

環境中の薬剤耐性に対する イニシアチブ

現状と課題

Initiatives for Addressing
Antimicrobial Resistance
in the Environment

Current Situation and Challenges



U.S. Centers for Disease
Control and Prevention



UK Science
& Innovation
Network

この科学白書は、薬剤耐性（AMR）に関する専門家によって、環境中の AMR に関するエビデンスを収集・整理し、環境中の AMR に対する知識の格差を是正するために作成された。この白書についての議論は、専門家が一同に会した、2018 年 4 月に開催された、U.S. Centers for Disease Control and Prevention（米国疾病予防センター）、the UK Science & Innovation Network（英国科学イノベーションネットワーク）、および Wellcome Trust（ウェルカムトラスト）の主催する国際環境 AMR フォーラムで行われたものである。

本書は、「環境中の薬剤耐性に対するイニシアチブ：要約（Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment: Executive Summary）」と並行して発表された。本書と、国際 AMR フォーラムで行われた関係者らによる議論は、この要約にまとめられている。この要約はオンラインで入手可能である。

<https://wellcome.ac.uk/sites/default/files/antimicrobial-resistance-environment-summary.pdf>

本書を引用する場合：

Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment: Current Sitation and Challenges. 2018.

<https://wellcome.ac.uk/sites/default/files/antimicrobial-resistance-environment-report.pdf>

目次

日本語作成にあたって...	4
略語集...	5
はじめに...	7
人および動物の汚染...	8
抗微生物薬の製造と廃棄...	29
農薬として用いられる抗微生物剤...	41
図表...	58
参考文献...	69
用語集...	83
謝辞...	86

日本語版作成にあたって

本文書は、Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment (2018 年 12 月、Center for Disease Control and Prevention (CDC)、Science and Innovation Network、および Wellcome Trust) を日本語に翻訳したものです。

翻訳に関しては細心の注意を払いましたが、正確性を完全に保証するものではないため、必要に応じて原文もご参照ください。

本文書の無断での転載を禁止いたします。

本日本語版は、厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「環境中における薬剤耐性菌および抗微生物剤の調査法等の確立のための研究」(H30-新興行政-一般-002)の研究班(研究代表者:金森 肇)において作成されました。

翻訳者:

- 金森 肇 東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座 総合感染症学分野 講師
- 黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター センター長
- 渡部 徹 山形大学農学部食料生命環境学科 教授
- 山口 進康 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部 課長
- 楠本 正博 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究部門細菌・寄生虫研究領域 ユニット長
- 馬場 啓聡 東北大学大学院医学系研究科 感染制御インテリジェンスネットワーク寄附講座 助教

略語集

3GCs (third-generation cephalosporin): 第三世代セファロスポリン

3GCREC (third-generation cephalosporin resistant *Escherichia coli*): 第三世代セファロスポリン耐性大腸菌

ADI (acceptable daily intakes): 一日摂取許容量

AMR (antimicrobial resistance): 薬剤耐性

AOEL (acceptable operator exposure level): 作業者曝露許容量

APIs (active pharmaceutical ingredients): 医薬品有効成分(原薬)

ARGs (antimicrobial-resistance genes): 薬剤耐性遺伝子

ARfD (acute reference doses): 急性参照用量

CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention): 米国疾病管理予防センター

CRE (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae): カルバペネム耐性腸内細菌科細菌

DNA (deoxyribonucleic acid): デオキシリボ核酸

ECDC (European Centers for Disease Control): 欧州疾病管理センター

EFSA (European Food Safety Authority): 欧州食品安全局

EPA (U.S. Environmental Protection Agency): 米国環境保護局

ESBL (extended-spectrum beta-lactamase): 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ

FDA (U.S. Food and Drug Administration): 米国食品医薬品局

IPM (integrated pest management): 総合的病害虫管理

LC (liquid chromatography): 液体クロマトグラフィー法

LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry): 液体クロマトグラフィー質量分析法

LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry): 液体クロマトグラフィータンデム質量分析法

MALDI-ToF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry):

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析

MS (mass spectrometry): 質量分析法

MIC (minimum inhibitory concentration): 最小発育阻止濃度

MLST (multi-locus sequence typing): 多遺伝子座配列タイピング

MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*): メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

MRL (maximum residue level): 最大残留レベル

MS/MS (tandem mass spectrometry): タンデム質量分析法

NARMS (U.S. National Antimicrobial Resistance Monitoring System): 米国薬剤耐性モニタリングシステム

NoAEL (No observed adverse effect level): 無毒性量

PCR (polymerase chain reaction): ポリメラーゼ連鎖反応

PFGE (pulse-field gel electrophoresis): パルスフィールドゲル電気泳動法

qPCR (quantitative polymerase chain reaction): 定量ポリメラーゼ連鎖反応

U.K. (United Kingdom): 英国

U.S. (United States): 米国

USDA (U.S. Department of Agriculture): 米国農務省

USGS (U.S. Geological Survey): 米国地質調査所

UV (ultraviolet): 紫外線

VRE (vancomycin-resistant Enterococci): バンコマイシン耐性腸球菌

WGS (whole genome sequencing): 全ゲノムシーケンシング

WHO (World Health Organization): 世界保健機関

WWTP (wastewater treatment plants): 排水(下水)処理場

はじめに

微生物、すなわち細菌および真菌が、抗微生物薬に対抗するため発達させてきた能力である薬剤耐性 (Antimicrobial resistance: AMR) は、優先的に対処すべき公衆衛生上の世界的脅威である。薬剤耐性を持った病原微生物は、時に治療が困難、あるいは不可能な感染症を引き起こす。本報告書は、水・土壌環境が人の健康に影響を及ぼす可能性のある病原性薬剤耐性微生物の発生源となる可能性を示した過去の報告に焦点を当て、環境中の薬剤耐性微生物に対する知識格差や、そのリスクに対し我々が取るべき対策についてまとめたものである。

人の活動により抗微生物薬および薬剤耐性微生物で汚染された環境は、薬剤耐性の発生および拡散の温床となり得る。抗微生物薬や薬剤耐性微生物による環境汚染は、人や他の動物の排泄物や、医薬品製造業者からの産業廃棄物、ならびに抗微生物作用を有した農薬の使用により起こると考えられるが、その規模や具体的リスクは完全には解明されていない。環境における薬剤耐性微生物の存在とその人の健康に対する直接的影響は、今後明らかにすべき科学的課題である。

環境中の抗微生物および薬剤耐性微生物が人の健康や生態系全体に与える影響を評価するためには、更なる研究が必要である。本報告書は、研究者と各国政府および非政府組織を始めとした、環境中の薬剤耐性微生物に関する利害関係者が、その評価法・対象法についての知識格差の是正および、国内的・国際的理解の向上のために協力し活動するための指針として活用されることを意図して作成された。

環境の薬剤耐性微生物による汚染は地球規模の問題であるが、その汚染の程度は国によって、また地域によって大きく異なる。環境中の薬剤耐性微生物に対しては、世界共通の課題として、グローバルな視点からそれぞれの地域の実情に即したアプローチを行うことが肝要であると思われる。本報告書によって、研究者を始めとした利害関係者が、それぞれの地域の状況を踏まえた上で、どのような行動が有益かつ実行可能であるかを理解し、環境中の薬剤耐性微生物の公衆衛生リスク低減に取り組むことが可能になることを期待する。

人および動物の汚染

著者

- Professor Shaikh Ziauddin Ahammad (Indian Institute of Technology Delhi)
- Dr. Matthew Arduino (U.S. Centers for Disease Control and Prevention)
- Professor Ana Maria de Roda Husman (National Institute for Public Health and the Environment, the Netherlands)
- Dr. Lisa Durso (U.S. Department of Agriculture)
- Thomas Edge (Environment and Climate Change Canada)
- Dr. Gary Garber (Public Health Ontario)
- Dr. Jay Garland (U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development)
- Professor William Gaze (University of Exeter)
- Professor David Graham (Newcastle University)
- Dr. Amy Kirby (U.S. Centers for Disease Control and Prevention)
- Professor Timothy LaPara (University of Minnesota)
- Professor Jean McLain (University of Arizona)
- Dr. Clifford McDonald (U.S. Centers for Disease Control and Prevention)
- Dr. Sharon Nappier (U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water)
- Professor David Patrick (University of British Columbia)
- Dr. Emily Rousham (Loughborough University)
- Professor Dov Stekel (University of Nottingham)
- Dr. Edward Topp (Agriculture and Agri-Food Canada)
- Dr. David Verner-Jeffreys (Center for Environment, Fisheries and Aquaculture Science)
- Professor Thomas Wittum (Ohio State University)
- Professor Alex Wong (Carleton University)

要約

- 人および動物からの排泄物(糞便)は人間の医学で重要な薬剤耐性微生物(病原微生物を含む)と抗菌薬を運びうる。排泄物が適切に処理されていない場合(基本的な衛生戦略の実施が不十分な場合等)、環境は抗菌薬および耐性菌で汚染されるかもしれない。
- 環境中の排泄物、抗微生物薬、耐性菌との関係および人間の健康への影響はよく理解されていない。しかし、科学的根拠として抗微生物薬や薬剤耐性因子は環境に拡散し、環境水中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)のような耐性菌の曝露によって感染リスクが高まる。
- 基本的な衛生(人の排泄物を安全に処理するための施設へのアクセスおよび衛生状態を維持する能力を含む)は多くの疾病を予防する上で非常に重要である。

人由来の排泄物

- 世界の衛生設備の多くは不十分であり、人の下水の一部しか適切に処理されていない。地球規模では、人の排泄物の大部分は処理されずに環境中に直接廃棄されている。排泄物が薬剤耐性病原微生物を含む場合、環境中のこれら病原微生物への曝露によって人の感染リスクが高まる。地球規模での衛生アクセスを向上させることで、潜在的なリスクを低減しうる。
- 下水処理場、あるいは浄化槽システムのような他の衛生戦略は、排水から耐性菌を含めた糞便中に含まれる細菌を減らすのに不可欠である。しかし、耐性菌のレベルが高い場合には、これらの衛生戦略は不十分であるかもしれない。環境水中の耐性病原微生物の評価は不十分な衛生戦略を特定するために有用である。
- 下水処理場への流入水における抗微生物薬および耐性菌の主要な供給源は医療施設である。最も薬剤耐性の高度な微生物による感染症は、入院治療中で、抗微生物薬の投与を受けている患者に生じる。耐性微生物は医療施設の配管システム（シンクおよび排水管等）に定着し増殖しうる。定着した薬剤耐性微生物は、入院患者に感染を起こし得ることが知られている。
- 一般集団からの下水中の耐性菌のレベルは地理的に異なるが、耐性菌のレベルが高く、衛生設備が不十分な場合は、下水は環境中の耐性菌の供給源である可能性がある。
- 研究により、表層水（河川、沿岸水）に検出可能なレベルの耐性菌が認められ、汚染水との相互作用によりこれらの微生物に曝露された人で感染症を発症した。

動物由来の排泄物と水産養殖

- 抗微生物薬が食用動物に使用される場合、動物の糞尿は抗微生物薬と耐性菌とを運びうる。どのくらいの期間、耐性微生物が糞尿中に、その後環境中に残存するのかは不明である。
- 動物の糞尿は肥料として使用される前に処理される（堆肥化等）。適切に実施された場合、このような処理は薬剤耐性の環境曝露の低減に有効である。
- 廃水処理施設から発生する人の排泄物（バイオソリッド）は農地で使用され、抗菌薬および耐性菌を含む可能性がある。農業におけるこれらの汚染物質の結果は不明である。
- 家畜生産や堆肥が適用された地域から流出する水は、近くの地表や地下水資源を耐性菌で汚染する可能性がある。流出によるリスクはよくわかっていない。
- 抗微生物薬は水産養殖（魚や魚介類の養殖）において世界中で投与されているが、水産養殖における抗微生物薬の使用量の推定は困難である。
- 抗微生物薬は、観賞魚（ペット）および食用でない他の水生種の飼育を補助するためにも大量に使用されている。
- 水産養殖における抗微生物薬の使用については、使用される量および種類を含め、より多くの情報が必要である。

知識格差の是正

科学的レビューは、以下に述べる行動が我々の理解の向上しさらなる行動へと導くことを示唆している。なお、特に言及しない限り、これらは人および動物の排泄物の両方に適用される。

環境水の評価

- 人の健康に対する耐性微生物のリスクをより良く理解するために、環境水のどこに、どの程度の薬剤耐性微生物菌が存在するかを評価する。
- レクリエーション用水および飲料水中に薬剤耐性微生物が混入する要因について理解するための研究を実施する。これには、耐性病原体（人または動物）の発生源の特定、およびこれらの水中の耐性菌の増幅および伝播を助長する選択的圧力が含まれる。
- 環境水中の薬剤耐性微生物を測定するためのサンプリング戦略および試験方法について評価し、ベストプラクティスを特定し標準化する。

衛生・排水処理の評価と改善

- 排出物の近くの環境の研究を行い、耐性微生物および抗微生物薬の排出を制限するアプローチの影響を評価することで、環境中の薬剤耐性微生物に寄与する可能性のある施設（病院等）で現場での排水の前処理の必要性を評価する。
- 環境水へ放水する前の排水中の薬剤耐性微生物と微生物薬を除去するための既存の排水処理プロセスの有効性を評価するための研究を行い、処理の非効率や失敗をもたらす要因（無効な処理方法や欠陥のあるインフラ等）を調査し特定する。
- 地球規模での衛生状態の改善のため、排水処理方法が存在しない地域で簡単に実施でき、薬剤耐性微生物のレベルが高い地域では既存の処理法を強化するような、効率的かつ入手可能な排水処理方法を特定する。

農業に関連した環境の評価

- 農場および水産養殖における疾病を予防・管理するための抗微生物薬に代替を同定・開発するための研究を実施する。
- 薬剤耐性微生物と抗微生物薬による環境汚染を防ぐために、農場で肥料として使用される、動物の糞尿や人の排泄物であるバイオソリッドの処理方法について評価する。

背景

人および動物に感染を引き起こす細菌および真菌は、抗微生物薬に対してますます耐性化している。感染を引き起こすことに加えて、これらの微生物は疾患を引き起こすことなく、しばしば人や動物の消化管(特に腸)に保菌される(存在する)。保菌も感染の既知の危険因子である。

結果として、感染または保菌した人や動物からの排泄物の廃棄は、環境中の耐性菌の供給源となりうる。一旦耐性微生物が環境中に入ると、他の人や動物に拡散し、保菌や感染を引き起こす可能性がある。人の感染を引き起こすことが知られている細菌の薬剤耐性、ならびに医学的に重要な抗微生物薬に対する耐性を付与する可動性耐性決定因子(プラスミド上の耐性遺伝子等)を有する細菌は、特に重大な懸念材料である。

薬剤耐性に加えて、この排泄物は環境における医学的に重要な抗菌薬の供給源にもなりうる。これらの抗菌薬が環境中で活性を保持する場合、それらは微生物集団に選択圧を加え、耐性菌を増幅する可能性がある。

環境中の人および動物の排泄物とその人の健康への影響との関連は十分に理解されておらず、知識格差是正のための追加の研究が必要である。この作業は、耐性の種類、耐性菌の濃度、汚染源(感染源)、どの程度の耐性が持続し、移動したか(拡散したか)を決定する方法およびサンプリング戦略を用いて実施されるべきである。

薬剤耐性の環境汚染に対する応答は、予防戦略(病院のような高汚染源からの下水の放出前に前処理すること等)および除去戦略(排水処理プロセス等)が含まれる。適切な研究方法およびデータ収集によって、この環境汚染を防止または除去するための介入による影響も評価されるべきである。排泄物管理と水処理の既存の方法の有効性を理解すること、ならびに新規の方法と戦略を究明することが重要である。

科学的課題

A. 人の排泄物または動物の排泄物中の薬剤耐性病原微生物(特に病院、人の下水道、畜産農場、水産養殖に由来するもの)は環境をどの程度汚染しているか?それらの汚染源からの薬剤耐性病原微生物または抗微生物薬による汚染を追跡するためにはどのような戦略が必要か?

