

일본에서 소해면상뇌증(BSE)의 현재 상황

The risk assessment, outbreak and control of BSE in Japan

Yokoyama T.

Prion Disease Research Center, National Institute of Animal Health
3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856 Japan
tyoko@affrc.go.jp

Abstract

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) has become an important concern in food safety. Until now, 36 cases of BSE have been detected in Japan. Control programs have led to a decrease in the annual numbers, and Japan has now been categorized as a "controlled risk" country by the World Animal Health Organization (OIE). In spite of a worldwide decrease in the number of BSE cases, sporadic occurrences of atypical BSE cases have been reported. In Japan, 2 atypical BSE cases were confirmed. A Japanese L-type-BSE (BSE/JP24) has exhibited transmissibility to bovinized transgenic mice (TgBoPrP) it has a shorter incubation period than that of classical BSE. Although the origin of atypical BSE is obscure, risk analysis of newly emerged BSE prions of cattle and humans is required.

Key words : BSE, prion, epidemiology, control, atypical BSE

Introduction

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cows, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans, scrapie in sheep and goats, and chronic wasting disease (CWD) in cervid are fatal neurodegenerative disorders they are collectively known as transmissible spongiform encephalopathies (TSE) or prion diseases (Prusiner 1991). In BSE-affected cows neurological signs such as abnormal gait, aggression, and hypersensitivity developed after a long incubation period (mean: over 45 years). A spongiform change, without any inflammatory response, is the only observed pathological feature in the brain. There is no available cure or prevention strategy that guarantees protection against the prion diseases, with the exception of the BSE control strategy. The nature of TSE agents (prions) has not yet been fully elucidated. An abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}), which is generated by a posttranslational modification of a cellular isoform of prion protein (PrP^C), accumulates in the brain of an affected animal. Prions are thought to mainly consist of PrP^{Sc}, if not entirely.



Evidence showing that recombinant mouse PrP can be transformed so as to become infectious to mice, lends credence to the "protein-only" hypothesis (Legname et al., 2004). The diagnosis of BSE is based on the detection of PrP^{Sc} in the brain (medulla oblongata). PrP^{Sc} accumulation has been observed in the middle to late stage of infection it is difficult to detect it in the early stage of affected cattle. Furthermore, there currently is no available test for living animals. BSE was first recognized in the United Kingdom (UK) in 1986 (Wells et al., 1987). The cause of the epizootic has been demonstrated to be the consumption of proprietary concentration or feedsupplements contaminated with BSE prions (Wilesmith 1988, 1991). BSE spread from the UK to other European countries, Japan, and North America. To date, BSE cases have been confirmed in 25 countries this spread may be associated with the export of contaminated meat and bone meal (MBM). Prior to the occurrence of BSE, no link was observed between animal and human prion diseases. BSE is the only concrete example of prion transmission to humans from another species (Collinge et al., 1996; Bruce et al., 1997). The variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in humans is caused by the consumption of food products derived from BSE-affected cattle and has raised the concern for food safety issues (Chazot et al., 1996; Will et al., 1996; 1998; Cousens et al., 1997).

PrPC and PrP^{Sc}

PrP^{Sc}, the main component of prions, is generated by a posttranslational modification of PrPC, which is a cell membrane glycoprotein (Oesch et al., 1985). The conversion of PrPC to PrP^{Sc} is thought to be the central event in prion pathogenesis. Although PrPC is highly conserved and shows high homology among many species, its function is still obscure. PrPC contains 2 asparagine (Asn)-linked glyco-modification sites, and is present in 3 different glycosylated forms (di-, mono-, and non-glycosylated forms). Conformational differences have been observed between PrPC and PrP^{Sc} (Pan et al., 1993) this provides a link to the relative resistance of PrP^{Sc} against digestion by proteinase K (PK). This characteristic is used to distinguish between PrP^{Sc} and PrPC in BSE diagnosis. After PK digestion, the core fragments of PrP^{Sc} (PrP^{core}) remain (Bolton et al., 1982) they exhibit different glycoform patterns for different prion strains (Collinge et al., 1996; Somerville, 1999; Vorberg & Priola, 2002; Yokoyama et al., 2007a). The classification of atypical BSE cases is based on the glycoform pattern and the molecular weight of PrP^{core} (Biacabe et al., 2004; Casalone et al., 2004).

Current status of BSE worldwide

Although over 190,000 cows were confirmed to be BSE-positive (approximately 97% of the

cases were detected in the UK), annual numbers peaked in 1992 (37,316 cases), and since then, there has been a steady decline (2006: 329 cases 2007: 179 cases and 2008: 125 cases) (Fig. 1). The recent decrease in the numbers in EU has led to a decrease in consumers' attention to BSE. World Animal Health Organization (OIE) categorized countries into 3 groups (negligible risk, controlled risk, and unknown risk) on the basis of the results of risk analysis. Eleven countries have been categorized as "negligible risk", while 33 countries as "controlled risk" (May, 2009). A past BSE-free status does not guarantee the "negligible risk" status this status is granted only on the basis of the findings of surveillance and risk analysis (OIE, 2008a).

vCJD

Further, vCJD has been confirmed in over 200 patients (approximately 80% of the cases were in the UK) the infection may have been caused by the consumption of BSE-prion-contaminated beef. Along with the decline in the number of BSE cases, the number of the vCJD patients has also declined. Eradication of BSE might arrest the cattle-to-human transmission. However, "human-to-human" transmission of vCJD has been reported via transfusion (Llewelyn et al., 2004; Peden et al., 2004). Prions are resistant to heat and disinfectants (Rohwer, 1991), and it is difficult to inactivate them completely. In EU, in addition to transfusion, improper sterilization of medical instruments is also suspected to have increased the risk of vCJD transmission. Although, BSE issues in the cattle are gradually close to the end, BSE-related issues have still remained.

