

The role of veterinary epidemiology in food safety issues: Methods and applications

Mo Salman

Professor of Veterinary Epidemiology, Animal Population Health Institute
College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences
Colorado State University, Fort Collins, Colorado USA

m.d. Salman@colostate.edu

Veterinary Epidemiology is defined as the discipline to determine the distribution and factors associated with animal disease in populations in order to implement disease control and preventive strategies. Veterinary epidemiology focuses on populations: from populations of individuals to populations of herds or flocks, to populations of counties, states, countries, or continents. Epidemiology involves a very broad definition of disease including any departure from optimal health and/or productivity. Thus, populations can be animal products including food items with specific contamination related to human and animal health issues.

Recently, food safety has been in the news and several public announcements about crises have been in circulation globally. Most of the challenging questions and issues related to food safety are also related to risk and uncertainty for a specific risk associated with either contaminated pathogens or chemicals. Thus several agencies and research scientists are engaged in risk analysis particularly its risk assessment component. The most important element of veterinary epidemiology by its definition is identifying risk factors and assessing their contribution to an adverse health event under the epidemiological section of risk analysis. Thus, epidemiology as a discipline is at the core of addressing food safety issues and determining preventive strategies to avoid major crises.

During the last few decades, veterinary epidemiology has contributed to identifying and/or controlling several food safety issues that are major concerns to the public and society in general. This presentation will give examples of such contributions with emphasis on beef cattle and the safety of beef.

Also, elaborations will be included on design and analytical methods of veterinary epidemiology that have been used for food safety. The link of risk analysis

as a section of veterinary epidemiology and HCCAP will be demonstrated through definitions and applications. Challenges for veterinary epidemiology as a discipline in terms of a national food safety system will be outlined too with emphasis on beef.

The conclusion of this presentation is that veterinary epidemiology is an essential component of a country's comprehensive food safety system. Several approaches of this discipline have already been integrated in the food safety system. Training and education in this discipline can be important part of the approaches to national food safety in a country. Nevertheless the discipline requires further approaches and refinement of current techniques to satisfy the need for a reliable food safety system. A multi-disciplinary approach to food safety is still essential but this approach would require synthesis and foremost team members who have a broad prospective of adverse health problems in the origin of food as well as knowledge of health issues for users/consumers. Veterinary epidemiologists are the most suitable people to satisfy this requirement.

Evaluation of diagnostic assays for food-borne pathogen monitoring programs

Ian Gardner

Professor of Epidemiology

School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616

E-mail: iagardner@ucdavis.edu

Introduction

Use of diagnostic tests is integral to surveillance and monitoring programs for food-safety pathogens. Low cost, ease of performance and rapidity of obtaining results are important considerations for tests used in the post-harvest phase of food production because of the need to distribute and further process product soon after harvest. Performance characteristics (sensitivity, specificity, and reliability) of tests usually are of lesser concern than the 3 aforementioned factors but this information is vital if informed interpretation of test results is to be made or if test data from different sources are to be compared and used in a microbial risk assessment.

Evaluation of diagnostic tests for use in monitoring or surveillance programs for food-borne pathogens offers many challenges. In addition, there are no agreed-to standards for test evaluation studies for food-borne pathogens in animals, animal products or the environment. This has resulted in variable quality of published papers. This is in contrast to the situation with tests related to international trade of animals or animal products where the World Organisation for Animal Health (OIE) prescribes tests and provides guidance as to the design of test evaluation studies (http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm). In this presentation, I will briefly review gold standard approaches to test evaluation and then focus on principles and application of no-gold-standard approaches to the assessment of tests for microbial pathogens.

Evaluation of test accuracy with a gold-standard

Diagnostic sensitivity and specificity are related to, but different from, analytical sensitivity (synonym: detection limit) and specificity (synonym: cross-reaction profile) (Saah and Hoover, 1997). For microbial pathogens, the latter are often determined in spiking experiments in one or more food matrices. However, these experiments can only provide an indication of whether further evaluation of test performance with field samples is worth pursuing. There are numerous examples with PCR assays where a low detection limit has been determined in experiments but inhibitors in the matrix and problems with DNA extraction affect the frequency of positive results in field samples. The true indicator of test accuracy, and hence a test's utility, is how it performs in field samples with the typical range of concentrations of the analyte of interest.

Evaluation of diagnostic performance using field samples can be done using several approaches including use of repository samples for which "gold-standard" data are available, use of a new screening test and then verification of all (or a random sample of) test-positive and test-negative samples with the gold standard method, or use of a cross-sectional design in which the new test and the gold-standard test are done on all samples. For these scenarios, estimation of sensitivity and specificity and associated confidence intervals is straightforward and can be augmented with receiver-operating characteristic analysis for tests that are measured on a continuous or ordinal scale (Gardner and Greiner, 2006). Lack of bias in sensitivity and specificity estimates is considered to be more important than the precision of estimates, which is sample size dependent. Bias often results from flaws in the design of the test evaluation study and sources of bias include use of an inappropriate reference test (gold-standard), unblinded evaluation of test results, and use of an inappropriate spectrum of diseased individuals. In the context of microbial pathogens and food products, the latter equates to the spectrum of microbe concentrations in the sampled products. Epidemiologic considerations in the design of test validation studies are discussed in detail elsewhere (Greiner and Gardner, 2000).

Sensitivity and specificity estimates for tests that are used commonly to detect microbial pathogens in all foodstuffs, animals and the environment are not commonly available. Possible reasons include the availability of numerous tests and multiple purposes for which they can be used, no agreed-to validation standards and the non-trivial task of designing a high quality and scientifically valid study. One set of validation standards cannot be applied to all diagnostic tests and their possible applications. For example, consider the evaluation of a new PCR method for *Salmonella* spp. Factors affecting the sensitivity of PCR include the number of

organisms in the sample, the weight or on a weight or volume basis; weight or volume of material tested, sample matrix (e.g. feces, tissues, milk), presence and concentration of inhibitors, and laboratory techniques (e.g. pre-enrichment, enrichment, and plating methods) that might be used to concentrate or allow selective growth prior to use of PCR.

Even when sensitivity and specificity estimates exist, the estimates often are imprecise or uncertain (manifested as wide confidence intervals) because only a limited number of samples are evaluated. For some tests such as isolation of bacteria, viruses and parasites, an assumption of perfect specificity is justifiable in experienced laboratories with good quality assurance protocols. In all other situations, tests should be assumed to have imperfect sensitivity and specificity, until proven otherwise.

Evaluation of test accuracy without a gold-standard

Latent-class methods (often termed “no gold standard methods”) for test evaluation don’t require designation of a perfectly sensitive and specific reference test, i.e. a gold standard, for the analysis of test evaluation data, and therefore offer more flexibility than a gold standard approach. Methods can be categorized as either as frequentist, involving maximum-likelihood (ML) estimation, or Bayesian in which prior information about one of more tests is incorporated into the data analysis. The frequentist approach was developed in the 1980’s (Hui and Walter, 1980) but has only had recent acceptance in the health sciences in part because its “black-box” approach and the lack of readily-available software to implement the methods. This has now changed with internet-based modules (Pouillot et al., 2002). Bayesian methods are also becoming more popular in part because of the shareware program WinBUGS (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>) which allows researchers to deal with many different designs involving multiple tests and populations.

Although methods exist for multiple populations and multiple tests (Branscum et al., 2005), the simplest case that is solvable by both ML and Bayesian methods involves test results from 2 tests in 2 populations. Subject to the assumptions inherent in the ML model, there are sufficient degrees of freedom to estimate 6 parameters: 2 sensitivities, 2 specificities and 2 prevalences (see Enoe et al., 2000 for mathematical results). Assumptions that are made are constant sensitivity and specificity in both populations and conditional independence of the sensitivities and specificities of the 2

tests (Gardner et al., 2000). An assumption of conditional independence is likely to be reasonable when the tests measure different biologic phenomena, e.g. one test detects antibody and the other detects antigen. On the other hand, tests that both detect antigen are unlikely to be independent unless their limits of detection are substantially different.

In the Bayesian approach, all parameters are considered uncertain and prior scientific knowledge about test accuracy, if available, is linked with information contained in the likelihood based on the observed test results. Prior knowledge about test accuracy can be obtained from subject-matter experts or from previously published validation studies and is incorporated into the analysis usually in the form of beta distributions. Posterior inferences about sensitivity, specificity and prevalence are obtained by combining the actual likelihood with the assumed prior distributions. Gibbs sampling is used to obtain numerical approximations to exact posterior inferences. Medians (or means) and 95% probability intervals are used for posterior inferences about model parameters. In a Bayesian analysis, the influence of prior selection on model inferences should be assessed and all models should be checked to ensure convergence.

Examples of latent class methods from published papers (Hoorfar et al., 1999; Gardner 2004; Mainar-Jaime et al., 2007) will be presented to show the utility of the approach, emphasizing the strengths and limitations of the methods.

Conclusions

The concepts described in this paper also apply to test evaluation studies to detect toxicants and other residues in food. Although gold standard methods yield increased precision of estimates for the same sample size, choice of an inappropriate reference test can induce substantial bias in estimates. For the latter reason, removing the restrictive assumption of a perfect reference test in the latent class approach can provide new insight into test accuracy. Software to allow implementation is now readily available but well-designed studies are critical for the credibility of the approach. More information about these methods, especially Bayesian approaches, including examples and sample code for several common scenarios is available at www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/

References

Branscum, A.J., I.A. Gardner, and W.O. Johnson. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Prev. Vet. Med.* 2005;68:145-163.

Enøe, C., M.P. Georgiadis, and W.O. Johnson. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev. Vet. Med.* 2000;45:61-81.

Gardner, I. A. An epidemiologic critique of current microbial risk assessment practices: the importance of prevalence and test accuracy data. *J. Food Prot.* 2004; 67: 2000-2007.

Gardner, I.A., H. Stryhn, P. Lind, and M.T. Collins. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev. Vet. Med.* 2000; 45:107-122.

Gardner, I.A., and M. Greiner. Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Vet. Clin. Pathol.* 2006; 35:8-17.

Greiner, M., and I. A. Gardner. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 2000; 45:3-22.

Hoorfar, J., E.M. Nielsen, H. Stryhn, and S. Andersen. Evaluation of two automated enzyme-immunoassays for detection of thermophilic campylobacters in faecal samples from cattle and swine. *J. Microbiol. Methods* 1999;38:101-106.

Hui, S.L., and S.D. Walter. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 1980; 36:167-171.

Mainar-Jaime, R., N.Atashpavar, and M. Chirino-Trejo. Estimation of the diagnostic accuracy of the *invA*-gene based PCR techniques and a bacteriological culture for the detection of *Salmonella* spp. in caecal content from slaughtered pigs using Bayesian analysis. *Zoonoses Publ. Health* 2007 (in press).

Pouillot, R., G.Gerbier, and I.A. Gardner. "TAGS", a program for the evaluation of test accuracy in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 2002; 53:67-81.

Saah, A.J., and D.R. Hoover. Sensitivity and specificity reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. *Ann. Intern. Med.* 1997;126:91-94.

Epidemiology of BSE in Japan

Yasuhiro YOSHIKAWA

Professor, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo

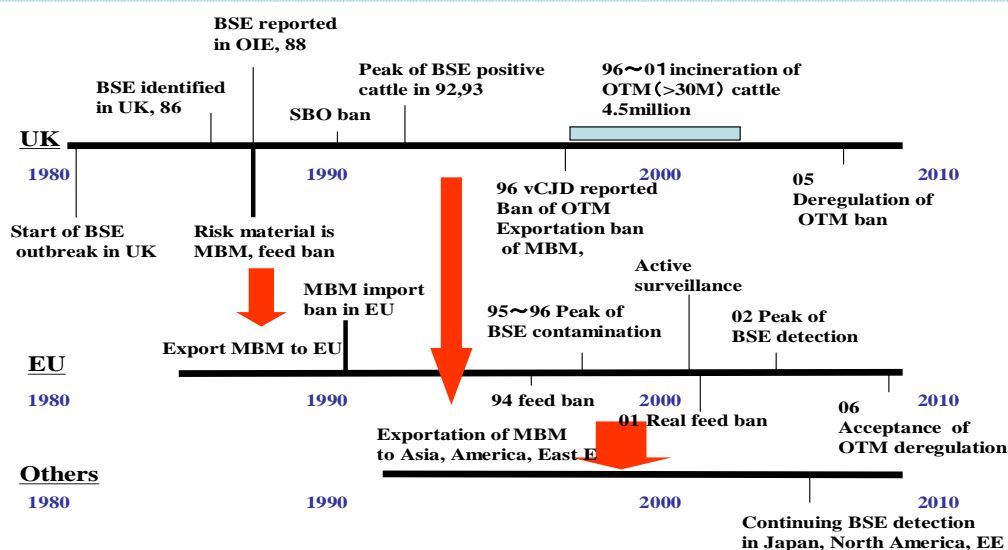
1. Background of the BSE outbreak in the World

BSE outbreaks are separated into three categories as in the UK, EU and other countries. BSE might be occurred in early 1980s in the UK, and first identified on 1986 and then confirmed in the OIE (Office de International Epizootics; World Animal Health Organization) meeting on 1988. Meat and bone meal (MBM) was considered as a causative material by epidemiological studies in the UK and banned to be used for animal feed as early as 1988. Specified risk material (SRM: SBO; specific bovine offal) removed from the food chain in the end of 1989. During this time, live cattle and the extra MBM were exported from the UK to the EU. The feed ban was relatively effective, and BSE positive cases were peaked in 1992 and 1993, and gradually decreased later. However, in 1996, vCJD cases were reported and it induced a world threatening panic. The UK decided to start a measure of incineration of over thirty month cattle (OTM), and both exportation ban and real feed ban of MBM. From 1996 to 2000, 4.5 million cattle were burned and the UK succeeded to contain the BSE. In 2005, OTM regulation was relaxed to BSE screening test in the slaughterhouse.

The EU stopped importation of MBM from the UK on 1990, and as a result extra MBM of the UK was exported to Asia, America, and East European countries. The EU started feed ban on 1994 and extra MBM was exported to other countries too. BSE contamination in the EU might be peaked during 1995 and 1996. At 2000, the EU started the active surveillance and introduced real feed ban on 2001. On 2002, BSE positive cases detected by the active surveillance became a peak, and rapidly decreased later. In 2006, the EU accepted the deregulation of OTM of the UK, and started a re-importation of UK beef.

The third group, such as Japan, North America and East European countries etc., which imported live cattle, MBM or greaves from the UK and EU, were involved in BSE outbreak later than 2000 and detection of BSE cattle are continuing now. The total number of BSE positive countries in the world is now 25.

Back ground of BSE outbreak in the world



2. Present status of BSE and vCJD in the World

BSE positive cases reported in the World at 2007 January were as follows. The UK had more than 180,000 cases and the number is extremely high, and three EU countries, Ireland, Portugal, and France, detected 1,000 to 1,500 BSE cattle. Spain, Germany and Switzerland reported about 500 cases, and Italy, Belgium and Holland had about 100 cases. Japan reported 31 BSE cases, but now in October 2007, the number is 33. The total number of countries with BSE positive cases in the world is now 25.

Case reports of vCJD were a bit different from those of BSE. The UK had 164 patients at 2007 January, and they were relatively young (20 to 30 years old). In France, the number of BSE was not so high (about 1,000) when compared with the UK (180,000) and Ireland (1,600) or Portugal (1,000), but number of the vCJD patient was high, 21 cases, when compared with Ireland (4) and Portugal (1). Moreover, the age of patients is older (30 to 40 years old) than that of the vCJD in the UK. There are several possibilities on a high frequency of vCJD in France. That is a large quantity of contaminated meat product importation such as machinery recovery meat (MRM) from the UK, or dietary culture of the calf brain consumption. The total number of countries with vCJD patients in the world is now 11.

