분할 수 있다. 항원 제시에 효과적인 adjuvant 종류로는 oil emulsion, Freund's complete (incomplete) adjuvant, Montanide, alum, nano- 또는 micro- 입자를 이용한 adjuvant, PLGA (Poly-lactide-co-glycolide)와 ISCOMs (Immune-stimulating complex) 및 기타 mineral oil adjuvants 등이 있다(Table 1). 대서양 연어(*Salmo salar* L.)와 농어(*Dicentrarchus labrax*)에서, 일부 상업용 mineral oil adjuvants는 비브리오병(vibriosis), 저수온기 비브리오병 및 절창병(furunculosis)과 같은 세균성 질병에 대하여 장기간 효과가 지속되는 것으로 나타났으나, 눈에 띄는 성장 지연과 육아종성 복막염 등과 같은 부작용이 있음이 밝혀졌다(Midtlyng et al., 1996; Midtlyng and Lillehaug, 1998; Afonso et al., 2005). 다른 종류

Table 1. Adjuvants currently used and clinical tested in fish vaccines

Type	Adjuvant	Pathogen	References
Aluminium	Potassium aluminium (Alum) Aluminium hydroxide	<i>Aeromonas salmonicida</i> (<i>A. salmonicida</i>)	Mulvey et al. (1995)
		<i>Edwardsiella ictaluri</i> (<i>E. ictaluri</i>)	Tyler and Klesius (1994)
		<i>Edwardsiella tarda</i> (<i>E. tarda</i>)	Fan et al. (2012)
		Reddish body iridovirus (TRBIV)	Jiao et al. (2010)
Oil emulsions	Aj-oil (Alpha Ject 5200)	<i>Moritella viscosa</i> (<i>M. viscosa</i>)	Gudmundsdottir et al. (2007)
	Oil-adjuvant	<i>A. salmonicida</i> + <i>M. viscosa</i>	Mutoloki et al. (2010)
	Mineral-oil-adjuvant	<i>A. salmonicida</i> + <i>Vibrio anguillarum</i>	Mikkelsen et al. (2004)
	Freund's complete adjuvant (FCA)	<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>	Kawakami et al. (1998)
		<i>Streptococcus iniae</i>	Soltani et al. (2007)
		<i>Aeromonas hydrophila</i> (<i>A. hydrophila</i>)	Fang et al. (2004)
		<i>Aeromonas salmonicida</i>	Olivier et al. (1985)
		<i>Mycobacterium bovis</i>	Kato et al. (2012)
		<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Hogfors et al. (2008)
		<i>Flavobacterium columnare</i>	Grabowski et al. (2004)
		<i>Edwardsiella tarda</i>	Jiao et al. (2010)
	Freund's incomplete adjuvant (FIA)	<i>Lactococcus garvieae</i> (<i>L. garvieae</i>)	Kubilay et al. (2008)
		<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Van Gelderen et al. (2009)
		<i>Aphanomyces invadans</i>	Saikia et al. (2012)
	Montanide ISA763	<i>A. hydrophila</i> + <i>L. garvieae</i>	Bastardo et al. (2012)
	Montanide ISA763A	<i>Philasterides dicentrarchi</i>	Lamas et al. (2008)
	Montanide ISA711	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Ninomiya et al. (2001)
Immuno-stimulatory adjuvants	β -glucan Yeast glucan	<i>Vibrio damsela</i>	Figueras et al. (1998)
		<i>A. hydrophila</i>	Kamilya et al. (2006)
		<i>E. ictaluri</i>	Chen and Ainworth (1992)
		<i>A. salmonicida</i> + <i>Vibrio salmonicida</i>	Rorstad et al. (1993)
	Quil-A saponins (ISCOMS)	<i>E. tarda</i>	Ashida et al. (1999)
	Poly I:C (polyinosinic polycytidylic acid)	Infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV)	Kim et al. (2009)
		Redspotted grouper nervous necrosis virus	Nishizawa et al. (2009)
		Viral hemorrhagic septicemia (VHSV)	Oh et al. (2012)
			Takami et al. (2010)
	Lipopeptides (pGPL-Mc)	<i>A. salmonicida</i>	Hoel et al. (1997)
	Flagellin (Toll-like receptor 5 agonist)	<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Wilhelm et al. (2006)
		<i>E. tarda</i>	Jiao et al. (2009)

Table 1. Adjuvants currently used and clinical tested in fish vaccines (Continued)

Type	Adjuvant	Pathogen	References
Immuno-stimulatory adjuvants	Bacterial DNA: CpG oligo, CpG-ODN (Toll-like receptor 9 agonist)	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Rhodes et al. (2004)
		<i>A. salmonicida</i>	Carrington et al. (2007)
		<i>A. hydrophila</i>	Liu et al. (2010a)
		<i>Vibrio harveyi</i>	Liu et al. (2010b)
		<i>Miamiensis avidus</i>	Kang et al. (2012)
		Salmonid alphavirus	Thim et al. (2012)
	Cytokines (IRF-1, IL-8, IL-1 β , TNF- α)	VHSV	Martinez-Alonso et al. (2011)
		<i>A. hydrophila</i>	Yin et al. (2000)
		Red sea bream iridovirus (RSIV)	Caipang et al. (2009)
		VHSV	Jimenez et al. (2006)
		VHSV	Sanchez et al. (2007)
Particle adjuvant	PLGA micro particles	<i>A. hydrophila</i> (+ FIA)	Behera et al. (2010)
	Virus-like particles	Lymphocystis disease virus	Tian and Yu (2011)
	Plasmid DNA	IHNV G protein	Adomako et al. (2012)

의 adjuvant로는 면역증강제 또는 면역촉진제(immune-stimulants)의 일종으로, 알루미늄을 함유한 adjuvant나 Poly I:C (Polyinosinic polycytidylic acid), β -glucan, saponins, lipopeptides 및 cytokines 등이 있다(Table 1). 어류에서 비특이적 면역반응을 자극하는 것으로 알려진 β -glucan은 복강 주사 시, 용량 의존적으로 높은 항체 생성을 보였으며 adjuvant로서의 효과도 높은 것으로 보고되었다(Midtlund et al., 1996; Ashida et al., 1999; Selvaraj et al., 2005; Kamilya et al., 2006). Saponine은 T1-helper와 T2-helper 반응을 자극 및 유도하는 특성이 있어 동물 백신 adjuvant로 많은 연구가 되고 있다(Sun et al., 2009). 가장 많이 사용되는 saponine의 종류로는 Quil-A가 있으나 높은 세포 독성과 수중에서의 불안전성으로 인해 다른 종류의 다양한 saponine이 adjuvant로 검토되고 있다(Ashida et al., 1999). Cytokine은 동물 백신에서 그 종류에 따라 많은 연구 결과가 있으나, 수산용 cytokine으로는 interleukin-8이 어류의 초기 면역반응을 조절할 수 있다는 점에서, 바이러스 백신 adjuvant로서의 잠재력이 탐색되고 그 가능성이 연구된 바 있다(Caipang et al., 2005; 2009).