Classical BSE and atypical BSE

Most BSE cases showed identical pathology and were thought to be caused by a single prion strain (classical BSE: C-BSE) (Wilesmith et al., 1991). However, recently, different phenotypes of BSE have been reported in Japan (Yamakawa et al., 2003; Hagiwara et al., 2007), EU (Biacabe et al., 2004; Casalone et al., 2004; Buschmann et al., 2006; Jacobs et al., 2007 Polak et al., 2008) and North America (Richt & Hall, 2008), mostly among aged cows these forms are referred to as atypical BSE. Currently, atypical BSE is classified as H-type and L-type, depending on the molecular weight and glycoform pattern of PrP^{core}. Furthermore, 1 atypical case (H-type) harbored a PrP amino acid substitution, which corresponds with that in human familial CJD this raised the possibility that the disease could occasionally be genetic in origin (Richt & Hall, 2008). The origin of atypical BSE remains to be determined; however, it is known that both phenotypes (H- and L-types) could be



transmitted to cattle, experimentally (Lombardi et al., 2008; Buschmann et al., 2009). The virulence of atypical BSE against cattle, and prion distribution in orally-infected cow are still obscure. To evaluate their risk to humans, more scientific knowledge should be gathered.

Current status of BSE in Japan

In Japan, 36 cases of BSE-positive cattle (including 2 atypical cases) were confirmed (Fig. 2). The numbers had peaked in 2006, but have been on a decline since then. This led to the assumption that BSE control programs were functioning effectively and that BSE was under control. Currently, Japan is categorized as "controlled risk" country by OIE. BSE-positive cows are classified into 3 groups by their year of birth as follows: 1995-1996, 1999-2002, and others (Table 1). It was thought that the asymptomatic cows of the 1995-1996 cohorts for MBM production might be responsible for BSE-positive cases which were born during 1999-2002. This indicated that if 1 indigenous BSE-positive cow was detected in a country (Japan in 2001), then an affected cow of the same age and the subsequently affected-cow were already in existence.

BSE control programs in Japan

BSE control programs are aimed at prevention of the following: 1) cattle-to-cattle transmission and 2) cattle-to-human transmission of BSE prions. The important steps undertaken under the program are as follows: (i) elimination of risk of BSE from import, (ii) elimination of BSE exposure risk, (iii) eradication of BSE-affected cows, and surveillance. To be more precise, (1) ban on import of live cows and animal feed from BSE-positive countries, (2) ban on ruminant-derived feed, (3) prevention of cross-contamination from ruminant-derived feed to other products at the feed mill/factory, (4) detection of BSE-affected cows by tests and eliminating the carcass from BSE-positive cows, (5) removal and elimination of specified risk materials (SRM), (6) prevention of cross-contamination during meat processing, and (7) ban on import of beef from unevaluated BSE-risk countries are some of the steps that are undertaken as part of BSE control programs.

BSE test program

Presently, BSE tests are conducted for healthy slaughtered cows aged over 21 months (over 1.2 million cows per year), and all dead cows aged over 24 months (over 90,000 per year). As shown in Table 1, the number of BSE cases in Japan has decreased since 2007, and it

represents the effectiveness of the ban on feed, which was introduced in 2001, immediately after the identification of the first indigenous case of BSE. The effectiveness of BSE control programs can only be ascertained over a long period of time because of the long incubation period of the disease. Like other countries, Japan may be on the verge of eradicating BSE. However, the sustained implementation of control programs, even when no positive cases are detected, is required to confirm the eradication of BSE. Cost-efficient and effective programs should be introduced for continual surveillance.

BSE diagnosis

BSE-affected cattle exhibited the following clinical signs: hyper-sensitivity, aggression abnormal gait in the terminal stage of the disease (Schicker et al., 2006), along with spongiform changes and accumulation of PrP^{Sc} in the brain. Since there is currently a worldwide decrease in the incidences of BSE, it may be difficult to diagnose the disease on the basis of clinical signs alone. Laboratory tests are necessary for the detection of BSE, particularly in the pre-clinical stage. In BSE-affected cows, PrP^{Sc} accumulation is mainly limited to the central nervous system (CNS) therefore, tests are performed on the tissue of the obex (medulla oblongata). Many commercial kits are available for diagnosis of BSE (Moynagh & Shimmel, 1999). Most kits are based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to enable large-scale surveillance. The remnants of PrP^{Sc} or PrP^{Core} in PK-digested samples are captured for detection by anti-PrP monoclonal antibodies (mAbs) (Grassi et al., 2001; Deslys et al., 2001) or ligands (Lane et al., 2003) specific for the prion. Western blotting (WB) and immunohistochemical (IHC) analysis are used as confirmatory tests for BSE (OIE, 2008b). All available BSE tests are postmortem diagnostic procedures and are applicable only to brain tissue. Since PrP^{Sc} accumulates in the CNS and some peripheral nerve tissues only during the middle-to-latter stages of disease, none of the BSE tests can detect the affected cattle in the early stage of the disease. To address this problem, tissues that could harbor BSE prions are defined as SRM and separated from BSE test-negative cattle to avoid their consumption by humans.