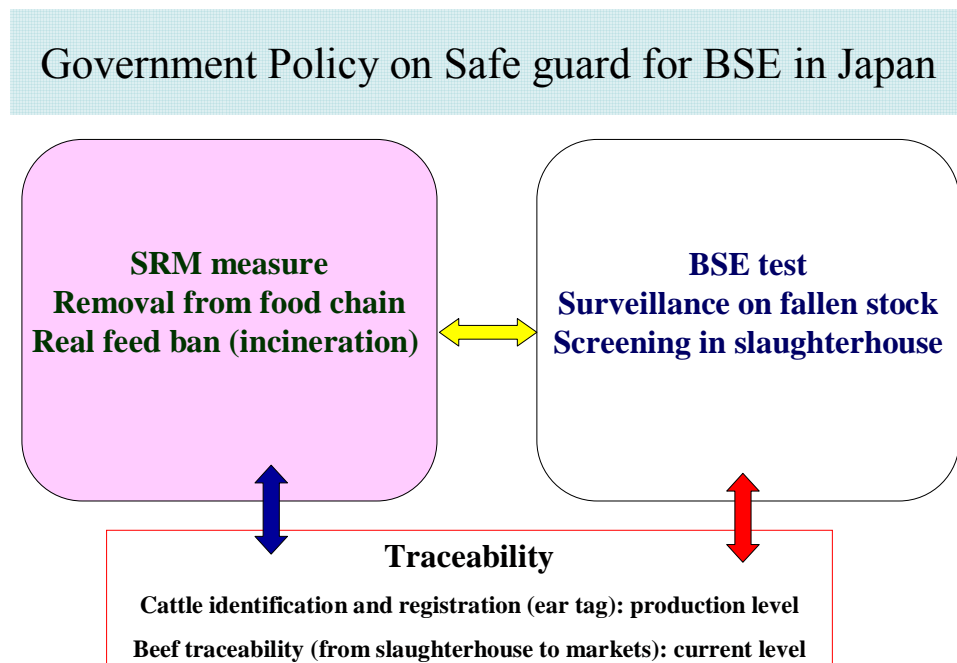
3. BSE safeguard policy in Japan

After the first case of BSE cattle was detected, consumers were led into a very big panic. The reason is that they lost trusts to the government and others as follows. There was distrust to the government because MAFF (Ministry of Agriculture Forest and Fishery) made a misunderstanding of the risk of BSE invasion, a lacking crisis measures, and no risk communication. Consumer gave a strong claim to the cattle breeder, because they used MBM as cannibalism for cattle, and gave a priority to the economy rather than safety. At the same time, meat importer and processor conducted false applications for the compensation buying of domestic beef by the MAFF, and false tags of meat by the distributor and beef market were also disclosed. Every day TV and newspapers mediated noisy but less signal information (low SN ratio). And finally, consumers distrusted the scientist who denied ZERO-risk and showed a scientific uncertainty, because majority of people believed that science is almighty, can explain everything and ensure safety. Thus, the consumers had an anxiety when they faced a scientific uncertainty.

Japanese government's policy of safe guard for BSE was consisted of three elements. The first is the SRM measures. The SRM of all aged cattle including the brain, trigeminus ganglia, spinal cord, vertebral column containing dorsal root ganglia, distal ileum, and tonsil/lingual tonsil are removed from food chain and incinerated. Besides SRM, other parts which are not used for human-consumption are rendered into MBM and incinerated. Thus, complete feed ban was performed. The second is BSE test which purposed surveillance of BSE on all fallen stock >24 month old and screening of BSE cattle in the slaughterhouse >21 month old. The third is traceability system. All cattle are identified by ear tag number with 10 digits and registered in the national control center in production level. All cattle meat from carcasses was stocked for the DNA diagnosis and 10 digits were displayed in the market or meat house. This is the beef traceability from the slaughterhouse to the markets in current level. The 10 digit can be traced by a personal phone or internet.

Another government policy introduced after BSE outbreak in Japan is separation of risk assessment and management: that is an introduction of risk analysis system on food safety. Risk analysis consists of three element, i.e., risk assessment, risk management and risk communication. In Japan, risk assessment is done neutrally and scientifically in Food Safety Commission (FSC) of the Cabinet Office. The purpose is scientific assessment of hazards for human health. On the other hand, risk management is done politically by MAFF or MHLW (Ministry of Health Labor and Welfare). The purpose is making a standard or regulation based on the risk assessment with considering risk

benefit or cost benefit. Risk communication is an exchange of information or opinion about the risk by all stake holders and it is performed by public comments and risk communication meetings.



4. BSE measures in Japan

Although there occurred a nationwide panic among consumers after the first BSE case, the activities of three organizations (MAFF, MHLW, FSC) has been successful in obtaining confidence or trust of consumers relatively short time. In 1996 MAFF started BSE surveillance test of the risk animals, and the TSE including BSE was involved in the notification disease in 1997. After the first case of BSE, complete feed ban for the use of MBM, removal of SRM and BSE test in the slaughterhouse had been obligated (2001 October). In addition, BSE-related risk is assessed by the Prion Expert Committee, Food Safety Commission, in the Cabinet Office since July 2003. Then, introduction of traceability system, and several BSE related risk assessments were conducted.

Risk assessment and management for BSE in Japan

	MAFF	MHWL	FSC
1996.April	Start BSE test on risk cattle (dead, or with neurological symptoms) Administrative guidance for feed ban of cattle MBM		
1997.April	Revision of prevention law for contagious diseases of domestic animals (TSE is notifiable disease)		
2001.Oct	Complete ban for importation of MBM Complete feed ban for use of MBM	Removal of SRM (CNS, distal ileum, eye) for food safety BSE test on all ages of cattle in slaughter houses	
2003. July 2003.Dec.	Bovine traceability system in production level		Start of the Food Safety Commission (Prion Expert Committee)
2004. Feb. 2004. April 2004. Sep. 2004. Dec.	BSE test for all dead cattle over 24 months became mandatory Bovine traceability system in distribution level	Vertebral column included in SRM	Risk assessment of vCJD in Japan
2005. Mar. 2005. May 2005. Aug. 2005. Dec.	All feed factories have exclusive production lines for cattle and others Enforcement of notification of imported compound feed	Mandatory BSE screening test is changed (over 21 months old cattle)	Food safety risk assessment related to BSE measures in Japan Risk assessment of imported beef from USA and Canada

Basic strategy of the risk management for BSE in Japan is importation ban of MBM, live cattle and beef from the countries where BSE has been detected. Cattle are grown with the feed produced in the completely isolated facility from those producing pig or poultry feed in order to avoid cross contamination. In the farm all cattle are identified by the traceability system and fallen stock in the farm over than 24 month old is BSE tested. In the slaughter house BSE test is conducted to over than 21 month old cattle (by the law) and the positive cattle is incinerated. The SRM is removed from all cattle regardless of the result of BSE test and incinerated. Both the slaughterhouse and meat processing facilities are completely separated between cattle and pig meat to avoid cross contamination. Non human-consumption materials from cattle are rendered and finally incinerated.

Containment of the BSE risk is based on stopping cattle to cattle, cattle to human and human to human infections. These are MBM feed ban, control of feed production and compost regulation. BSE test and SRM removal in the slaughterhouse, and regulation for drug production using BSE free cattle materials are safeguards for cattle to human infection. Ban of blood transfusion and organ transplantation from the high risk person who stayed in the UK until 1966 or EU, is precautionary to prevent human to human infection. Japan is one of the most strictly regulated countries in the measures of BSE, but we have already conducted deregulations of some measures. They are use of

swine MBM for swine feed after complete separation of feed factory (2005) and use for fish feed (2007), after risk assessment of FSC. Liquid compost treated with high pH from cattle MBM (2004), and ash of cattle MBM or bone can be used for the compost (2005). And revision of BSE test in slaughterhouse with more than 21 month old was settled in law (2005) by the assessment of FSC.

5. Principle and strategy of the epidemiology of BSE in Japan

The main work of this study is to identify, as hypotheses, all feasible sources and routes of infection for the BSE cases discovered in Japan, and to study the probability of each hypothesis. Unlike ordinary microbial infections, BSE has an extremely long incubation period for several years (mean incubation period is $Ca\ 5 \pm 1.5$ years) and it is technically impossible to detect genome of pathogen or antibody, and the number of confirmed cases is extremely small. Nevertheless these difficulties, it is hoped that these research results will be of use in preventing future outbreaks, which is the primary object of epidemiology.

The principle and strategy of the epidemiological studies of BSE in Japan are as follows. 1) BSE risk status in Japan is divided into 3 sages, i.e., before 1996 April when administrative guidance for feed ban of cattle MBM introduced. After that to 2001 September, the first case of BSE in Japan, then, after 2001 October with real feed ban in the law. 2) Make hypotheses depending on the invasive risk and propagation risk of BSE in Japan, and they are checked by evidences, case control study or statistics. 3) Time sequential and spatial grouping of BSE cattle was conducted that is Group A (1995, 1996, born in Hokkaido, Kanto), Group B (1999 born in Kyushu), Group C (1999-2001 born in Hokkaido), Group D (Juvenile cattle born after real feed ban) and Pre A , Post D groups.

6. Characteristics of BSE outbreak in Japan

The feature of the BSE outbreak in Japan is a bit different from those of European countries as follows. 1), Epidemic size is relatively smaller than those in European countries. Thus, precise data on each BSE positive case were listed up, and all population of cattle including healthy slaughterhouse ones (from 2001 October) and farm fallen stocks (from April 2004) are BSE tested. 2), Un-even distribution of BSE cases was observed. Until now, Hokkaido is a core of epidemic, and two different time

outbreaks were occurred. 3), Dairy cow are mainly involved. And 4), Sporadic, discontinuous outbreaks were occurred temporally-spatially. That is, in 33 BSE test positive cattle in Japan, the birthplaces of 26 cases are Hokkaido and other 7 cases are born in other prefectures. If atypical case was eliminated, 26 in 31 cases (84%) were born in Hokkaido.

Another characteristic of BSE outbreak is difference of the temporal patterns of the Group A and C. Mean and standard deviation of the A group birth interval are 3.6 ± 1.8 M. It is concentrated in an extremely narrow period. However, those of the C group are 10.5 ± 6.6 M until now. By the statistical analysis, the groups A & C are parametric, but uneven distribution, in the 95% interval, P (both sides examination) = 0.0013. It suggested that cause of the A group was different from that of C group significantly, and possible contamination of A group might be single or a few number of lots of the causative agents.

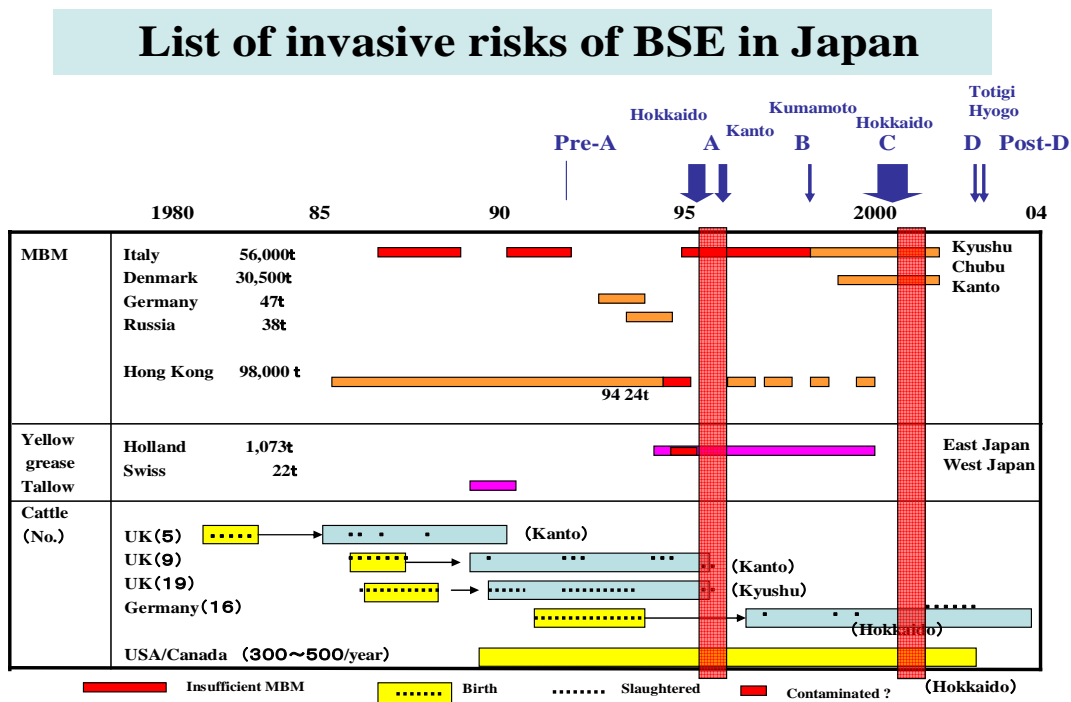
7. Invasive BSE risk in Japan

The risk of the BSE agent being introduced to Japan through imports of live cattle can be divided into four scenarios. These are the 5 cattle born in southern England and imported into the Kanto region in 1982, the 9 cattle born in southern England and imported into the Kanto in 1987, the 19 cattle born in southern England and imported to Kyushu in 1988, and the 16 cattle born in Germany and imported to Hokkaido in 1993. All history of each animal is known. On studying the respective import lots, the origin of live cattle imports from the UK (all dairy cattle) gradually shifted from central to southern England, where BSE contamination was more intense. This study also clarifies issues such as where the cattle were reared in Japan after import, slaughterhouse processing after exhaustion of the reproductive cycle, MBM manufacturing processes, and where the cattle were re-used as MBM. In Japan, over 160 slaughterhouse and rendering factories, as well as feed factories are regional. Almost all animal feed were produced and consumed local regions, for example Hokkaido products are 100% consumed in Hokkaido.

The risk imported MBM is divided into three scenarios, i.e. imports from Italy, Hong Kong and Denmark. The scenarios for MBM imports from Germany or Russia were not considered, since the risk from these is thought to be extremely low. This is because the respective import volumes were small and there was hardly any manifestation of BSE among cattle produced in those countries at the time of import. In the case of Italy, 55,930 tons of Italian MBM had been imported between 1987 and

2001. Moreover, MBM imports from Italy involve a number of factors, including the state of BSE incidence in Italy, variations in the volume of MBM imported, and changes in the MBM manufacturing processes. Namely, the 656 tons imported between 1987 and 1993 (no imports in 1991 and 1992) to Yokohama, Nagoya and Moji were categorized as M1, the 5,408 tons imported between 1995 and 1998 to Yokohama, Nagoya, Kobe and Kagoshima (of which the 4,802 tons imported after June 1998 were heat-treated at 133°C, 3 bar, 20 minutes) as M2, and the 49,846 tons imported between 1999 and 2001 to West Japan (Kyushu, Kansai, Chubu) as M3. In the case of Denmark, 30,500 tons of Danish MBM had been imported in 1999-2000.

The risk of importation of animal fat and tallow is divided into two scenarios. These are the 1,245 tons of Holland animal fat (powdered fat) imported into Kanto and Kyushu between 1994 and 2000, and the 22 tons of Switzerland animal fat (tallow) imported in 1989.



8. Outbreak of the A-group in Hokkaido and Kanto

Population study on the Hokkaido dairy cows suggested followings. 1, Statistically the Before-group-A (dairy cows in Hokkaido which were born before 1995 August, and no positive case in BSE test; zero/40,000) and Group-A (they were born from 1995 Sept. to 1996 August, and by the test BSE positive cases were detected; 10/55,000) are

different on BSE prevalence. It suggested that contamination occurred suddenly at the latter half of 1995.

2, Statistically Group-A and Post-group-A (they were born from 1996 Sept. to 1999 July, and by the test, zero/250,000) are different on BSE prevalence. It suggested that on 1997, 98 there were no BSE invasion and propagation in Hokkaido.

3, Statistically Post-group-A and Group-C (they were born from 1999 August to 2001 October, and by the test, BSE positive cases were detected; 15/170,000) are different on BSE prevalence. It suggested that Group-C outbreak might be induced by BSE propagation in Hokkaido (from Group-A). It is because spatial overlapping of the positive cases in Groups-A and -C was observed, and the interval between Group-A and -C might be consistent with the BSE incubation period. Other than Hokkaido (in Kanto and Kyushu), indigenous propagation of BSE was not detected.

Strangely, the invasive BSE risk into Hokkaido was very poor. That is, UK live cattle were rendered and consumed as animal feed outside of Hokkaido (Kanto, and Kyushu) and there were no reports of Italian MBM importation into Hokkaido (they were imported into Kanto, Chubu, and Kyushu), Germany live cattle were rendered in Hokkaido, but later than 1996 (after A group outbreak) and MBM used in the Hokkaido feed factory from 1995 April, was derived from Hokkaido cattle at that time. On the contrary, all BSE cattle of A-group drunk the milkreplacer made of Holland yellow grease (Hokkaido 10 cases, Kanto 3 cases).

BSE outbreak of dairy cow in Hokkaido

Birth before 1995 Aug. 1995 Sep.-96 Aug. 96 Sept.- 99 July. 99 Aug.-01 Oct

Before group A BSE case zero/40,000	Group A BSE cases 10/55,000 (13-16/130,000)	Post group A BSE case Zero/250,000	Group C BSE cases 15/170,000
---	--	--	------------------------------------

- 1, Statistically Before-group-A and Group-A are different on BSE prevalence. It suggested that contamination occurred suddenly at the latter half of 1995.
- 2, Statistically Group-A and Post-group-A are different on BSE prevalence. It suggested that on 1997, 98 there were no BSE invasion in Hokkaido.
- 3, Statistically Post-group-A and Group-C are different on BSE prevalence. It suggested that Group-C outbreak might be induced by BSE propagation in Hokkaido (from Group-A)
- 4, Spatial overlapping of the positive cases in Groups-A and -C was observed, and the interval between Group-A and -C might be consistent with the BSE incubation period.
- 5, Other than Hokkaido, indigenous propagation of BSE was not detected.