病院

病院からの環境汚染のリスクに関して考慮すべきいくつかの課題がある。例えば、最も薬剤耐性の強い病原体による感染症は、一般に治療目的で病院に滞在し、抗微生物薬を投与されている入院患者に起こる。患者から患者へ、また患者から医療従事者への薬剤耐性微生物の伝播を予防するためには、基本的な感染管理および衛生のプラクティスが不可欠である。さらに、患者の尿・糞便から検出される抗微生物薬および薬剤耐性病原微生物は、基本的に施設の下排水収集システム中に放出される。未処理または処理が不十分な下水道中の汚水は、環境中の抗微生物薬および薬剤耐性微生物の供給源である。人や動物への不必要な曝露を防ぐためには、施設内または施設外(下水システム内)での強固な下水処理が必要である。施設内において薬剤耐性微生物は、シンクの排水管、水道および他の水の供給源などの医療施設配管システム内で存続し、増殖することができる。この薬剤耐性のリザーバーは、病院内の薬剤耐性の伝播を助長し、病院排水中の薬剤耐性の負荷となり得る。

医療施設内の薬剤耐性菌の推進要因

抗微生物薬の使用および薬剤耐性微生物の拡散は、医療施設における薬剤耐性汚染の要因である。抗微生物薬の使用は、薬剤耐性微生物を選択し、増幅させる。入院患者への抗菌薬投与は頻繁に行われている。欧州では急性期入院患者の20~30%が抗微生物薬を投与され^[1]、米国の病院では2人中1人が1日以上抗微生物薬投与を受けている^[2]。薬剤耐性微生物は、人から人へ、また病院環境(器具やシンク等)から人へ伝播する可能性がある。これらによって薬剤耐性微生物が感染または定着するリスクが高い患者が汚染され、それに続いて、薬剤耐性および潜在的な活性をもつ抗

微生物薬が、医療施設配管システムを介し排水中へ放出される^[3]。

前述のように、薬剤耐性微生物を保菌者の排泄物の処理もまた、病院内の人に対する潜在的な脅威となり得る。例として、ある研究ではカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)が病室シンクのトラップから検出され、シンク・ストレーナー(三角コーナー)で増殖し、このストレーナーからの飛散によって新規の患者がCREに曝露された^[4]。これらの知見は、医療施設における新たな感染制御の問題を提起している。病院における抗菌薬耐性の伝播にどの程度病院内の配管が寄与しているかを理解し、効果的なリスク低減のためにとるべき戦略を明確にすることが重要である。

医療施設排水の特徴

病院排水は薬剤耐性微生物の供給源となり得る。病院廃棄物処理に関する現在の規制は、薬剤耐性微生物および抗微生物薬に関連する環境汚染のリスクが考慮される以前に策定された。医療施設からの排水中に放出される薬剤耐性微生物の程度は、医療施設の種類(規模、管理法、場所を含む)に依存する。医療施設が排水をどのように取り扱い、処分するかについても大幅な違いがある。例えば、ある国では医療施設が独自の排水処理場を有することが必要とされる一方、医療廃棄物や医療施設からの排水が他の排水と共に地域の処理場で処理される国も存在する。いずれの戦略も、その有効性は廃棄物中の薬剤耐性のレベル、処理プロセスの頑健性(例えば、3段階処理場は、1段階処理場よりも細菌をより良く除去する)、および処理場の維持によって左右される。

未処理の病院排水から一般的に検出される多剤耐性菌には、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)やカルバペネマーゼを産生する腸内細菌科細菌、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、および緑膿菌が含まれる^[5]。多くの細菌の濃度は都市排

水中と病院排水中で同定であるが、耐性腸内細菌の割合はしばしば病院排水においてより高いということが証明されている。これは VRE について実証されており、地域の排水と比較した場合、病院排水において VRE は有意に検出頻度が高かった^[5-7]。バングラデシュでは、病院に近い排水試料中の NDM-1 陽性菌(すなわち CRE)の検出率は、同じ都市からの市内排水試料中よりも有意に高かった(71%対 12.1%)^[8]。

病院排水中の残留抗菌薬濃度は、病院で 사용되는最も一般的な抗菌薬と一致することも報告されている。例としてインドでは、抗菌薬のシプロフロキサシンの使用と病院排水中のシプロフロキサシン濃度との間に相関があったが^[9]、環境水試料から回収された大腸菌分離株に対するこれらの抗菌薬の効果は明らかではなかった。また、病院からの抗菌薬耐性病原性細菌は、より多くの細胞当たりの薬剤耐性遺伝子(ARG)を保有する傾向を示す報告が増えている^[10]。一般的に、病院排水中の薬剤耐性病原性細菌や耐性遺伝子の絶対量は、地域の排水中のそれに比べ 10 倍以上高い^[11,12]。インドの研究では、病院排水中のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌は、地域の排水中の 100 ~ 1,000 倍多く、病院内環境中の関連する抗菌薬耐性遺伝子は地域のほぼ 10 万倍高いことが示された^[13]。特に懸念されるのは、細菌から細菌に遺伝子の水平伝播を介して移動しうるプラスミド上に、複数の薬剤耐性遺伝子を有する腸内細菌科細菌である^[14]。

一方で、これらの情報は限られた研究に基づくものであり、医療施設排水に対する供給源としての処理が最良の介入方法であるかどうか、または他の介入方法を考慮すべきかどうかを明らかにするためには、より多くの知見が必要である。病院排水中の多剤耐性病原微生物が、地域からの同様の微生物よりも人の健康に対してより大きなリスクをもたらすという絶対的な研究結果はない。病院からの腸内細菌は耐性を示す可能性が高く^[14]、これまでのエビデンスから、これらの細菌は遺伝子の水平伝播によって他の細菌とこの薬剤耐性を共有することは可能であると考えられるが、病院排水の人の健康に対する特徴的なリスクを明確にする上で、更なる研究が必要である。

排水中に検出される薬剤耐性菌は、施設内で感染を引き起こす薬剤耐性菌と関連しうるが^[15]、必ず

関連するわけではない。病院排水はほとんど常に地域からの排水と混合するため、地域の下処理施設で受け入れられる特定の薬剤耐性遺伝子または耐性菌の最初の供給源を決定することは困難である。このことは、より広い人・動物の集団または自然環境で薬剤耐性菌の検出率が比較的高い地域においては特に困難である^[16]。排水中に検出される薬剤耐性菌の根源を断定することは困難であり、どのリスク低減措置が最も効果的であるかを理解する上で、知識格差となっている。

同様に、排水中に検出される抗微生物薬のレベルは、医療施設における抗微生物薬の使用と必ずしも関連するわけではない。その原因の一つは、環境中での抗微生物薬の分解やおよび細菌の生存はいくつかの要因に依存するためである。例えば、抗微生物薬の半減期は数分から数十日までと様々であり^[17]、耐性菌の生存率も地理的条件に依存し非常に多様である。排水中の抗微生物薬と薬剤耐性微生物の関係は、地球上の異なる場所の、異なる環境温度や耐性保菌率にも依存する^[13]。

医療施設排水と地域排水の混合

医療施設の排水が、より広範なコミュニティからの排水と混合されるということは、下水システムの下流の、最終的に下水処理施設に辿り着く薬剤耐性微生物の種類に関連する重要な要因であるように思われる^[18]。細菌は、ストレスを受けたときに遺伝子の水平伝播を促進させることが知られており、それらの局所の生息域における変化は、遺伝子を交換し進化する速度(薬剤耐性遺伝子を共有することを含む)に影響を与える。下水の合流点での遺伝子の水平伝播に影響を及ぼす要因には、温度、共選択的金属および殺生物剤の存在、ならびに基本的な医療施設、市中および環境で見出される細菌の違いが含まれる。

しかし、病院と地域それぞれからの排水の、相対的な重要性や違いについては議論の余地がある^[19]。初期の知見でも、医療に関連する細菌は遺伝子の水平伝播をより起こしやすく、排水処理におけるそれらの生存に有利に働く選択的優位性をもつ可能性があることが示唆されている。これを実証するためには、より多くのデータが必要である。病院排水から分離された微生物が、地域の排水中の微生物と比較し人の健康に対してより大きなリス

クを有するかどうかは、重要な未解決問題である。最近の報告では、病院排水中の微生物と地域排水中の微生物は異なったものであることを示唆しており、この問題を明らかにするために新しい分析方法が開発されつつある^[11]。現在、この知識格差によって医療施設排水特有のリスクを確実な方法で特定することが困難である。

人の下水

人の下水には、薬剤耐性遺伝子を運ぶ病原性および共生性(疾病を引き起こさない)の腸内微生物が含まれる。*E. coli*、*Klebsiella pneumoniae*、および *Acinetobacter baumannii* などの潜在的に疾病を引き起こす多くの細菌は、動物および人の腸管内に定着しており、それらが耐性である場合、人の下水中の薬剤耐性の原因となる^[20]。例として大腸菌は、人、動物および環境中に自然に存在するため、市中における薬剤耐性の懸念となる。このことは、ESBL やカルバペネマーゼのような、細菌間を容易に移動する耐性メカニズムとも関連している^[20]。世界的には、健康な人の推定 14% が ESBL 産生腸内細菌科細菌を保菌しており、東南アジアおよびアフリカではその保菌率は 22% と高い^[21]。これらの細菌が下水・排水を通じ土壌や表層水に放出されると、環境のレジストーム(病原性細菌および非病原性細菌の両者のもつすべての薬剤耐性遺伝子およびその前駆体の総体)に影響する。

下水処理施設は耐性微生物を含む糞便に由来する排水中の微生物を減少させるために必須であるが、薬剤耐性微生物のレベルが高い場合には、従来のシステムでは不十分かもしれない。薬剤耐性微生物は、高度な下水処理施設によっても除去されず、処理場からの排出を受ける表層水中にも検出可能なレベルで残存しうる^[22]。下水は河川を経由して環境中に放出されると希釈される可能性があるが、河口、すなわち沿岸では、なお自然環境中の微生物と相互作用する^[23]。また、処理されていない人の排泄物が、期せずして表層水に直接放出されてしまうこともある(複合下水道のオーバーフロー等)。米国の最近の研究では、農村部の浄化システムや都市部の暴風雨水の流出などから環境中への人の排泄物汚染が驚くべき量に上ることが明らかになった^[24, 25]。これらの知見は、浄化システムの整備がずさんで排水処理能力が不十分

であることなど、インフラに欠陥があることを示している。

世界中の多くの中心市街地において衛生インフラが不足していることは、人間の汚水がその一部しか適切に処理されていないことを意味する(例として、汚水のうち適切に処理されているのは、インドのデリーでは全体の 56%、ガーナのクマシ市では 55% である)。バングラデシュのダッカでは、人の排泄物の 1% しか効果的に処理されておらず、70% が環境中に直接排出されている^[26]。

処理プラント内では、非常に低い濃度ではあるが、微生物群が抗微生物薬にさらに曝露される可能性がある。例として、6 つの異なるクラスに属する 56 種類の抗菌薬が東アジア、北アメリカ、ヨーロッパ、およびオーストラリアの下水処理施設の流入水および流出水においてナノグラム/リットル(ng/L)からマイクログラム/リットル(μg/L)のレベルで検出されたが、その結果は人に最も一般的に処方される抗菌薬と密接に関係していた^[27]。これらは低濃度であっても、微生物群を変化させ、耐性微生物を選択しうる(環境中の抗微生物薬の選択圧の詳細については、「抗微生物薬の製造と廃棄」の項を参照)^[28-30]。残留した抗微生物薬の濃度は、多くの低～中所得国では評価されておらず、そのためその人の健康に対する潜在的なリスクは不明である。

また、処理下水汚泥(バイオソリッド)を農地に使用することには懸念がある。適切に処理された下水汚泥は、バイオソリッドと呼ばれる、下水処理施設から発生する人の排泄物を主成分とする栄養素に富んだ有機物となる。バイオソリッドはリサイクルされ、生産性の高い土壌を改善・維持し、植物の成長を促進させるための肥料として適用される^[31]。ヨーロッパの研究では、処理された下水汚泥中には微量な抗微生物薬と ESBL 産生菌などの薬剤耐性菌が存在し、ある種の消毒を用いない処理では、これらの汚染物質の除去が困難であることが明らかとなった^[32]。現在、これら微量の化学的・生物学的汚染物質が環境に与える影響についての理解は限られている。しかし最近の研究では、人への曝露と環境への伝播が示唆されている^[33, 34]。

畜産廃棄物

薬剤耐性の発生源としての、農業で発生・使用される廃棄物

薬剤耐性菌（複数のクラスの抗菌薬に耐性の細菌を含む）は、食品を生産する畜産農場の動物糞尿中から検出される。薬剤耐性は、食用動物生産システムにおいて一般に適用される抗微生物薬や、共選択性を有する他の薬剤（金属等）の選択圧により生じる^[35-40]。薬剤耐性菌はまた、農地を肥やすために使用されるバイオソリッドを介して持ち込まれる可能性がある^[41-45]。

米国薬剤耐性モニタリングシステム（NARMS）からのデータ（人、生鮮小売肉製品、および食用動物における薬剤耐性に焦点を当てた、培養に基づく全国的なサーベイランス体制）によると、食品媒介疾患を引き起こす細菌における薬剤耐性は、10年以上に渡り安定もしくは低下していることを示している^[46]。しかし、NARMS は共生（非病原性）細菌における薬剤耐性は追跡しないため、これらの細菌の薬剤耐性による農場レジストームに対する潜在的な寄与は不明である。

食用動物由来の細菌は、プラスミドなどの可動性遺伝子上に薬剤耐性機構を有する。これは、動物由来の細菌から、一般に人に保菌または感染する細菌への薬剤耐性伝達のリスクを増大させる。例えば、*bla*CMY-2 と呼ばれるセファロスポリナーゼを保有するプラスミドは、北アメリカの牛のサルモネラおよび腸内細菌科細菌に広く存在している^[47]。

動物の糞尿は、抗微生物薬および薬剤耐性菌の両者を運びうる。食用動物は、一般に分解されないままの抗微生物薬を糞便中に排出する。抗微生物薬が環境中に残存する時間は、様々な要因に依存する。抗微生物薬の存在は、動物の腸内における可動性耐性遺伝子の選択を介して薬剤耐性を増加させ、糞尿を肥料とした土壌で存続しうる^[48-50]。抗菌薬（および生物活性分解産物）を含む糞尿は、土壌中の薬剤耐性を選択・増大させ、抗微生物薬を含まない糞尿とは異なる方向へ土壌の微生物叢構造を変化させうる^[51, 52]。

薬剤耐性で汚染された農業廃棄物に曝露された環境

農業廃棄物は重要な肥料であり、通常は使用前に処理される。糞尿は、農産物の種類や作業の規

模、土壌の種類、地表および地下水への近接性などの要因に基づき、異なった方法で処理される^[53]。閉じられた生産システムでは、糞尿は使用される前に、好気性消化（堆肥化等）または嫌気性消化によって処理される。これらの処理は薬剤耐性菌および耐性遺伝子の分布および量を変化させうるが、このことが環境に対する曝露の低減に有効であるかどうかについて明らかではない^[54,55]。

動物性糞尿やバイオソリッドで施肥された土壌は、動物性糞尿を取り入れていない土壌と比較して薬剤耐性微生物や耐性遺伝子が豊富に含まれる^[50, 56, 57]。薬剤耐性微生物は一度土壌中に入ると、抗微生物薬からの選択圧がなくても存在し続ける^[58]。多くの研究は、（病原微生物を含む）厩肥施用が土壌中の耐性微生物群に変化をもたらす^[45, 59-62]、作物を汚染させる可能性があることを示している^[60, 63]。作物の農業的ニーズに合わせた商用肥料の施用率下において、農地は 1 ヘクタール当たり推定 $10^8 \sim 10^{13}$ コピーの様々な耐性遺伝子を含むことが明らかになっており、肥料施用下では、農地に通常存在しない程度の薬剤耐性菌の存在が示されている^[64]。