SRM (specified risk materials)

SRM removal policy is an important part of control programs and is responsible for a substantial reduction in BSE risk. SRM have exhibited or have been assumed to account for significant amounts of BSE transmissibility in affected animals. The definition of SRM differs slightly in every country (Table 2). In Japan, head excluding tongue, cheek meat (brain, eye,



trigeminal ganglia, and tonsils), spinal cord, vertebra, and distal ileum of cows of all ages are classified as SRM. These tissues are destroyed regardless of the result of the BSE test and excluded from human consumption. The criteria for SRM should be reviewed on the basis of the most recent scientific knowledge, along with risk evaluation (Masujin et al., 2007).

The characterization of Japanese L-type BSE

In spite of the decrease in the number of C-BSE cases, sporadic occurrences of atypical BSE have been reported. In Japan, 2 atypical BSE cases were detected. The first case, (BSE/JP8), was a healthy slaughtered young heifer (23 months old) (Yamakawa et al, 2003). ELISA test showed the weak positive in this case. A different glycoform pattern of PrP^{core} was detected by western blotting, almost limited to the obex. However, PrP^{Sc} and spongiform changes were not detected in immunohistochemical and pathological tests. We could not confirm the transmissibility of PrP^{Sc} in transgenic mice with overexpression of bovine PrP gene (TgBoPrP) (Yokoyama et al., 2007b). In contrast, the second case of atypical BSE in Japan (BSE/JP24) was identified in a 14 year-old cow (Hagiwara et al., 2007) this case showed the transmissibility in TgBoPrP mice. The incubation period in TgBoPrP of BSE/JP24 prion was shorter than that of C-BSE. Different glycoform of PrP^{core} was conserved during passage. Wild-type mice were susceptible to C-BSE prion, but not to BSE/JP24 prion. The different PrP^{core} characteristic was conserved during mouse passages of BSE/JP24. We concluded that the BSE/JP24 prion is different from that of C-BSE (Masujin et al., 2008). The analysis of prion distribution in BSE/JP24-affected cattle is necessary to evaluate the risk of atypical BSE.

Conclusion

The effectiveness of the control program can be ascertained only over long durations because the incubation period of BSE is long and no tests are available to detect this disease in live animals. Continual surveillance and control programs based on risk analysis, even no positive cases are detected, for the eradication of BSE, and further maintain the guaranteed BSE risk status. Risk analysis for the occurrence of atypical BSE should be performed to evaluate the risk from newly emerging BSE prions. In order to prevent future outbreaks, BSE control programs should not be withdrawn without careful consideration.

Introduction

소에서 소해면상뇌증(BSE), 사람에서 Creutzfeldt-Jakob disease(CJD), 양과 산양에서 scrapie, 사슴에서 chronic wasting disease(CWD)는 치명적인 신경퇴행성 질환이다. 이들을 총괄적으로 전염성해면상뇌증(transmissible spongiform encephalopathy: TSE) 혹은 prion disease라고 알려져 있다 (Prusiner 1991). BSE에 걸린 소들은 4~5년 이상의 잠복기를 보낸 뒤 비정상 보행, 공격성, 과민반응과 같은 신경증상을 보인다. 특징적인 병리 소견은 어떤 염증 반응도 나타나지 않으면서 뇌가 해면상으로 변한다는 것이다. BSE 통제 strategy를 막고는 prion 질환을 막을 수 있는 효과적인 치료법이나 예방법도 없으며, 아직 TSE agent(prion)에 대해 충분히 설명할 수 없는 상태다. BSE에 걸린 동물은 prion 단백질의 cellular isoform(PrP^C)의 해독 후 변형(posttranslation modification)에 의해 만들어지는 prion 단백질의 비정상 isoform(PrP^{Sc})이 뇌에 축적된다. Prion은 주로 PrP^{Sc}로 구성되어져있다고 생각된다. 유전자재조합 마우스 PrP는 마우스에 전염성을 갖을 수 있게끔 변형될 수 있음을 보여주는 증거는 "protein-only" 가설에 힘을 실어준다 (Legname et al., 2004). 뇌(연수)에서 PrP^{Sc}을 검출되면 BSE에 걸렸다고 진단할 수 있다. PrP^{Sc}의 축적은 감염의 증기에서 말기에서 관찰되며, 초기에는 파악하기 어렵다. 게다가 현재 살아있는 동물에게 행할 수 있는 검사법은 존재하지 않다. BSE는 1986년 영국(UK)에서 처음 확인하였다 (Wells et al., 1987). 유행의 원인은 BSE prion에 오염된 사료 첨가물을 사료에 고농도로 섞여 먹인 것으로 밝혀졌다 (Wilesmith 1988, 1991). BSE는 영국에서 다른 유럽 국가들, 일본, 북미로 전파되었으며 현재까지 25개국에서 확인되었다. 이는 오염된 육골분 사료(meat and bone meal: MBM)의 수출과 관련이 있을 것이다. BSE가 나타나기 전에는 동물과 사람의 prion disease사이의 연계성이 발견되지 않았었다. BSE가 유일하면서도 명확하게 다른 종에서 사람으로 prion 전파가 일어나는 사례이다 (Collinge et al., 1996; Bruce et al., 1997). 사람의 variant Creutzfeldt-Jakob disease(vCJD)는 BSE에 걸린 소에서 유래한 식품을 먹어서 걸리게 되어 식품안전 상 주요 관심사로 떠올랐다 (Chazot et al., 1996; Will et al., 1996; 1998; Cousens et al., 1997).