Adjuvant는 백신의 효능을 향상시키는 기술로 정제된 단백질을 기본으로 합성 및 재조합 백신에 특히 중요하나, 앞서 언급한 oil adjuvant만 해도 많은 결함을 알면서도 사용하고 실정으로 아직 많은 연구가 필요한 분야이다. 최근에는 TLR ligand나 cytokine과

같은 adjuvant가 그 사용의 편리성으로 인해 oil adjuvant 대체제로 부각되고 있다. 면역세포는 병원체 감염 시, 각각의 병원성 세균이나 바이러스에 특이적인 면역반응을 일으키지만, 세균의 세포벽, lipopolysaccharide (LPS), 단백질이나 바이러스의 RNA/DNA와 같이 공통적으로 존재하는 분자들에 대응하기 위한 수용체를 가지고 있다. 이들을 pattern recognition receptor (PRR)이라고 하며, TLR은 대표적인 PRR이다. TLR agonist들은 면역세포에 대한 활성이 강하기 때문에 백신 adjuvant로서 개발되고 있다(Schnare et al., 2001). 경구 백신의 개발에서 중요한 부분이라 할 수 있는 점막 adjuvant는 점막세포에서 면역을 유도하기 위해 사용되며, 특히 subunit 백신을 점막 백신으로 개발하고자 할 때 유용하다. 대표적인 점막 adjuvant인 세균(*Vibrio cholerae* 등)의 B subunit 독소만을 분리하여 사용하면 세포 독성 없이 점막면역만을 활성화 할 수 있다. 독소의 B subunit은 표적세포의 수용체와 결합하여 A subunit이 세포로 들어갈 수 있도록 보조하며, A subunit은 세포 내에서 생리 활성을 자극한다. 또한 리포솜(liposome)은 생체의 세포막과 같이 인지질의 이중막 구조를 가진 입자로 독성이 없으며, 그 자체로는 면역증강 활성이 없으나 양이온성 리포솜은 비특이적 면역활성이 있어 면역증강제로 개발되고 있다. 하지만 리포솜은 제조가 어려운 편이며, 동결 보관 시 쉽게 파괴되고, 냉장 보관 시에도 안정성이 낮다는 단점이 있다. 최근에는 두 종류의 TLR agonist를 같

이 사용하거나 TLR4/TLR9 agonist를 alum 또는 리포솜과 함께 혼합하여 adjuvant로 개발하고 있다(Mount et al., 2013; Rombout et al., 2014). 앞으로 부작용을 줄이면서도 접종이 편리한 경구 백신의 개발을 위한 점막면역을 활성화 할 수 있는 adjuvant의 개발은 수산용 백신 개발에 있어 중요한 기술이라 할 수 있다.

2. Fucoidan 구조 및 특성

Fucoidan은 최근 천연 면역증강제로 인기를 얻고 있는 생리활성 물질로 많은 연구들을 통해 항암, 항종양 효과, 항균, 항바이러스성, 항돌연변이 및 면역력 증강 등의 생리학적 효과가 구체적으로 확인됨에 따라, 특히 갈조류에 많이 포함되어 있는 fucoidan의 여러 기능성에 대한 관심이 높아졌다(Kwon et al., 2006; An et al., 2012; Lim, 2014; Kwak, 2014). 화학적 구조는 L-fucose에 에스테르화 황산을 주성분으로 하는 복합황산화 다당류로, 소량의 glucose, galactose, mannose, uronic acids 등과도 결합하고 있다(Choi et al., 2000). Fucoidan이란 이름이 동일한 구조의 물질을 의미하는 것은 아니며 주성분이 fucose인 고분자 다당류의 총칭으로 사용된다.

Fucoidan의 중요한 특징은 모든 천연 다당류가 다분산성(polydispersity)을 가지는 것과 마찬가지로 분자량이 다양하다는 것이다. 해조류 종류 또는 해조류의 발달 단계에 따라 다양한 구조를 보이는데 유사한 기후조건과 서식지에서는 유사한 구조를 가지는 것으로 알려져 있다(Cumashi et al., 2007; Skriptsova et al., 2010).

유럽 다시마(*Saccharina latissima*), 호스테일 켈프(*Laminaria digitata*), 헛가지말(*Anelopus japonicus*), 큰실말(*Cladosiphon okamuranus*), 끈말(*Chorda filum*) 등에서 추출되는 fucoidan은 pyranose 잔기가 1→3 결합 구조로, 이 중 큰실말류(*Cladosiphon* sp.) 유래는 그 크기가 1927.2 kDa에 달한다. 뚝부기류(*Ascophyllum nodosum*)에서 추출되는 다당류는 α-L-fucopyranose 잔기가 1→3이 1→4로 변형된 구조이며(Imbs et al., 2011), 유럽 다시마(*S. latissima*) 유래 fucoidan은 395.4 kDa, 미역(*Undaria pinnatifida*)에서 추출된 것은 51.7 kDa에 달한다(Fitton et al., 2015). Fucoidan의 분자량에 따른 연구를 살펴보면, 뚝부기류(*A. nodosum*) 유래 fucoidan의 분자량은 500 kDa 이상의 고분자로, 그 자체로는 체내 흡수율이 낮기 때문에 저분자화하여 약리효과를 증대시킬 수 있다는 보고가 있으며(Alain et al., 1996), 다시마(*Laminaria japonica*) 유래 저분자 fucoidan이 항산화 및 항응고 효능이 높았다는 보고가 있다(Wang et al., 2010). 그러나 흥미로운 사실은 분자량이 712 kDa에 달하는 해조류(*C. okamuranus*, *U. pinnatifida*) 유래 fucoidan의 섭취 이후, 사람의 혈청과 소변에서 임상적으로 관찰되었다는 것이다(Irhimeh et al., 2005; Tokita et al., 2010). 이는 소화관 내의 산성조건에서도 fucoidan이 분해되지 않고 혈액 속으로 흡수되며 비록 소량이었으나 배출 직전의 소변에서도 fucoidan의 구조를 유지하고 있다는 것을 의미한다. 따라서 반드시 저분화된 fucoidan만이 면역효과가 있다는 것은 아니라는 것을 의미하기 때문에, 자연유래 fucoidan

의 수산용 경구 백신 또는 면역증강제로서의 이용 가능성을 긍정적으로 검토할 수 있을 것이다.