牛・豚および家禽の糞便中または生産環境中からのカルバペネム耐性菌検出は、環境または食品供給による広範な曝露によって、この臨床的に非常に重要なクラスの抗菌薬が潜在的に無効となる可能性を示しており、重大な懸念事項である^[65-67]。家畜の生産環境やその糞尿が肥料として使用された地域の周辺の土壌および地下水資源は、薬剤耐性菌で汚染される可能性がある^[68, 69]。薬剤耐性遺伝子の過剰負荷に関しては、環境に見出されるベースラインレベルでの薬剤耐性の基準に対して相対的に評価する必要がある^[70-73]。

水産養殖

水産養殖（魚介類の養殖）は現在、全海産物の半分以上を供給しており、世界の動物食品由来タンパク質の約 8%に相当している。2015 年の水産養殖生産量は、全世界で 76.6 百万トン（水産植物および非食品を除く）であった。養殖生産国トップ 10 は次の通りであった^[74]：

- 中国（47.6 百万トン）
- インド（5.2 百万トン）

- インドネシア(4.3 百万トン)
- ベトナム(3.4 百万トン)
- バングラデシュ(2.1 百万トン)
- ノルウェー(1.4 百万トン)
- エジプト(1.2 百万トン)
- チリ(1 百万トン)
- ミャンマー(1 百万トン)
- タイ(0.9 百万トン)

抗微生物薬は、水産養殖、特に集中飼育システムにおいて、疾病を制御するために世界中で使用されている。これらは一般に飼料中に添加されるか、または時にバス・トリートメントにより投与される。概して、水産養殖における抗微生物薬の使用量は、販売および使用記録がしばしば不完全または欠落していることにより、決定するのが困難である。最も信頼できる抗微生物薬の使用に関する情報は、高所得国で養殖された、高価な水生生物種に関するものであるが、この情報は全体的な抗微生物薬使用量の推定値および使用パターンを表すものではない^[75]。これら高所得国における水生生物に対する抗微生物薬の使用は、陸生動物に適用されるものと同じシステム下で厳格に規制されることが多い。しかし、抗微生物薬の使用が規制されている国においても、抗微生物薬の使用には相当な差異がみられる。Smith ら^[76]は、ノルウェーにおける抗微生物薬の使用量を、生産量 1kg 当たりわずか 1mg と推定した(この使用は主に、100 万トンを超える大西洋サケ生産のためである)。一方チリ(大西洋でサケの生産が 2 番目に多い)では、2015 年に 560 トン以上の抗微生物薬が使用されたが、これはサケ生産量 1kg 当たり 600mg 以上の抗微生物薬に相当する。チリにおけるこの抗微生物薬使用量は、細菌の一種 *Piscirickettsia salmonis* によって引き起こされるピシリケッチア症のアウトブレイク予防と関連している。

高所得国および中所得国での使用が認可されている抗微生物薬は、一般的に非常に数が限られている。例としてイギリスでは、養殖用のサケ科魚類に対する使用について販売認可された抗微生物薬は、フロルフェニコール、オキシテトラサイクリンおよびアモキシシリンの 3 種のみである。

東南アジアの多くの国々をはじめとした、他の主要な水産物生産国では、抗微生物薬の使用量または販売量など使用量に関連した他のデータを収

集する取り組みがない(または非常に限定されている)ため、抗菌薬の使用推定値の集計は困難である。水産物の生産はしばしば、多くの小規模な、個人レベルの事業により行われているため、データの収集は特に困難である。アジア諸国からの限られたデータは、多くの場合、個々の養殖業者の抗菌薬使用調査からの外挿に基づいているが、その抗微生物薬の総使用量は相当量に上るものと考えられる。例えば、表流水サンプル中の抗微生物薬残留物の分析によって、推定で約 5,800 トンのエンロフロキサシン、1,800 トンのスルファジアジン、12,300 トンのスルファメトキサゾール、および 6,400 トンのトリメトプリムが毎年メコンデルタ川に排出されていることが明らかとなった^[77]。このデータには陸生家畜生産からの排出も含まれるが、その主要な供給源はこの地域をベースとする大型のエビおよび魚の養殖システムであった。この調査によって、この地域のナマズ養殖業者が 17 の異なる抗菌薬を使用しており、収穫魚 1kg 当たり推定 93mg の抗菌薬が使用されていたことも明らかになった。検出された抗微生物薬のうち最も多かったものは、スルファメトキサゾール、セファレキシン、アモキシシリン、フロルフェニコール、およびエノロフロキサシンであった^[77]。

水産養殖における抗微生物薬の総使用量が、すべての食用動物における使用量の中で特別に顕著な割合を示すかどうかについては議論がある。しかし、抗微生物薬は、適正な使用がなされない限り、環境を汚染し、魚介類に影響を及ぼす主要な病原微生物における薬剤耐性を助長する懸念がある。これは水産物の生産性の低下を引き起こし、生産者の生活に悪影響を及ぼす可能性がある。これらの魚介類が飼育される水生環境は、薬剤耐性の高度化および拡散において一定の役割を担っており、水産養殖業がこのプロセスに影響を与える可能性がある。

人から通常検出される薬剤耐性微生物は、農業事業からの排出物や、処理および未処理の人の下水を介して水生環境に排出される。水生養殖施設はこれらの微生物およびそれらが保有する可動性耐性遺伝因子のリザーバーにもなり得る。排出された微生物は、養殖水生動物に関連する病原性ならびに非病原性微生物によって構成される水生微生物叢中に潜在的に移行する可能性がある。これまでの諸研究によって、魚介類の病原微生物が、

臨床分離株に類似した耐性遺伝子や関連する可動性因子をもつことが示されている。このことは、両者に共通の起源(人から魚に伝播した病原微生物)が存在したことを示している^[78, 79]。他方への伝播(病原微生物が魚から人へ)も理論的には可能であり、潜在的な曝露経路(魚の取り扱いや消費)が存在する可能性がある。実験室において、生サケ中での魚の病原性細菌、*Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* の耐性株と、人由来の感受性大腸菌株との間における耐性プラスミドの接合(単細胞生物の性生殖の一形態)は確認されている。しかし、人に疾病を引き起こす微生物が、水産養殖由来の薬剤耐性を獲得したことを示すエビデンスはない。食物の調理は、このリスクを最小限にするのに役立つ。生の海産物(牡蠣や寿司)を消費する場合のリスクの理解のためには、より多くの情報が必要である。また、ろ過摂食を行う二枚貝は、人の耐性病原微生物を含む細菌を水カラム中で生物濃縮(貯蔵)する傾向があるため、研究に値する。

抗微生物薬は装飾用魚(ペット)をはじめ食用ではない他の水生種の飼育補助目的にも大量に使用される^[80, 81]。売買されている装飾用魚における薬剤耐性の量は非常に高くなりうることが示されている。所有者は装飾用魚を身近に保管し取り扱うため、その耐性病原微生物および耐性遺伝子は魚から人に伝播しうる。人の細菌感染と装飾用魚への曝露を関連づける報告は限られている。しかし、人および動物の健康に対する実際のリスクは、十分に説明または理解されていない。水産養殖における抗微生物薬の使用については、その数量、使用される種類、および抗微生物薬が他の方法の代わりに用いられている理由など、不明な部分が多い。特に熱帯および亜熱帯生産地域における、水産養殖生産システムに関連した微生物(病原微生物および共生生物)の薬剤耐性変化のレベルおよび割合、そして消費者および養殖魚にもたらされるリスクについても、より多くの情報が必要である。これらについて、国家レベルおよび国際レベルで問題を評価するための効果的な方策が必要である。オンラインで入手可能な「世界動物保健機構(OIE)

水生動物規約」には、そのための勧告が記載されている(http://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=titre_1.6.htm)。

水産養殖における抗微生物薬の代替

抗微生物薬を使用する代わりに、代替の制御方法を奨励する努力がなされてきた。例えば、ノルウェー、スコットランド、および他のすべての主要生産地域(チリを除く)では、ニジマス部門および大西洋サケ産業のためのワクチン接種に基づく制御戦略を成功裏に実施している。ワクチン接種は、南ヨーロッパのタイおよびスズキ産業でも広く使用されている。ワクチンは開発および管理費用が未だ高額であり、収益性の低い他の魚類養殖部門ではあまり成功していない。また、ワクチンは魚類における細菌感染症のアウトブレイクを効率的に予防することができるが、適応免疫系を有さない甲殻類または軟体動物に対してはそれほど有効でない。

抗微生物薬の使用を低減する別の方法として主要なものに、バイオセキュリティおよび飼育環境の質の改善が挙げられる。良好な水質およびバランスのとれた貯蔵密度が得られる場合、魚のストレスは緩和され、疾病はより少なくなる^[82]。実用的な例として、異なる魚群を飼育する間(生産のギャップ)に休閑期を実施することは、水産場における疾病を軽減しうる。これらのシステムは、地域管理計画などの体制を通じて、地方の水産場から国レベルまで様々な段階で実施することができる。

より良い疾病の診断および疾病の出現に対する早期警告システムは、抗微生物薬の必要性を低減させるために有効である可能性がある。高レベルの抗微生物薬の使用は、しばしば診断および治療の遅れを意味する。また、多くの疾病が魚の食欲低下を引き起こすため、飼料で投与される抗微生物薬治療の有効性はさらに低下する。

代替が利用可能でないか効果的ではない場合、製品認証制度による抗微生物薬の販売および管理に対する標的化された適切な規制は、抗微生物薬の使用の低減に役立つ可能性がある^[75]。

B. 環境中の AMR をどのように測定すべきか? 耐性病原体の追跡方法は対象によって(病院、污水处理システム、農場などによって)異なるのか? これらの方法を標準化し、リスク低減のための介入の影響をモニタリングすることができるか?

抗微生物薬耐性病原体および ARG を検出および測定する方法

環境サンプル(土壌、水、堆肥)中の抗微生物薬耐性病原体および ARG を検出するためには、多くの方法が利用可能である(表 1)。AMR または ARG を検出するための唯一にして最良の方法はなく、方法によって感度、費用および技術的条件が異なるため、それぞれの場所、時間、問題に最適な方法を用いるべきである。以下に各方法とその利点、および限界を示す。

培養法

実験室において微生物を増やしたり、計測することが可能な微生物培養法は、抗微生物薬耐性病原体を検出するための方法として歴史的にゴールドスタンダードであった。培養法は安価、定量的であり、臨床現場から微生物を容易に運ぶことができる。環境サンプル中の AMR の培養法による検出では、目的の細菌を単離するために様々な選択培地またはスクリーニング培地を使用する。多種多様な細菌を対象とする培地が市販されている。必要な機器は最低限であり、この方法は資源の乏しい状況にも適する。分子生物学的手法とは対照的に、培養法により検出された細菌は生きている状態であり、耐性を規定するカットオフ値と照合させることができる。抗微生物薬耐性細菌は抗微生物薬を含む選択培地によってサンプルから直接単離することができ、抗微生物薬を除いた試験を並行させることで、サンプル中に耐性菌群が存在する割合を推定することが可能である。

培養法には環境の微生物を扱う上で大きな制限もある。自然環境由来のほとんどの細菌は実験室で培養することができず、このことは環境サンプルを扱う上で特に深刻な制限となる。また、多くの細菌は環境ストレス下において、生きているが増殖しない状態に移行する。培養可能な細菌でも、この場合長い培養時間や複数の培養工程、および確認分析作業が必要となる。サンプルの保存方法および保存された期間は、標的生物の検出および定量の両方に強く影響する。培養法の最大の欠点は、この方法の処理能力が高くないことであると思われる。環境サンプルにおける細菌は多様であり、培養物からどのような種類の細菌を回収する必要がある

るか、およびどのような種類の耐性を検出する必要があるかについてあらかじめ決定しておかなければならない。このことは、実験室での試験計画の改善につながる。

段階希釈した抗微生物薬に分離株を暴露させ、その増殖を阻害する抗微生物薬濃度を決定する微量液体希釈法は、最小発育阻止濃度(MIC)によって規定される、分離株がその薬物に対し感受性であるか、または耐性であるかを判定するためによく用いられる方法である。標準化されたプロトコールと、感受性/耐性を評価するためのカットオフ値が存在する。MIC の決定はまた、感受性/耐性のみを決定する方法では見逃され得る、耐性の段階的上昇(「MIC クリープ」)のモニタリングを可能にする。しかし、感受性を決定するための MIC カットオフは臨床における治療効果に基づいており、環境モニタリングには適切ではない可能性がある。また、この方法は、臨床的意義に基づく標準温度の下で行われるため、環境条件を反映していない可能性がある。集団の中の MIC 分布に基づく疫学的カットオフ、または数学的な MIC 分布に基づく生態学的カットオフの使用も発案されている。ディスク拡散法は、耐性の決定および MIC の推定が可能な、より簡便な薬剤感受性の測定方法である。ディスク拡散法の結果による感受性/耐性の解釈については、MIC 測定法と同様の限界がある。

分子生物学的手法

分子生物学的手法は微生物分離株(病原体および共生菌)の遺伝的な特徴を明らかにするために使用される。また、ARG の検出・追跡、および環境サンプル中の微生物を計数する(試料中の生きた微生物の個々の数を決定する)ためにも用いられる。標的には ARG、属および種の決定因子、ならびにインテグラーゼや挿入配列、プラスミド関連遺伝子のような遺伝子水平伝播に関連する遺伝子が含まれる。設計が十分であれば、分子生物学的手法は安定的で無駄がなく、容易な方法であるが^[83]、高額な費用、解析法の複雑さ、必要な装置へのアクセスといったいくつかの要因が、現在のところ環境サンプル中の耐性の測定における分子法の普及を妨げている。しかし、その費用は下がってきており、微生物学実験室での普及が始まっている。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、DNA の標的断片を複製するために使用される技術であり、多くの分子生物学的手法の基礎となる方法である。標準的な PCR 法によって、標的遺伝子の有無が評価できるが、サンプル中にどの割合で耐性が存在するかについての情報は得られない。

定量的 PCR(qPCR)解析は、標的遺伝子の計数を可能にするが、PCRを阻害する物質(環境サンプル中には多いが臨床サンプル中には稀な、有機酸複合体や金属)の混入している場合や、標的遺伝子が微量である場合にその感度は低下する。さらに、qPCR 法は標準的な PCR よりも高価であり、計数には標準との比較が必要である。このことは、異なる実験室間での定量的データの比較を困難にする。しかし、AMR に対する介入の効果を評価するための大量の定量的データが短時間で得られるため、qPCR は AMR 評価のための野外研究において一般的に用いられている^[64, 84]。

製品として、96 ウェルまたは 384 ウェルフォーマットで同時に複数の標的 ARG を定量できるように設計された qPCR プラットフォームが市販されている^[85, 86]。複数の標的を同時に解析する場合、反応が個々の標的に対し最適化されていないため、単一の標的を解析する場合に比べ感度が落ちる可能性がある。また、ドロップレットデジタル PCR は、最新の技術によってサンプルを数千の液滴にエアロゾル化し、個々の液滴について標準的な qPCR 法を用いて、そこに含まれる ARG を評価する^[87]。この方法は定量における諸問題を克服しており、また qPCR よりも正確である。ドロップレットデジタル PCR には、PCR や qPCR と同様の限界はないが、環境微生物学にとっては新技術であり、未だその開発は初期段階である^[88]。

次に挙げる分子生物学的手法は、詳細な遺伝情報が得られる DNA シーケンシングによるものである。アンプリコンシーケンシング(ターゲットシーケンシングアプローチ)では、単一の遺伝子(多くは 16S rRNA 遺伝子)を PCR によって増幅し、得られたアンプリコンをシーケンスする。この方法は、サンプル中の多様な遺伝子を捉えることができる。DNA シーケンシングはまた、ARG のような機能遺伝子も標的にできる。シーケンシングの前に PCR 工程を組みこんだものが epicPCR であり、この方法では各細胞における 16S および ARG を対応させた形で集団全体のシーケンシングが可能であり、