PrP^C와 PrP^{Sc}

Prion의 주요 구성요소인 PrP^{Sc}은 세포막 당단백질인 PrP^C의 해독후 변형(posttranslation modification)에 의해 만들어 진다 (Oesch et al., 1985). PrP^C에서 PrP^{Sc}로의 변환이 prion 병인론의 핵심이라고 생각된다. PrP^C가 상당히 잘 보존되고 많은 종들 사이에서 높은 상동성(homology)을 보임에도 불구하고 그 기능은 아직 확실치 않다. PrP^C는 두 개의 asparagine(Asn)-linked glyco-modification site를 갖고 있고, 3개의 다른 glycosylated form(di-, mono-, non-glycosylated form)으로 존재한다. PrP^C와 PrP^{Sc} 사이에 conformational 차이가 발견되었는데(Pan et al., 1993), 이는 PrP^{Sc}이 proteinase K(PK)의 소화에 상대적 인 저항성을 갖음을 의미한다. 이 특징은 BSE를 진단할 때 PrP^C와 PrP^{Sc}을 구분할 때 유용하다. PK 소화 후 PrP^{Sc}의 핵심 조각(PrPcore)은 남게 되는데 (Bolton et al., 1982), 다른 prion 주(strain)는 다른 glycoform patten을 갖는다 (Collinge et al., 1996; Somerville, 1999; Vorberg & Priola, 2002; Yokoyama et



al., 2007a). 비전형 BSE 케이스의 분류는 glycoform pattern과 PrPcore의 분자량을 기준으로 한다 (Biacabe et al., 2004; Casalone et al., 2004)

현재 전 세계적인 BSE 상태

190,000마리 이상의 소가 BSE-양성(케이스의 약 97%가 영국에서 확인되었음)으로 확인되었지만, 1992년에 peak에 달하고(37,316 케이스) 그 이후로는 꾸준히 감소해오고 있다 (2006: 329 케이스; 2007: 179케이스; 2008: 125 케이스)(Fig. 1). 최근 EU의 숫자 감소는 소비자의 BSE에 대한 경각심을 줄어들게 했다. 세계동물보건기구(World Organization for Animal Health, OIE)는 위험성 분석 결과를 기초로 해서 국가들을 3개의 그룹(negligible risk, 통제led risk, unknown risk=위험거의 없음, 통제된 위험, 위험도 미정)으로 분류했다. 11개 국가가 “negligible risk”로 분류된 반면, 33개 국가는 “통제led risk”로 분류되었다(May, 2009). 과거 BSE-free 상태였다고 “negligible risk”라고 보증할 수 없으며, 이 상태는 오직 감시(surveillance)와 위험성 평가를 통해서만 보증할 수 있다(OIE, 2008a).

	1992	...	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Total
EU	36	...	1,010	1,032	772	529	327	199	96	11	5,752
UK	37,280	...	1,202	1,144	611	343	225	114	67	10	184,551
USA	0	...	0	0	0	0	1	1	0	0	2
Canada	0	...	0	0	2	1	1	5	3	1	14
Japan	0	...	3	2	4	5	7	10	3	1	35
Israel	0	...	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Total	37316	...	2,215	2,179	1,389	878	561	329	169	23	190,355

EU : 스위스의 BSE 케이스 포함.