3. 수산양식에서 fucoidan의 사용

양식생물에서 fucoidan의 투여효과에 대한 연구는 Table 2에서 볼 수 있듯이, 항산화 능력, 비특이적 면역반응 향상 및 질병 저항성을 증가시키는 사료 첨가제로서의 기능에 대한 보고가 대부분이다. 물론 추출 원료, 어종 및 발달 단계에 따라 fucoidan의 유효 농도는 다양하였으나, 적정 농도에서 사료 혼합 첨가 시, 면역증강 효과 및 어병 세균에 대한 저항성 증가를 보였다. Fucoidan의 세포 내 산화적 손상에 대한 저항 능력은 주로 free-radical 제거 능력, 지질과산화(lipid peroxidation), SOD (super oxide dismutase) 및 CAT (catalase) 같은 항산화(anti-oxidant) 효소를 측정함으로써 분석하였다. SOD는 CAT와 함께 세포 내에서 발생된 활성산소(ROS, reactive oxygen species)에 대한 첫 번째 방어선으로서, superoxide와 hydrogen peroxide를 제거하여 세포를 보호하는 역할을 한다(Hayes and McLellan, 1999).

Fucoidan의 면역증강 효과는 interleukin (IL)-1과 interferon- γ 의 생성을 유도하고 T-lymphocyte, B-cell, macrophage 및 병원성 감염세포를 파괴할 수 있는 자연살해세포(NK cells)의 기능 향상에 기인한다(Maruyama et al., 2006). 어류에서 fucoidan의 면역증강 효과를 검토한 연구에서는, 백혈구와 lysozyme의 활성, 식세포(phagocytes)의 호흡폭발(respiratory burst activity), 식균작용(phagocytosis) 그리고, 세균 및 바이러스에 대한 저항성 증가에 따른 폐사율 감소 등을 보고하면서 사료 첨가제 또는 면역보조제로서의 가능성을 제기하였다(Prabu et al., 2016). 새우류의 세균성 질병에 있어, 면역증강제 또는 사료 첨가제로서의 fucoidan의 가능성에 대한 검토는 여러 연구진들에 의해서 진행된 바 있다(Immanuel et al., 2012; Madasamy et al., 2014). 새우 사료에 fucoidan 첨가 시, 항균성과 phenoloxidase (PO), SOD 등의 증가로 인한 면역활성이 효과적으로 향상되었으며, 특히 WSSV (white spot syndrome virus) 항바이러스 활성에 대한 보고가 주를 이룬다(Takahashi et al., 1998; Chotigeat et al., 2004; Cruz-Suarez et al., 2007; Immanuel et al., 2010, 2012). 이상에서 볼 수 있듯이 fucoidan에 대해서 수산 분야에서는 아직까지 기능성 사료에 대한 검토만 이루어졌을 뿐, adjuvant로서의 가능성 연구는 미흡한 실정이다.

4. Adjuvant로서의 fucoidan의 가능성

이상적인 adjuvant는 병원균을 효과적으로 제거하기 위해서 안정된 구조여야 하며, 체액성 및 세포성 매개 면역반응을 활성화시키고, 독성은 낮은 생분해성이며 안전성도 보장되어야 한다(Aguilar and Rodrigues, 2007; Dubensky and Reed, 2010). 이런 점에서 fucoidan은 유망한 adjuvant 후보물질이라 할 수 있으며, 최근

Table 2. Comparison effects of fucoidan from various brown algae in fisheries

Brown algae	Animals	Effects	References
<i>Ecklonia cava</i>	Zebra fish	Anti-inflammatory effect (ROS scavenging activity, Protection of lipid peroxidation)	Lee et al. (2013)
<i>Ecklonia cava</i>	Zebra fish	Free radical & intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging activity, Protection of lipid peroxidation & cell death	Kim et al. (2014)
<i>Clarias gariepinus</i>	African catfish	Enhance the non-specific immune response (macrophage oxidative burst & phagocytic activity, lymphocyte transformation, lysozyme), Enhance disease resistance (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	El-Boshy et al. (2014)
<i>Gadus morhua</i>	Cod	Stimulate cellular immune response (respiratory burst, myeloperoxidase activity), Enhance disease resistance (<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i>)	Caipang et al. (2011)
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	Shrimp	Enhance the innate immune response (THC, prophenoloxidase, respiratory burst & phagocytic activity), Enhance disease resistance (<i>Vibrio alginolyticus</i>)	Kitikiew et al. (2013)
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	Carp	Enhance the non-specific immune response (phagocytic activity, NK cell, lymphocyte, lysozyme), Protection of lipid	Kakuta (2004)
<i>Sargassum cristaefolium</i>	Tilapia	Innate immune parameters increase (phagocytic activity, leucocyte count)	Isnansetyo et al. (2016)
<i>Saccharina japonica</i>	Yellow catfish	Enhance the non-specific immune response (lysozyme, respiratory burst, phagocytosis), Blood characters, antioxidant-status (SOD, CAT, MDA)	Yang et al. (2014)
<i>Sargassum polycystum</i>	Shrimp	Enhance disease resistance (WSSV)	Chotigeat et al. (2004)
<i>Sargassum wightii</i>	Shrimp	Enhance the innate immune response (THC, prophenoloxidase, respiratory burst, SOD & phagocytic activity), Enhance disease resistance (WSSV)	Immanuel et al. (2012)
<i>Sargassum wightii</i>	Shrimp	Enhance the innate immune response (THC, prophenoloxidase, respiratory burst, SOD & phagocytic activity), Enhance disease resistance (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	Sivagnanavelmurugan et al. (2014)
<i>Sargassum wightii</i>	Sutchi catfish	Enhance the non-specific immune response (respiratory burst, phagocytosis, leukocyte count, lysozyme, Interferon gamma), Enhance disease resistance (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	Prabu et al. (2016)
<i>Sargassum wightii</i>	<i>Labeo rohita</i>	Non-specific immune response (respiratory burst, lysozyme, phagocytosis), Enhance disease resistance (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	Mir et al. (2017)
<i>Undaria pinnatifida</i>	Shrimp	Enhance disease resistance (<i>Vibrio harveyi</i>)	Traifalgar et al. (2009)
<i>Undaria pinnatifida</i>	Barramundi	Enhance growth & muscle fibre	Tuller et al. (2012)