検出された耐性遺伝子とその細菌に由来するものなのかを明らかにすることができる。この方法は、微生物生態学における諸問題に対処できるように設計されており、環境サンプルに対しても機能することが実証されている^[89]。

分離株の AMR 判定に関する分子生物学的手法には、全ゲノムシーケンシング(WGS)や、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-ToF MS)がある。WGS は、分離株にける既知の ARG の検出が可能であり、結果から予測される耐性は、臨床分離株における耐性の表現型とよく相関することが示されている^[90-93]。WGS は現在、公衆衛生分野での AMR サーベイランスにおいて一般的に使用されているが、環境由来の細菌を対象とした場合のその精度は評価されていない。現在のところ、WGS は耐性遺伝子が存在するかどうかを決定することができるのみであり、耐性の程度については決定することができない。WGS によるデータから MIC を推定する方法は開発中である^[94]。さらに、WGS によって検出できるのは、既知の耐性遺伝子または既知の耐性遺伝子と類似性を有する遺伝子のみである。WGS によって ARG 同士の遺伝的関連性やその移動を推定することが可能であるが、これは ARG 曝露による人へ水平伝播のリスクおよび健康リスクを評価する上で重要である。

MALDI-ToF MS は、培養が困難な細菌も同定可能な、迅速かつ信頼性の高い手法である^[95]。薬剤耐性の表現型の検出のため、薬剤耐性の原因となるタンパク質や標的抗微生物薬の修飾および分解能、または抗微生物薬存在下での細菌増殖の阻害などをより高い感度・精度で検出できるよう、MALDI-ToF MS の改良が進められている^[95-100]。

分子生物学的手法は培養法よりも迅速に、実験室で培養するのが困難な細菌であっても、ARG を検出することができる^[101]。標的遺伝子が存在した場合、一般にそのサンプルは耐性を有するものと捉えられるが、遺伝子は必ず発現するとは限らないため、遺伝子の検出が臨床的な基準によって定義される耐性と同等ではないことに留意しなければならない^[102, 103]。つまり、ARG のサンプル中または細菌中からの検出が、耐性の発現またはその生物の生存性を説明するものではない。したがって、耐性遺伝子は遺伝的な薬剤耐性の可能性の指標であり、明白な耐性菌の指標ではない。

メタゲノミクス

古典的なメタゲノミクスでは、環境サンプルから抽出した全 DNA に広範囲なシーケンシングを行う。次いでその環境サンプル中の耐性遺伝子を、既知の ARG との配列類似性に基づいて同定することができる。この手法は、下水および排水^[104-106]、病院排水^[107]、動物および人の糞便^[108, 109]、ならびに家畜および人の腸内^[110-112]など、様々な人および動物の排泄物サンプル中の遺伝子を検出するために使用されている。

メタゲノム法の主な利点は、メタゲノムシーケンシングの 1 回のランで、サンプル中に存在する多くの異なる耐性および非耐性遺伝子を検出できる能力にある (PCR 法は、対象となる全ての特異遺伝子それぞれについて別個の試験を必要とする)。メタゲノミクスにはいくつかの限界がある。この方法は高価であり、耐性生物の定量はその絶対数ではなく比率に限られる。特定の遺伝子のリードはリード全体のごく一部分であるため、その感度は限定的であり一定しない^[111, 113]。標的を定めたメタゲノムアプローチは、この問題の解決に役立つかもしれない^[114]。多くの恩恵をもたらすメタゲノムの別の限界は、この方法で検出できるのは既知の耐性遺伝子 (またはタンパク質) のみであるということである。この方法は、前述の分子を標的とした手法と同様に、過去に同定された遺伝子に類似しない、新規の ARG は検出することができず、新たな薬剤に対し活性を獲得した耐性遺伝子を誤って分類する可能性がある (アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼによるキノロン活性の獲得など)^[115]。現在のところ、培養法および後述するゲノム機能解析法のみが、新規の ARG によってもたらされる耐性を確実に検出することができる。

最後に、メタゲノミクスが広く使用されるためには、それぞれの実験室がその整合性の確保および標準化に取り組む必要がある。工程における各段階でのプロセスのあるステップにおける差異は、ARG 存在量の推定値の差異につながる可能性がある^[116, 117]。さらに、ある耐性のある特定の宿主生物のものとして割り当てることは、特にプラスミド媒介遺伝子について困難である (しかし、クロスリンク法はこの問題の解決につながるかもしれない)。これは疫学的調査において問題となり得る。さらに、サン

プル中の細菌についての分類学的同定のレベル (科、属、種、または株) は、解析に使用する配列データベースにより制限される。

機能ゲノミクス

ゲノム機能解析法は、メタゲノム解析法とは異なり、新規 ARG を同定することができる^[118, 119]。この手法において、環境サンプル由来のゲノム DNA 断片は、大腸菌に代表される扱いやすい宿主においてクローニングされ、発現される。次にこの形質転換された宿主に対し、目的の抗微生物薬に対する耐性のスクリーニングと、従来型のシーケンシングによる耐性遺伝子の同定が行われる。ゲノム機能解析法は、様々な環境において新規遺伝子を同定するために使用されている^[120-124]。機能ゲノミクスは新規 ARG を同定するための強力なツールであるが、一般的なサーベイランスでは有用ではない可能性が高い。1 つのサンプルを処理するのに相当な必要な時間と労力は要する上、単一の宿主種 (大腸菌など) の使用は、一定の実験において検出され得る ARG の数および種類を制限する。

各系統解析法における相違点

病院や農場など、特定の発生源に対し耐性病原体または耐性遺伝子を追跡する必要性が生じることがある。このような疫学的調査においては、高度の解像度、すなわち近縁の遺伝子または病原体の識別が可能な方法が必要である。

細菌分離株の WGS は、系統解析法のゴールドスタンダードである。各生物の全ゲノム配列が決定できるため、WGS は多様性を検出するための最上の方法である。WGS は強力な疫学的手法であり、全体的に多様性がほとんどない病原体においてさえ、分離株をいくつかの共通配列の変異に基づいてグループ化できる。WGS は北米およびヨーロッパにおける食品媒介性病原体の疫学的調査において定期的に用いられている。食品媒介性病原体の WGS は、米国 FDA、米国 CDC、カナダ食品検査機関、および欧州疾病予防管理センター (ECDC) で今や日常的に用いられている。標準の方法には細菌分離株が必要であることに留意すべきではあるが、本方法は環境サンプルにも容易に適用することができる。

技術または費用の問題で WGS の使用が難しい場合がある。そのような場合には、他の技術が系統解析の補助となる。例えば多遺伝子座配列タイピング (MLST) は、分離株由来の複数の遺伝子の PCR 増幅およびシーケンシングによるもので、分子疫学において長い歴史を有する^[125]。同様に、DNA 切断パターンに基づいて分離株をグループ化するパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) は、各株間の遺伝的関係を立証するのに役立つ。MLST、PFGE、およびその他の方法は WGS よりも解像度が低く、肯定的な系統解析が見込めない場合がある。これは各配列の多様性が低い細菌種または血清型において特に問題となる。

メタゲノムデータは、特に耐性生物の培養が困難である場合、または特定の病原体ではなく耐性遺伝子が研究の焦点である場合の系統解析に有用である。系統解析のためのメタゲノムデータを使用には限界があるが、最近の研究では、メタゲノムデータが疫学において有用であることを示すものもある。特定の ARG の適切な系統解析および追跡には、メタゲノムアセンブリの間にしばしば失われるプラスミドのターゲットシーケンシングが必要となるかもしれない。

リスク低減法の効果をモニタリングする方法の標準化

培養法については、すでに抗微生物薬感受性測定のためよく工夫された標準的な手順が存在する。培養法は人および動物における抗菌薬使用制限プロトコルのような、臨床および農業環境におけるリスク緩和対策の効果をモニターするために広く使用されている。MLST または WGS などの培養分

離株の分子タイピングは、さらなる疫学的データ蓄積のためますます広く使用されている。

標準化された方法は臨床用途で利用可能である。環境サンプルにおけるリスク低減方法の効果をモニターするためにも、同じ方法を用いることができる。培養法は 1 つまたは少数の特定の細菌種をモニターする場合に最も適切である。一般的な大腸菌は、コミュニティ全体における耐性レベルの指標生物としてしばしば使用される。

他方、分子生物学的手法またはメタゲノム法を用いた、ARG 生物全体のプールとしてのモニタリングが注目されている。現在のところ、モニタリングに分子生物学的手法またはメタゲノム法を用いる場合の、標準的かつ一般的な手順は存在しない。PCR 法は容易に標準化され、臨床診断において非常に一般的である。しかし、環境サンプル中の ARG を検出するための広く受け入れられている PCR 技術は存在しない。これはおそらく、すべての（または多くの）基質に対し機能する方法の開発が困難であり、標的とすべき特定の遺伝子に関するコンセンサスが欠如しているためである。すでに述べたように、メタゲノム研究はプロトコルの変化に非常に敏感であるため、DNA 抽出技術、シーケンシングプラットフォーム、およびバイオインフォマティクスパイプラインの違いは、メタゲノム解析の結果にかなりの影響を及ぼし得る。メタゲノム解析のための標準化されたプロトコルの開発は、メタゲノム法についての検証が少なく、またメタゲノム解析自体が急速に変化している技術であるため、現時点では困難である。標準化された qPCR およびメタゲノムパイプライン、ならびに基準物質の開発に関するさらなる研究が、培養に依存しないモニタリングの実現を目指し進められている。

C. ひとたび環境水が汚染されると、それが AMR の拡散をもたらし、人の健康に対する脅威となるということについて、どのようなエビデンスがあるのか？薬剤耐性菌の量や種類から、人の健康に対するリスクを予測できるか？細菌と抗微生物薬の相互作用は AMR にどのような影響を及ぼすか？

人々に曝露される可能性のある環境水中の薬剤耐性菌に関しては様々な研究がある^[126]。例えば、遊泳者の ESBL 産生腸内細菌科細菌への曝露の可能性が示されている。

AMR が環境水から人間に広がる一般的な方法としては、例として以下のものがある。

- レクリエーション水
- 飲用および洗浄用の水 (飲料水)
- 食用の魚および二枚貝
- 処理済みまたは未処理の表流水で汚染された農産物

- 水道水
- 排水

レクリエーションの際の曝露

2003 年には、およそ 1 億 2,000 万例の胃腸疾患と 5,000 万例の呼吸器疾患が、排水で汚染された沿岸環境での遊泳またはそこで採取された貝の摂取に起因していた。35 カ国の加盟国を有する政府間経済組織である経済協力開発機構は、レクリエーション目的での海水浴場における沿岸海水への曝露に関連する健康上の影響について系統的レビューを行った。このレビューでは、遊泳者は非遊泳者と比較して以下の症状を経験するリスクが高いと結論付けられた^[127]。

- 何らかの症状全て (オッズ比=1.86; 95%信頼区間: 1.31-2.64; P = 0.001)
- 聴覚症状 (オッズ比=2.05; 95%信頼区間: 1.49-2.82; P<0.001)
- 胃腸症状 (オッズ比=1.29; 95%信頼区間: 1.12-1.49; P<0.001)

レクリエーション水を汚染し得る、排水中の抗微生物薬耐性微生物や ARG の負荷が増加するにつれて、薬剤耐性微生物による感染症の割合が増加し得る。レクリエーション水 (および関連するビーチの砂) は、AMR および ARG のリザーバーとしてますます認識されるようになっており、病原微生物における AMR の発現にとって重要であると考えられている。以下の研究は、レクリエーション水における AMR を評価したものであり、淡水および海洋に見られるいくつかの ARG および生物の型を浮き彫りにした。しかし、それぞれの研究間での地理的な差および、評価のために選択された ARG、排水の発生源、耐性を決定する方法の違いから、研究同士を比較することは困難である。

カリフォルニアの 3 つのビーチでの前向きコホート疫学研究は、様々な指標 (抗微生物薬耐性の細菌および病原体) の検出と胃腸疾患の発生との相関を示した^[128]。MRSA は消化器疾患との関連性が高かった。MRSA の存在は、生活排水と不完全なインフラに起因すると考えられた。この研究は、インフラが不十分な場合、レクリエーション目的の来訪者が高レベルの抗微生物薬耐性病原体に曝

露される可能性があることを浮き彫りにしている。別の研究では、オハイオ州北東部の 10 の淡水ビーチにおける黄色ブドウ球菌および MRSA の検出率を評価した^[129]。砂および水サンプル中の黄色ブドウ球菌の総検出率は 22.8% (64/280) であった。MRSA の検出率は 8.2% (23/280) であった。秋 (4.2%; 5/120) および春 (10.0%; 4/40) に対して、検出率が最も高かったのは夏 (45.8%; 55/120) であった。本研究の結果は、オハイオ州北東部のビーチの砂および淡水に MRSA を含む黄色ブドウ球菌が存在することを示している。夏季の黄色ブドウ球菌の高い検出率と人に関連する株の存在は、ビーチの水および砂中の黄色ブドウ球菌検出の増加について人間の活動がその役割を果たしている可能性を示している。

市中発症の ESBL 産生菌による尿路感染症のリスク因子を評価した症例対象研究も行われている。その中で同定された、いくつかの独立したリスク因子の 1 つは、過去 1 年以内のレクリエーション淡水遊泳であった (オッズ比=2.1; 95%信頼区間: 1.0-4.0)^[130]。この研究は、遊泳が ESBL 産生大腸菌の腸管定着のリスク因子である可能性を示唆し、水から新たに獲得された ESBL 産生株がその後の尿路感染症を引き起こす可能性を示唆している。著者らは、この顕著な環境との関連性は、より多くのエビデンスによって実証される必要があると述べている。別の研究では、レクリエーションに使用される表層水中に ESBL 産生大腸菌が見出された。その場所は家禽農場および都市排水の排出地点の下流であった。その細菌の濃度は、これらのレクリエーション水を用いた場合、遊泳者が ESBL 産生大腸菌に暴露されるリスクが 95%であることを示唆している^[130]。

定着や感染、遺伝子水平伝播のような、曝露による公衆衛生上の影響を評価するためには、さらなる研究が必要である。イングランドおよびウェールズでの海洋レクリエーション水の利用による、第三世代セファロスポリン (3GC) 耐性大腸菌 (3GCREC) に対する集団レベルの曝露推定値を算出する試みがなされた。著者らは、沿岸のレクリエーション水における 3GCREC の検出率を概算し、得られたデータをビーチ沿岸の大腸菌密度と組み合わせ、それを基に様々なレクリエーション活動における摂取量を推定した。結果として、異なる水上スポーツの間に摂取される 3GCREC の平均数のデータが得られた。筆者らは、3GCREC の検出率は低い (0.12%) もの、水の利用者はそれに対する曝露リスクがあり、水上

スポーツ活動の種類によってそのリスクは異なる可能性がある」と述べている^[33]。

Leonard ら^[34]は、ARG の相対的存在量を評価するために、2016 年に英国環境庁によって採取された、日常入浴水サンプルから回収されプールされた大腸菌分離株をシーケンスした。すべての入浴者が 2016 年に少なくとも 1 つの耐性大腸菌を摂取したと推定され、少なくとも 100 の ARG 保有大腸菌の摂取を含む 250 万の曝露があったと推定された。

汚染されたレクリエーション水からの、定着につながる曝露のリスクを理解することは重要である。横断的疫学研究では、通常のサーファーと非サーファーを比較し、水曝露と 3GCEC による腸管定着との関連性を評価した。結果は、非サーファーの *bla*_{CTX-M} 保有大腸菌保菌率は 1.5%であったのに対し、サーファーのそれは 6.3%であった(リスク比=4.09; 信頼区間: 1.02-16.4)。細菌の密度は、曝露のリスクならびに、感染または定着を起こし得るに十分な量を摂取してしまう危険性を高める。曝露の種類は、摂取される薬剤耐性菌の数にも影響し、頭部を沈める水上スポーツは、頭部を沈めない活動よりもはるかに多くの曝露をもたらす。例えば、サーファーは 1 セッションあたり 150ml を超える水を摂取するが、遊泳者は約 30ml しか摂取しない^[33]。