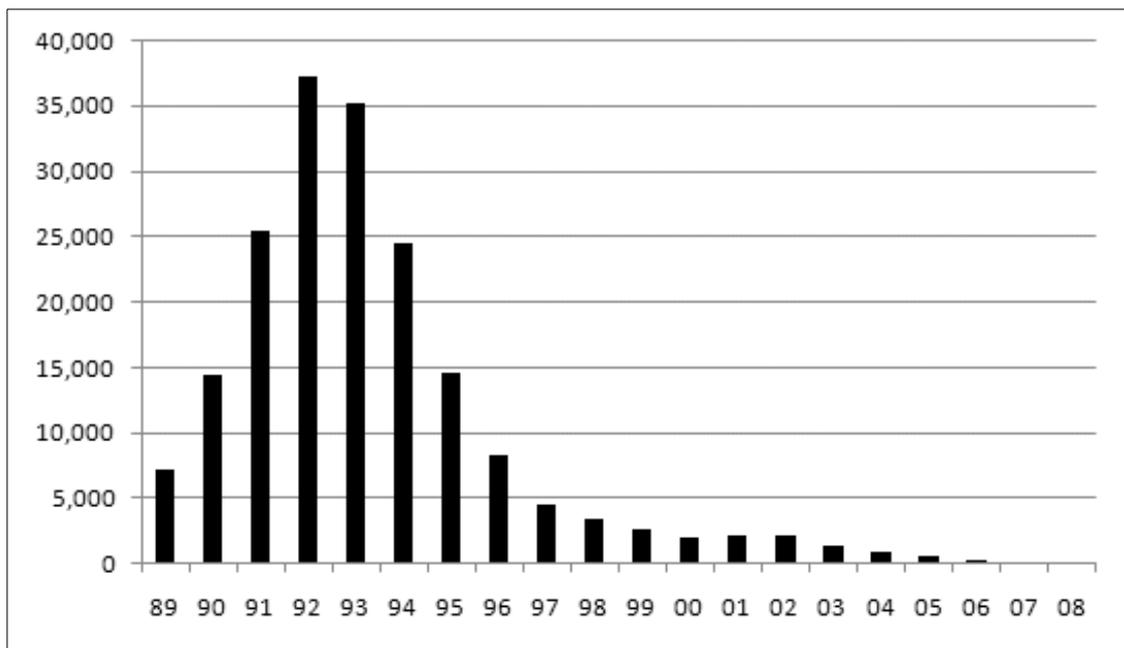


Fig 1. 전 세계 BSE case 분포

vCJD

또, vCJD는 200명 이상의 환자(케이스의 약 80%가 영국에서 확인되었음)에서 확인되었다. 감염은 아마 BSE-prion에 오염된 소고기를 소비하면서 일어났을 것이다. BSE 케이스가 줄어들어 따라 vCJD환자의 숫자도 감소하였다. BSE의 박멸이 **소-사람**의 전파를 막았을 것이다. 하지만, vCJD의 **사람-사람**의 전파는 수혈을 통해서도 일어난다고 보고되었다 (Llewelyn et al., 2004; Peden et al., 2004). Prion은 열과 소독제에 저항성을 보이고 (Rohwer, 1991), 완전히 불활화 시키기는 어렵다. EU에서는 수혈에 의한 전파뿐만 아니라, 수술도구의 부적절한 멸균 또한 vCJD 전파의 위험을 증가시키는 것으로 의심한다. 소에서의 BSE 이슈는 점차 줄어들고 있지만, BSE와 관련된 이슈는 여전히 남아있다.

전형(全形)적인 BSE와 비전형(非全形)적인 BSE

대부분의 BSE 케이스는 동일한 병리학적 병변을 보이고 단일 prion 주(strain)(classical BSE: C-BSE)에 의해 발생한다고 생각되어져왔다 (Wilesmith et al., 1991). 하지만 최근에 대부분 노령우에서 다른 표현형의 BSE가 일본 (Yamakawa et al., 2003; Hagiwara et al., 2007), EU (Biacabe et al., 2004; Casalone et al., 2004; Buschmann et al., 2006; Jacpbs et al., 2007; Polak et al., 2008), 북미 (Richt & Hall, 2008)에서 보고되었는데, 이들 form을 비전형 BSE라고 한다. 최근에, 비전형 분자량과 PrPcore의 glycoform patter에 의해 BSE가 H-type과 L-type으로 분류되었다. 게다가, 비전형 BSE 케이스중 하나는(H-type) PrP amino acid 치환이 일어나서 사람의 유전적인 CJD와 일치했다. 이것은 이 질병이 때때로 유전적인 기원을 가질 가능성이 있음을 의미 한다 (Richt & Hall, 2008). 비전형 BSE의 기원은 결정되어있지만 실험적으로 각 표현형(H-, L-type) 둘 다 소로 전파될 수 있는 걸로 알려져 있다 (Lombardi et al., 2008; Buschmann et al., 2009). 소에서 비전형 BSE의 병원성과 구강 감염된 소에서 prion의 분포는 여전히 명확하지 않다. 사람한테 끼치는 위험성을 평가하기 위해서는 더 과학적인 지식이 있어야한다.

일본에서 BSE의 현재 상황

일본에서, 36 케이스(비전형 케이스 2 포함)의 BSE-양성우가 확인되었다. 2006년에 peak에 달했지만 그 이후로 감소하고 있다. 이것은 BSE 통제 프로그램이 효과적으로 기능해오고 있고 BSE가 통제 하에 있다고 가정할 수 있다. 최근 일본은 OIE에 의해 "controlled risk" 국가로 분류되었다. BSE-양성우는 태어난 년도에 따라 3 그룹으로 아래와 같이 분류 된다: 1) 1995-1996, 2) 1999-2002, 3) 그 외 (Table 1). MBM을 만드는데 쓰인 1995-1996의 우군에서 증상을 보이지 않는 소들이 1999-2002 사이에 태어난 BSE-양성우의 원인이 되었을 것이라 생각된다. 이것은 만약 한 나라에서 한 마리 재래종 소가 BSE-양성으로 파악되면 (Japan in 2001), 같은 연령의 병에 걸린 소와 이어서 병에 걸린 소들이 이미 존재함을 나타낸다.