이에 대한 연구가 빠르게 증가하고 있다(Kuznetsova et al., 2016). Fucoidan은 대식세포(macrophages)의 식균활성(phagocytosis) 증가, 자연살해세포(NK cells)의 활성 촉진으로 염증성 cytokines의 생성을 통한 항바이러스 작용과 CD4, CD8 T-cell에 의한 interferon

생산을 유도하여 cytotoxic T-cell을 통한 항균작용이 있음이 알려져 있다(Ale et al., 2011; Hayashi et al., 2008; Irhimeh et al., 2007; Kim and Joo, 2008). 또한, 쥐를 이용한 연구(*in vivo*)에서 fucoidan이 수지상 세포(dendritic cells)의 성숙, CTL의 활성화 및 Th1 면역

반응을 통한 항원 특이적 항체 생산 및 memory T-cells 생성을 촉진시켜 adjuvant로서의 잠재성을 인정 받은 바 있다(Yang et al., 2006, 2008; Jin et al., 2009, 2014). 이러한 fucoidan의 효과는 수지상 세포(dendritic cells) 성숙의 전형적인 유도체인 종양괴사인자(TNF- α)의 효과와 유사하다는 것이 확인되었으며(Makarenkova et al., 2009), 이는 백신 항원에 대한 효과적인 면역기억을 확립하는데 중요한 역할을 한다.

돼지 호흡기 질환의 주요 원인균인 *Bordetella bronchiseptica*와 *Mycoplasma hyopneumoniae* 백신 개발 연구에서, adjuvant로 사용된 fucoidan은 항원 제시(antigen-presenting) 기능을 하는 MHC (major histocompatibility complex) class II의 발현을 자극하고, lymphocytes 활성화 표지자인 CD25 및 CD69의 발현을 매우 향상시켰다. 또한 *B. bronchiseptica*와 함께 투여한 경우 유의한 독성은 나타나지 않은 반면, 비장세포의 생존력과 백신의 유효성에 중요한 cytokine의 일종인 TNF- α 의 생성을 유의하게 증가시키고, 발열 반응을 초래할 수 있는 백신 항원의 농도를 낮출 수 있었다는 점에서, fucoidan의 adjuvant로서의 가능성을 보여주었다(Kim and Joo, 2015). 닭의 경우, 뉴캐슬병(newcastle disease), 전염성 기관지염 및 조류 인플루엔자에 대한 백신 접종 시, fucoidan을 adjuvant로 사용하였을 때, 백신 항원에 대한 체액성 및 세포성 매개 면역 반응을 활성화시키는 효과를 보였다(Li et al., 2012). 인체의 경우, 인플루엔자바이러스 A(H5N3 및 H7N2 subtypes)에 감염된 마우스 실험에서는 백신과 함께 fucoidan을 경구투여 시, 바이러스 복제 억제효과 및 호흡기 점막에서 국소적인 IgA 생성 증가와 높은 바이러스 중화 항체가를 보임으로 fucoidan의 adjuvant 효과가 입증되었다(Hayashi et al., 2013; Synytsya et al., 2014). 위에서 언급되었듯이 사람과 가축을 대상으로 한 연구에서 fucoidan의 adjuvant로서의 이용 가능성은 매우 긍정적으로 평가되고 있다.

결론

해조류는 항균, 항바이러스, 항종양, 항혈액응고 및 면역력 증강 등의 생리적 순기능을 가진 것으로 밝혀졌다. 본 논문에서는 특히 갈조류에 많이 함유되어 있는 fucoidan의 항산화 효과, 면역증강 효과와 수산생물용 백신 adjuvant 후보물질로서의 가능성을 살펴 보았다. 특히 fucoidan이 비장세포를 활성화하여 DC (dendritic cells)와 MHC class II의 발현을 증진시키는 등 항원 특이적 항체 생산을 향상시킨다는 점에서 그 가능성을 보여주었다. 하지만 fucoidan을 수산용 adjuvant로 사용하기까지는 극복해야 할 중요한 과제들이 남아있다. 예를 들어, fucoidan 투여 후, B-cell의 성숙도 및 비율 변화를 관찰한 연구에서 시험 농도 중 가장 높은 농도구(50 μ g/ml)에서 오히려 B-cell 마커 발현이 감소하였다는 보고가 있다(Kim and Joo, 2015). 이는 lymphoblast에서 B-cell 마커 발현이 낮았기 때문일 수도 있으나, 어떤 기준 이상의 농도는 fucoidan과 관련된 세포 독성이 나타난 것일 수도 있기 때문에, 이 현상을

이해 및 극복하기 위해서는 어체 내 독성생리 반응에 대한 연구가 수행되어야 한다. 또한, 백신 적용 실험에서 어중에 따라서 가장 좋은 효과를 보이는 fucoidan의 최적 농도를 탐색하는 연구가 뒤따라야 할 것이다. Fucoidan은 *in vitro* 백신 실험에서는 면역증강 효과가 입증되었다고 볼 수 있다. 그러나 경구투여를 할 경우에는 백신 전달과정에서 위장관 벽이라는 한계가 있다는 점을 인지해야 한다. 일부 사람과 동물 연구에서, fucoidan을 경구 백신 adjuvant로 사용할 수 있음이 확인된 보고는 있다(Irhimeh et al., 2005; Tokita et al., 2010). 이 후, 장관 내 미생물에 의한 fucoidan의 분해 가능성도 제기되었으나(Kuznetsova et al., 2012), fucoidan이 소장 상피세포에서 일부 흡수된다는 사실이 확인되었다(Nagamine et al., 2015). Fucoidan은 분자량 및 구조적 특성에 따라 흡수율이 다르다고 보고되고 있다. 쥐의 비장세포에서, 고분자량 fucoidan(평균 130 kDa)은 세포의 생존력과 interferon-gamma와 nitric oxide를 증가시킨 반면, 저분자량(30 kDa)은 낮은 면역 활성화와 비교적 높은 독성도 확인되었다(Jang et al., 2014). 그럼에도 불구하고, 저분자(4 kDa) 또는 나노 입자 형태의 fucoidan의 경우는 더 추가적인 연구가 필요하겠지만, 사람 및 동물 백신에서 adjuvant로서 전망이 밝다고 보고되었다(Lira et al., 2011; Lee et al., 2013).