多くの研究は、薬剤耐性菌の定着が人の感染リスクを高めることを実証しているが(医療環境では患者が最初に定着されたときに感染リスクはより大きくなるなど)、健康な人のほとんどは、重大な健康への影響なしに定着を解消する。定着が最初に感染に進行する場合、定着と感染との間の期間は非常に短くなる。消化管内の無傷で成熟した微生物叢は、定着の防止に働くが、この微生物叢は抗微生物薬や他の環境曝露によって破壊され得る。これによって、それぞれの薬剤耐性菌の定着に対する感受性が高くなる。特に感受性の高い集団には、入院直後の患者、慢性疾患を有し衰弱した患者、および未成熟の微生物叢を有する乳幼児が含まれる。

無傷の微生物叢があっても、環境の薬剤耐性菌への継続的な高レベルの曝露は、一時的または持続的な定着をもたらす。これは、コミュニティ内で継続的な曝露を受けている健康なサーファーおよび個人にみられる。進行中の曝露を除去

しても、そのクリアランスには時間がかかることが示されており、これは強い環境曝露(水、食物など)のある環境から復帰した、健康な旅行者に見られる^[131]。この定着は、典型的には「クリアされる」のに数か月を要するが、抗生物質の使用などの微生物叢を破壊するイベントと相まって、感染または伝播を引き起こす可能性がある。

飲料水

Coleman ら^[132]は、家庭用飲料水道中の薬剤耐性大腸菌は、定着と関連した独立因子であることを実証した。水や下水処理、および衛生状態の悪い条件下では、抗微生物薬耐性は人の飲用または食物生産のための水中に存在し得る^[133]。衛生資源が多い地域においても、飲料水の原水中からは薬剤耐性微生物、ARG、抗微生物薬が検出されているが、現代の水処理プロセスはそのような汚染物質を効果的に除去する。WHO の水安全計画は、管理システムの有効性を評価するための勧告を含む、安全な飲料水生産のためのリスク評価とリスク管理の枠組みを概説している^[134]。

高リスクの曝露に対する予防

環境表面および地下水中に薬剤耐性菌が高レベルに存在していても、環境中からの AMR の拡散を低減するための方策は実施することができる^[133]。例として、レクリエーション水は薬剤耐性菌を除去するために処理することができ、他の汚染された環境表面水から分離することもできる。飲料水については、最終処理プラントおよびよく管理された給水管システムによって、蛇口に届く水から可能な限り AMR を除去できる。下水は漁場および二枚貝のいる海底に届かないようにする。灌漑用水には比較的汚染されていない水を用いる。一般に、消費者を保護するために、入浴水のプロファイル、水安全計画、および危害分析重要管理点(食品安全に対処する管理システム)といったリスク評価およびリスク管理の枠組みが用いられている。これらの枠組みが、薬剤耐性の増幅および伝達を妨げることができているかどうかについては評価が必要である。

農場への近接

いくつかの研究で、農場～環境～人経路での伝播が起こり得ることを示唆する結果が得られている^[135-138]。例として、ある研究では、オランダ国境沿いの農場の近くに住む人々において MRSA 定着のリスクが高いことが確認された^[138]。農場の近くに住む人々に見られる菌株の種類は、農場の動物に見られる菌株の種類に類似しており、医療における曝露の可能性が高い人々に見られる菌株の種類とは異なっていた。定着の報告は曝露の存在を示すが、必ずしも疾患を示すわけではない。別の研究では、農地および畜産経営において

施用された豚糞尿への近接性が、MRSA 感染のリスク因子であることが明らかにされた^[137]。重要な点は、人に見出されるほとんどすべての MRSA 株は、他の人に見出される株であり、農業起源に見出される株とは異なるということであり^[139, 140]、これは、人から人への伝播が標準であることを示唆している。人における家畜関連 MRSA 感染の報告は稀であり、国によっては確認されておらず、家畜への職業性曝露を有する人々に圧倒的に集中している^[141]。農業曝露による AMR の公衆衛生への影響についてよりよく理解する必要がある。

D. 環境汚染の防止や環境水中の抗微生物薬耐性病原体の減少に効果的なリスク低減法は何か？効果的なリスク低減法がない場合、汚染防止または細菌負荷の低減のためにはどのような戦略が最も有望か？

環境中の薬剤耐性微生物（病原微生物を含む）を防ぎ、その量を減少させるためには様々なリスク低減のためのオプションがある。本節では第一に、より多くの情報が利用可能であるヒューマン・システムに関連するリスク低減に焦点を当てる。しかし、技術はアニマルシステムに類似しており、リスク低減策は非技術的および技術的解決策を組み合わせた、ワンヘルスアプローチに従った全体論的なものでなければならない。リスク低減方法を考慮する場合、関連する標的（薬剤耐性の人の病原体または ARG など）を同定することが重要である。第一の目標は、人の抗微生物薬耐性病原体への人の曝露を低減することである。しかし、AMR 低減のためには、抗微生物薬耐性の共生菌、環境微生物、またファージベクターのような他の因子も考慮する必要がある。

環境 AMR の科学者の間では、環境中の抗微生物薬耐性病原体の明らかな伝播拡散要因として、環境中の微生物、ファージ、および遊離 DNA の重要性についての議論がなされている。臨床に関連する耐性遺伝子は、人の病原体に耐性を運ぶことのできる病原性細菌または細菌に由来する可能性が高いため、これらの定量的測定方法は、焦点を当てるべき最優先事項である。

リスク低減策に関する地域的および世界的な状況

薬剤耐性微生物が観光や貿易によって大陸を横断し、容易に移動できることを示す研究結果が増えている^[142]。例として、細菌が耐性を伝達できる因子であるクラス 1 インテグロン遺伝子量の増加が報告されている^[143, 144]。

このグローバル化の進んだ状況にふさわしいリスク低減法は、各オプションの費用と相対的な有効性に基づくべきである。有効であることが証明されたリスク低減法は存在しないが、利用可能な資源や文化的状況などの不確定要素に基づいて、それぞれの方法を組み合わせることは、環境中の薬剤耐性微生物および ARG を減少させるのに役立つかもしれない。例として、すべての研究結果は、技術的介入（生物学的廃棄物処理等）を伴わない管理的介入（抗菌薬の不必要な使用を減らすことなど）、またはその逆の場合には、抗微生物薬耐性の環境レベルを減少しないことを示唆している。これは特に、廃棄物処理が機能的でない世界の 80%において当てはまる^[146]。しかし、各介入それぞれの相対的な有効性に関する情報は限られている。

過去の文献で提案されている一般的なリスク低減法には、抗微生物薬使用の改善、未処理の排水の環境への直接的な放出の低減^[145]、および耐性の共選択を促進する可能性のある「問題」汚染物質（重金属および殺生物剤）の排出の低減^[37]などの社会的、行動的、および管理的介入が含まれる。

一般的なリスク低減法には、地域における排水管理の実施または改善も含まれる。例として：

- 野外排泄を減らすために、家庭や地域、あるいは拠点となる場所にトイレ(処理がなされないものでも)を提供し配置すること
- 新たな糞便が受水に入るのを遅らせる「地域の」分散された排水管理オプション(携帯用トイレ等)、または局所における最低限の「処理」(浄化槽、排水口等)に接続されたトイレを提供すること
- 一次、二次(生物学的)、三次処理を含む集中処理施設に、地域および他の排水を運ぶ下水収集システムを提供すること
- 中枢排水処理システムへの抗微生物薬耐性の負荷を低減する、重要な供給源(病院、製造施設等)からの排水に対し選択的に前処理を行うような下水収集ネットワークを提供すること
- 排水バイオソリッドにより厳密な処理または加工を行うような、下水の収集および処理ネットワークを提供すること
- 局所の前処理と集中型の地域排水処理を備え、且つ最終的に水の再利用を可能にするための後三次処理も備えた下水収集システムを提供すること

著者らは、異なる対策のバリエーションおよびその組み合わせの、既存のインフラおよびシナリオに応じた適用を提案する。例として、発展途上の低所得国および中所得国では、環境中の薬剤耐性微生物および ARG を減少させるための最初の措置は単にトイレへのアクセスを増加させることであり、これは地方の分散化された排水処理を改善することであろう。

より発展した国において、特に希少な水の再利用が重要である場合には、何重もの排水処理が必要とされるかもしれない。これは三次排水処理から、再利用に先立つ高度な水処理までの範囲に及び得る。

環境中の薬剤耐性菌および ARG を減少させるためのリスク緩和オプション

AMR を除去するための、特に二次(生物学的)および三次排水処理のための異なるリスク低減法

の相対的有効性に関するデータが増えてきている。しかし、「最良の」オプションについては文献間でかなりの矛盾がある。さらに、リスク低減のポテンシャルに関するデータがほとんど存在しない、浄化槽等の他の分散型オプションのような、より原始的な方法も存在する。以下は、基本的な衛生状態の改善から高度三次排水処理までの範囲にわたる、既知の、または達成可能なものに基づく、異なる技術によるリスク低減法である。これらの選択肢について説明し、続いて AMR を低減につなげる可能性について説明する。

排水基本管理の改善：浄化槽、排水口、およびその関連オプション

地域での AMR 曝露を低減するための、手頃で利用可能な小規模排水管理および処理のオプションは、一般的に不足している。このような低減法は重要であり、排水衛生システムなし(野外排泄が行われているなど)の状態から、仮設トイレ(屋内トイレまたは屋外トイレ)の設置への移行は劇的な効果を生む可能性がある^[146]。これは、よく管理された排水処理プロセスを組み込むことによって、さらに改善することができる。地域の排水がより良くまとめられている場合、地域規模で生物学的排水処理プロセスを使用する等、廃棄物の処理の方向付けがより容易である。地域規模のオプションの一例としては、ほとんどエネルギー費用をかけずに薬剤耐性菌を 90% 以上減少させることができる、脱窒下向流懸垂型スポンジリアクターがある^[147]。

しかし、単純かつ利用可能な技術は広く不足しており、特に低所得国および中所得国では、AMR 低減に関する大きなギャップとなっている。このギャップは世界共通のものであり、「必要最小限の」低減策が、世界中のほとんどの地域において、排泄物から薬剤耐性微生物を除去するための唯一のオプションである。予備的検討によるデータは、よく管理された浄化槽は、薬剤耐性レベルを 50% まで低下可能であることを示唆している。したがって、浄化槽、排水口、またはそれらに準ずるプロセスを備えた仮設トイレが実装された場合、野外排泄の低減および排泄物の封じ込めによる環境 AMR の低減は(糞便に対して)1,000,000 倍にもなり得る^[146]。このような低減は、脱窒下向流懸垂型スポンジなどの局所規模の技術を使用することでさらに

促進することができる。基本的な衛生状態を改善することは重要であるが、長期にわたる維持および支援も重要であり、それは先進国と開発途上国の双方におけるグローバルな課題である。

従来の二次排水処理

WWTP は様々な処理ステップを有する。最初のスクリーニングおよび一次汚水の沈降は、容易に沈降可能な、不活性の固形物および固形物内の薬剤耐性菌を含む生物学的固形物を除去する。これは、必要最小限度のリスク低減のための排水処理オプションと同様である。一次沈降後、生物学的処理工程で使用される技術は、薬剤耐性微生物が除去されるか、または未処理のまま通過するかを左右する。生物学的処理（二次処理とも呼ばれる）とは、可溶性有機物（元の廃棄物中の生物、およびそのプロセスで濃縮された生物を含む、その物質中で増殖する微生物）の除去を目的としている。生物学的処理の後、この混合された微生物群は、二次沈降（時には濾過）によって液体流から分離される。これにより、別々に処理される 2 つの流出物流、すなわち上清である液体流出物およびバイオソリッドが生成される。

生物学的処理プロセスは、それぞれ薬剤耐性微生物および ARG を減少させる能力が大きく異なる。例として、従来型の生物学的処理は典型的には一次処理後 ARG の約 90%を除去するが、99%以上除去可能な技術も存在する^[146]。しかし、これらの推定値は液体流出物についてのみのものである。これは、バイオソリッド中に分離された耐性微生物および ARG を含まない。また、残留金属および抗微生物薬など、生物学的処理システムにおいて細菌間の遺伝子水平伝播を促進し得る、選択圧となる薬剤の、排水中の存在に対する懸念もある。これが起こることを示すエビデンスも存在するが、実際の活性化汚泥における遺伝子伝達の割合は比較的低いようである^[148]。WWTP 内の耐性伝達の程度を明らかにするためには、より多くの研究が必要である。

世界的な AMR の脅威を助長する主要な要因は既存の技術の脆弱性ではなく、世界中の広い地域で二次処理が不足していることにあることを示す研究結果が増えている。しかし、これは現在の生物学的処理オプションが完全であることを意味するもの

ではない。特定の種類の耐性が排水処理中で選択され得るという研究結果がある^[149]。病原体を含む、WWTP に侵入する排水中の薬剤耐性腸内細菌のうちわずかであるがその一部が、現在の二次処理システムの中で選択的に生き残るという研究結果も増えている^[14]。その理由は知られておらず、さらなる研究が必要である。

これらの弱点に対処するため、既存の WWTP からの薬剤耐性微生物および ARG の放出を低減するために、既存の WWTP のプロセスの改変および改良が行われている。例えば、嫌気性処理および好気性処理に用いられるバイオリクターのシーケンシングは、ARG の多様性および処理された流出物中の存在量をさらに 60%減少させることができる^[150]。膜分離プロセスなどの他の技術は、薬剤耐性微生物の除去において有望な結果を示しており、下水に放出する前段階における供給源の前処理は、WWTP に入る前段階での（例えば、下水貯水池内の病院排水源から）遺伝子水平伝播が可能な細菌の除去に有効かもしれない。

三次排水処理

二次 WWTP 流出物の三次処理の方法には、殺菌剤および他の酸化剤の使用、ならびに濾過のための様々なオプションが含まれる。

塩素殺菌は、標準的な塩素用量および接触時間で使用する場合、細菌の約 99%の除去を達成することができる。しかし、薬剤耐性菌の塩素処理に対する感受性は若干低いようであるため、薬剤耐性菌をさらに減少させるためにはより高い用量が必要とされる可能性がある。しかしながら、より高い塩素用量はまた、水の再使用時の潜在性の懸念となる、より高いレベルの発がん性殺菌副産物を生成する可能性がある。

紫外線 (UV) 殺菌は殺菌副産物を生成しないため、塩素の代替物となる。通常の殺菌過程における微生物の不活性化のためには一般的に 5.0~約 200 mJ/cm² の用量が使用され、10~20mJ/cm² の用量によって薬剤耐性菌の 99.9%までを不活性化できることが明らかになっている。しかし、ARG に対しては、比較的高い UV 線量であっても 90~99%の除去しか達成できない。UV 処理は有望な方法ではあるが、排水処理に共通の問題である、より

大きな固体物質の存在下においてはあまり効果的ではない。

塩素処理および UV の他に、細菌および他の負荷を低減するための三次処理のオプションには、オゾン処理を含めた他の高度な酸化プロセスが含まれる。オゾンは細菌および病原体の破壊について保証された強力な酸化剤であり、適切な用量および接触時間によって薬剤耐性菌および ARG のレベルを低下させることができる。しかし、オゾン処理は非常に費用がかかり、薬剤耐性大腸菌やブドウ球菌属を含む一部の菌株がオゾン処理によって増加する可能性があることを示す研究報告がある^[151]。これらの問題はあるものの、オゾン処理は塩素処理または UV よりも効果的な殺菌法であると考えられ、三次処理法の候補である。