Table 1. 일본의 BSE 양성우 숫자

	C-BSE			atypical BSE	Total
	95-96	99-02	others		
2001	3				3
2002	2				2
2003	2	1		1	4
2004	3	2			5
2005	3	4			7
2006		9		1	10
2007		2	1		3
2008		1			1
2009		1			1
Total	13	20	1	2	36

일본에서의 BSE 통제 프로그램

BSE 통제 프로그램은 아래 사항들을 예방하는 것을 목표로 삼고 있다: 1) 소- 소로의 BSE prion 전파, 2) 소- 사람으로의 BSE prion 전파. 프로그램에 앞서 먼저 취해진 중요한 단계는 아래와 같다: (i) 수입으로 인한 BSE의 위험성의 제거, (ii) BSE에 노출될 위험성의 제거, (iii) BSE에 걸린 소들의 박멸과 감시(surveillance). 더 자세히 들어가 보면, (1) BSE 양성 국가에서 살아 있는 소와 사료의 수입의 금지, (2) 반추동물 유래의 사료 금지, (3) 반추동물 유래의 사료에서 사료공장의 다른 생산물들 사이의 교차오염 예방, (4) test를 통해 BSE에 걸린 소들을 찾아내고 BSE 양성 우의 도체 제거, (5) 특정위험물질(specific risk material: SRM)의 배제와 제거, (6) 육가공 공정(meat precess)에서 교차 오염 예방, (7) BSE risk 평가를 받지 않은 국가에서의 소고기 수입 금지 등이 BSE 통제 프로그램의 부분으로 행해진 단계다.

BSE test 프로그램

현재, BSE test는 21개월령 이상의 건강한 도축우(매년 1,200,000마리 이상)와 24개월령 이상의 죽은 소(매년 90,000마리 이상)를 대상으로 행해진다. Table 1에서 보여지 듯, 일본에서의 BSE 케이스는 2007년 이래 감소해고 있고, 이는 재래종 소에서 BSE가 처음 발견된 즉시 2001년에 도입한 사료를 금지한 것이 효과가 있었음을 나타낸다. BSE 통제 프로그램의 효과는 이 질병의 긴 잠복기 때문에 오랜 기간이 지난 후에야 만 확인할 수 있다. 다른 국가와 마찬가지로 일본은 BSE를 박멸하기 직전에 까지 와있다. 하지만 양성 케이스가 파악되지 않더라도 BSE의 박멸을 확인하기 위해서는 통제 프로그램의 지속적인 수행이 요구 된다. 지속적인 감시(surveillance)를 위해 비용-효율적이고 효과적인 프로그램이 도입되어야 한다.

BSE 진단

BSE에 걸린 소는 다음의 임상증상을 보인다: 질병의 말기에 과민반응, 공격성, 비정상 보행 (Schicker et al., 2006), 뇌의 해면상 변화와 함께 뇌에 PrP^{Sc}가 축적된다. 현재 전 세계적으로 BSE의 발생이 감소기 때문에 임상증상만을 기초로 질병을 진단내리는 것이 어려울지도 모른다. 특히 전-임상(pre-clinical) 단계에서 BSE를 확인하기 위해선 실험실 검사가 필요하다. BSE에 걸린 소는 PrP^{Sc}축적이 주로 중추신경계(central nervous system: CNS)에 국한되기 때문에 연수의 빗장(obex) 조직으로 검사한다. 이미 상용화되어있는 여러 kit로 BSE의 진단이 가능하다 (Moynagh & Shimmel, 1999). 대부분의 kit는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 기본으로 해서 대단위 감시(large-scale surveillance)가 가능하다. PK-digested sample에서 PrP^{Sc} 혹은 PrP^{core} 잔여물이 anti-PrP 단일클론항체(monoclonal antibodies: mAbs) (Grassi et al., 2001; Deslys et al., 2001) 혹은 prion 에 특이적인 ligand (Lane et al., 2003) 에 의해 탐지되어 확인할 수 있다. BSE를 확진하기 위해서는 Western blotting(WB)과 immunohistochemical(IHC) 분석을 이용한다 (OIE, 2009b). 모든 사용가능한 BSE 검사법은 사후 진단 과정이며 뇌 조직을 이용해야만 가능하다. PrP^{Sc}가 질병의 중기에서 후기 사이에 CNS와 몇몇 말초신경 조직에 축적되기 때문에 질병에 걸렸어도 초기 단계라면 어떤 BSE 검사법이라도 이를 확인할 수 없다. 이 문제점을 해결하기 위해 BSE 검사 음성우에서 BSE prion이 포함될 수 있는 조직들(SRM)을 분리해서 사람들이 이를 소비하지 못하도록 하고 있다.

SRM(specific risk material)

SRM 제거 정책은 통제 프로그램의 중요한 부분이며 BSE 위험을 근본적으로 줄이기 위해 필요하다. BSE에 걸린 동물의 SRM은 BSE 전염성을 갖고 있다고 알려져 있거나 그렇다고 가정된다. SRM의 정의는 모든 국가에서 약간씩 다르다(Table 2). 일본에서는 모든 연령대의 소에서 혀를 포함한 머리, 볼 살(뇌, 눈, 삼차신경절, 편도), 척수, 척추, 회장 원위를 SRM으로 구분하고 있다. 이 조직들은 BSE검사 여부와 상관없이 파괴되어 사람이 원칙적으로 소비할 수 없게 하고 있다. SRM에 대한 기준은 가장 최근의 과학적 지식과 위험성 평가를 토대로 정해져야 한다 (Masujin et al., 2007).