백신은 수산생물의 질병을 예방하기 위한 매우 중요한 기술이라 할 수 있다. 특히 어류 질병을 효율적으로 제어하기 위해서는 특정 어류와 병원체를 대상으로 한 맞춤형 백신의 개발은 필수적이다. 현재까지 어류 백신은 세균성 질병에는 매우 성공적이었으나, 바이러스성 또는 진균 및 기생충성 질병에 대한 백신 개발은 아직까지 미진한 상황이다. 이러한 질병에 대응하기 위해서는 수산양식에 적용 가능한 DNA 백신, 재조합 백신 등 신규 기술 개발이 필요하다. 하지만 작용기전 연구, 유효성 연구, 안정성 확보에 이르기까지 그 개발 기간이 장시간 소요되는 기술 분야이며, 기초부터 개발 단계까지 장기적인 관점에서 계획할 필요가 있다. 그러나 수산용 백신 개발을 위하여 초기 연구 단계에서부터 진입한다는 것은 경제적인 관점에서도 어려운 점이 있기 때문에, 인체 또는 동물에서 개발한 백신이나 adjuvant를 도입하거나 공동 연구를 통하여 개발 기간을 단축시키고 개발 비용을 절감하는 것도 전략이라 할 수 있다. 특히 영국의 Patrick Smith 교수가 '경구 백신은 수산양식의 성배'라고 칭할 정도인(Smith, 2015) 경구 백신의 개발은 국내 수산양식산업에 재도약의 기회를 제공할 것이다.

사사

이 논문은 2019년도 국립수산물과학원 넙치 연쇄구균(*Streptococcus parauberis*) 백신의 개량 연구(R2019056)의 지원으로 수행된 연구입니다.

참고 문헌

- Adomako M, St-Hilaire S, Zheng Y, Eley J, Marcum RD, Sealey W. 2012. Oral DNA vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against infectious haematopoietic necrosis virus using PLGA (Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)) nanoparticles. *J Fish Dis* 35: 203-214.
- Afonso A, Gomes S, da Silva J, Marques F, Henrique M. 2005. Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intra-peritoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol* 19: 1-16.
- Aguilar JC, Rodrigues EG. 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 25: 3752-3762.
- Alain N, Frederic C, Catherine BV, Patrick D, Jacqueline J. 1996. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr Res* 289: 201-208.
- Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, Mikkelsen JD, Meyer AS. 2011. Fucoidan from *Sargassum* sp. And Fucus vesiculosus reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*. *Int J Biol Macromol* 49: 331-336.
- An IJ, Cho SD, Kwon JK, Kim HR, Yu HJ, Jung JY. 2012. The effects of fucoidan on the activation of macrophage and anticancer in gastric cancer cell. *J Fd Hyg Safety* 27: 406-414.
- Ashida T, Okimasu E, Ui M, Heguri M, Oyama Y, Amemura A. 1999. A protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* against experimental edwardsiellosis by formalin-killed *Edwardsiella tarda* in combination with oral administration of immunostimulants. *Fish Sci* 65: 527-530.
- Bastardo A, Ravelo C, Castro N, Calheiros J, Romalde JL. 2012. Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Shellfish Immunol* 32: 756-761.
- Behera T, Nanda PK, Mohanty C, Mohapatra DM, Swain P, Das BK. 2010. Parenteral immunization of fish, *Lebeo rohita* with poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate and adaptive immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 28: 320-325.
- Caipang CM, Hirono I, Aoki T. 2005. Induction of antiviral state in fish cells by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, interferon regulatory factor-1. *Fish Shellfish Immunol* 19: 79-91.
- Caipang CM, Hirono I, Aoki T. 2009. Modulation of the early immune response against viruses by a teleostean regulatory factor-1 (IRF-1). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 152: 440-446.
- Caipang CM, Lazado CC, Berg I, Brinchmann MF, Kiron W. 2011. Influence of alginic acid and fucoidan on the immune responses of head kidney leukocytes in cod. *Fish Physiol Biochem* 37: 603-612.
- Carrington AC, Secombes CJ. 2007. CpG oligodeoxynucleotides up-regulate anti-bacterial systems and induce protection against bacterial challenge in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 23: 781-792.
- Chen D, Ainsworth AJ. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J Fish Dis* 15: 295-304.
- Cho SY, Kim HJ, Lan NT, Han HJ, Lee DC, Hwang JY, Kwon MG, Kang BK, Han SY, Moon HJ. 2017. Oral vaccination through voluntary consumption of the capsid protein of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Vet Microbiol* 204: 159-164.
- Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Kim CW, Koo JG. 2000. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) extract and fucoidan components on lipid metabolism of stressed mouse. *Korea J Fish Aquat Sci* 33: 124-128.
- Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture* 233: 23-30.
- Cruz-Suarez LE, Hernandez J, Porchas-Cornejo M, Coronado-Molina DE, Limme-Unzueta-Bustamante ML, Nieto-Lopez M, Tapia-Salazar M, Ricque Marie D. 2007. Fucoidan extracted from the brown algae *Cladosiphon okamuranus* has been shown to be effective against WSSV in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Asia Pacific* 3: 19.
- Cumahsi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D'Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozovich GE, Berman AE, Bilan MI. 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17: 541-552.
- Dubensky TW Jr, Reed SG. 2010. Adjuvants for cancer vaccines. *Semin Immunol* 22: 155-161.
- El-Boshy M, El-Ashram A, Risha E, Abdelhamid F, Zahran E, Gab-Alla A. 2014. Dietary fucoidan enhance the non-specific immune response and disease resistance in African fish, *Clarias gariepinus*, immunosuppressed by cadmium chloride. *Vet Immunol Immunopathol* 162: 168-173.
- Fan T, Hu X, Wang L, Geng X, Jiang G, Yang X. 2012. Develop-