/ what is the cause of Group-A (1996) contamination?

Imported fat for milk replacer, feed with MBM, MBM supplement

9. Possible cause and contradiction

The possibility that animal fat imported from Holland at 1995 to 1996 being a causative agent, is examined by a case control study. The Group-A Hokkaido, Kanto and control farms (population control) randomly sampled 200 farms from 20,000 dairy farms in East Japan where the milk replacer made from Holland animal fat was used. The randomness was confirmed by statistics. The study resulted in 1% significance on $P < 0.0001$, odds ratio=39.3, and 95 % intervals (4.9-312.9), suggesting that the hypothesis is statistically significant. The same results was obtained by the comparison of expectation value and actual value using milk replacer of T factory (Pure milk/ Milfood A super) and BSE positive case in Hokkaido A group are independent or not (Share in Hokkaido=30 %), $p=0.00001$, statistically significant.

In deed, importation records from Holland (Shipping day) of the 1st lot was 1995 July 15, 2nd lot 1995 Sept.29, 3rd lot 1995 Dec. 9, and 4th lot 1996 Jan. 29. In T factory, the milk replacer was produced from 1996 Jan. and Feb (Pure milk, Milfood A super) from the 2nd lot arrived at 1996 Dec, and transported to the East of Japan. The Hokkaido A-group dairy cow were born from 96 Feb. to 96 Aug. and in Kanto from 1995 Dec. to 96 Mar. The maximum term of validity on the milk replacer may be about 6 months after production. Thus, if 2nd lot was contaminated, all dairy cows might drink the milk replacer of this lot.

Feed history of Group A cases (Hokkaido, Kanto)

case	1-2M (milk replacer)	3-6M (calf starter)	7-12M	>1y
1	Milfood Asup	Milfood B flake	Young cow lead	Young cow lead
2	Milfood Asup, Pure milk H	Milfood B green	New sun lucky18	New sun lucky18
4	Milfood Asup	Milfood Asup	Milfood Asup New step 16	New step 16
6	Milfood Asup	Milfood B	Support 70	Support 70
7	Milk	Milfood Asup Infant green	Infant green	Young cow lead
11	Milfood Asup, Milfood B flake	Support 70	Support 70	Support 70
13	Pure milk H, Milfood B green Infant green	Infant green	Infant green New lead 18	New lead 18
15	Milfood Asup, New step 18, Calf top L	New step 18 Calf top L	New step 18	New step 18
16	Milfood Asup, Milfood B flake	Young cow lead	Young cow lead Tokuhai 18ME	Tokuhai 18ME
19	Milfood Asup	Milfood Asup	Calf meal ,Yodel 18	Yodel 18
3	Pure milk, Moret, premium	Pure milk, premium starte		
5	Milk, Pure milk	Pure milk	Maybypass40	Maybypass 40
10	Pure milk	Pure milk		

Thus, the circumstantial evidences suggested that milk replacer containing Holland animal fat might be the cause of A-group outbreak in Hokkaido and Kanto on 1995 and 96. However, the contaminated milk replacer lot had to be made of 54~81 full brawn BSE cattle theoretically in order to induce A-group outbreak (Ca. 20 ~30 cases), provided the worst scenario was accepted (impurity of the animal fat was 0.5 %, including the central nervous system and other SRM) .By the Holland epidemiology, however, such kind of high dose of BSE contamination could not be occurred. Probably there are missed risk factors in this estimation, such as un-homogeneous protein impurity and content of SRM of animal fat and high intestinal absorption of neonatal cattle (< 1 month old) than calf which are used for the experimental infection (3~6 months old).

The value of risk-based surveillance for food safety issues

Katharina D.C. Stärk

Professor, Department of Veterinary Clinical Sciences, Royal Veterinary College,
North Mymms, England.

E-mail: kstaerk@rvc.ac.uk

Surveillance is defined as a continuous effort to collect data related to a relevant health issue in order to derive information that can be used as a basis for decision making. In the context of safety of animal-derived food, the general aim of surveillance is to protect the health of consumers and to pursue specific objectives, including the documentation of absence of pathogens or substances (e.g. dioxins), to document the acceptable level of hygiene (e.g. *E. coli*) or to monitor trends in pathogen reduction as part of control efforts (e.g. Salmonella). Surveillance efforts include a set of activities: data collection, data analysis, interpretation of results and review or intervention (Fig. 1).

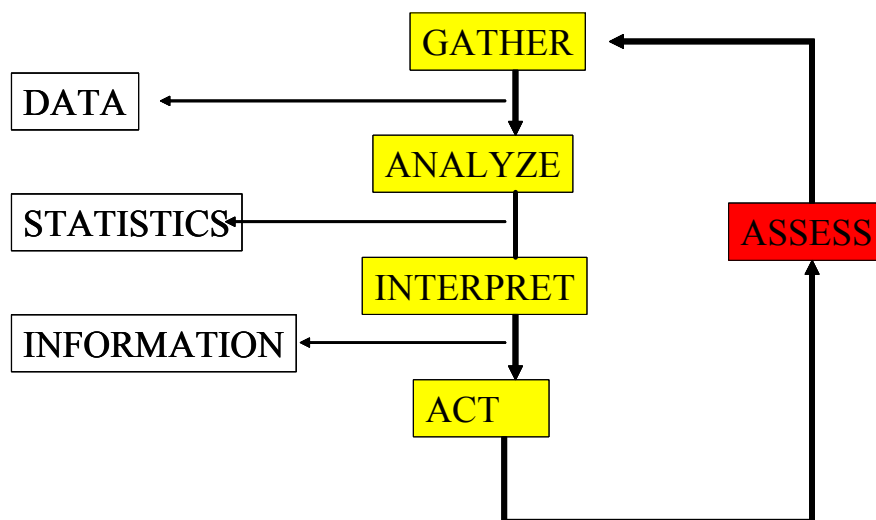


Figure 1: Activities and outputs of surveillance programmes

Due to ongoing food safety scares, the demand for data on food safety and therefore the need for food safety surveillance are increasing, particularly for countries participating in international trade with animal-derived food. Most notable examples of food safety issues in the context of international trade are BSE, antimicrobial residues

and food contaminants as well as genetically modified food. According to the Sanitary and Phytosanitary Agreement (www.wto.org) and according to *Codex Alimentarius* standards (www.codexalimentarius.net), exporting countries need to provide surveillance data on food safety hazards to importing countries to allow for risk-based import decisions. However, the resources available for the implementation and continuing operation of surveillance programmes are limited and priorities need to be set in order to make best use of human and financial capacity.

Risk assessment is a structured, transparent and science-driven approach which can be used to rank risks and therefore to set priorities. International guidelines on the principles of risk assessment have been developed by *Codex Alimentarius* and the International Office for Animal Health (OIE). Risk assessment methods have been proposed to design so-called “risk-based” surveillance systems that set priorities on certain pathogens (or substances) or specific populations. The aim is to design cost-effective surveillance systems that provide maximum information in return for the financial investment. This can either lead to a higher level of information for the same level of investment or to equal information for reduced cost (Stärk et al., 2006). The value of using risk-based surveillance in comparison with conventional surveillance is therefore demonstrated by increased cost-effectiveness. This will lead to increased consumer safety either by freeing-up resources that can be used to address alternative hazards or by increasing the level of information available for a specified pathogen or substance.

Risk assessment methods can be used at several design steps of a surveillance system (Fig. 2). First, risk assessment can be applied to identify most relevant pathogens or substances or pathogen-substance combinations to be included in a surveillance programme. Risk assessments can also be used to identify populations or products to be targeted by the surveillance efforts. This application is also referred to as “targeted surveillance”. The best-established example of this latter is the surveillance of BSE in different cattle populations. For BSE, the risk-based approach is now fully integrated in international guidelines of the International Animal Health Office (OIE) and accepted as the method of choice.

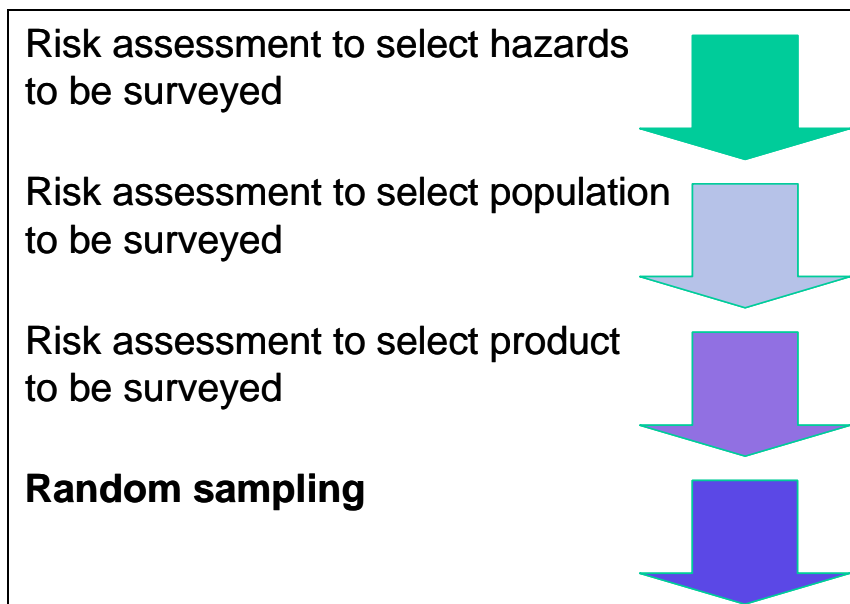


Figure 2: Use of risk assessment methods in the design of surveillance systems

When designing risk-based surveillance programmes, a risk assessment has to be conducted. For this, data input is required, most of which in itself originates from surveillance efforts. Knowledge of risk factors is required and therefore a requirement for risk-based surveillance. This indicates that risk-based surveillance demands an initial investment and cannot be applied to hazards of which we have only limited knowledge. Also, it has been demonstrated that the value of risk-based surveillance is highest for rare events, i.e. pathogens with a very low prevalence (Presi et al, in press). The benefit of this approach is therefore highest for rare events and when relevant knowledge of risk factors and data to conduct risk assessments is readily available.

Over time, the close interaction between surveillance and risk assessment (Fig. 3) will lead to fine-tuning of the surveillance design. The updated risk assessment will lead to better targeting of populations or products to be sampled and therefore allow taking full advantage of the potential of risk-based surveillance. However, if the input data are not accurate or the risk assessment incomplete, results of risk-based surveillance may also become biased.



Figure 3: Risk-based surveillance cycle

Important note: Basic epidemiological principles such as the performance of diagnostic tests (specificity, sensitivity), calculation of adequate sample size and random selection of samples are equally valid in both conventional and risk-based surveillance designs. The goal is to achieve unbiased results that are a valid basis for decision making.

Reference

Stärk K.D.C., G. Regula, J. Hernandez, L. Knopf, K. Fuchs, R.S. Morris, P. Davies (2006) Concepts for risk-based surveillance in the field of veterinary medicine and veterinary public health: A review. BMC Health Services Research 6:20.

Presi P, Stärk K.D.C., Knopf L, Breidenbach E, Sanaa M, Frey J, Regula G (in press) Efficiency of risk-based sampling versus random sampling for monitoring tetracycline residues in slaughtered calves in Switzerland. Food Additives and Contaminants

The Contribution of Veterinary Epidemiology to Health Decision Processes: Understanding and Solving the Issue of Antimicrobial Resistance

David A. Dargatz DVM, PhD

United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service,
Centers for Epidemiology and Animal Health, Fort Collins, Colorado, USA

There is an increasing global concern for the threat posed by antimicrobial resistance. The concern is shared by those involved in human and animal health care. Infections with antimicrobial resistant forms of bacteria have the potential to complicate treatment and potentially to jeopardize the prospects for a cure. There is a growing list of bacteria that are demonstrating increasing antimicrobial resistance. Many of these bacteria are associated with nosocomial infections. However, some of these bacterial infections are community acquired, in some cases by foodborne transmission. Hence the concern about antimicrobial resistance among animal care takers and veterinarians stems not only from the potential adverse impact on the animals themselves but also to consumers.

There is much debate about the sources of the growing antimicrobial resistance problem. Undoubtedly antimicrobial use in some settings plays a role in the selection for and amplification of populations of resistant organisms. However, there is also clear potential for co-selection for resistant populations based on other closely associated genes that confer some increased fitness of the bacteria. In addition, resistant organisms (pathogenic or commensal) can move from one ecologic niche to another.

In developing policy to deal with the issue of antimicrobial resistance it is important that decisions be based on sound evidence. Epidemiologic approaches can be used to provide the data to improve our understanding of the ecology of antimicrobial resistance. These data can then be used in a risk assessment process that should allow the weight of the evidence to be considered in making decision about policy. A core component of epidemiology is the study of the distribution and determinants of disease. In this case disease could be defined as the occurrence of resistant bacteria and thus epidemiology can be used to explore the factors that

contribute to the rise (or fall) in antimicrobial resistance frequency. Various epidemiologic approaches are associated with greater or lesser weights of evidence.

- outbreak investigations can help to detect new trends or emerging conditions and are often best suited to suggest relationships or generate hypotheses
- broad based studies such as cross-sectional or cohort studies may allow the collection of data on a broader group of potential risk factors but again are often best used to identify associations between risk factors and outcomes or generate hypotheses
- clinical trials or experimental studies are much more controlled and can be used to confirm the associations observed in less controlled studies
- meta-analyses draw together data from a variety of studies into a unified analysis that takes into account the strengths and weaknesses of the previous studies to look for consistency in the evidence

Well designed epidemiologic studies can also provide parameters for modeling efforts which in turn can be useful to understand the behavior of complex systems.

Through sound epidemiologic studies using a variety of approaches data can be collected to aid in the understanding of such complex issues as antimicrobial resistance in various ecologic niches. Furthermore, epidemiology can help to define the potential linkages of these ecologic niches that allow actions within one niche to affect outcomes in another perhaps distant and seemingly unrelated niche. It is only through better understanding of the ecology of antimicrobial resistance that optimum decisions can be made regarding surveillance and policy.

Epidemiology of Highly Pathogenic Avian Influenza in Thailand

Suwicha Kasemsuwan

Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

Highly pathogenic avian influenza (HPAI) subtype H5N1 was first reported of its zoonotic ability in Hong Kong in 1997; since then Department of Livestock Development (DLD), veterinary authority of Thailand has been conducting active and passive surveillance for highly pathogenic avian influenza (HPAI) along with Newcastle disease; however HPAI had never been detected. In Thailand, the first HPAI case was in layer hen which was confirmed in January 23, 2004. Once the outbreak was confirmed the DLD immediately launched disease control measures authorized by the Animal Epidemic Act B.E. 2499 (A.D.1956) in order to contain this highly contagious animal disease. The emergency response plan for HPAI was brought into practice readily; preventive and control measures were implemented and adjusted overtime depending on epidemiological findings. During 2004-2007 there were 6 epidemic waves clearly separated by appreciable subsiding periods. Magnitude and impact of the later epidemic waves markedly declined as an outcome of industrious disease control efforts.

Thailand H5N1 outbreak has been categorized into 6 waves: the first wave started from 23 January to 25 May 2004 which covered 190 cases in 42 provinces about 30 million birds was destroyed. The situation was maintained, no more cases identified up to 2 July 2004. The second wave was from 3 July 2004 to 12 April 2005 in which 1539 outbreaks 51 provinces were involved. The third wave was from 1 July to 30 November 2005, the magnitude of the outbreaks were 20 times less than the second outbreak wave. Since then, there were outbreaks on 18 July 2006 in layer hen farms in a province in North-eastern part of Thailand and on 23 July 2006 in native chicken in a province in central part of Thailand. Three outbreaks occurred again during 10 January to 23 January 2007. The last report outbreak was on 9 March 2007 in native chicken in a North-eastern province. (Table 1)

Table 1 Thailand HPAI outbreak waves and their relevances

Wave	Date	Number of animals stamped out	Number of outbreaks	Number of affected sub-districts	Number of affected districts	Number of affected provinces
1	23 Jan – 25 May 04	60,811	190	141	89	42
2	3 Jul 04 – 12 Apr 05	3,232,277	1539	784	264	51
3	1 Jul – 30 Nov 05	417,146	75	55	27	11
4	18 - 23 Jul 06	6,645	3	3	3	2
5	10 – 23 Jan 07	4,116	3	3	3	3
6	9 Mar 07	40	1	1	1	1

To control HPAI disease, Department of Livestock Development has issued new legislations to enforce with Animal Epidemic Act. The legislation and the epidemic curve are listed in Table 2 and Figure 1.