Table 2. 명시된 SRM 요약 (January 2009)

cattle	EU	USA	Canada	Japan
skull(including brain and eyes)	>12 months	>30 months	>30 months	all ages
tonsils	all ages	all ages	>30 months	all ages
spinal cord	>12 months	>30 months	>30 months	all ages
vertebral column	>30 months	>30 months	>30 months	all ages
intestines and mesentery	all ages			
distal ileum		all ages	all ages	all ages

skull : including trigeminal ganglia in US, Canada, and Japan.

vertebral column : including dorsal root ganglia

intestine : infectivity in the distal ileum (particularly associated with Peyer's patch) was confirmed in experimentally affected BSE cattle in the early stages of incubation. Immunohistochemical tests have shown the presence of PrP^{Sc} in the nervous plexuses of the intestine.



Japanese L-type-BSE의 특징

C-BSE의 케이스 수는 감소하고 있지만, 비전형 BSE의 산발적인 발생이 보고되고 있다. 일본에서는 enrodml 비전형 BSE 케이스가 확인되었다. 첫 번째 케이스(BSE/JP8)는 건강하고 어린 미경산(23 month old) 도축우였다 (Yamakawa et al., 2003). 이 경우 ELISA검사 시 약한 양성을 보였다. Western blotting 검사 시 대부분 obex에 국한되어서 다른 glycoform pattern의 PrPcore를 확인할 수 있었다. 하지만 IHC 분석과 병리학적 검사를 했을 때 뇌에서 PrP^{Sc}와 해면상 변화를 관찰할 수 있었다. bovine PrP gene(TgBoPrP)을 과발현 시킨 형질전환 마우스에서 PrP^{Sc}의 전염성을 확인할 수는 없었다 (Yokoyama et al., 2007b). 반대로 두 번째 비전형 BSE 케이스(BSE/JP24)는 14년령의 노령 우에서 확인되었는데 (Hagiwara et al., 2007), 이 경우는 TgBoPrP 마우스에서 PrP^{Sc}의 전염성을 확인할 수 있었다. TgBoPrP 마우스에서 BSE/JP24 prion의 잠복기는 C-BSE prion의 잠복기보다 짧았다. 다른 glycoform의 PrPcore가 계대과정 동안 관찰되었다.. Wild-type 마우스는 C-BSE prion에는 감수성을 보인 반면 BSE/JP24 prion에는 감수성을 보이지 않았다. 다른 PrPcore의 특징은 BSE/JP24의 마우스 계대 동안 유지된다는 점이다. 우리는 BSE/JP24 prion과 C-BSE prion이 서로 다르다고 결론내렸다 (Masujin et al., 2008). BSE/JP24에 걸린 소에서 prion 분포 분석이 비전형 BSE의 위험을 평가하는데 필요하다.

결론

BSE의 잠복기가 길고, 살아있는 동물에서 BSE를 진단하는 기술이 없기 때문에 BSE통제 프로그램은 오랜 시간이 지난 후에야 그 효과를 평가할 수 있다. BSE 박멸과 guaranteed BSE risk 상태를 위해 BSE 양성 케이스가 나타나지 않더라도 위험성 평가를 바탕으로 지속적인 감시(surveillance)와 통제프로그램을 유지해야한다. 또 새롭게 나타나고 있는 비전형 BSE의 발생을 위한 위험성 분석이 시행되어야한다. 앞으로 BSE의 발생을 예방하기 위해서 BSE 통제 프로그램은 충분히 고려 없이 철회되어서는 안 된다.

References

- Biacabe, A. G., Laplanche, J. L., Ryder, S., Baron, T. 2004. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.* 5: 110-115.
- Bolton, D. C., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218: 1309-1311.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCordle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., Bostock, C. J. 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501.
- Buschmann, A., Gretschel, A., Biacabe, A.G., Schiebel, K., Corona, C., Hoffmann, C., Eiden, M.,

- Baron, T., Casalone, C., and Groschup, M.H. 2006. Atypical BSE in Germany—proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet. Microbiol.* 117: 103–116.
- Buschmann, A., Ute, A., Leila, K. M., Markus, K., Ron, R., Bob, H., Groschup, M.H. 2009. Experimental challenge of cattle with H-type and L-type atypical BSE. *PrPCanada 2009*, March 1-2, 2009 Edmonton, Alberta, Canada.
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., and Caramelli, M. 2004. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 3065–3070.
- Chazot, G., Broussolle, E., Lapras, C., Blattler, T., Aguzzi, A., Kopp, N. 1996. New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet*, 347: 1181.
- Cousens, S. N., Vynnycky, E., Zeidler, M., Will, R. G., Smith, P. G. 1997. Predicting the CJD epidemic in humans. *Nature* 385: 197–198.
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., Hill, A.F. 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685–690.
- Deslys, J. P., Comoy, E., Hawkins, S., Simon, S., Schimmel, H., Wells, G., Grassi, J., Moynagh, J. 2001. Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature* 409: 476–478.
- Grassi, J., Comoy, E., Simon, S., Créminon, C., Frobert, Y., Trapmann, S., Schimmel, H., Hawkins, S. A., Moynagh, J., Deslys, J. P., Wells, G. A. 2001. Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet. Rec.* 149: 577–582.
- Hagiwara, K., Yamakawa, Y., Sato, Y., Nakamura, Y., Tobiume, M., Shinagawa, M., Sata, T. 2007. Accumulation of mono-glycosylated form-rich, plaque-forming PrP^{Sc} in the second atypical bovine spongiform encephalopathy case in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 305–308.
- Jacobs, J.G., Langeveld, J.P., Biacabe, A.G., Acutis, P.L., Polak, M.P., Gavier-Widen, D., Buschmann, A., Caramelli, M., Casalone, C., Mazza, M., Groschup, M., Erkens, J.H., Davidse, A., van Zijderveld, F.G., Baron, T. 2007. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1821–1829.
- Lane, A., Stanley, C. J., Dealler, S., Wilson, S. M. 2003. Polymeric ligands with specificity for aggregated prion proteins. *Clin. Chem.* 49: 1774–1775.
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. 2004. Synthetic mammalian prions *Science* 305: 673–676.
- Llewelyn, C.A., Hewitt, P.E., Knight, R.S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J., Will, R.G., 2004. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363: 417–421.
- Lombardi, G., Casalone, C., D' Angelo, A., Gelmetti, D., Torcoli, G., Barbieri, I., Corona, C., Fasoli, E., Farinazzo, A., Fiorini, M., Gelati, M., Iulini, B., Tagliavini, F., Ferrari, S., Caramelli,