他の三次のリスク低減オプションには、殺菌剤と、精密濾過、限外濾過、ナノ濾過、および逆浸透などの他の技術との組み合わせが含まれる。これらのオプションのうち膜技術は、薬剤耐性菌および ARG を低減するのに最も効果的であると思われる。この技術は三次排水処理や水の再利用にもおそく使用することができ、種々の細菌に対し有効である。しかし、膜分離技術以外のそれぞれの方法における AMR 低減のデータは、薬剤耐性菌および ARG についてのものに限定されている。さらに、膜低減技術はより高価になる傾向があり、十分な資源を有する場合にその適応は限定される。

下水システムに入る前段階での供給源の前処理

下水道への排水源（病院排水など）の中には、より高いレベルで薬剤耐性微生物および ARG を含み、遺伝子水平伝播の起こりやすい薬剤耐性微生物を放出し得るものがある。Lamba ら^[12]は、独自の WWTP を有するインドの病院の、排水中の CRE や *bla*_{NDM-1}、および遺伝子水平伝播や糞便指標細菌について研究した。非常に高レベルの CRE および *bla*_{NDM-1} が処理後の病院排水中から検出されたが、定性的な検討では、この研究における WWTP のほとんどがよく管理されていないか、または薬剤耐性菌を減少させるのに適していなかったことが示唆された。

現在ほとんどの国で排水処理において実施されていないが、病院排水などの重要な供給源をターゲットとした前処理は、地域における既存の

WWTP への AMR 負荷を軽減するために有効な方策である可能性がある。排水を処理する費用は使用される技術および処理される廃棄物の量に基づくという事実からも、この方策は好ましいものと思われる。供給源に対する全処理は、処理量のはるかに少なくすむ可能性があり、このことはより積極的に高価な技術が AMR 供給源に対する前処置に適用可能であることを意味する。

供給源処理の方法の選択のためには、レジストームを含む微生物学的環境に対する理解が必要である。重要な供給源が同定されれば、費用効果の高い前処理法が可能であり、この方法は病原体を含む環境中に放出される薬剤耐性菌を低減するための既存の WWTP の改良と組み合わせることができる。

動物糞尿を含む排水バイオソリッドの処理

過去の研究によって、未処理の都市排水中の ARG の 90～95%が、排水汚泥中に分離され物理的に除去されることが示された。残留排水汚泥中の有機物含有量を減らし、病原体を不活性化するために、多くの技術が利用可能または実際に利用されている。これらの技術がまた、様々な程度で ARG の量を減少させることが可能であることは驚くべきことではない。米国 EPA は、バイオソリッドから「病原体を有意に低減させるための」5 つの処理プロセス、すなわち、好気性および嫌気性消化、空気乾燥、堆肥化、および石灰安定化を推奨している。これらの「病原体を有意に低減させるプロセス」は、従来のプラントの混合汚泥中の病原性細菌、ウイルス、または寄生虫の密度を着実に減少させる。また、堆肥化、熱乾燥、熱処理、好熱性好気性消化、ベータ線照射、ガンマ線照射、低温殺菌の 7 つの「病原体をさらに低減させるプロセス」がある。これらのプロセスは、処理された汚泥が使用または廃棄される時点で、下水汚泥中の病原体を検出可能レベル以下に着実に低減するために使用される。一般に、「病原体をさらに低減させるプロセス」は ARG もある程度低下させることができるが、「病原体を有意に低減させるプロセス」は、ARG のより迅速かつ広範な減少を達成することができる^[152]。

これらの同じ技術は動物糞尿を処理するためにも使用され得るが、一般的ではない。処理される代わりに、動物糞尿は通常、ARG がはるかに遅い速

度で減衰する土壤に直接（処理なしまたは最小限の処理で）適用される。実際、ARG は土壤中に糞尿適用前よりも高いレベルで少なくとも 6 ヶ月間検出されることが明らかとなっており^[60]、これは動物糞尿が年 2 回以上土壤に施用された場合に ARG が経時的に蓄積し得ることを示している。

処理された排水汚泥は、添加剤または肥料として土壤にも適用される。排水汚泥または未処理の動物糞尿が適用された土壤中の ARG は、コントロール（排水汚泥や糞尿を適用していない土壤）と比較して上昇し得る^[153, 154]。しかし、この上昇のレベルは、供給源の人および動物における抗菌薬の使用を減らすとことで低下する^[84, 155]。米国 EPA 病原体低減プロセスを使用することにより、ARG の存在が有意に低減される^[156, 157]。ある研究において、排水汚泥を「病原体を有意に低減させるプロセス」を使用して処理した場合、土壤中の ARG レベルが 6 ヶ月以内にバックグラウンドレベルに戻ったが、「病原体をさらに低減させるプロセスをのみ使用して排水汚泥を処理した場合、ARG レベルはコントロールに比べて上昇したままであった。これは、「病原体を有意に減少させるプロセス」が薬剤耐性菌を除去するのに最も有効であることを裏付けるものである^[158]。

排水汚泥や動物糞尿の処理および取り扱いの改善は、薬剤耐性菌の広がりを低減するための実質的な機会につながり、排水汚泥や動物糞尿をより広く処理し、排水汚泥や動物糞尿を土壤にあまり頻繁に適用しないための効果的なプロセスおよび技術の実施によって達成することができる。

抗微生物薬の製造と廃棄

著者

- Professor Diana Aga (University of Buffalo)
- Professor Julian Davies (University of British Columbia)
- Sumanth Gandra (Center for Disease Dynamics, Economics & Policy)
- Professor Barbara Kasprzyk-Hordern (University of Bath)
- Professor Joakim Larsson (University of Gothenburg)
- Professor Jean McLain (University of Arizona)
- Dr. Andrew Singer (NERC Centre for Ecology and Hydrology)
- Jason Snape (Astra Zeneca and Newcastle University)
- Herman Slijkhuis (DSM Sinochem Pharmaceuticals Inc.)
- Dr. Andrew Sweetman (Lancaster University)
- Professor Nick Voulvoulis (Imperial College London)

要約

- 効果的な管理策が講じられていない状態で抗微生物薬が製造された場合、環境への医薬品成分(API)の放出が起こる可能性がある。製造過程で周囲の環境(土壌、水など)に大量の抗微生物薬が放出される可能性があり、薬剤耐性菌の選択につながる可能性がある。
- 抗微生物薬汚染による選択圧がかかることで、環境水中の耐性菌濃度が高くなる可能性がある。人間が高レベルの耐性菌を含む水に曝された際の高い感染リスクや、耐性菌の定着リスクが知られている。
- 抗微生物薬の製造過程で発生する廃棄物がどの程度環境を汚染するかは不明であるが、製造過程では大量の抗微生物薬含有廃棄物が生成されるため、汚染の可能性は高い。
- 環境中に放出された API の量を把握したり、リスク評価を行うためには、廃棄量のデータにアクセスする必要がある。しかし、ほとんどの製造業者は自発的にデータを開示せず、また、排水中に放出された API を報告する義務はない。
- 抗微生物薬を含む排水の制限に関する国際的な基準はない。
- 抗微生物薬の製造過程で排出された、水および水環境中の医薬品成分を分析する科学的手法は存在するが、結果を比較するためには国際的に認められた標準的な方法が必要である。
- 薬剤耐性との戦いに関するロードマップ(The Industry Roadmap for Progress on Combating Antimicrobial Resistance)は、13 の業界リーダーによって採用されており、抗微生物薬製造による環境への影響を減らすための重要な手順を概説している。医薬品アクセス財団は、2018 年 1 月の薬剤耐性ベンチマーク(AMRB)(2020 年にリリースされる環境管理指標を含む)を更新することにより、この取り組みを続けている。

知識格差の是正

科学的レビューは、以下に述べる行動が我々の理解の向上しさらなる行動へと導くことを示唆している。以下のアクションが理解を改善し、追加のアクションを導くことが示唆されている：

- 製造過程からの抗微生物薬の流出を明らかにするための標準化されたモニタリング手法を開発・検証する。
- パイロット試験を実施して、科学的専門家によって提案された排出制限の実現可能性とコストを評価する。
- グリーン調達などのインセンティブを設定し、評価することで、抗微生物薬製造過程から発生する汚染物質をタイムリーかつ効果的な方法で削減する。
- 抗微生物薬の製造が行われている国において、環境汚染を制限する方策を開発し、AMR Industry Alliance 等業界パートナーと協力して方策を評価および実現する。

背景

抗微生物薬は、効果的な制御手段を講じずに製造された場合環境中に放出される可能性があり、放出された抗微生物薬によって環境中の薬剤耐性菌のレベルが高まる可能性がある。抗微生物薬の製造過程では大量の抗微生物薬が使用されるため、製造過程から出た廃棄物は環境を汚染する可能性がある。この環境汚染は人間の健康に影響を与える可能性があるため、リスクを最小限に抑えるための対策を講じる必要があるが、リスクを完全に理解するためにはより多くの調査が必要である。このリスクに対処するためには、以下の要素が必要になる場合がある：

- 抗微生物薬またはその成分による環境汚染を最小限に抑えたり、排除するような抗微生物薬製造方法に関する知識
- 環境中の抗微生物薬またはその成分をモニタリングするための標準化された方法
- 環境への抗微生物薬の排出許容量に関する合意
- 製造過程の改善

科学的課題

A. 抗微生物薬はどこで、どのように製造されるか？

抗微生物薬の製造

抗微生物薬の製造プロセスには、発酵、合成および半合成の 3 つのプロセスがある(表 2)。ほとんどの抗微生物薬は発酵を利用して製造されており、現在市販されている約 120 種類の抗微生物薬がこの方法を用いている。合成または半合成により製造される抗微生物薬は約 50 種類と少ない^[159]。

当初、抗微生物薬は真菌(ペニシリン等)または土壌細菌(ストレプトマイシンやテトラサイクリン等)によって自然に作られていた^[160]。現在、発酵に用いられる微生物は、抗微生物薬の収量を最大化するためにしばしば遺伝子組み換えが行われている。遺伝的修飾は、微生物を紫外線、X 線または他の変異原に曝すことにより生じる。遺伝的増幅は、収量を増やすために用いられる別の手段であり、プラスミドを用いて遺伝子のコピーを微生物に挿入することにより生じる。この遺伝子は、抗微生物薬の生産に関与する酵素をコードしている。

抗微生物活性を持った抗微生物薬製造廃棄物は、排水や固形廃棄物を介して環境中に侵入する可能性がある^[161]。例えば、1,000 kg の抗生物質(プロカインペニシリン G)の製造過程では以下のものが発生する^[162]：

- 10,000 kg の湿った菌糸体
- 35,000 kg の湿った汚泥
- 56,000 L の発酵液廃棄物
- 1,200 L の廃溶剤

各廃棄物に含まれる成分は、廃棄する過程で抗微生物薬の汚染源となる場合があるが、有効成分のレベルは抗微生物薬の種類および製造過程によって異なる。

世界的生産

抗微生物薬のサプライチェーンは複雑で全地球規模であり、多くの利害関係者が関与している(図 1)。抗微生物薬は世界的な需要が高いため、製造は高

度に商業化されている。政府当局は、製造の規制において重要な役割を果たす。

毎年、抗微生物薬の製造量は世界中で 100,000 トンを超えている^[163]。家畜は 2010 年に少なくとも 63,000 トンの抗微生物薬を消費し、この量は製造された抗微生物薬のほぼ 66 %を占めている^[164]。一部の予想では、2030 年までに、抗微生物薬による動物の治療の増加と、大規模農業から集約農業への移行が起こるため、抗微生物薬の製造は少なくとも 3 分の 2 増加するとされている^[165]。

多くの製薬会社は、製造を人件費や資本コストが安いインドと中国に外注している。薬剤耐性に関するレビュー(2016)¹によれば、これらの国々は他の国よりも環境保護法が劣っている。アジアは、抗微生物薬を含む医薬品成分(API)の世界的に主要な生産地および供給地である。API は、患者(人間または動物)に影響を及ぼす医薬品内の生物活性物質である。

API 生産をマッピングするためのデータの不足

現在、各国でこの情報を報告する必要があるため、世界的に毎年生産される API の量および生産地に関する公開情報はほとんどない。さらに、製造に対する規定も異なる。例えば、欧州医薬品庁の人間用医薬品の環境リスク評価に関するガイドライン(2006)^[166]では、市場での認可を受ける前に、医薬品は環境リスク評価を受ける必要があると規定されている。しかし、この要件は、ガイドラインが設定された 2006 年より前に市場に出された抗微生物薬には適用されておらず、環境中での AMR 発生に関するリスク評価は必要とされていない。米国では、規制当局が国内の製造廃棄物に制限を設けているが、海外で生産する際に出た廃棄物に関しては制限を設けていない。

¹ 英国首相は、2014 年 7 月に薬剤耐性に関するレビューを委託した。首相は、経済学者の Jim O' Neill に世界的な問題を分析し、具体的な行動を提案するよう依頼した。英国政府とウェルカムトラストが共同で支援を行った。

B. 現在、廃棄物由来の抗微生物薬で環境はどの程度汚染されているのか？ 環境汚染は環境中の AMR の増加を引き起こすのか？

その影響と潜在的なリスクの観点から、抗微生物薬の製造工場からの局所的な排出は、人々が治療に使用した抗微生物薬の排出（すなわち人間の排泄物）よりも多くの抗微生物薬汚染につながる可能性がある。抗微生物薬は人口のごく一部で用いられているため、人間の排泄物を介して排水処理システムに入る API の濃度は一般的に低い。さらに、汚染物質の除去に対する各排水処理プロセスの有効性は異なるものの、その処理過程で排水中の抗微生物薬は削減される。通常、処理後の排水や河川水に存在する API は、効果的な排水処理プロセスによって非常に低い濃度（ng/L レベル）となる。

対照的に、製造工場からの API の直接的な排出は、周辺の高濃度の抗微生物薬をもたらす可能性がある^[167]。場合によっては、製造過程から出た排液中の抗微生物薬の濃度は、抗微生物薬を服用している患者の血中濃度よりもはるかに高くなる。Larsson ら^[168]は、インドの約 90 の医薬品メーカーにサービスを提供している排水処理プラント（WWTP）において排水中の様々な API を分析した。この研究では、28～31 mg/L のシプロフロキサシンと 0.15～0.9 mg/L のフルオロキノロンが検出された。Lübbert ら^[169]はインドの製造拠点周辺においてそれぞれ 0.69 mg/L、2.5 mg/L および 240 mg/L のモキシフロキサシン、ポリコナゾールおよびフルコナゾールを報告した。Li ら^[170]は、中国河北省の医薬品製造施設からの処理済み排水中のオキシテトラサイクリンの濃度は 20 mg/L であると報告した。これらの高濃度の API は、製造排水および河川水だけでみられるわけではない。例えば、Kristiansson ら^[171]は、インドの産業排水処理施設の下流の底質中の有機物には、1 kg あたり 914 mg のシプロフロキサシンが存在したことを報告した。

多くの研究が、インドと中国の排水中の抗微生物薬濃度の上昇を報告しているが、世界中の抗微生物薬製造が行われている地域から同様の報告がある^[167]。例えば、パキスタンのラホールでは、医薬品製造工場の下流にある水路から 49 µg/L のスルファメトキサゾールと、他のいくつかの抗微生物薬が低濃度ではあるが発見された^[172]。韓国では、最大 44 mg/L のリンコマイシンが製薬会社の排水処理施設からの流出水中で検出された^[173]。クロアチアでは、医薬品