Table 2 List of current legislation concerning avian influenza in Thailand.

Date	Legislation
2000	Ministry Regulation, Ministry of Agriculture and Cooperatives Animal Epidemic Act B.E. 2499 (A.D. 1956), dated 31 December 2499 and its amendment in B.E. 2542, 2545 (A.D. 1999, 2000) Royal Decree B.E. 2537 (A.D. 1994) for controlling poultry Royal Decree B.E. 2539 (A.D. 1996) for controlling duck and geese
2003	Departmental Ordinance, Department of Livestock Development, regarding permission, diagnosis, disinfection, movement of live animals or carcasses in the Kingdom of Thailand, B.E. 2546 (A.D. 2003)
10 Aug 2004	Royal Decree B.E. 2547 (AD. 2004) for controlling poultry and fertile eggs
20 Sept 2004	Departmental Ordinance, Department of Livestock Development, regarding poultry zoning, B, E. 2547 (A.D. 2004)
22 Sept 2004	Departmental Ordinance, Department of Livestock Development, regarding stamping out of infected animals and disease carrier and carcass disposal, B.E. 2547 (AD. 2004)
28 Dec 2004	Ministry Regulation, Ministry of Agriculture and Cooperatives B.E. ,2547 (A.D. 2004), dated 28 December 2547
1 Jul 2005	Departmental Ordinance, Department of Livestock Development, regarding definition of avian influenza, B,E. 2548 (A.D. 2005)
22 Oct 2005	Ministry Proclamation, Ministry of Agriculture and Cooperatives, regarding criteria

	for restocking of poultry in avian influenza infected area, dated 22 October 2548 (A.D. 2005)
22 Oct 2005	Ministry Proclamation, Ministry of Agriculture and Cooperatives, regarding intensive measures for prevention and control of avian influenza, dated 22 October 2548 (A.D. 2005)
25 Oct 2005	Ministry Proclamation, Ministry of Agriculture and Cooperatives, regarding intensive measures for movement control of live poultry and carcass, dated 25 October 2548 (A.D. 2005)
26 Oct 2005	Ministry Proclamation, Ministry of Agriculture and Cooperatives, regarding prohibition of selling, distributing, moving, butchering, or do .other activities with sick or dead poultry, dated 26 October 2548 (AD. 2005)
18 Nov 2005	Ministry Proclamation, Ministry of Agriculture and Cooperatives, regarding avian influenza prevention and control measures for fighting cocks, dated 28 November 2548 (A.D. 2005)
2005	Ministry Regulation, Ministry of Agriculture and Cooperatives B.E. 2548(A.D.2005), dated 23 November 2548

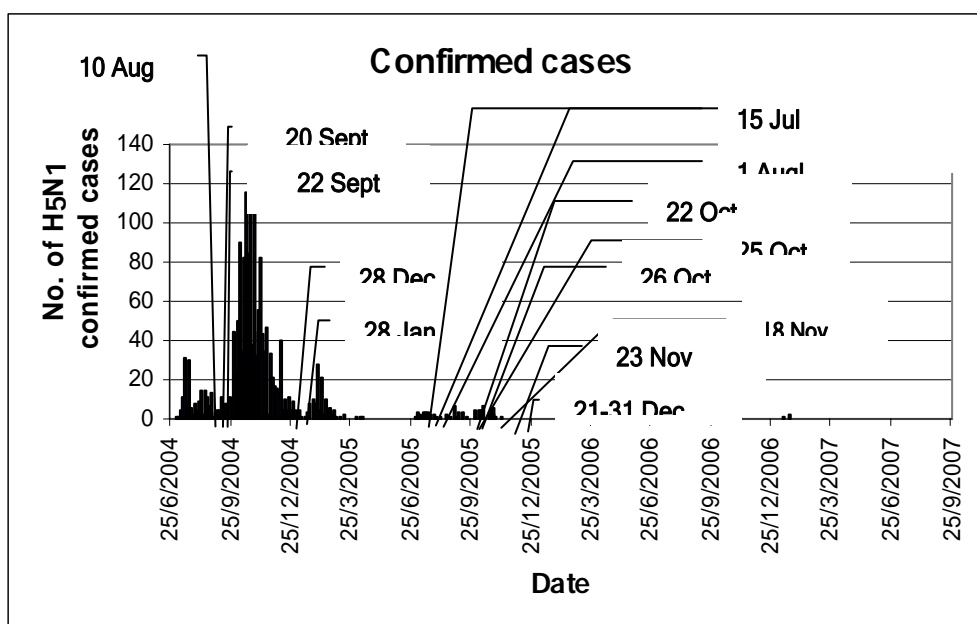


Figure 1 Thailand HPAI epidemic curve from 25 Jun 04 to 25 Sept 07 along with the date of legislation issues. The date in the graph referred to the date of legislations issued presented in the table above.

The HPAI disease surveillance system in animal in Thailand includes active and passive surveillance. The sensitivity of passive surveillance system had been adjusted through case definitions. During the first wave of the outbreak, the definition referred to poultry unit with severe respiratory signs with excessively watery eyes & sinusitis, cyanosis of the combs, wattle and shanks, edema of the head, ruffled feathers, with diarrhea and nervous signs and sudden death of almost 100% or cumulative mortality rate more than 40% within 3 days without any noticeable signs. The case definition

has revised in July 2004 by changing the mortality rate to death $\geq 10\%$ within a day and revised again in July 2005 to farm poultry: cumulative mortality rate $>1\%$ within 2 days and backyard poultry: cumulative mortality rate $>5\%$ within 2 days. If any one criterion is observed, disease control measures will be immediately executed. Apart from the passive surveillance system, the active surveillance activities have been implemented and are listed in Table 3. The term x-ray was introduced to indicate targeted intensive surveillance.

Table 3 H5N1 active surveillance system in Animal in Thailand

Date	Activities	Definition	Samples taken	confirmed cases
19-31 Jan 04	1 st x-ray	<ul style="list-style-type: none"> Representative samples from every poultry farms Representative samples from native chicken and 'other' species from every villages in high-risk provinces Representative samples from native chicken and 'other' species from 60 villages in other provinces (sensitive area 40 provinces, 71 districts) 	75,625	161
11 Feb.-4 Mar. 04	2 nd x-ray	Continued sample collection in 'every villages'	12,000	18
20 Jul 04	Surveillance of moved poultry	<ul style="list-style-type: none"> Prior to movement Within-farm (every 60 days) 		
1-31 Oct. 04	3 rd x-ray	High risk and low risk areas (district level) (457 sub-districts, 184 districts, 44 provinces)	150,648	724
1-29 Feb 05	4 th x-ray	Re-evaluation definitions of high risk and low risk (high risk = districts having outbreaks from Nov 04 to Jan 05 and low risk = the other districts) (37 sub-districts, 22 districts, 10 provinces)	66,588	72
1-31 Jul 05	5 th x-ray	<ul style="list-style-type: none"> High risk, medium risk and low risk areas Only cloacal swabs 17 sub-districts, 7 districts, 3 provinces 	84,945	20
17 -31 Oct 05	6 th x-ray	Only free-grazing ducks and geese were sampled,	99,855	

Date	Activities	Definition	Samples taken	confirmed cases
1-28 Feb 06	7 th x-ray	<ul style="list-style-type: none"> • Only cloacal swabs • 27 sub-districts, 17 districts, 8 provinces • Re-evaluated high risk areas = sub-districts suffered from the 3rd wave of epidemic • Areas with many wild birds • All flocks of free grazing ducks: 10% of serum samples from ducks. 	57,461	0
1 Jun – 31 Jul 06	8 th x-ray		86,274	2
11-30 Sept 06	9 th x-ray	<ul style="list-style-type: none"> • Only clinical surveillance • 30 provinces 	2,243	0
3 Jan – 5 Mar 07	10 th x-ray	Revision of high risk areas	55,204	3
17 Jun – 31 Jul 07	11 th x-ray	<ul style="list-style-type: none"> • Revision of high risk areas • Target 41,968 samples 		

H5N1-HPAI control measures implemented in Thailand has been proven effective however the active surveillance activity is continued to indicate any outbreak that may occur. With this system, infected poultry detection rate has been increased when compare to the passive surveillance system. Due to the labor and cost, target intensive surveillance areas have been selected according to the high risk area.

Epidemiology of highly pathogenic avian influenza in Asia

Toshiyuki Tsutsui

Epidemiologic research team, National Institute of Animal Health

Highly pathogenic avian influenza caused by H5N1 strains has spread in Asian region in recent years. This disease has seriously affected poultry industry, and total economic loss was estimated \$10 to 15 billion in this region. Among regions, disease status varies between countries. Countries like Japan, Korea and Malaysia, have succeeded early eradication of the disease after the incursion. The early detection and rapid response was the key for their success of early eradication. These countries have enough capacity and capability to apply necessary control measures including stamping-out with compensation. On the other hands, the disease becomes endemic in China and Indonesia, and sporadic outbreaks have continued in other affected countries. These countries have some limitations in resources or infrastructure to achieve appropriate measures. In addition, the characteristics of poultry production and marketing system make the disease control difficult. The distribution of poultry from producers to consumers relies on live poultry markets in many countries, where the cold chain is not well established. These markets allow mixing several species of poultry in the same place and giving opportunities for transmitting the disease each other. As a result, infected poultry are distributed to other areas through the markets.

Small holders of free range poultry cause another difficulty for controlling the disease dissemination. These poultry often play an important role in a household income especially in rural areas. These family owned poultry freely move around residential area and even in the neighboring poultry farms. It is usual that abnormal symptoms of these poultry are not recognized by veterinary authorities. Another risk factor is a large duck population in these countries. Duck production system is mostly connected with rice production, and uses water reservoir effectively. However, duck population harbors viruses and their movements cause the dissemination of viruses.

There are several constraints for the disease control in this region. However, activities have been enhanced to overcome these constraints under the cooperation with international organizations and donor countries. Development of harmonized control strategies in this region may be required taking account of active movements of people and commodities across the country borders.

Epidemiology of Avian Influenza (H5N1 virus)

Yoshihiro Ozawa
OIE Honorary Adviser

1. Modes of transmission and the origin of H5N1 viruses

Avian Influenza (A.I.) is transmitted by infected birds and their excrements. Also, AI is mechanically transmitted by surface means via contaminated food, water, feeds, soil, vehicles, humans, animals, flies, feathers etc. AI viruses can be spread by national or international trades of infected birds and contaminated products. Wild birds, especially migratory waterfowl, are a recognized source and reservoir for all subtypes of AI viruses. Some mammals such as dogs and cats are susceptible to the virus, but they are usually considered as the dead ends.

In 1996, H5N1 virus was first detected in Guangdong Province, China. In 1997 the virus became widespread in poultry markets in Hong Kong, and killed 6 of 18 infected persons. The virus was wiped out by culling all domestic poultry in Hong Kong. In 2002, a new H5N1 genotype appeared again in Hong Kong, and the variant strains spread across Southeast Asia and South Asia between 2002 and 2007. The viruses can be divided into several clades such as V1, V2, V3 and Indonesian clades. The strains of H5N1 virus appeared in Korea(2003) and Japan (2004) were closely related to Guangdong strain/174/04 which is distinct from the above 4 clades.

In April 2005, a new variant H5N1 virus, which caused high mortality in both wild birds and poultry, was observed in Quinghai Lake, China. The virus was spread westward through migratory birds into Siberia, Kazakhstan and Turkey. This unprecedented mortality of wild birds associated with H5N1 viruses opened a new window for its movement within wild and domestic birds across Eurasia, the Near East and Africa. Virus strains are divided into 3 clades (EMA1,2,3). The virus isolated in 2007 in Japan is closely related to one of those viruses of Quinghai origin(EMA clades).

2. AI situation in Europe

The European Union decided to make risk assessments of H5N1 virus entering via migratory birds into Europe, and active and passive surveillance for AI virus in wild birds started in July 2005. The conclusion of this study indicated a high risk of introducing the virus via migratory birds, and also a risk of the infection to become enzootic in Europe.

The EU encouraged each member country (a) to make an extensive survey of AI viruses in both wild and domestic birds, (b) to vaccinate zoo birds and poultry that cannot be kept in houses (c) to keep all domestic birds in closed housing in high risk areas or zones and (d) to vaccinate domestic birds that cannot be housed.

Between 2005 and 2006, H5N1 viruses were detected in wild birds in 25 countries. AI outbreaks in poultry farms were reported from 13 countries in Eastern Europe, and 4 countries in Western Europe (Sweden, Denmark, France and Germany). It is considered that migratory birds played a major role in spreading H5N1 viruses in Europe.

The results of the risk control measures in Western Europe can be summarized as follows:

- (i) It was successful to protect the zoo birds by vaccination, but several birds died due to trauma of vaccination.
- (ii) Surveillance of wild birds was useful in improving early warning systems for poultry producers, and was effective in reducing the exposure risks of poultry.
- (iii) Mass culling of poultry and ornamental birds could be avoided.

In 2007, H5N1 virus surfaced again in Hungary, UK, Czech R., Germany and France. It seems that H5N1 viruses became enzootic in some countries in Eastern Europe including Russia.

3. Outbreaks in the Near East and Africa, and the surveillance in the Americas

In the Near East, the outbreaks occurred in several countries via infected wild birds, and by human activities such as trades. Between October 2005 and December 2006, AI (H5N1) outbreaks occurred in Turkey, Kuwait, Iraq, Iran, Georgia, Afghanistan, Kazakhstan and Israel. In 2007 outbreaks occurred in Pakistan, Turkey,

Afghanistan, Kuwait and Saudi Arabia. The viruses isolated in those countries could be divided into 2 clades (EMA1 and EMA3).

In East Africa, the outbreaks of AI(H5N1 virus) have been reported from Egypt, Sudan, Ethiopia and Djibouti since February 2006. The viruses isolated in East Africa clustered within EMA1 clade.

In West Africa outbreaks occurred in Nigeria, Niger, Cameroon, Burkina Faso, Cote d'Ivoire, Ghana and Togo. It is considered that human activities played a major role in spreading the disease in West Africa. The viruses isolated in West Africa could be divided into 2 clades(EMA1 and EM2) indicating that H5N1 viruses entered there via 2 different routes from the Near East.

In the Americas, a highly pathogenic H5N1 virus of Asian origin has not been detected so far despite of their extensive surveillance in Canada and the USA including Alaska. In 2006, however, low pathogenic viruses of a different origin have been isolated in the USA.

Thus, H5N1 viruses attacked the countries in more than one-half of the world within a very short period, indicating that migratory birds played a major role in spreading the viruses. The virus strains isolated in those regions can be grouped into 3 clades(EMA1, 2 ,3).

4. Advanced strategies for the prevention/control of AI

In the 20th century, traditional control actions started only after an AI outbreak occurred in a poultry farm. Usual control measures applied were culling of infected and high risk birds, movement control (quarantine), bio-security measures of farms, and vaccination in some countries.

Through the knowledge gained in Europe (EU₁₅) in 2006 and 2007, the EU now puts emphasis on the measures listed below that can start well in advance of AI outbreaks:

- a) Risk assessment of wild birds transmitting AI viruses to poultry
- b) Early warning systems to protect poultry and outdoor zoo/ hobby birds.

- c) Strengthening of AI surveillance in wild birds and poultry in a high risk area.
- d) Safe disposal of infected wild birds/animals and thorough decontamination of the premises.
- e) Vaccination of zoo birds, hobby birds and poultry that cannot be kept in their houses.
- f) Testing of vaccinated birds for sub-clinical infection by DIVA tests prior to shipment.
- g) Setting up a vaccine bank and planning the strategies for vaccination prior to AI outbreaks in poultry.

5. Risk of the occurrence of a pandemic virus

Search for a pandemic virus (H5N1) has been and still is underway throughout the world. Since 2003, H5N1 virus has killed 202 persons out of 330 infected (as of 10 October 2007), but so far only one case of human to human infection in Indonesia has been suspected. A real concern is the appearance of a highly pathogenic and highly transmissible AI virus that may infect both humans and poultry. Preparation for such a case must be kept in our mind in order to avoid worldwide catastrophes both in humans and animals at the same time.