- M., Monaco, S., Capucci, L., and Zanusso, G. 2008. Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes. *PLoS Pathog.* 4: e1000075.
- Masujin, K., Matthews, D., Wells, G. A. H. Mohri, S., Yokoyama, T. 2007. Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform encephalopathy-affected cattle. *J. Gen. Virol.* 88: 1850–1858.
- Masujin, K., Shu, Y., Yamakawa, Y., Hagiwara, K., Sata, T., Matsuura, Y., Iwamaru, Y., Imamura, M., Okada, H., Mohri, S., Yokoyama, T. 2008. Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion* 2: 123–128.
- Moynagh, J., Shimmel, H. 1999. Tests for BSE evaluated. *Nature* 400: 105.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S. B., Weissmann, C. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP27-30 protein. *Cell* 40: 735–746.
- OIE, 2008a. Chapter 11.6, Bovine spongiform encephalopathy, Terrestrial animal health code (7th edition), 484–501.
- OIE, 2008b. Chapter 2.4.6, Bovine spongiform encephalopathy, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (6th edition), 671–682.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., Prusiner, S. B. 1993. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 10962–10966.
- Peden, A. H., Head, M. W., Ritchie, D. L., Bell, J. E., Ironside, J. W. 2004. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 364: 527–529.
- Polak, M. P., Zmudzinski, J. F., Jacobs, J. G., Langeveld, J. P. 2008. Atypical status of bovine spongiform encephalopathy in Poland: a molecular typing study. *Arch. Virol.* 53: 69–79.
- Prusiner, S. B. 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515–1522.
- Richt, J. A., Hall, S. M. 2008. BSE case associated with prion protein gene mutation. *PLoS Pathog.* 4: e1000156.
- Rohwer, R. G. 1991. The scrapie agent: “a virus by any other name”. In *Curr Top Microbiol. Immunol.* 172: 195–232.
- Schicker, E., Braun, U., Hornlimann, B., Konold, T. 2006. Clinical findings in bovine spongiform encephalopathy. In *Prions in humans and animals* (edited by Hornlimann B, Diesner D, Kretzschmar H), De Gruyter, Berlin, 383–397.
- Somerville, R. A. 1999. Host and transmissible spongiform encephalopathy agent strain control glycosylation of PrP. *J. Gen. Virol.* 80: 1865–1872.
- Vorberg, I., Priola, S. A. 2002. Molecular basis of scrapie strain glycoform variation. *J. Biol. Chem.* 277: 36775–36781.

- Wells, G. A. H., Scott, A. C., Johnson, C. T. Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M., Bradley, R. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121: 419-420.
- Wilesmith, J. W., Ryan, J. B. M., Atkinson, M. J. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* 128: 199-203.
- Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., Ryan, J. B. 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123: 638-644.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Smith, P. G. 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347: 921-925.
- Will, R. G., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Mitrova, E., de Silva, R., D'Alessandro, M., Delasnerie-Laupretre, N., Zerr, I., van Duijn, C. 1998. Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries, 1993-1995. EU Collaborative Study Group for CJD. *Ann Neurol.* 43: 763-767.
- Yamakawa, Y., Hagiwara, K., Nohtomi, K., Nakamura, Y., Nishijima, M., Higuchi, Y., Sato, Y., Sata, T., Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. 2003. Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56: 221-222.
- Yokoyama, T., Shimada, K., Masujin, K., Iwamaru, Y., Imamura, M., Ushiki, Y. K., Kimura, K. M., Itohara, S., Shinagawa, M. 2007a, Both host prion protein 131-188 subregion and prion strain characteristics regulate glycoform of PrP^{Sc}. *Arch. Virol.* 152: 603-609.
- Yokoyama, T., Masujin, K., Yamakawa, Y., Sata, T., Murayama, Y., Shu, Y., Okada, H., Mohri, S., Shinagawa, M. 2007b. Experimental transmission of two young and one suspended bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases to bovinized transgenic mice. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 317-320.