製造工場からの排水から最大 3.8 mg/L のアジスロマイシンが検出された^[174]。

AMR は全ての環境に存在するが、ARG と可動性遺伝因子の量は、高レベルの抗微生物薬汚染のある環境中ではかき多いことが分かった^[175, 176]。ある研究では、スウェーデンにある下水や産業廃棄物で汚染されていないレクリエーション湖中の耐性遺伝子と可動性遺伝因子の量を調べ、これをフルオロキノロン製造廃棄物汚染に曝されているインドの湖水と比較した^[175]。インドの湖では、スウェーデンの湖と比較して ARG が 7,000 倍も多かった。可動性遺伝因子の量もインドの湖水のサンプルでより多く検出された。他の研究では、工場から排出された抗微生物薬により汚染された環境中の細菌群集と、廃水汚泥、人または動物からサンプリングされた細菌群集を比較した場合、ARG の相対量や多様性は工場からの抗生物質に汚染された環境中の細菌群集のほうが高かった^[176]。

細菌群集が高レベルの抗微生物薬に曝されると、耐性レベルは細菌群集内で劇的に上昇し、可動性遺伝因子の働きが促進されることによって耐性遺伝子が他の細菌に移動する。インドの研究では、93 種類の病原性および非病原性環境由来細菌株の耐性プロファイルを調査した。これらの株は、抗微生物薬を含む排水が流入する排水処理施設から得られた。得られた全ての株のうち、86 % は 20 以上の抗微生物薬に耐性があった。さらに、95 % は少なくとも 1 つの可動性遺伝因子を保持していた^[177]。中国の他の研究では、オキシテトラサイクリン製造工場からの排水が流入する排水処理施設から得られた 341 の環境由来細菌株の耐性プロファイルを調査した。排水処理場、下流の河川水および上流の河川水からのオキシテトラサイクリン耐性株の割合は、それぞれ 95 %、86 % および 3 % だった^[178]。可動性遺伝因子は、排水処理施設由来の株と、下流の河川水から一般的に検出された。興味深いことに、排水処理施設と下流の河川水両方から分離された多剤耐性菌の割合（96 %）も、上流の河川水（28 %）と比較するとはるかに高かった。最近の研究では、1 種類の抗微生物薬が過剰に存在する場合においても、多剤耐性株の割合が高い理由として、複数の耐性遺伝子を含む可動性遺伝因子が関わっていることが示されている^[179]。

^{180]}。インド、中国、クロアチアでの同様の研究では、薬剤耐性菌は、上流のサンプリング地点と比較して、製造工場の排水が河川に流入する地点でより豊富に存在することが示された^[180、181]。

抗微生物薬の製造と、環境中に存在する高レベルの抗微生物薬との間には明確な関連があるが、排出量のデータがないため、全ての地点で問題の程度を知ることは困難である。2018 年の AMR ベンチマークレポートで報告されているように^[182]、企業は自発的に排出量を報告しない。また、当局は排出量のデータの収集や、制限の設定をしていない。工場からの

抗微生物薬排出の影響を受けた水中の細菌が、高レベルの薬剤耐性および耐性遺伝子を持つとの報告があるにも関わらず、抗微生物薬の環境への排出が人間の健康に及ぼす影響に関する情報は限定的である。高レベルの薬剤耐性菌を含むレクリエーション用水への人間の暴露は、一部の感染症の罹患リスク増加と関連していることが分かっている。抗微生物薬と薬剤耐性微生物が様々な環境中でどのように拡散していて、どのように人間の健康への影響が発生するかについての完全な理解が急務である。

C. どの対策が環境汚染を抑えるための最も重要であるか？

抗微生物薬製造過程からの抗生物質の排出を削減するために、技術的手段とインセンティブの組み合わせが実現可能である。両方のアプローチは、タイムリーかつ効果的な方法で抗微生物薬による環境汚染を制限または排除するために必要となる場合がある。

インセンティブ・アクションと規制

様々な法的、経済的または社会的インセンティブが、抗微生物薬製造に伴う環境汚染削減を促進できる。これらのインセンティブは、規制当局、政府、一般人、メディア、国際機関(WHO など)、投資家、製薬業者、研究者および保険会社など、多数の利害関係者の協力のもとに実現できる。

抗微生物薬を購入する際は、製品のライフサイクル全体における環境管理など、コストと品質以上のことを考慮する必要がある。

責任ある製造に報いる調達慣行(グリーン調達など)が、最も強力な影響を与える可能性がある。非金融的インセンティブの例として、医薬品アクセス財団(Access to Medicine Foundation)の一例が挙げられる。この財団は、2 年ごとにベンチマークレポートを発行しており、これは製薬会社が製造工場からの排出を制限するためのより強力な取り組みを行っていることを示す。ベンチマークレポートには、環境保護戦略とサプライチェーンに関する重要な情報を開示している企業も記載されている(<https://amrbenchmark.org>)。医薬品アクセス財団は、政府や投資家を含む複数の利害関係者と協力して、業界全体での医薬品の製造

と品質管理に関する基準の認識と普及を請け負っている。

抗微生物薬排出の制限は、文献で提案されている(以下の排出制限の定義を参照)。様々な抗微生物薬製造プロセスがこれらの制限を満たすか否か判断する必要がある。排出制限の合意は、グリーン製造を促進し、製造業者間の公平性を生み出すであろう。現在、国際的な排出制限やクリアな監視システムはなく、多くの国ではほとんどまたはまったく制限がない。

管理アクション

人に投与される抗微生物薬のうち、推定 20～30 % が不適切に使用されている^[183、184]。効果的な抗微生物薬の管理(より良い処方のかたや適切な診断)は、抗微生物薬の使用量を減らし、製造量を減らすため、製造過程での環境への悪影響を減らすことができる。抗微生物薬の需要や使用量が非常に多く、抗微生物薬へのアクセスが未だ制限されている低所得国において、処方箋などによる管理は抗微生物薬使用量の削減に役立つが、それでも環境負荷を減らすための部分的な解決策に過ぎない。

技術的なアクション

製薬会社による責任ある製造の実施への献身が高まっている。2016 年には、100 社以上の企業が AMR 対策に関するダボス宣言に署名した。これは署名企業に、「抗微生物薬による環境汚染を低減する

ための対策支援」を求めたものである。サプライチェーンに対するもう一つのアクションとして、2016 年に 13 の製薬会社(研究重視の企業の多くを含む)によって発表された、薬剤耐性との戦いに関するロードマップ(The Industry Roadmap for Progress on Combating Antimicrobial Resistance)が挙げられる。署名企業は、抗微生物薬の生産による環境への影響を以下の方法で削減する計画に同意した:

- 医薬品の製造と品質管理に関する基準を評価するための製造およびサプライチェーンの監査
- 抗微生物薬排出を管理するための共通の枠組みを確立し、Pharmaceutical Supply Chain Initiative などの既存の取り組みに基づいて、2018 年までにサプライチェーン全体に適用を開始する
- 利害関係者と協力して、サプライチェーンが枠組みの基準を満たしていることをクリアに実証する実用的なメカニズムを開発する
- 独立した技術専門家と協力して、2020 年までに抗微生物薬含有廃棄物の環境への影響を低減するための抗微生物薬の排出濃度と製造管理法に関するリスクベースの目標を科学的観点から確立する

製薬業界は、製造過程で出た廃棄物によって生み出される AMR によってもたらされるリスクにも対応し始めている。2018 年 1 月、AMR Industry Alliance は製造業者による環境への影響を評価するための枠組みを作成した(<https://www.amrindustryalliance.org/why-the-amr-industry-alliance>)。抗微生物薬製造の枠組みは、サプライチェーンをマクロとミクロの両方から制御する場所のリスク評価を行うために必要な最低減の設備や方法を供給する。

製造過程で発生した廃棄物を軽減するために行われている一般的な製造慣行として、製造プロセスまたはバッチ反応器の洗浄効率を改善して、抗微生物薬含有廃棄物を排出する前に抗微生物薬を捕捉して処理する方法が挙げられる。標準的な排水処理施設は、API を処理または除去する能力を有しているが、除去率はさまざまである。廃棄物は異なる API の複雑な混合物によって構成されており、混合物の組成は製造施設が生産している薬品に依存している。それぞれの施設の API には、不純物、溶媒、緩衝液、殺虫剤、触媒、金属および微生物が混在している。

有害な医薬品製造廃棄物を処理するための幾つ

かの方法が文献に記載されているが、最も完全な方法は焼却である。医薬品含有排水の抗微生物活性を除去するための革新的な方法として、以下の方法が挙げられる:

- 焼却は、全ての抗微生物活性をなくすのに効果的である。最も効果的な方法ではあるが、おそらく最もエネルギー消費の激しい方法である。
- 微生物学的処理には、微生物による排水中の有機成分の好気性または嫌気性分解が含まれる。この方法は非常に効果的ではあるが、制限があるため、潜在的に不完全な方法である。排水中に含まれる有毒成分は微生物を殺すおそれがあり、処理効率を低下させる可能性がある。
- 酵素を用いる処理では、排水中の化学物質を分解する特定の酵素を使用する。この方法は生きた微生物を必要としないため、排水中の有毒成分の問題はあまりない。また、微生物学的処理とは異なり、酵素は自然に分解されるため、下流の環境を汚染するリスクが低くなる。
- 化学的処理は、酸、塩基、フェントン試薬、オゾンまたは塩素を使用して廃水中の有機成分を化学的に分解する。廃水は、溶存有機負荷を対処するために中和と二次処理を必要とする可能性がある。
- 排水中の有機化合物を炭などに吸着させることによる除去方法は、広範囲の化学物質の除去に効果的だが、高価な場合がある。
- 光触媒処理は、フォトリアクターと呼ばれる特殊な機器から光とフリーラジカルを生成することで、廃棄物を処理する。
- UV 処理は、太陽から放出される UV 光を再現する方法であり、多くの環境汚染物質を劣化させる。
- 電気化学的分解は、排水中の有機化合物を酸化する効果的な方法である。このプロセスに続いて、UV 処理や化学的処理などの二次処理が行われる。

これらの処理方法のいくつかは、新しい廃棄物の問題を生み出す可能性がある。例えば、吸着によって抗微生物薬を除去すると、追加の固体廃棄物が生成され、廃棄に特別な処理が必要になる可能性がある。さらに、分解技術では、分解過程で抗微生物活性を持つ物質(代謝物など)が生成される可能性があるため、反応を注意深く監視する必要がある。API を代謝する微生物学的処理では、耐性菌の選択が

起こる可能性があり、追加の処理を行わなければ新たな耐性菌が環境中に侵入する可能性がある。

ほとんどの処理プロセスでは、抗微生物薬を含む液体廃棄物に焦点を当てられているが、固体廃棄物もまた汚染源となる可能性がある。例えば、発酵による製造プロセスでは、抗微生物活性を有する残留物

を含む菌糸マットが生成される。場合によっては、この廃棄物は動物農場の飼料として使用される。抗微生物薬がマットに存在する場合、この慣習によって、動物および農場の環境における薬剤耐性の選択リスクが増加する可能性がある。

D. 環境汚染を防ぐための既知の対策を実施することで生じる経済的な影響は何か？

抗微生物活性のある API 製造排水を処理するための最も経済的な方法は、以下の要因に依存している：

- 除去する化合物の種類
- 環境中で許容される抗微生物薬の濃度
- 処理に必要な技術の種類
- 製品および廃棄物の量
- 製造場所

処理費用は、処理後の廃棄物に含まれる抗生物質の許容レベルに大きく依存する。受け入れ環境における抗生物質の許容レベルに関する議論は進行中であり、いくつかの文献で提案されている^[104, 185]。責任を持って抗微生物薬を製造する製薬会社は、主に環境毒物学または生物学的毒性試験に基づいて、独自の制限を設けている。ただし、これらの制限は、薬剤耐性が発生するリスクを最小限に抑えるための許容レベルを見越したものではない。AMR Industry Alliance の製造部門の活動の一つは、科学的視点に基づいたリスクベースの目標を設定することである。

一般的に、微生物学的処理は、最も経済的に廃棄物を処理する方法である。ただし、ARG を保有する微生物集団が発生し、抗微生物活性を持つ化合物を分解する能力を持つ可能性がある。したがって、余

剰汚泥の適切な取扱いと排水処理が必要である。排水中の有害物質が増えると微生物が死ぬ可能性があることを認識することも重要である。微生物を殺す可能性のある排水中の有害物質は、微生物学的処理の前に別の処理方法（例えば、高度な酸化）によって除去する必要がある。また、排水には抗微生物活性を持つ化合物が含まれている可能性が高く、追加の処理（炭素処理など）が必要である。

焼却は、大量の有機溶媒または他の有機化合物を含む排水に最適な方法である。高レベルの無機物質（主に塩）を含む排水は、通常、多段蒸発法で処理され、排水中の抗微生物活性を持つ菌性化合物はこのプロセスの中で除去されるであろう。そうでなければ、排水は多段蒸発法の前に処理する必要がある。焼却ユニットから来る水は微生物学的に処理されるべきであり、固形物は地域の規定（通常、埋立て地への分配を含む）に従って廃棄されるべきである。

多くの場合、処理のための高度な機器に投資することにより、運用コストを削減できる。受け入れ環境における抗微生物薬濃度が、予測される無影響濃度値を超えないことを確認するための総コスト（投資および運用コストの減価償却費として定義）は、API または中間物のコストの 15 %と推定（業界のある著者による未発表の推定）される。査読済みの公開された経済的分析が必要である。

E. 環境汚染を測定する標準法は確立されているのだろうか？

抗微生物薬製造廃棄物をモニタリングする標準法および法令の不足

排水は、処理プロセスの種類に応じて異なる特性と汚染物質濃度を有している。排水に含まれる主な化学物質は、溶剤、洗剤、消毒剤、および医薬品で

あり、これらはすべて潜在的に環境毒性（環境に有害）である。揮発性有機化合物（例：EPA メソッド 1671^[186]）およびホルムアルデヒド、イソブチルアルデヒド、フルフラールなどの他の水溶性有機化合物（例：EPA メソッド 1667^[187]）をモニタリングする標準的な方法はあるが、排水処理過程で発生する可能性

のある API 残留物またはその化学変化過程で生じる生成物を分析する標準的な方法はない。抗微生物薬製造廃棄物中の API 分析の標準的な方法がないことは、環境における薬剤耐性の原因とメカニズムを調査する際の重要なギャップである。

製造業者は、薬剤耐性の発達と増加の重要な要因と考えられているにもかかわらず、排水排出過程で放出された API の量を報告する義務はない。抗微生物薬の極性および揮発性は低いいため、環境および生体サンプル中のこれらの化合物の分析は、一般的に液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析を組み合わせて行われる (LC-MS)。これにより、高度な選択性感度が示される。しかし、LC-MS 分析の精度は、サンプル基質中の共抽出成分が LC-MS のクロマトグラフィー分離およびイオン化プロセスに干渉するため、シグナルの抑制および増強の影響を著しく受ける可能性がある。

基質が標的分子のシグナル強度に影響する度合いは大きく異なり、分子の種類と基質の組成 (フミン酸、タンパク質、リン脂質など) に依存する。抗微生物薬の検出で最も頻繁に使用される方法には、選択的反応モニタリングモードで動作するトリプル四重極型 MS を備えた液体クロマトグラフィー、選択的タンデム質量分析 (LC-MS/MS) が含まれる^[188-192]。

機器の進歩は、ハイブリッド四重極線形イオントラップ MS 検出システムと組み合わせた超高压液体クロマトグラフィーを使用することで、水性サンプル中の複数のクラスの抗微生物薬のより迅速かつ選択的な分析を可能にした^[193]。LC-MS 法は非常に感度が高く、抗微生物薬の種類とサンプル基質の複雑さによっては、定量限界がサブ ppt レベル (1~100 ng/L) に達する。これらの方法は、複数の残留物の分析を可能にする。例えば、1 回の短い分析 (例: 30 分間) で 100 以上の化合物を分析できる。これらの分析には、すべての主要な抗微生物薬、その代謝産物、変化生成物、および殺虫剤などの他の共選択剤が含まれる可能性がある。

あまり一般的ではないが、MS でのガスクロマトグラフィー (GC) の使用も報告されている (GC-MS)^[194]。GC-MS の使用は、揮発性の形に誘導体化 (化学的に変化) できる抗微生物薬に限定される。製薬および水部門のほとんどの分析ラボは、LC-MS または GC-MS の機能を備えた認定ラボを所有しているか、アクセスできる。