- ment of an inactivated iridovirus vaccine against turbot viral reddish body syndrome. *J Ocean Univ China* 11: 65-69.
- Fang HM, Ge R, Sin YM. 2004. Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion. *Fish Shellfish Immunol* 16: 645-658.
- Figueras A, Santarem MM, Novoa B. 1998. Influence on the sequence of administration of beta-glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Vet Immunol Immunopathol* 64: 59-68.
- Fitton JH. 2011. Therapies form fucoidan: multifunctional marine polymers. *Marine Drug* 9: 1731-1760.
- Grabowski LD, LaPatra SE, Cain KD. 2004. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L), following immunization with *Flavobacterium columnare*. *J Fish Dis* 27: 573-581.
- Gudmundsdottir BK, Bjornsdottir B. 2007. Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. *Vaccine* 25: 5512-5523.
- Hastein T, Gudding R, Evensen O. 2005. Bacterial vaccines for fish-an update of the current situation worldwide. *Dev Biol (Basel)* 121: 55-74.
- Hayes JD, McLellan LI. 1999. Glutathione and Glutathione-dependent enzymes represents a coordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Rad Res* 31: 273-300.
- Hayashi K, Nakano T, Hashimoto M, Kanekiyo K, Hayashi T. 2008. Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. *Inter Immunopharmacol* 8: 109-116.
- Hayshi K, Lee JB, Nakano T, Hayshi T. 2013. Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity. *Microbes Infect* 15: 302-309.
- Hoel K, Lillehaug A. 1997. Adjuvant activity of polar glycopeptidolipids from *Mycobacterium chelonae* in experimental vaccines against *Aeromonas salmonicida* in salmonid fish. *Fish Shellfish Immunol* 7: 365-376.
- Hogfors E, Pullinen KR, Madetoja J, Wiklund T. 2008. Immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with a low molecular mass fraction isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis* 1: 899-911.
- Imbs TI, Shevchenko NM, Semenova TL. 2011. Compositional heterogeneity of sulfated polysaccharides synthesized by the brown alga *Costaria costata*. *Chem Nat Compd* 47: 96-97.
- Immanuel G, Sivagnanavelmurugan M, Balasubramanian V, Palavesam A. 2010. Effect of hot water extracts of brown seaweed *Sargassum* spp. on growth and resistance to white spot syndrome virus in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. *Aqua Res* 41: 545-553.
- Immanuel G, Sivagnanavelmurugan M, Marudhupandi T, Radhakrishnan S, Palavesam A. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish Shellfish Immunol* 32: 551-564.
- Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM, Kongtawelert P. 2005. A quantitative method to detect fucoidan in human plasma using a novel antibody. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27: 705-710.
- Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM. 2007. Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34 cells. *Exp Hematol* 35: 989-994.
- Isnansetyo A, Fikriyah A, Kasanah N, Murawntoko. 2016. Non-specific immune potentiating activity of fucoidan from a tropical brown alga (Phaeophyceae), *Sargassum cristaefolium* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacult Int* 24: 465-477.
- Jang HW. 2016. Global Agribusiness Annual 2016. World Agricul, 188: 1-14.
- Jang JY, Moon SY, Joo HG. 2014. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food Chem Toxicol* 68: 234-238.
- Jiao XD, Cheng S, Hu YH, Sun L. 2010. Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's adjuvant-induced on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen. *Vaccine* 28: 1832-1837.
- Jiao XD, Zhang M, Hu YH, Sun L. 2009. Construction and evaluation of DNA vaccines encoding *Edwardsiella tarda* antigen. *Vaccine* 27: 5195-5202.
- Jimenez N, Coll J, Salguero FJ, Tafalla C. 2006. Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* 24: 5615-5626.
- Jin JO, Park HY, Xu Q, Park JI, Zvyagintseva T, Stonik VA, Kwak JY. 2009. Ligand of scavenger receptor class A indirectly induces maturation of human blood dendritic cells via production of tumor necrosis factor-alpha. *Blood* 113: 5839-5847.
- Jin JO, Zhang W, Du JY, Wong KW, Oda T, Yu Q. 2014. Fucoidan can function as an adjuvant in vivo to enhance dendritic cell maturation and function and promote antigen-specific T cell immune responses. *PLoS One* 9: e99396.
- Jung TS. 2006. The present and future of aquatic vaccine. *Kor Soci Veter Pub Health* 30: 121-135.