発がん性評価における遺伝毒性

— 閾値を考える —

林 真

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

先進諸国においては数万から十万種類の化学物質が我々の身の回りに存在すると言われている。それらの内最も日常的に接しているのが食品関連化学物質であろう。それらの安全性を評価する一環として、遺伝毒性、変異原性の評価が行われている。変異原性の評価が導入された当初においては、変異原性があるもの、すなわちがん原物質との図式があった。その後データの蓄積に伴い、短絡的な考えは無くなってきたが、「遺伝毒性に閾値はない」との考えから、遺伝毒性を有するがん原物質に閾値を仮定することはできない、従って、摂取許容量の設定はできない、との考えが一般的に支持されている。最近では、国際的な了解事項として、DNAに直接作用するものには閾値は存在しないが、DNAに直接作用しないような遺伝毒性物質には閾値が存在する、と考えられるようになってきた。この考えに基づくと、動物を用いる試験でがん原性が認められたときに、その発生機序が遺伝毒性に基づくものか否かにより、評価が大きく分かれることになる。

食品をはじめとする化学物質の安全性評価においては、理論的・科学的な評価が重要であることは勿論であるが、現実的な考えも取り入れる必要があると考える。ある量での暴露が明らかであるにもかかわらず、変異原性が認められない用量を現実的な閾値と考えると、DNA直接傷害性物質にも現実的な閾値が存在することを示す情報が蓄積されつつあるが、十分な検出感度を持つ試験がなされたかが問われる。試験の感度は統計学的には指標を解析する細胞数に依存することが知られている（数多く解析すれば感度が上がる）。染色体異常誘発性の指標となる小核誘発の作用機序の異なる3種類の化学物質（マイトマイシン C, Ara-C, コルヒチン, アクリルアミド）を用いて、通常観察細胞数である動物あたり 2000 細胞のところを、機械を用いて 100(20)万細胞まで解析し、小核試験の感度がどのように変化するかを調べた。その結果、2000 細胞程度の観察では無視できる程度であった動物間差が明らかになったが、処理群単位でみた場合には観察細胞数を増加させても検出感度の上昇につながらないことが判明した。これら3種類のモデル化合物の用量反応関係と閾値について考察する。

Evaluation of genotoxicity in carcinogenic assessment —Threshold of genotoxicity—

Makoto Hayashi

Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

In the developed countries, people contact with up to a hundred thousand chemicals in their daily life. Among these, food and food related chemicals are most commonly and important chemicals in our daily life. During the course of safety assessment of these chemicals, genotoxicity are routinely evaluated. In the early days when genotoxicity assays were introduced, people tended to consider that genotoxicity equal to carcinogenicity. After accumulating information about genotoxicity, there is no more such tendency at the present time. Now, however, it has been believed that there is no threshold for the genotoxic chemicals derived from the hypothesis based on radiation biology. Accordingly, it is supported the idea that acceptable daily intake (ADI) cannot be set for genotoxic carcinogens. Recently, however, it is international trend to believe the idea that there is threshold for non DNA direct acting chemicals although it is not true for DNA direct acting ones. Based on this, it is important to understand the mechanism of carcinogenesis, especially whether the genotoxic mechanism contributes or not, for the risk characterization for human health.

It is, of course, important to make risk assessment based on theoretical consideration and best science, it is also important to assess practically. If we consider that it is a practical threshold that no genotoxic effect can be seen at the condition that shows the apparent existence of a certain exposure of the chemical, such data are accumulating even for DNA direct acting chemicals. One important question raised is the power of the assay to show no genotoxic effect. It is well know statistically that bigger sample size gives higher power, i.e., higher sensitivity can be obtained when more cells are analyzed. We examined the sensitivity of the rodent peripheral blood micronucleus assay using 3 model chemicals (mitomycin C, Ara-C, colchicine, and acrylamide) with different modes of action in induction of micronuclei. It is known that there is no practical difference among animals when 1000 cells were analyzed manually per animal. We analyzed up to 1 million cells per animal by flow cytometry in comparison to 2000 manual analysis as a routine practice. Based on the million-cell-analysis the difference among animals became apparent that was not clear by the 2000 manual analysis. The result showed that the sensitivity of the micronucleus assay could not be improved when an animal was considered as a statistical evaluation unit but cells as the unit. The

practical threshold for DNA direct acting chemicals and the power of the assay system are discussed.

発がん性評価における閾値の問題

福島 昭治

中央労働災害防止協会・日本バイオアッセイ研究センター、所長

Existence of Carcinogenic Threshold

Shoji Fukushima, MD, Ph.D

Japan Bioassay Research Center

Japan Industrial Safety and Health Association

一般に化学物質は特定の反応をおこすにあたって用量依存性を示す。用量によって反応の強さが違い、低用量の場合、反応しない用量域があり、この場合にその反応に閾値があるという。すなわち、閾値を求めることはリスク評価にとって必須な作業である。一般毒性の場合、これが安全性を保証するものであり、人々の安心意識につながる。しかし、発がん物質に対するリスク評価はどうであろうか。現在までのところ発がん物質、特に遺伝毒性発がん物質には閾値がないとして評価されてきた。すなわち、発がん物質は環境中に存在する限り安全ではないという考え方でゼロリスク論と呼ばれている。私達はこれが正しいかどうかを検証するために、ラット発がん中期検索法を用いて、種々の環境発がん物質の低用量発がん性を”Weights of evidence”の観点から解析した。

遺伝毒性発がん物質については、食品を料理する際に発生する焼け焦げに含まれるヘテロサイクリックアミン (MeIQx, PhIP 等) および食品汚染物質として、また胃で生合成される N-ニトロソ化合物 (Diethylnitrosoamine, Dimethylnitrosoamine 等) のラット肝発がん性に関して、発がん物質-DNA 付加体、酸化ストレスのマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine、および前がん病変のマーカーである Glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢の発生に実験上 “作用しない量” が存在した。また、in vivo 変異原性についても “作用しない量” が統計上求められた。以上、マーカーから推察される発がん機序を考えると、遺伝毒性発がん物質には閾値、少なくとも実的な閾値があると結論する。

非遺伝毒性発がん物質には発がんホルミシス現象を示すものがあり、それには閾値が確実にあることを実証した。すなわち、医薬品の Phenobarbital や農薬として過去に用いられた α -BHC と DDT のラット肝発がん性に関して、低用量では高用量における発がん反応 (GST-P 陽性細胞巢の発生とその増加) と異なり、発がんを抑制するという反応、すなわちホルミシス現象がみられ、非遺伝毒性発がん物質には確実に閾値があることが判明した。

これらの結果が、発がんリスクアセスメントに有用な情報となり、リスクマネジメントに大いに役立つことが期待される。

1. hormesis, non-genotoxic agents

1) Phenobarbital

2) α -BHC

2. genotoxic carcinogen

3) 臭素酸カリー、in vitro Ames

4) EHES→臭素酸カリ

国際基準設定に向けた食品汚染アフラトキシンの評価

小西 良子

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部、部長

アフラトキシンは、*Aspergillus* 属の真菌の2次代謝物であり、天然物のなかで最強の発がん物質として知られている。アフラトキシンには、多くの類似体が存在するが、そのうち食品汚染頻度が高いものとしてアフラトキシン B₁ (AFB₁)、B₂ (AFB₂)、G₁ (AFG₁)、G₂ (AFG₂) が挙げられる。また、乳加工品には AFB₁ の代謝物であるアフラトキシン M₁ (AFM₁) の汚染頻度が高い。

アフラトキシンの毒性の主な標的臓器は肝臓である。大量に摂取した場合には黄疸、急性腹水症などの肝臓障害を呈する食中毒(アフラトキシコーシス)を起こす。一方、少量を慢性的に摂取し続けた場合には、原発性肝臓癌を引き起こすことが、国際がん研究機構(IARC)およびFAO/WHO合同食品添加物専門委員会(JECFA)のリスク評価によって明らかにされている。IARCにおいて、食品に自然汚染するアフラトキシン化合物は、「ヒトに発ガン性がある」グループIに分類されているが、毒性学的にみて、AFB₁>AFG₁=AFM₁の順に発がん性は強い。

アフラトキシンの毒性の重要性から、多くの国でアフラトキシンに対して基準値を設定している。国際的にみると、AFB₁を含めたAFB₂、AFG₁、AFG₂の4種類の総和で規制を行う国が主流であり、その数も年々増加している。AFB₂およびAFG₂の発がん性は構造上起こり得ないとする議論もあるが、代謝によりAFB₁、AFG₁またはAFM₁に変換する可能性はまだ残されていることも考慮にいと、健康被害を未然に防止する観点から、AFの総量規制は妥当といえよう。しかしわが国では食品衛生法第6条に則りAFB₁をその規制対象としている。すなわち、AFB₁のみが、有毒な、若しくは有害な物質とみなされ、「それを含む食品又は添加物は、これを販売し、又は販売の用に供するために、採取し、製造し、輸入し、加工し、使用し、調理し、貯蔵し、若しくは陳列してはならない」としている。本規制が設定された昭和48年においては、アフラトキシンの分析法として当時においての最も感度の高い方法が使われていたが、その方法での検出限界が実質上今の規制値(10・g/kg)となっている。AFM₁については、EUと米国において各々基準値が設けられているが、わが国においてはまだ基準値は設定されていない。このよ

うな背景から、わが国でも今後総 AF を対象に基準値を策定する必要があるかを判断するため、科学的根拠に基づくデータ作成への取り組みが始まっている。

基準値策定のために必要なデータとして、まず毒性の評価がある。前述にもあるようにすでに幾つかの国際機関で毒性評価はなされており、とくにヒトへの発ガンリスク評価方法が提案されている。その中で代表的なものは、JECFA が行なっている発ガン予測式と欧州食品安全機関（EFSA）がとりいれている暴露マージン法（Margin of Exposure: MOE）である。JECFA 方式では、 AFB_1 を一日体重 1 Kg 当たり 1 ng を一生涯摂取した場合、原発性肝臓ガン発症リスクは健常人では 10 万人に 0.01 人、B 型肝炎キャリアでは 0.3 人となると評価している。すなわち AFB_1 摂取量 (ng) がわかれば、 $(0.01 \times \text{健常人の割合} + 0.3 \times \text{B 型肝炎キャリアの割合})$ の式に乗じて、10 万人あたりの発ガンリスクを求めることができる。MOE 方式では、ヒトの疫学的結果から計算された“10%のヒトが肝臓ガンになる AFB_1 の用量(ベンチマークドーズ: BMDL10 ; 870ng/kg/day)” を、実際の AFB_1 摂取量で除した値でリスクを評価する。一般的にはその値が 10,000 以上であれば、問題がないと考えられている。今年 6 月に開催された JECFA では、木の実中のアフラトキシンの基準値策定のための暴露評価を行ったが、この 2 方法で行ったリスク評価結果が根拠となっている。

わが国のアフラトキシンの摂取量は、平成 16 年度から平成 18 年度にかけて行なった実態調査の結果を基に算出した。わが国では AFB_1 : 10・g/kg で規制しているため、汚染量は非常に低いレベルにあり、それに伴ってアフラトキシンの摂取量も 99.5 パーセントタイルにおいて 0.307 ng/kg bw/day と低い水準に留まっている。また、摂取量を基に、総 AF 規制をした場合との発ガンリスクの比較をモンテカルロ手法で行った結果、現行の規制を行なっている場合においては、総 AF 規制をした場合とほとんどリスクは変わらないことが示された。

これらの結果は、今後内閣府食品安全委員会に図られ、詳細なリスク評価が行われる予定である。

参考文献

- ・ Joint FAO/WHO expert committee on Food Additives 47th Report ed., “Evaluation of certain veterinary drug residues in food.” Geneva, WHO, 1998, p. 359-468.
- ・ Joint FAO/WHO expert committee on Food Additives 47th Report ed., “Safety evaluation of certain mycotoxins in food.” Geneva, WHO, 2001, p. 570-680.

- IARC (International Agency for Research on Cancer)., “Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene.” IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum., **82**, 1-556 (2002).
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 68th Meeting:SUMMARY AND CONCLUSIONS, World Health Organisation, Geneva, Switzerland. 2007 (Available at URL: <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary68.pdf>)
- FAO Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, Rome, FAO, 2004, p. 17-22.
(Available at URL:<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.HTM>.)
- 小西良子ほか “平成16年度厚生労働省科学研究総括・分担研究報告書：食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究” , 2005.

Bacterial food poisoning: Occurrence and control

Susumu Kumagai

Professor, University of Tokyo, Graduate School of Agricultural and Life Sciences

Since the time when a reporting system for food-poisoning was established under the Food Sanitation Law after the 2nd World War, numbers of patients of reported food poisoning cases have been 20,000-60,000 per year. During this time period, the number of deaths per year has gradually decreased from several million to about ten, which number is continuing during 20 years.

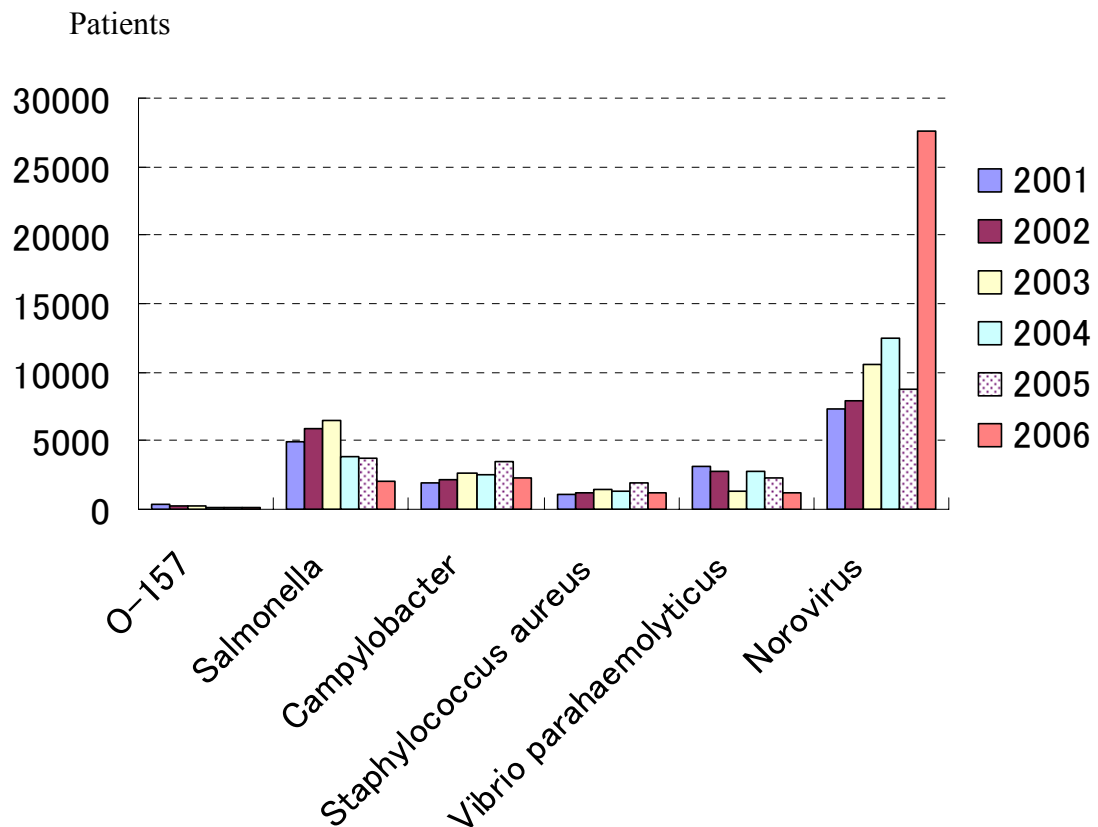
Since *Vibrio parahaemolyticus*, which was firstly found to be food poisoning bacteria in Japan, is living in coastal sea and contaminates sea-food, it has long been a major food poisoning bacterium in Japan, where raw sea-foods have been favorable foods. This had been a characteristic of food poisoning in Japan. However, *V. parahaemolyticus* infection decreased gradually, while Salmonellosis increased gradually, *Salmonella* being the most frequent causal agent from 1996. Furthermore a series of verotoxin-producing *E. coli* O157:H7 outbreaks occurred in 1996. Since then the food poisoning in Japan characterized by *V. parahaemolyticus* infection as a major causative agent has remarkably changed.

Food-borne Salmonellosis increased by the increase in the frequency of *Salmonella* contamination in shell eggs. This increase was caused by the increase of frequency of infection of laying chickens. The Ministry of Health and Welfare enforced labeling of the date of minimum durability for shelled eggs to be eaten raw, and labeling of packers, etc. At the production level, laying chicken farms have attempted to improve sanitary conditions including *Salmonella* vaccination. These control measures may have led to the decrease in food-borne Salmonellosis.

Food-borne *V. parahaemolyticus* infection increased with the increase of incidence of serotype O3K6 in 1998. It was guided that disinfected or potable water should be used for washing, immersing and storing shellfish and fin fish during distribution. Based on data of sea-foods survey conducted in summer 2000, *V. parahaemolyticus* standards for raw consumption and ready-to-eat boiled sea-foods were set to be <100 MPN/g and non-detectable level, respectively. Also the temperature of sea-foods was set at $\leq 10^{\circ}\text{C}$ in the Ministry Ordinance, and recommended to be maintained at $\leq 4^{\circ}\text{C}$ as far as possible. Outbreaks (including sporadic cases) and patients

of *V. parahaemolyticus* infection decreased from 1998 to 2001 to about 1/3 and 1/4, respectively, and these numbers remain unchanged until 2004.

Thus we may have succeeded to reduce food-born *Salmonella* and *V. parahaemolyticus* infection probably through a series of control measures, but what measures among them were effective and to what extent they were have not been analyzed based on scientific data. In order to control successfully new types of food-borne pathogenic bacteria which might appear in future, verification systems to analyze the effectiveness of control measures will be needed to be developed.



カンピロバクター食中毒の防止に向けて

品川 邦汎

岩手大学農学部獣医学課程、教授

近年、各国でヒトの下痢症・食中毒の起因菌として *Campylobacter jejuni* が注目されている。特に、わが国における食中毒発生件数では *C. jejuni/coli*（ほとんどが *C. jejuni*）によるものが第1位（平成18年、ノロウイルス食中毒が第1位）を示している。これらの事例の多くは夏期に発生が多い患者1名の散発事例であるが、最近では集団事例（患者2名以上）も増加傾向を示している。

C. jejuni 食中毒の原因食品としては、「食鳥肉およびその加工品」などの食鳥肉関連食品によるものが最も多く、その他牛肉などによるものも多い。

本シンポジウムでは、*C. jejuni* 食中毒の発生概要、原因食品として多い食鳥肉の本菌汚染状況、および食鳥処理場でのと殺・解体工程での汚染防止、衛生管理（HACCP：危害分析重要管理点方式、SSOP：標準的衛生作業手順書などの作成）について、さらに食鳥（ブロイラー）生産農場での *C. jejuni* 汚染および鶏への保菌防止などについて報告する。

1. カンピロバクター食中毒の発生状況

C. jejuni 食中毒では散発事例が圧倒的に多く、毎年322～490件の発生し、*C. jejuni* 食中毒全事件の約70～80%を占めている。他方、*C. jejuni* 集団事例は、年間63～150件（全食中毒件数の5～17%）発生しており、しかも年々増加している。また、患者数も毎年1,400～2,300名発生（集団食中毒の患者数の3～15%）し、しかも増加傾向を示している。

C. jejuni 食中毒の原因食品（散発事例を含む）は「肉類およびその加工品」によるものが最も多く、毎年13件～48件（患者数98～775名）発生している。この他、原因食品が特定できなかったが、食品によることが明らかな事例が19～62件/年（患者数400～1,200名/年）と多い。本菌は環境中では死滅し易く、原因食品の特定が困難で不明の事例が、年間約360件～520件（患者数800～1,100名）と、*C. jejuni/coli* 食中毒全件数の77～94%を占めている。また「肉類およびその加工品」による事例では、食鳥肉関連食品によるものが最も多く、発生事件の約4～8%を占めている。特に、鶏肉（鳥

肉・ササミ・鳥レバー刺身、鳥たたきなど）、鶏肉料理およびバーベキュー、串焼きなどによるものが多く、この他牛のレバー刺身、バーベキュー・ホルモンによる事例も見られる。

2. 市販食鳥の食中毒菌汚染

市販鶏肉（もも肉、むね肉、手羽先など）から分離される *Campylobacter* 属菌のほとんどが *C. jejuni* であり、その汚染率は極めて高く（60～80%）、汚染菌数も $10^2 \sim 10^3$ cfu/100 g のものが 50～60%、 10^4 cfu/100 g 以上のものも数%見られる。特に、国内産鶏肉に比べブラジル、米国などからの輸入鶏肉の汚染は低く数%～20%で、菌数も 10^2 cfu/100g のものが多い。しかし、これら輸入鶏肉は冷凍品であり、凍結・融解により本菌が凍結障害や死滅などを起し、汚染率・菌数の減少を示したものと考えられる。この他、鶏肝臓の *C. jejuni* 汚染率は鶏肉に比べ $10^2 \sim 10^3$ 倍高く、汚染菌数も $10^3 \sim 10^5$ cfu/100 g のものが多い。

鶏および食鳥肉から分離される *C. jejuni* 菌株の血清群 (Penner 血清) では、B 群が最も多く、次いで D 群および O 群であり、食中毒菌株で最も多い O 群や D, B 群と同じものが多く認められる。

3. 食鳥肉の *C. jejuni* 制御

1) 食鳥処理工程の汚染

食鳥肉の多くはブロイラーによるものであり、大規模食鳥処理場（年間 30 万羽以上と殺・解体処理を行う施設）では、農場から搬入された鶏は、懸鳥、と殺・放血、湯漬、脱羽、中抜き、内臓摘出、冷却および水切りまで一貫して行われている。処理場搬入鳥の *C. jejuni* 汚染は、生産農場により大きく異なり、検出されない農場と、高率にしかも菌数の極めて高い（ $10^6 \sim 10^7$ cfu/g 糞便）農場が見られる。

と殺・処理工程の中で、と体への *C. jejuni* 汚染の高い箇所としては、脱羽、中抜きおよび冷却工程である。特に、中抜き工程では自動中抜き機の不備（不調整）により腸管損傷・破損を起し、腸内容物による汚染が認められる。

処理場でと殺解体後、部分肉加工（カット）段階で、*C. jejuni* 汚染率は急増（50～65%）する。本原因として、一部の汚染の高いと体がカット工場に混入し、使用器具・機材および作業者の手指などを汚染して、拡散を起すと考えられる。

2) 食鳥処理における衛生管理

食鳥処理場でのと殺・解体における微生物汚染要因とその防止措置について、厚生労働省食品安全部監視安全課は、「一般的な食鳥処理場における衛生管理総括表（平成 18

年3月、監視安全課長通知)」を作成し、各処理場における自主的衛生管理方法として HACCP プラン作成の際のガイドライとして活用するように通達している。その中で、重要管理点 (CCP) と考えられる工程について、(1)農場から処理場への食鳥の搬入(生体受け入れ)工程、(2)内臓摘出後の冷却工程(管理基準:冷却温度・時間、次亜塩素ナトリウムの濃度)、(3)処理工程の最終製品(丸と体)の保管(保管温度と時間)である。また、微生物汚染管理ポイントとして最も重要な工程は、(1)脱羽処理でのと体への糞便汚染、(2)内臓摘出工程での腸管破損による内容物(糞便)汚染、および(3)冷却工程、特に水冷式によると体へ汚染拡大である。

3)食鳥(ブロイラー)生産農場での衛生管理

病原微生物の汚染の少ない、安全で衛生的な食鳥肉を生産するためには、食鳥生産農場では抗菌・抗生物質の残留および食鳥への病原菌(食中毒起因菌)の感染(保菌)予防が重要である。また、これらの衛生管理を行うための食鳥生産現場では、適正農業規範(GAP: Good Agriculture Practice)、および食鳥飼育のための衛生的標準作業手順(SSOP: Sanitary Standard Operation Procedure)を作成することが必要である。

食鳥肉によるヒトへの危害発生(食中毒)防止については、発生頻度、原因物質、発生要因などを十分に把握し、対策を立てることが重要である。そのためには、「農場から食卓」までの各段階において、GAPやGMP、さらに HACCP 方式の構築、また SOP および SSOP などを整備することが必要である。

Control of chicken Salmonellosis in the Poultry Farms

Masayuki Nakamura

Professor, Zoonoses Laboratory, School of Veterinary Medicine, Kitasato University

1. Eggs contaminated with *Salmonella* Enteritidis (SE)

In Japan, more than one million chicks of grand parents and parent stocks are imported every year. Because a few of these chicks were contaminated with SE, commercial layer chickens became contaminated with SE. Therefore, the food-borne disease by SE was prevailing since 1989.

In the early 1990's, 15% of layer farms were contaminated with SE. In 1995, 8.5% of layer farms were positive for SE in a survey of one tenth of layer farms in Japan and in 2001, 3.5% of layer farms were positive in the same laboratory's survey.

For the control to reduce the contamination of SE at the farm level, strength of the animal quarantine, vaccines, CE products, an addition of herbal medicines to feed and so on are put into practice.

2. Chicken meat contaminated with salmonellae

In 1995-2002, more than 50% of broiler farms were contaminated with salmonellae and the most prevailing serotype was SI. In the early 2000's, 20-50% of broiler chickens

was contaminated with salmonellae in the individual level and the serotype of almost all of them (80-100%) were SI.

For the control to reduce the contamination of salmonella at the farm level, CE products, an addition of herbal medicine to feed, probiotics and so on is put into practice.

食品安全における薬剤耐性菌への対応

田 村 豊

酪農学園大学獣医学部獣医公衆衛生学教室、教授

Correspondence to Antimicrobial Resistant Bacteria derived from
Food Animals in Japan

Yutaka TAMURA

Laboratory of Veterinary Public Health, School of Veterinary Medicine
Rakuno Gakuen University

抗生物質は、人類が 20 世紀に残した偉大な遺産の一つに数えられ、細菌感染症克服の切り札として盛んに利用された。その結果、長らく人類を苦しめてきた多くの急性感染症は激減し、抗生物質は“魔法の弾丸”と言われるに至った。他方、抗菌性物質（抗生物質と合成抗菌剤）の動物分野での応用は、人体用と随伴するかたちで感染症の治療や成長促進目的で広く行われた。動物における抗菌性物質の利用が普及するのに伴い、食用動物における耐性菌の出現という新たな問題が指摘されるようになった。特に、食用動物由来耐性菌の食物連鎖によるヒト医療に対する影響である。この問題に対しては欧米の多くの学術団体が科学的な検証を行い、その可能性を否定するものではないが、食用動物に使用される抗菌剤のヒト医療への影響について明らかな科学的証拠がないと結論付けている。

加えて国際機関も活発に対応している。最近、WHO/FAO/OIE が共催で、「ヒト以外での抗菌剤の使用と薬剤耐性」に関するワークショップを開催し、菌種は限定されているものの、ヒト以外での抗菌剤の使用がヒトの健康に影響しているとのリスク評価結果を公表した（2003 年）。さらに翌 2004 年には、同じく 3 つの国際機関が連携して、この問題に対するリスク評価が終了したとして、「ヒト以外での抗菌剤使用による耐性菌のリスク管理オプション」に関するワークショップが開催された。したがって、国際機関では既に食用動物由来耐性菌の食品を介したヒトの健康への影響が明らかであると共通認識に至っており、リスク管理に関心が移行している。

一方、わが国ではこの問題に対して WHO の勧告に準拠する形で様々な対応を行っている。まず、耐性菌対策で最も重要といわれている耐性菌のモニタリング体制を家畜衛

生分野において確立した（1999年）。また、農林水産省は最近の国際動向も配慮して、2003年に抗菌性飼料添加物の全ての成分に対して食品を媒介するヒトの健康影響評価を食品安全委員会に諮問した。委員会では、早速、リスク評価基準を作成し、モネンシンナトリウムの評価結果を公表した。現在、ヒト医療で最も重要視されているフルオロキノロン剤のリスク評価が開始されたところである。

今回、食用動物由来耐性菌をめぐる国際情勢と我が国の対応に関して、特にリスク評価の現状を紹介したい。また、精度の高いリスク評価の実施には、食品への耐性菌の伝播経路を解明することが重要である。そこで我々が実施している環境（野生動物）における耐性菌の生態に関する疫学調査成績も紹介したい。

英文抄録和訳

食の安全問題における獣医疫学の役割：アプローチと実際

Mo Salman

コロラド州立大学教授：獣医・生物医科学部、動物衛生研究所；獣医疫学分野
m.d. Salman@colostate.edu

獣医疫学は、動物集団における疾患の発生を制圧し予防措置を講じるために、動物の疾患発生に関わる要因と分布を明らかにする教義である。獣医疫学は個体の集まりから、大規模な家畜群、地域・州・国あるいは大陸の集合体へとその対象が移っていく。疫学は健康や生産性を阻害するあらゆる疾患を相手にする非常に広い分野を含んでいるといえる。したがって、ヒトや動物の健康に影響する食品汚染を含む畜産物もこのような集団対象になりうる。

最近、食品安全がニュースになることが多く、様々な危機に関する公的な通達（情報）も広く出回っている。食品安全に関する突っ込んだ疑問や問題の多くは、病原体や化学物質に関係したある特定のリスクの有無に関する疑問である。そのため、多くの機関や研究者は、とくにそのようなリスク評価のためのリスク分析の仕事に携わるようになった。

定義上、獣医疫学の最も重要な要素はリスク要因の同定と、リスク要因による副次的な健康影響をリスク分析の疫学手法のもとで評価することである。したがって、疫学は食品安全問題に迫る中心的な位置にあり、重大な危機を未然に防ぐための戦略を決定するための学際的な分野であるといえる。

最近の数十年間において獣医疫学は、市民や社会の最大の関心事になっている様々な食品安全問題を明らかにし制御するために貢献してきた。このシンポジウムでは、肉用牛や食肉の安全性に関して獣医疫学が果たしてきた貢献例を紹介したい。

これらには食品安全の評価に使用されている獣医疫学の分析手法やデザインに関する事項も含まれている。獣医疫学やHCCAPの分野におけるリスク分析に関連した内容が実際的な面を通して明らかになるであろう。国家の食品安全システムという意味では基準（規制）に向けての獣医疫学の試みを牛肉などを例に挙げて概説したい。

食品由来病原体の監視における診断検査の評価

Dr. I.Gardner

カリフォルニア大学獣医学部疫学、教授

はじめに

食品安全関連の病原体に関するサーベイランスやモニタリングの実施において、診断技術の利用は不可欠の要素である。低コストで実施しやすく、また迅速に結果を得ることは、食品生産物のポストハーベスト段階で使用される試験において考慮されるべき重要な点である。なぜならば、生産物は収穫直後より分配され、さらなる流通過程に乗せる必要があるからである。試験の能力特性（感度、特異性、信頼性）は、通常、前述の3要素（低コスト、容易さ、迅速さ）に比べてあまり考慮されていない。しかし、この情報は、得られた結果の解釈や様々な情報源からの試験データの比較、さらにそれらの微生物リスク評価の使用に際して必須事項である。

食品由来病原体に関するモニタリングやサーベイランスで使用される診断試験の評価を行うにあたっては多くの点を克服しなければならない。また、動物やその生産物、あるいは環境における食品由来病原体に関する試験評価研究においては、共通認識に基づいた基準がまだ無い状態である。このような状況は、動物あるいはその生産物の国際貿易に関連した試験でとられている措置とは対照的である。すなわち動物衛生のための世界的組織（OIE）は試験法を規定し、試験評価研究を行う際の計画に関するガイダンスを提供している（http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm）。

今回のシンポジウムでは、試験評価法への理想的な基準のアプローチを端的にレビューするとともに、微生物病原体に対する試験評価の原則や一般的なアプローチの応用例を中心にして述べたい。

ゴールド・スタンダードによる試験精度の評価

診断精度と特異性は、分析感度（同義語：検出限界）および特異性（同義語：交叉反応像）に関係している（つまり、それらにより異なる）（Saah and Hoover, 1997）。微生物的病因に関しては、特異性はしばしば1つまたは複数の食品系列におけるスパイク試験で決定される。しかしながら、このような実験は単にフィールド標本の試験能力の

さらなる評価を行うことが価値があることなのかどうかを示唆するにすぎない。検出限界が低いことが実験でわかっている PCR アッセイを用いた例は数多く存在する。しかし、マトリックス中のインヒビターの影響を受けたり、DNA 抽出物がフィールド標本の陽性成績をしばしばもたらすといった問題を抱えている。試験精度の真の指標、したがって試験の利用性は、対象の分析物の濃度が典型的な範囲のフィールド標本に対していかに能力を発揮するか、である。

フィールド標本に対する診断能力の評価はいくつかの方法で実施しうる。すなわち、“ゴールド・スタンダード”を利用しうる貯蔵型標本の利用、新規スクリーニング試験の利用、そしてゴールド・スタンダード法によるすべての陽性、陰性試験標本（あるいは無作為標本）の検証、あるいは新法とゴールド・スタンダード法をすべての標本に用いる横断試験法の使用などがある。これらのシナリオに関して、感度や特異性の評価、信頼区間は確実性があり、連続尺度あるいは順序尺度で測られる試験法に対する受信者動作特性によって増強されうる (Gardner and Greiner, 2006)。感度や特異性評価において偏見がないことは評価の精度よりも重要であると思われ、それは標本サイズに依存する。偏見はしばしば試験評価研究のデザインの欠陥に起因し、偏見の源は不適切な参照試験（ゴールド・スタンダード）の使用、試験成績の非盲検的評価の使用、そして不適切なスペクトラムをもつ疾患患者の使用が含まれる。微生物病因とその産生物の混合物において、後者は微生物濃度のスペクトラムに等しい。試験法のバリデーション研究計画に関する疫学の問題は他の場所で詳しく述べられている (Greiner and Gardner, 2000)。すべての食品材料、動物および環境中の微生物病原体を検出するために用いられている試験法の感度と特異性を評価することは一般的に難しい。その理由としては、極めて多数の試験法があり、目的も多様であり、同意されているバリデーションの基準となるものがなく、またレベルが高く科学的な研究をデザインできる通常のタスクがないからである。