- Kakuta I. 2004. Enhancement of the biodefense activity and improvement of physiological condition of fish by oral administration of algae fucoidan. *Aqua Sci* 52: 413-420.
- Kamilya D, Maiti T, Joardar S, Mal B. 2006. Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). *J Fish Dis* 29: 331-337.
- Kang Y, Kim K. 2012. Effect of CpG-ODNs belonging to different classes on resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and *Miamiensis avidus* (Ciliata: Scuticociliata) infections. *Aquaculture* 324: 39-43.
- Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. 2012. *Mycobacterium bovis* BCG vaccine induces non-specific immune response in Japanese flounder against *Nocardia seriolae*. *Fish Shellfish Immunol* 33: 243-250.
- Kawakami H, Shinohara N, Sakai M. 1998. The non-specific stimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin. M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. *Fish Pathol* 33: 987-992.
- Kim EA, Lee SH, Ko CI, Cha SH, Kang MC, Kang SM, Ko SC, Lee WW, Ko JY, Lee JH, Kang N, Oh JY, Ahn G, Jee YH, Jeon YJ. 2014. Protective effect of fucoidan against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish model. *Carbohydrate Polymers* 102: 185-191.
- Kim HJ, Oseko N, Nishizawa T, Yoshimizu M. 2009. Protection of rainbow trout from infectious hematopoietic necrosis (IHN) by injection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or poly (I:C). *Dis Aquat Organ* 83: 105-113.
- Kim MH, Joo HG. 2008. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunol Letters* 115: 138-143.
- Kim SY, Joo HG. 2015. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci* 16: 145-150.
- Kitikiew S, Chen JC, Putra DF, Lin YC, Yeh ST, Liou CH. 2013. Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol* 34: 280-290.
- Knight-Jones TJD, Edmond K, Gubbins S, Paton DJ. 2014. Veterinary and human vaccine evaluation methods. *Proc Biol Sci* 281: 2132839 (<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.2839>).
- Kubilay A, Altun S, Ulukoy S, Ekici S, Diler O. 2008. Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Lactococcus garvieae* using vaccine mixtures. *Isr J Aquacult* BAMIGDEH 60: 268-273.
- Kuznetsova TA, Zaporozhets TS, Makarenkova ID. 2012. Probiotic properties of polysaccharides from brown seaweed *Fucus evanescens* and perspectives for clinical using. *Tikhookean Med Zh* 1: 37-40.
- Kuznetsova TA, Zaporozhets TS, Persianova EV, Khotimchenko YS, Besednova NN. 2016. Prospects for the use of sulfated polysaccharides from brown seaweeds as vaccine adjuvants. *Russian J Mar Biol* 42: 443-450.
- Kwak JY. 2014. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Mar Drugs* 12: 851-870.
- Kwon DJ, Lim ST, Chung YJ, Park SH, Kweon DK. 2006. Comprehension and practical use of Fucoidan extracted from brown seaweeds. *Food Sci Ind* 39: 73-80.
- Lamas J, Sanmartin M, Parama A, Castro R, Cabaleiro S, De Ocenda M. 2008. Optimization of an inactivated vaccine against a scuticociliate parasite of turbot: effect of antigen, formalin and adjuvant concentration on antibody response and protection against the pathogen. *Aquaculture* 278: 22-26.
- Lee KW, Jeong D, Na K. 2013. Doxorubicin loading fucoidan acetate nanoparticles for immune and chemotherapy in cancer treatment. *Carbohydr Polym* 94: 850-856.
- Lee SH, Ko CI, Jee YH, Jeong YH, Kim MS, Kim JS, Jeon YJ. 2013. Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from *Ecklonia cava* in zebrafish model. *Carbohydrate Polymers* 92: 84-89.
- Li LJ, Li MY, Li YT, Feng JJ, Hao FQ, Zhang L. 2012. Adjuvant activity of *Sargassum pallidum* polysaccharides against combined Newcastle disease, infectious bronchitis and avian influenza inactivated vaccines. *Mar Drug* 10: 2648-2660.
- Lim JK. 2014. A review of the usability of fucoidan extracted from brown seaweed as a functional ingredient cosmetics. *Kor J Aesthet Cosmetol* 12: 447-452.
- Lira MC, Santos-Magalhaes NS, Nicolas V. 2011. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. *Eur Pharm Biopharm* 79: 162-170.
- Liu CS, Sun Y, Hu YH, Sun L. 2010a. Identification and analysis of a CpG motif that protects turbot (*Scophthalmus maximus*) against bacterial challenge and enhances vaccine-induced specific immunity. *Vaccine* 28: 4153-4161.
- Liu CS, Sun Y, Hu YH, Sun L. 2010b. Identification and analysis of the immune effects of CpG motifs that protect Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol* 29: 279-285.
- Madasamy S, Bergmans JT, Arunachalam P, Grasian I. 2014. Dietary

- effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prohenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish Shellfish Immunol 39: 439-4493.
- Makarenkova ID, Akhmatova NK, Semenova IB. 2009. Sulphated polysaccharides derived from sea brown algae as inducing substances for dendritic cell maturation. Tikhookean Med Zh 3: 318-325.
- Martinez-Alonso S, Martinez-Lopez A, Estepa A, Cuesta A, Tafalla C. 2011. The introduction of multi-copy CpG motifs into an antiviral DNA vaccine strongly up-regulates its immunogenicity in fish. Vaccine 29: 1289-1296.
- Marrack P, McKee AS, Munks MW. 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. Nat Rev Immunol 9: 287-293.
- Maruyama H, Tamauchi H, Iizuka M, Nakano T. 2006. The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mekabu). Planta Medica 72: 1415-1417.
- Midtlyng P, Reitan L, Speiberg L. 1996. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intra-peritoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. Fish Shellfish Immunol 6: 335-350.
- Midtlyng P, Lillehaug A. 1998. Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intra-peritoneal administration of vaccines containing adjuvants. Dis Aquat Org 32: 91-97.
- Mikkelsen H, Schroder M, Lund V. 2004. Vibriosis and atypical furunculosis vaccines: efficacy, specificity and side effects in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Aquaculture 242: 81-91.
- Mir IN, Sahu NP, Pal AK, Makesh M. 2017. Synergistic effect of L-methionine and fucoidan rich extract in eliciting growth and non-specific immune response of *Labeo rohita* fingerlings against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 479: 396-403.
- Mount A, Koerning S, Silva A, Drane D, Maraskovsky E, Morelli AB. 2013. Combination of adjuvants: the future of vaccine design. Expert Reviews Vaccines 12: 733-746.
- Mulvey B, Landolt M, Busch R. 1995. Effects of potassium aluminium sulphate (alum) used in an *Aeromonas salmonicida* bacterin in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis 18: 495-503.
- Mutoloki S, Cooper GA, Marjara IS, Koop BF, Evensen O. 2010. High gene expression of inflammatory markers and IL-17A correlates with severity of injection site reaction of Atlantic salmon vaccinated with oil-adjuvanted vaccines. BMC Genomics 11: 336.
- Nagamine T, Hayakawa K, Nakazato K, Iho M. 2015. Determination of active transport of fucoidan derived from *Okinawa mozuku* across the human intestinal caco-2 cells as assessed by size-exclusion chromatography. J Chromatogr (B) Anal Technol Biomed Kife Sci 997: 187-193.
- Ninomiya K, Yamamoto M. 2001. Efficacy of oil-adjuvanted vaccines for bacterial hemorrhagic ascites in ayu *Plecoglossus altivelis*. Fish Pathol 36: 183-185.
- Nishizawa T, Takami I, Kokawa Y, Yoshimizu M. 2009. Fish immunization using a synthetic double-stranded RNA poly (I:C), an interferon inducer, offers protection against RGNNV, a fish nodavirus. Dis Aquat Organ 83: 115-122.
- Oh M, Takami I, Nishizawa T, Yoshimizu M. 2010. Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* from viral hemorrhagic septicemia (VHS) by poly (I:C) immunization. Dis Aquat Organ 89: 105-115.
- Olivier G, Evelyn TP, Lallier R. 1985. Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophage in the phenomenon. Dev Comp Immunol 9: 419-432.
- Palm NW, Nedzhitov R. 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. Immunol Rev 227: 221-223.
- Park JM. 2008. Current status of veterinary vaccines. J Kor Veter Med Associa 44: 339-368.
- Pasquale A, Preiss S, Silva F, Garcon N. 2015. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. Vaccines 3: 320-343.
- Peddie S, McLauchlan PE, Ellis AE, Secombes CJ. 2003. Effect of intraperitoneally administered IL-1 beta-derived peptides on resistance to viral haemorrhagic septicemia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Org 26: 195-200.
- Prabu DL, Sahu NP, Pal AK, Dasgupta S, Narendra A. 2016. Immunomodulation and interferon gamma gene expression in sutchi cat fish, *Pangasianodon hypophthalmus*: effect of dietary fucoidan rich seaweed extract (FRSE) on pre and post challenge period. Aqua Res 47: 199-218.
- Pulendran B, Ahmed R. 2011. Immunological mechanisms of vaccination. Nat Immunol 12: 509-517.
- Rhodes LD, Rathbone CK, Corbett SC, Harrell LW, Strom MS. 2004. Efficacy of cellular vaccines and genetic adjuvants against bacterial kidney disease in chinook salmon (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol 16: 461-474.
- Rombout JHWM, Yang G, Kiron V. 2014. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. Fish Shellfish Immunol 40: 634-643.