ある一つのバリデーション基準をすべての診断試験に応用したり、それらの応用の可能性を模索することはできない。例として、*Salmonella* spp に対する新しい PCR 法の評価を考えてみる。PCR の感度を左右する要因にはサンプル中の微生物の数、重量、体積、標本基質（例。糞、組織、乳）、抑制因子の存在と濃度、PCR の使用に先立って濃縮や選択的な増殖を行う検査技術（例。事前濃縮法、増菌法、平板培養法）などが含まれる。仮に感度や特異性の推定値が存在するときでさえも、その推定値はしばしば不正

確で不明確（大きすぎる信頼区間として表出される）である。なぜならば、単に限られた数の標本が評価を受けるにすぎないからである。

細菌、ウイルス、寄生虫の分離のような試験に関しては完全な特異性があるだろうと想定することは、高いレベルの信頼されたプロトコルを有している経験からして正当なものであろう。しかしながら、他のすべての状況において試験は、証明されないかぎり不完全な感度と特異性を持っていると仮定すべきである。

ゴールド・スタンダードをもたない試験精度の評価

試験評価のための Latent-class 法(潜在的階級法)（しばしば“非ゴールド・スタンダード法”と呼ばれる）は、評価データの分析に対して完全に感度の良い特別な試験であること（ゴールド・スタンダード）を要求しない。したがってゴールド・スタンダードのアプローチよりもむしろフレキシビリティの方が優先される。その方法は最尤（ゆう）推定を含む frequentist であるかまたは Bayesian（ベイジアン）のいずれかに分類される。Bayesian はデータ分析に適用される様々な試験のうちの一つについて優先的な情報を与える。

Frequentist アプローチは 1980 年代 (Hui and Walter, 1980) に発展したが、その“ブラックボックス”的なアプローチとその方法を満たすための手っ取り早いソフトウェアが無いために、健康科学の一部の分野で最近ようやく受け入れられはじめた方法である。現在、これはインターネットに基づく様式に変わっている (Puillot et al., 2002)。Bayesian 法は、シェアウェアプログラムである WinBUGS ([http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.](http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml)

shtml) によって一部ではより知られてきている。WinBUGS は、研究者が多変量試験や多母集団を含む多くの異なった研究デザインを処理できるようになっている。これらの方法は多母集団や多変量試験で適用されるけれども (Branscum et al., 2005)、ML および Bayesian 法で解が得られるもっとも単純なケースは 2 試験/2 母集団に基づく結果である。ML モデルにおける assumptions inherent に従えば、6 つの変数、すなわち 2 種類の感受性、2 種類の特異性および 2 種類の発生、を仮定する上で十分な自由度を持っている (Enoe et al., 2000 for mathematical results)。ここでなされる仮定は、母集団および条件付独立の両方において一定の感度と特異性を有しており、2 種類の試験に特異性である (Gardner et al., 2000)。条件付独立の仮定は試験が異なった生物学的現象を測定するとき（たとえば、一方の試験は抗体を測定し、他方の試験が抗原を測

定する)には合理的であるように見える。一方、たとえば両方とも抗原を測定する試験では、それらの検出限界が実質的に異なる限り、独立ではないとみなされる。

Bayesian 法では、すべての変数は不確実であり、もし得られる場合には試験精度に関する事前の科学的知識は観察試験結果に基づく確からしさの情報に関連している。試験精度に関する事前の知識は、その題材の専門家から得ることができるか、あるいはすでに公表されている精度評価成績から得ることができる。そして通常、ベータ分布様式の解析に組み込まれる。感度、特異性、発生頻度に関する事後推計(推論)は、事前の仮定分布に実際の確からしさを合わせることによって得られる。ギブス標本は正確な事後推計に数値的な近似性を得るために用いられる。メジアン(または中央値)および95%信頼区間はモデルの変数の事後推計のために用いられる。Bayesian 分析においては、モデル変数に関する事前選択の影響を評価すべきであり、すべてのモデルは収斂するかどうかを確定するためにチェックされるべきである。公表されている論文(Hoorfar et al., 1999; Gardner 2004; Mainar-Jaime et al., 2007)からの潜在階級法の例は、アプローチの利用法を例示し、その方法論の長所や限界を主張している。

結論

この発表で述べるコンセプトは食品中の毒物や他の残留物を検出するための評価研究を試験するためにも応用されるものである。ゴールド・スタンダード法は標本の大きさが同じ場合の推定の精度を増大させるけれども、不適切な参照試験は推定における実質的な偏見を与えうることにもなる。

後者の理由に関しては、潜在階級法における完全な参照試験の固定観念を取り除くことで試験精度に対する新たな洞察をもたらすことが可能になる。実施するためのソフトウェアは今ではすぐにでも入手できる状況であるが、方法論の信頼性を確保するためには十分に練られた研究が重要である。

これらの方法、とくに Bayesian 法に関するより詳しい情報は www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/ で入手可能である。いくつかの共通したシナリオに関する例示や標本コードがそれらには含まれている。

食品安全問題に関わるリスクベースのサーベイランス

Katharina D.C. Stärk

英国王立獣医大学獣医臨床科学部、教授

サーベイランスは、ある決定を行う際の根拠として使用される際の元となる情報を得るために、ある健康指標に関連するデータを継続して収集する作業であると定義される。動物由来食品の安全性という意味では、サーベイランスの通常の目的は消費者の健康を守り特定の目標を遂行することである。それらには、病原体や物質（例. ダイオキシン）が含まれていないことを明確にしたり、（大腸菌の例のような）衛生上の許容レベルの設定や（サルモネラ菌のような）病原体に対して行った対策努力の効果として減少傾向がみられるかどうかといった監視が含まれる。サーベイランス作業には一連の活動、データ収集、データ分析、結果の解釈そして総括あるいは調停が含まれる（図1）。

食品安全への脅威の進行に伴って食品安全に関するデータの必要性和、したがって食品安全サーベイランスに対する必要性が高まっている。とくに動物由来食品の国際間貿易に参加している国々ではこの要求が高い。国際貿易に関連した食品安全問題でもっとも知られている例はBSE、抗菌剤残留、食品汚染、遺伝子操作食品である。

「衛生と植物防疫の措置に関する WTO 協定」(www.wto.org)や「コーデックス食品規格」(www.codexalimentarius.net)に従えば、輸出国は、輸入国がリスクに基づいた輸入決定を認可するために、輸入国に対して危害となるような食品安全に関するサーベイランスデータを提供することが求められている。

しかしながら、サーベイランスプログラムの実施や作業の持続のために役に立つ原資は制限されており、人的、財政的な能力を最良に利用するためには優先度を高めるべきである。

リスクアセスメントは構造的で透明性を有した科学的アプローチである。それはリスクの順位付け、つまり優先度を定めるためにある。リスクアセスメントの原則に関する国際ガイドラインはコーデックス食品合同委員会および国際獣疫事務局（OIE）によって進められている。ある病原体（または物質）ないしは特定の集団に優先的に注目して

いわゆる“risk-based”サーベイランスシステムを計画するための様々なリスク評価手法が提案されている。

財政投入に対する最大の情報が得られる費用対効果サーベイランスシステムを構築することが目標である。これは同じレベルの財政投入に対するより高い情報レベルをもたらすか、あるいは等しい情報量で費用を削減することができる(Stärk et al., 2006)。一般のサーベイランスに比べて“risk-based”サーベイランスを利用する価値はそれゆえ費用対効果の増大によって実証される。これはある特定の病原体や物質に対して得られる情報のレベルを高めるか、あるいは様々な危害に取り組む際に利用できる資源の自由度を高めることによって消費者の安全性の増大を導くことができる。

サーベイランスシステムの様々な段階でリスクアセスメント手法が用いられている(図2)。サーベイランスプログラムにおいては、リスクアセスメントはまず関与する病原体や物質の同定、あるいは病原体+物質を同定するために利用される。リスクアセスメントはサーベイランス作業によってターゲットとなるべき集団や生産物を見極めるためにも用いられる。この応用は“標的サーベイランス”とも言われる。後者のもっとも確立された例は様々な肉牛集団におけるBSEのサーベイランスが挙げられる。BSEに関しては今やOIEの国際ガイドラインにおいて十分に統御されており選択方法として受け入れられている。

risk-basedサーベイランスプログラムを計画する際はリスクアセスメントが導入されるべきである。ここではデータ入力が必要であり、その多くはそれ自身がサーベイランス作業から起こるものである。リスク要因に関する知識が要求され、それゆえrisk-basedサーベイランスのためにそれが要求される。これは、risk-basedサーベイランスが初期投資を必要とし、我々がわずかな限られた知識しか持っていない危害に対しては応用することができないことを意味する。また、risk-basedサーベイランスの価値はまれに生じる出来事、たとえば発生率が非常に低い病原体、に対してもっとも高いことが実証されている(Presi et al, in press)。このアプローチの有益性はそれゆえ珍しい出来事に対して高く、そしてリスク要因に関する知識やリスクアセスメントを導くデータがすでに入手できているときに高い。いかなるときでもサーベイランスとリスクアセスメントの間には緊密な相互関係があり、これはサーベイランス計画の行き届いた調和をもたらす(Fig. 3)。

更新されたリスクアセスメントは標本を抽出するためのよりよく的が絞れた集団対象あるいは生産物を導き、したがって risk-based サーベイランスの有益性を十分に引き出すことが可能になる。しかしながら入力データが正確でなかったり、リスクアセスメントが不完全な場合は risk-based サーベイランスからの結果は偏ったものになるかもしれない。

重要な注意点：診断試験の能力（特異性、感度）、適切な標本サイズの算定、標本の無作為選抜のような基本的な疫学原則は、通常のスーベイランス計画においても今回の risk-based サーベイランスにおいても同じである。あくまでもスーベイランスの目的は決定のための説得力のある根拠をもち偏見的でない結果を得ることである。

健康評価過程における獣医疫学の役割： 抗菌剤耐性問題への理解と解決

David A. Dargatz DVM, PhD

米国農務省動植物検疫部、疫学・動物衛生センター、フォートコリンズ、コロラド

抗菌剤耐性による脅威に対する世界的な関心が高まっている。この関心はヒトと動物のいずれの領域においても等しく含まれる関心事である。耐性菌による感染は治療を複雑にし、治癒を予測することを潜在的に難しくしている。抗菌剤耐性が高まっていることが明らかになっている細菌のリストが増えてきている。これらの細菌の多くは院内感染に関連している。しかしながら、これらの細菌感染の一部は市中感染であり、一部は食品由来で起こっている。そのため動物管理者や獣医師の間での抗菌剤耐性に関する関心は動物自身への害作用のみならず、消費者への害作用にまで及んでいる。

増大している抗菌剤耐性問題の源についてはかなり多くのデータベースが存在する。疑いもなく、ある状況下では抗菌剤の使用が耐性微生物を淘汰させ、それらの集団を増幅する上で役割を演じている。しかしながら、細菌の適応値の増大を招く他の関連遺伝子による耐性集団への共淘汰 (co-selection) の潜在能力も明らかに存在する。さらに、病原性（あるいは変利共生）の耐性微生物は一つの生態的位置から他の環境位置へと移行することができる。

抗菌剤耐性の問題を取り扱う上での方針を発展させる上で、正当な証拠に基づく決定を行うことが重要である。疫学的方法論は抗菌剤耐性の生態に対する我々の理解を向上させるデータを提供するために用いられる。これらのデータはリスク評価過程で用いられるが、その過程では方針決定を行う際に考慮すべき証拠の重み付けがなされる。疫学の中心的要素は疾患の分布と決定因子に関する研究である。このような症例疾患では耐性菌の発現率が明確にされ、それゆえ疫学は抗菌剤耐性頻度の上昇（または下降）に寄与する要因を明らかにするために用いられる。様々な疫学的アプローチは証拠の重み付けの大小に関連してなされている。

- ・感染症勃発の際の調査研究は何らかの新しい傾向があるか、あるいは緊急事態であるかを見極める上で役に立ち、しばしば相関性を示唆したり仮説を生み出す上で最適なものである。
- ・横断的研究あるいはコホート研究のような広域研究は、より広い集団の潜在的なリスク要因に関するデータの収集を可能にするが、リスク要因と転帰との間の関連性を同定したり、あるいは仮説を生むためにしばしば用いられる。

- ・臨床的な試行や実験的な研究ははるかに条件が整っており、より条件があいまいな研究で得られた因果関係を確定するために用いられる。
- ・メタ分析（集積分析）は様々な研究からのデータを一緒にして統合分析にかけられるもので、証拠における一貫性を探するために先行する研究の強みと弱みを検討する。

十分にデザインされた疫学研究はまた複雑系の動態を理解するために利用することができるモデリング作業のための指標（変数）を提供する。多くの方法を用いた正当な疫学研究を通じて、様々な生態的位置における抗菌剤耐性のような複雑な問題を理解するためのデータを集めることができる。さらに、疫学は、ある一つの生態的位置の中の活動が他の、おそらく遠隔地や一見関係のなさそうな生態的位置の結果に影響を及ぼすような生態的位置の潜在的なリンケージを明らかにする上で有用である。サーベイランスや方針に関する最適な決定は、抗菌剤耐性の生態をよりよく理解することを通じてのみなされる。

タイにおける高病原性鳥インフルエンザの疫学

Suwicha Kasemsuwan

(タイカセタート大学獣医学部)

高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)の H5N1 は 1997 年に香港で初めてその人獣共通感染性が報告された。タイのディベラップメント (DLD) (獣医当局) はニューカッスル病とともに HPAI に関する能動的、受動的サーベイランスを実施しているが、HPAI はかつては検出されていなかった。タイにおける最初の HPAI 症例は 2004 年 1 月 23 日に確定された産卵鶏であった。発生が確認されるやいなや DLD は、この高度に伝染性の動物疾患を把握するために、獣疫条例 B.E. 2499 (A.D.1956)によって直ちに疾病制圧の対策に乗り出した。HPAI に対する緊急時対応計画が速やかに実施に移され、予防および制圧の方策が実施され疫学的知見に依存しながら状況の推移を監視した。2004-2007 の間に明らかな潜伏期をはさんで 6 回の明瞭な流行が生じた。後半の流行の大きさと強さは産業界の疾患制圧努力の結果として著しく減弱した。

タイの H5N1 発生は次の 6 回の流行期に分類される。最初の流行は 2004 年 1 月 23 日に始まって 5 月 25 日までの期間で、42 の県で 190 例が生じ、約 3000 万の鶏が廃棄された。その後状況は安定し、2004 年 7 月 2 日までそれ以上の発生例は鑑別されなかった。2 番目の流行は 2004 年 7 月 3 日から 2005 年 4 月 12 日までで、この間に 51 の県で 539 の発生がみられた。3 番目の流行は 2005 年 7 月 1 日から 11 月 30 日までで、発生の大きさは 2 番目の流行より 20 倍小さかった。それ以降は、2006 年 7 月 18 日にタイの北東地域の県での産卵鶏に、2006 年 7 月 23 日にタイ中央部の県で地鶏に発生がみられた。2007 年 1 月 10 日から 23 日の間に再び発生した。最後に報告された発生は 2007 年 3 月 9 日で北東部の県での地鶏であった (Table 1)。

タイにおける動物の HPAI サーベイランスシステムは、能動的および受動的サーベイランスを持っている。受動的サーベイランスシステムの感度は症例の定義を通して調整される。最初の流行波の間、家禽類に適用された本疾患の定義は、過度に潤んだ眼と副鼻腔炎、とさか・肉髯・脛のチアノーゼ、頭部の浮腫、縮れた羽毛を伴う重度の呼吸症状、下痢、神経症状、そしてほとんど 100%の突然死あるいは 3 日以内に何ら目立った徴候もなく 40%以上の累積死亡率を示すものである。

この HPAI 症例の定義は、2004 年 7 月に死亡率を「1 日以内に 10%以上」と変える修正がなされ、2005 年 7 月には再度の修正がなされた。すなわち、「農場鶏 (farm poultry)

に対しては2日以内の累積死亡率が1%以上」、「庭先鶏 (backyard poultry) に対しては2日以内の累積死亡率が5%以上」とした。

もしいずれか一つの基準が観察されるならば、疾患制圧対策が直ちに執行されるであろう。受動的サーベイランスシステムとは別に、能動的サーベイランス活動が実施されており、それらは **Table 3** に掲載している。x-ray と書いているのはターゲットサーベイランスを意味している。タイにおいて実行されている H5N1-HPAI の制圧方策は有効であることが証明されている。しかしながら、起こるかもしれないいかなる勃発も検出するために能動的サーベイランスを続けるべきである。このシステムを使うことで、感染鶏の検出率は受動的サーベイランスシステムに比べて増大してきている。労働と費用の面から、このターゲットサーベイランスの適用地域は高リスク地域に準じて選抜されてきている。

アジアにおける高病原性鳥インフルエンザの疫学

筒井 俊之

独立行政法人動物衛生研究所 疫学研究チーム

H5N1 によってもたらされる高病原性鳥インフルエンザは近年、アジア地域に拡大している。この疾患は家禽産業に深刻な影響を及ぼしているが、その経済的損失はアジア地域で 100 億～150 億ドルに上ると見積もられている。アジア地域における本疾患の状況は国家間で異なっている。

日本、韓国やマレーシアのような国では、疾患の侵入後早期の撲滅に成功している。早期の検出と迅速な対応が早期の撲滅の成功への鍵であった。これらの国では補償金の特別手当を含む必要な制圧対策を適用するのに十分な余裕と能力を有している。他方、中国やインドネシアでは本疾患は地方病的流行となり、他の影響を受けている国々では散発性の発生が続いている。これらの国々は適切な対策を達成するための資源やインフラに何らかの制約を抱えている。加えて、家禽生産や市場システムの特徴が疾患をコントロールする上で困難さをもたらしている。生産者から消費者へ家禽の流れは、ワールドチェーンシステムが十分に発達していない多くの国では生きたままの家禽市場に依存している。これらのマーケットではある場所で多くの家禽種が混ざり合っており、疾患が個体間で伝達する機会を増やしている。結果的に、感染鶏が市場を通じて他の地域へと分布していくことになる。

放飼鶏の小規模所有は本疾患の拡散をコントロールする上で別の困難さをもたらしている。これらの鶏はしばしば、とくに農村地帯における世帯収入源として重要な役割を担っている。これらの家庭は居住区域の周辺を自由に動き回り、付近の養鶏場にすら出入りすることもある鶏を所有している。これらの鶏の異常な徴候を獣医師が認識していないことも少なくない。他のリスク要因はこれらの国では大きなアヒル集団を有していることである。アヒル生産システムは大部分が米の生産現場につながっており、貯水池を有効に使っている。しかしながら、アヒル集団はウイルスの温床となり、彼らの移動がウイルスの拡散を起こすことになる。この地域では疾患を制御するためのいくつかの強制がある。しかしながら、国際組織やドナー国の協力下のこれらの強制を実際の活

動の方が上回る勢いで増大している。この地域がハーモナイズされた統制戦略を発展させるためには国境を越えた人や産物の活発な移動に考慮する必要がある。

鳥インフルエンザ(H5N1) ウィルスの疫学的考察

小澤 義博

国際獣疫事務局(OIE)名誉顧問

1、伝播方法と H5N1 ウィルスの起源

鳥インフルエンザ(AI)は通常、感染した鳥やその排せつ物により広がる。また AI は機械的・人為的に汚染した食品、水、飼料、土、車、人、動物、器具、衣服、ハエ、羽毛などにより伝播する。AI ウィルスは感染した鳥や汚染製品の国内・外の貿易によっても広がる。野鳥、特に水鳥は、全てのタイプの AI ウィルスの保有宿主として認められている。犬・猫などの哺乳動物は AI ウィルスに感染することが知られているが、それらは通常最終宿主であると考えられている。

H5N1 ウィルスは 1996 年に中国の広東州で始めて発見された。1997 年にこのウィルスは香港の家禽市場で大流行し、18 人の感染者の中 8 人が死亡した。このウィルスは香港の全ての家禽を殺処分することにより、撲滅に成功した。しかし 2002 年には H5N1 ウィルスの変異株が香港で発生し、その後分岐しながら東南アジアに拡がり各国に大打撃を与えた。これらのウィルスは V1, V2, V3 とインドネシア群の 4 つの分岐に分けられている。2003 年末から 2004 年にかけて韓国と日本に発生した H5N1 ウィルスは広東株/174/04 株に似たウィルスで上記の 4 つの分岐群に含まれていない。

2005 年 4 月には野鳥(渡り鳥)と家禽の両方に高い死亡率を示す H5N1 ウィルスの変異株が、中国のチンハイ(青海)湖で生まれた。このウィルスは渡り鳥によって西方に拡がり、シベリア、カザフスタンやトルコ方面に急速に拡がった。野鳥にこれまで見られたことのない高い致死率を示すこのウィルスは、鳥インフルエンザの歴史に新しい頁を開き、ヨーロッパ、中近東やアフリカに短期間のうちに広がってしまった。この H5N1 ウィルスは EMA1, 2, 3 の 3 つの分岐群に分けられ、中近東、ヨーロッパ、アフリカ各地に拡がり今日にいたっている。また 2007 年に日本で再発した H5N1 ウィルスは、青海系統のウィルスに属することが分かっている。

2、ヨーロッパにおける H5N1 ウイルスの現状

欧州連合(EFSA)は渡り鳥による H5N1 ウイルスのヨーロッパ侵入のリスク評価を行い、感染した野鳥の受動的・能動的な監視を 2005 年 7 月に開始した。このリスク評価によると、このウイルスは野鳥によりヨーロッパに侵入するだけでなく、ヨーロッパ内に定着するリスクがあることを示唆した。そこで欧州連合は加盟国に次の対策を奨励した。

- a) 野鳥と家禽の AI ウイルスの監視を強化すること
- b) 屋内で飼えない動物園の野鳥類にワクチンを接種すること
- c) AI の高リスク地区の家禽を屋内で飼育すること
- d) 屋内で飼育できない家禽にワクチンを接種することであった。

2005 年から 2006 年にかけて H5N1 ウイルスはヨーロッパ 25 ヶ国で発見された。家禽での発生は、東欧 13 カ国と西欧 4 カ国（スウェーデン、デンマーク、ドイツ及びフランス）で報告された。これら欧州における H5N1 ウイルスの急速な伝播には渡り鳥が主役を果たしたものと考えられる。

2006 年に実施された EU のリスク管理の結果をまとめると、

- i) 動物園の野鳥はワクチン接種により感染を防止することが出来たが、ワクチン接種によるストレスでショック死した野鳥が多数出た。ワクチンを接種しなかったドイツでは感染例があった。
- ii) 野鳥の監視強化は AI の早期発見につながり、家禽生産者の警戒態勢を早期に強化することにより被害を最小限にとどめることが出来た。
- iii) 家禽や観賞用の鳥の大量殺処分を防止し、経済的被害は最小限に止めることが出来た。

しかし 2007 年に入ると再びハンガリー、イギリス、チェコ、フランス及びドイツで H5N1 ウイルスの散発的発生が見られた。これは H5N1 ウイルスが東欧(ハンガリーやチェコ)やロシアの一部に定着していたことを示唆している。

3、中近東とアフリカへの伝播とアメリカ大陸における監視

中近東諸国への H5N1 ウィルスの侵入は、野鳥の移動だけでなく、感染した家禽とその産物の移動によって起こったものと考えられる。2005 年 10 月から 2006 年 12 月までの間にトルコ、イラク、イラン、グルジア、カザフスタン、アフガニスタン、パキスタン、イスラエルで発生が報告された。また 2007 年には再びパキスタン、トルコ、アフガニスタン、クウェート、サウジアラビアで発生があった。これらの国で分離されたウィルス株は、2 つの分岐群 (EMA1 と EMA3) に分けることが出来る。

東アフリカでは 2006 年 2 月にエジプトで H5N1 の発生が報告されて以来、スーダン、エチオピア、ジブティに拡がった。これらの国で分離されたウィルス株は EMA1 の分岐群に属している。

西アフリカでの発生は、2006 年 2 月にナイジェリアで最初の報告があり、その後ニジェール、カメルーン、ブルキナファソ、コートジボアール、ガーナ、トーゴなどに拡がった。この広がりには主として人の活動が関与したものと考えられる。西アフリカで分離されたウィルスは EMA1 と EMA2 の 2 群に分けられるが、これはナイジェリアに 2 つのルートで H5N1 ウィルスが侵入した可能性を示唆している。

アメリカ大陸では、アメリカ合衆国(アラスカを含む)とカナダで集中的な野鳥のサーベイを行って来たが、今日までのところアジアに発生した高病原性の H5N1 ウィルスは発見されていない。しかしアメリカ合衆国では、起源の異なる低病原性 H5N1 ウィルスが 2006 年に分離されている。

かように、地球上の約半分の地域の国々が一年たらずの間に H5N1 ウィルスによる攻撃を受けたが、その主な原因は主として渡り鳥による長距離の伝播があったためと考えられる。また、これらのウィルス株は少なくとも 3 つの分岐群 (EMA1, 2, 3) に分けることが出来る。

4、AI の予防・防疫に関する改善策

20 世紀末までの伝統的な AI 対策では、AI が養鶏場で発生してから緊急防疫対策が開始された。AI の主な対策は感染した鳥群及び近隣の感染リスクの高い家禽群の殺処分、家禽や動物や鶏卵の移動の禁止、養鶏場等のバイオセキュリティの強化および幾つかの国ではワクチン接種などが実施されてきた。

2006年/2007年におけるヨーロッパ(特に西ヨーロッパ)諸国の経験から、EUはAIの発生が起こる以前に採るべき対策として下記の対策を重要視するようになった。

- a) 感染した野鳥によるAI侵入のリスク評価を行うこと
 - b) 野鳥の感染が発見された場合、近隣の家禽や屋外飼育の鳥類を一定期間屋内飼育にかえること
 - c) 感染地域内では感染野鳥の調査のみならず、屋内飼育の家禽の健康状態を毎日1~2度調査すること
 - d) 感染もしくはその疑いのある鳥や犬・猫などの動物の安全な処置と、汚染現場の消毒を行うこと
 - e) 動物園飼育の野鳥類及び屋内飼育の出来ない家禽にワクチンを接種すること
 - f) ワクチンを接種した鳥を移動(出荷)する場合は、感染の有無の検査(DIVAテスト)を行うこと
 - g) ワクチン・バンクの設立と、AIが発生する前に緊急事態に備えてワクチン接種計画を建てておくこと
- 等である。

5、人のパンデミックウイルス発生のリスク

人から人に感染を起こすH5N1ウイルスの世界的規模での監視は今までも、またこれからも続けられる。2003年以来H5N1ウイルスに感染した人は合計330人、その内202人が死亡したと報告されている(2007年10月10日現在)。しかし今日までに人から人へ感染した疑いのあるケースは、インドネシアの1例のみである。人から人へ急速に感染するウイルスの発生のみならず、最悪の場合、そのウイルスが人にも鳥にも高病原性と高伝播性を有し、人の移動によりAIが世界中に拡がってしまう可能性がある。このような緊急事態が生じた場合、世界的な大災害を防止するための疫学的対策を、今から研究しておく必要がある。

細菌性食中毒：発生状況と対応

熊谷 進

東京大学大学院農学生命科学研究科、教授

第二次世界大戦後、食品衛生法の下に食中毒の報告のシステムが整ってからは、患者数は最初の数年間を除き毎年2-6万人で推移してきた。この間、死亡者数は年間数百万人から徐々に減少し、この約20年間は年間10人前後で推移している。この減少は、食品衛生の向上によるとともに、医療の進歩によるところが大きい。この約半世紀間、患者数に減少傾向が見られないのは、食中毒病因物質の種類が漸次追加されてきたこともあって、報告される事例の割合が増加してきたことと、食品の製造流通規模の大型化に伴う大型食中毒事例の発生を反映したものと考えられる。

この十数年の細菌性食中毒発生の特徴はとくに、サルモネラ、腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌、カンピロバクターに見ることができる。サルモネラ食中毒は、欧米諸国に少し遅れて平成4年頃から、鶏卵のサルモネラ・エンテリティディス汚染に起因して年々増加したが、平成10年頃から減少し現在に至っている。平成6年に厚生省は、殻つき卵の表示について、①生食用または加熱用の区別、②生食用の消費期限、③製造者等を、また、液卵については、低温殺菌をしていない液卵を使用する場合の加熱等を義務付けた。

腸炎ビブリオ食中毒はもともと我が国において、最も発生頻度が高く患者数も多い食中毒と認識されていたが、平成4年に著しく減少してから再び平成9年と10年に増加したが、この増加は東南アジアや米国においても同じ時期に増加が認められた血清型O3:K6による食中毒の増加を反映したものである。その後、加熱後の冷却や魚介類の洗浄に沿岸海水を使用しないことの指導が行われ、生食用の魚介類食品に対して腸炎ビブリオの基準を設定することによって、衛生管理の指導強化が図られた。平成11年から腸炎ビブリオ食中毒は減少した。

平成8年に腸管出血性大腸菌による大規模食中毒事例が相次いで発生した。学校給食等の大量調理施設の衛生管理の強化や食肉処理工程の改善が速やかに図られ、その後、食中毒は減少したが依然として集団事例は見られる。カンピロバクター食中毒は平成9

年から増加し、その後、食鳥処理場における衛生水準の向上への対策が講じられたが、減少せずに現在に至っている。

以上のように、細菌による食中毒事例が増加するごとに、原因食品や汚染経路、食材の汚染実態や汚染機序などの調査を踏まえ、食中毒発生防除のための対策が講じられてきた。その後の食中毒発生状況から、それら対策の多くが功を奏したと考えられるが、その科学的裏付けを得ることが今後の食中毒対策を講じる上で重要であると考えられる。加えて、今後とるべき対策の効果を予測するために、微生物学的リスク評価手法を十分に活用することが望まれるが、さらにその精度を高めるために、食中毒細菌の挙動や病原性の研究ならびに同細菌に対する人の感受性に関わる研究の発展が望まれる。

生産段階における鶏サルモネラ症の制御

中村 政幸

北里大学獣医学部獣医学科
人獣共通感染症学研究室、教授

サルモネラ食中毒の原因として、*Salmonella* Enteritidis (SE) による鶏卵汚染および *S. Typhimurium* や *S. Infantis* による鶏肉汚染がある。

1. 鶏卵の SE 汚染

1980 年代前半に、エリート鶏が何らかの要因で SE に汚染され、原種鶏、種鶏を毎年約 100 万羽輸入しているわが国も影響を受け、輸入検疫で一部は淘汰されたが、汚染ひなが国内に開放された。その後、コマーシャル採卵鶏も介卵感染によって汚染され、SE 汚染卵が市場に出回り、1989 年頃から SE 食中毒が増加した。食中毒事件数では、1992 年にはビブリオ食中毒を抜いて食中毒の第 1 位を占め、その後、2003 年まで第 1 位や第 2 位を占め、現在は第 3 位に位置している。

生産段階、すなわち採卵鶏農場では、1990 年代前半は 10 数%が SE に汚染され、その後 2000 年代初頭には数%にまで減少したが、その後の減少は非常にゆるやかであるらしい。このような SE 汚染農場の減少には農水省の輸入検疫の強化や厚生労働省による卵の賞味期限の表示などの法的規制も効果的であった。また、野外でも社会問題化した卵のサルモネラ汚染に対する関心は高く、種々の対策が取られた。その代表的なものとして、生産者の衛生管理の強化、あるいはワクチン、CE 製品、生薬、生菌剤などの使用があり、効果が認められている。このような対策により、わが国では生卵を食べているのに拘わらず、英国や米国より食中毒患者からの SE 分離株数の減少率が際だって高いことは注目に値する。

なお、食品安全委員会は昨年から自らの判断で食中毒に対するリスク評価を実施している。現在、不足する情報の収集に努めており、リスク評価終了後、厚生労働省と農林水産省に勧告することになっている。

2. 鶏肉のサルモネラ汚染

鶏肉の SI や ST などによる汚染を原因とする食中毒の原因としては、飼育中のブロイラーが環境やサルモネラ汚染飼料の給与により感染（主として腸管内感染）し、食鳥処理場での交差汚染によって鶏肉が汚染されるルートが多い。

ブロイラー農場のサルモネラ汚染率は 50%以上であるとの報告が多く、血清型では SI が最も多く、鶏肉の汚染率もこれを反映したものになっている。ブロイラーのサルモネラ汚染に対する規制はないが、農場段階での対策として、CE 製品、生薬、生菌剤などの使用が報告されている。