- Rorstad G, Aasjord P, Robertsen B. 1993. Adjuvants effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Shellfish Immunol 3: 179-190.
- Saikia D, Kamilya D. 2012. Immune responses and protection in catla (*Catla catla*) vaccinated against epizootic ulcerative syndrome. Fish Shellfish Immunol 32: 353-359.
- Sanchez E, Coll J, Tafalla C. 2007. Expression of inducible CC chemokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to a viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) DNA vaccine and interleukin 8. Dev Comp Immunol 31: 916-926.
- Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nature Immunol 2: 947-950.
- Selvaraj V, Sampath K, Selar V. 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol 19: 293-306.
- Sivagnanavelmurugan M, Thaddaeus BJ, Palavesam A, Immanuel G. 2014. Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish Shellfish Immunol 39: 439-449.
- Skriptsova AV, Shevchenko NM, Imbs TI, Zvyagintseva TN. 2010. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida*. J Appl Phycol 22: 79-86.
- Smith P. 2015. Fish vaccines- a short, but remarkable, journey. Veterinary Vaccinology Network Meeting Birmingham ICC. pp 1-104.
- Soltani M, Alishahi M, Mirzargar S, Nikbakht G. 2007. Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. Iran J Fish Sci 7: 129-140.
- Stills HF. 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freud's complete and other adjuvants. ILAR J 46: 280-293.
- Sun HX, Xie Y, Ye YP. 2009. Advances in saponine-based adjuvants. Vaccine 27: 1787-1796.
- Synytsya A, Bleha R, Synytsya A, Hayashi T. 2014. Mekabu fucoidan: structural complexity and defensive effects against avian influenza A viruses. Carbohydr Polym 111: 633-644.
- Takahashi Y, Uehara K, Watanabe R, Okumura T, Yamashita T, Omura H, Yomo T, Kawano T, Kanemitsu A, Narasaka H, Suzuki N, Itami T. 1998. Efficacy of oral administration of fucoidan, a sulfated polysaccharide, in controlling white spot syndrome in Kuruma shrimp in Japan. In: Advances in Shrimp Biotechnology (ed. By T.W. Flegel), National center for genetic engineering and biotechnology, Bangkok, 1998, pp 171-173.
- Takami I, Kwon ST, Nishizawa T, Yoshimizu M. 2010. Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* from viral hemorrhagic septicemia (VHS) by poly (I:C) immunization. Dis Aquat Organ 89: 109-115.
- Thim HL, Illiev DB, Christie KE, Villonig S, McLoughlin MF, Strandkog G. 2012. Immunoprotective activity of a salmonid alphavirus vaccine: comparison of the immune response induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I:C alone or combined with an oil adjuvant. Vaccine 30: 4828-4834.
- Tian J, Yu J. 2011. Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against lymphocystis disease virus. Fish Shellfish Immunol 30: 109-117.
- Tokita Y, Nakajima K, Mochida H, Iha M, Nagamine T. 2010. Development of a fucoidan-specific antibody and measurement of fucoidan in serum and urine by sandwich ELISA. Biosci Biotechnol Biochem 74: 350-357.
- Traifalgar RF, Serrano AE, Corre V. 2009. Evaluation of dietary fucoidan supplementation effects on growth performance and vibriosis resistance of *Penaeus monodon* postlarvae. Aquaculture Sci 57: 164-174.
- Tuller J, De Santis C, Jerry DR. 2012. Dietary influence of fucoidan supplementation on growth of *Lates calcarifer* (Bloch). Aqu Res 45: 749-754.
- Tyler JW, Klesius PH. 1994. Protection against enteric septicemia of catfish (*Ictalurus punctatus*) by immunization with the R-mutant, *Escherichia coli* (J5). Am J Vet Res 18: 495-506.
- Van Gelderen R, Carson J, Nowak B. 2009. Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against marine flexibacteriosis. Aquaculture 288: 7-13.
- Villumsen KR, Koppang EO, Raida MK. 2015. Adverse and long-term protective effects following oil-adjuvanted vaccination against *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout. Fish Shellfish Immunol 42: 193-203.
- Wang J, Zhang QB, Zhang ZS, Song HF, Li PC. 2010. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. Int J Bio Macromolecules 46: 6-12.
- Wilhelm V, Miquel A, Burzio LO, Roseblatt M, Engel E, Valenzuela S. 2006. A vaccine against the salmonid pathogen *Piscirickettsia*

- salmonis* based on recombinant proteins. Vaccine 24: 5083-5091.
- Yang JW, Yoon SY, Oh SJ, Kim SK, Kang KW. 2006. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. Biochem Biophys Res Commun 346: 345-350.
- Yang M, Ma C, Sun J, Shao Q, Gao W, Zhang Y, Li Z, Xie Q, Dong Z, Qu Y. 2008. Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. Int Immunopharmacol 8: 1754-1760.
- Yang Q, Yang R, Li M, Zhou Q, Liang X, Elmada ZC. 2014. Effects of dietary fucoidan on the blood constituents, anti-oxidation and innate immunity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Fish Shellfish Immunol 41: 264-270.
- Yin Z, Kwang J. 2000. Carp interleukin-1 beta in the role of an immune-adjuvant. Fish Shellfish Immunol 10: 375-378.