抗微生物薬分析のための公開された方法があり、

この方法は結果を正確に再現するための強固な検証データを提供する。しかし、これらの方法は標準法ではなく、ラボごとに異なっている。水圏環境での抗微生物薬に関するほとんどのデータは、都市や病院の廃棄物や農業用水を受ける地表水由来のものである。さらに、ほとんどのデータは、通常、国の資金提供機関または研究財団によって支援されているローカライズされた研究プロジェクトから得られる。抗微生物薬やその代謝産物および分解生成物の残留濃度に関する情報を提供する政府規定がないため、抗微生物薬製造業者が、製造廃棄物中の抗微生物薬の量に関するデータを国内および世界レベルで明らかにすることは、不可能ではないが困難である。強固で目的に合った包括的な標準法を使用した、抗微生物薬製造廃棄物中の抗微生物薬濃度に関するより多くのデータ収集が必要である。

抗生物質の現在の分析方法の課題と制限

前述したように、LC-MS を使用した環境サンプル中の抗微生物薬の分析は、基質成分 (例えば、高濃度の塩、溶存有機化合物、タンパク質、および脂肪酸) からさまざまな干渉を受ける。これらの成分は、偽陽性および偽陰性の検出につながる可能性がある。実際に、高濃度の医薬品有効成分の前駆体 (上流成分)、産物の発酵、または化学合成の副産物のために、製造廃棄物中の抗微生物薬の測定はエラーが発生しやすい可能性がある。その他の課題には、抽出回収率の低下、LC-MS でのイオン化抑制、および予測不可能な基質の影響がある。これらは、環境中の抗微生物薬分析における一般的な課題であり、製造廃棄物の分析に限らない^[195]。従って、製造排水の分析において、同位体標識された抗微生物薬の類似体を代用物として使用して、抽出回収率と基質の影響の変動を補正することが不可欠である。あいにく、すべての抗微生物薬が市販の標識類似体を持っているわけではなく、その場合はサンプルの調製および測定中の損失を考慮して、目的の抗微生物薬に構造的に近い内部標準物質を代理として使用する必要がある。さらに、LC-MS 法はその性能基準を確立する必要がある。このような基準の例として、イオン測定のスループット可能な変動の設定や、クロマトグラムのスループット可能なリテンションタイムの変動の設定がある。最後に、サンプルの保存や準備が抗微生物薬の安定性に及ぼす影響を評価する必要がある。

ある。サンプルのろ過や抽出以前の保存温度、保存期間、または化学添加物（サンプルの酸性化など）が分析物の完全性に影響するかどうかは不明である。

都市の下水処理場から放流される地表水中の抗微生物薬の濃度は、通常低濃度 ($\mu\text{g/L}$ レベル未満) であるため、幅広いサンプル調製と濃縮が必要である。固相抽出（すなわち、混合物から化合物を分離するプロセス）は、河川水や排水などの液体基質から抗微生物薬を抽出するための好ましい方法である^[191, 196]。一般的に、抗微生物薬の固相抽出の回収率は、50%から 100%以上の範囲だった。回収率が低い理由として、固相抽出カートリッジへの吸着が少ない、極性の高い抗微生物薬である可能性が挙げられる。製造廃棄物中の抗微生物薬の濃度は高い (mg/L レベル) と予想されるため、固相抽出中に一部の検体を失う潜在的な可能性を排除することができ、サンプルのクリーンアップや濃縮が行われない「dilute-and-shoot」分析を行うことが可能と思われる。「dilute-and-shoot」アプローチでは、注入前に 10 倍または 100 倍希釈のサンプルが必要であるため、製造廃棄物中の抗微生物薬のハイスループット分析に適している。しかし、「dilute-and-shoot」法を実装する前に、製造廃棄物中の抗微生物薬およびその他の検体の目標定量化レベルを確立することが必要不可欠である。これは、この方法の定量限界が目標濃度を検出するのに十分かどうかを判断するために必要である。しかし、製造廃棄物排水中の API 残留物の最大許容汚染物質レベルに関する規定はないため、現時点では、従来の方法で用いられている手間のかかる固相抽出手順の代替手段として、許容可能な費用対効果の高い「dilute-and-shoot」方法の使用を推奨することはできない。

抗微生物薬の一部は、受水地の沈殿物、または製造廃棄物からの発酵液の污泥に吸着する可能性があるため、固体試料中の抗微生物薬の濃度を決定することも重要である。固形物（浮遊粒子状物質、堆積物、生物相）から抗微生物薬を抽出するさまざまな手法が存在する。これらの手法は、有機溶媒を用いた固体サンプルの単純な超音波処理から、高速溶媒抽出およびマイクロ波支援抽出の使用にまで及んでいる^[189, 191, 197]。固体基質から抗微生物薬を抽出することは難しいため、多くの大規模なモニタリング研究では液相のみに焦点を当てている。液相に重点が置かれているため、環境で抗微生物薬がどのよ

うに循環するかについての知識のギャップが生じている。将来のモニタリング戦略では、浮遊粒子状物質、堆積物、生物相などの固体基質を考慮する必要がある。

現在の分析アプローチの最大の制限は、いくつかの既知の標的分析物の分析に限定されることである。わずかな医薬品有効成分またはその親となる抗微生物薬のみが一般に分析法に含まれる。これは、環境中の処理または廃棄中に形成される潜在的な変換生成物は考慮されないことを意味する。いくつかのクラスの抗微生物薬は環境中で不安定であり、生物学的に活性である可能性のある変換生成物を形成する。たとえば、テトラサイクリンはエピマー化または加水分解するか^[198]、共役テトラサイクリン環を保持する光分解生成物を形成することが知られている^[199]。これらの変換生成物はまだ生物学的に活性であることが示唆されている。さらに、 β -ラクタム結合の加水分解に対する脆弱性のために、 β -ラクタムファミリーの抗微生物薬（例えば、セファロスポリンおよびペニシリン）は一般的に不安定である。API 変換生成物は、親化合物よりも高いレベルで環境に存在する場合がある^[191]。これが、製造廃棄物の API と API 変換生成物の両方をモニタリングすることが重要である理由の 1 つである。

近年、ターゲット駆動型分析から遠ざかろうと、環境モニタリングに高分解能 MS を使用する報告が増えている。四重極飛行時間型 MS や OrbitrapTM MS などの高分解能 MS と組み合わせた液体クロマトグラフィーにより、非標的スクリーニングと並行して標的分析を行うことができ、さらに、遡及的分析の可能性を提供する。遡及的分析を可能にする長期データセットを保存することは、環境問題へのアプローチ法に革命をもたらす可能性がある。四重極飛行時間型 MS 機器は、速度や感度を犠牲にすることなく、全質量範囲のスペクトルを取得できるため、これらのタイプの機器は、複雑な基質の存在下で、幅広いクラスの抗微生物薬の定性および定量分析に最適である。ただし、四重極飛行時間型 MS の高い分解能は、正確な質量測定を通じて高度な選択性を提供するが、この MS フォーマットは、選択した反応モニタリングモードで実行する場合、トリプル四重極 MS と比較して一般に感度が低くなる。一方、OrbitrapTM MS は、確認と定量の両方に有利な同期フルスキャン MS および MS/MS 取得機能を使用できるため、他の LC-MS 機器にある多くの制限を克服する。四重極飛行時間

型 MS はフルスキャン MS および MS/MS 実験も実行できるが、Orbitrap™ MS は非常に高速なデータ取得レートを備えており、低い検出限界と高い感度を提供し、抗微生物薬とその変化化合物において低シグナル強度のイオンの検出を可能にする。Orbitrap™ MS は、他の MS プラットフォームの約 2 倍の費用がかかるため、多くの環境研究所で珍しい機器となっている。したがって、高解像度の MS テクノロジーは、環境規定の設定において非常に限られた用途の研究ツールとみなされている。

製造廃棄物の影響を評価するための補完的な生体分析および分子試験法の必要性

環境問題には、生物分析的アプローチと曝露およびハザード分析を組み合わせた包括的な環境評価が必要である。薬剤耐性の面では、化学的標的に焦点を合わせた MS (標的 vs スクリーニング/遡及的) と選択的効果に焦点を当てた生物分析的アプローチ、すなわち耐性表現型または耐性遺伝子の増加の測定を組み合わせる必要がある。さらに、生体 (魚類急性毒性試験)、細菌、または細胞毒性試験法を用いて、環境毒性試験を標準試験の一部として実施する必要がある^[185, 200]。

環境マトリックス中の薬剤耐性遺伝子のモニタリ

ングは、これらの遺伝子が新たな汚染物質となりうる可能性があるという認識が高まっているため、最近推奨されている^[201]。耐性遺伝子の存在と多様性を特定するための環境サンプルの分子分析は、薬剤耐性菌のホットスポットをローカルおよびグローバルスケールで特定するのに非常に役立つ可能性がある^[101]。

特に培養に依存しないアプローチに基づいた遺伝データは、環境サンプルの情報をより広く捕捉する能力があるため、環境中の薬剤耐性の研究に特に有望である^[202]。先進国の研究者はゲノム研究ツールにアクセスしやすくなっているが、次世代シーケンシングのコストの低下により、薬剤耐性の複雑さを解明するためのこうしたアプローチへのアクセスと使用が増加している。

薬剤耐性はグローバルな課題であるため、薬剤耐性決定因子の世界的なモニタリングネットワークを確立することは、環境分野における薬剤耐性のダイナミクスを理解するのに役立つ。収集したデータは世界的に公開し、かつ、サンプルのサンプリング、準備、分析、解釈の共有方法を含める必要がある。まず、主要な薬剤耐性決定因子を包括的に評価し、地域的および世界的なモニタリング用に薬剤耐性マーカーを選択する必要がある。

F. 抗微生物薬製造過程からの許容可能な廃棄物排出基準を設定するためにはどのような情報が必要か？

許容可能な廃棄物排出基準を実装するためには次の事項が必要である。

- 基準の定義 (最大排出量の制限等)
- 基準を満たすために必要な製造慣行 (または緩和戦略) を見極める
- 排出を監視することによる製造慣行の評価と査定

排出制限の定義

抗微生物薬の製造廃棄物排出について規定している基準はない。最終的には安全な基準がどのような基準であるかに行き着くが、「安全」という言葉は広く解釈されやすい。「安全」または「容認できる」ことを決定するためには、私たちのゴールが、人の健康、

環境の健康、またはその両者の保護のいずれにあるのかを決めなければならない。安全基準に達するために適用されるアプローチは、そのゴールによって異なる^[104, 185, 203, 204]。

理想の目標点は、安全であると考えられるゼロ排出基準の採用である。しかしこの基準は、特に多くの液体廃棄物を生み出す抗微生物薬の生産過程にあって現実的に適応できる場所があるとは思えない。答えは廃棄物の排出の許容と、人と環境の健康を保護する安全限界との間にあると思われる。表 3 では、安全限界を決定する方法として、測定基準に対応したいくつかの分析方法を示している。

これらの安全限界は、製造現場近くの水域や排水そのもので測定できる環境中の抗微生物薬の濃度を規定する。それぞれの分析方法は異なるが、シプ

ロフロキサシンとテトラサイクリンについて公開された分析方法の間ではいくつかの合意がある^[29, 205, 206]。Gullberg、Lundstrom および Kraupner により示された分析方法で設定された安全限界は、抗微生物薬ごとに確立されなければならないことに注意が必要である。加えて、濃度制限が用いられた際、サンプルが収集された場所に関するより多くの情報が必要になる（例えば、排出場所の排水なのか、より下流の排水なのか、等）。

Le Page によるリスクアセスメント研究のレビューとメタ解析は、環境リスクアセスメント（1つのシアノバクテリア種に基づく）は不十分であり、細菌の多様性や群集構造、生態系機能における抗微生物薬の影響に関するより多くのデータが必要であると結論づけた。入手可能ないくつかのデータに基づいて、著者は 27 種類の抗微生物薬の、様々な感受性の高い系統の微生物に対し作用しない濃度のデータに基づき、154 ng/L という控えめな制限値を報告した。実装のためには、筆者らは 100 ng/L の抗微生物薬排出の閾値の設定が環境中の細菌群集構造を保護すると述べている。

一部の製造業者は、生産過程での抗微生物薬の排出量を推定するために、マスバランスに基づいた計算を提案している。この場合、抗微生物薬の消失または排出は、生産された抗微生物薬全体に対する割合として報告される。このアプローチに関する懸念は、測定値が環境水中に排出された抗微生物薬の濃度を反映しておらず、機能的限界の適用を誤ると、環境中の微生物に対して薬剤耐性を選択する抗微生物薬濃度の排出が生じる可能性があるということである。しかし、マスバランスの計算は、製造過程における抗微生物活性を持つ化合物の比較的大きな消失を検知することには価値があるかもしれない。

製造工場からの排水は、処分される際に自然の微生物群集に選択的な圧力をかける可能性がある。多くの場合、第三者の排水処理会社が抗微生物薬生産業者の排水を管理しているため、その排水は人の排泄物と混合される。この排水による人間への健康リスクまたは環境リスクはよく理解されていない。製造業者は、地元の農家に、雑排水、菌糸マット、および抗微生物薬または抗微生物活性のある代謝物を含むその他の汚泥を提供している。介入戦略を策定する際には、これらの行為に適用される制限または対策を検討する必要がある。介入の要件を検討する際には、コミュニティの慣行と経済的影響に関す

る情報のギャップに対処する必要がある。

ここで説明した取り組みに加えて、AMR Industry Alliance^[207]は、WHO と協力して、排出制限目標値の開発に取り組んでいる。現在、WHO は、廃棄物排出の標準化された目標を設定するために必要な、利用可能なデータと追加データを議論するための科学専門家会議を開催している。インド政府はまた、薬剤耐性の国家行動計画に示されているように、国家排出制限を設定することを計画している^[208]。

基準を満たすために要求される産業的な介入

排出基準と評価手段が定義されて実装される際、抗微生物薬製造業界への重要な次のステップは、最も費用対効果の高い介入方法を見極め、その基準を満たすために、生産プロセスにいつどこで介入するか正しく狙うことである（例えば、排水の汚染を避ける、特定の排水の前処理あるいは排出時の処理を行う、等）。生産施設間で運用慣行や廃棄物管理のプロトコルが変わるため、基準を満たすための対策も異なることが予測される。

費用対効果の高い実装のための課題の一つは、多くの企業が排水や廃棄物汚泥の処理や管理に関する情報の共有を躊躇することである。例えば、薬剤耐性ベンチマークにより製造および生産分野を評価された 18 社のうち、15 社は環境リスク管理戦略を実施している。これらのうち 12 社が各々の戦略を公表している。薬剤耐性ベンチマークには、「そのような開示をすることは重要なファーストステップである。それは透明性の尺度を提供し、製薬会社が薬剤耐性を最小化するために製造慣行を調整することの自発性を示す」との一文がある。上記のような戦略の開示を超えて、(1) その企業の製造現場におけるこの戦略の監査結果、(2) 抗微生物活性を持つ API や医薬品を製造する第三者の現場と排水処理プラントにおけるこの戦略の監査結果、(3) それら抗微生物活性を持つ API や医薬品を製造する第三者や抗微生物活性を持つ廃棄物処理プラントの詳細、(4) 抗微生物薬の排出レベルの各項目について公表した企業はなかった。シオノギは 2017 年の環境・健康・安全報告書において、その第三者を開示することを約束した。企業からのこの情報の透明性が高まることは、製造プロセスに対する迅速かつより費用対効果の高い介入に役立つ他、最も適切な介入戦略の決定にも役立つ。

施設への経済的インパクトもまた、介入条件を見極めるためのファクターである。紫外線照射や産業廃液の逆浸透膜処理など高コストな介入がなくとも、小さな緩和戦略が大きなインパクトをもつ可能性はある。

リスク緩和策の評価と査定

基準が採用され、製造設備がこれらの基準を満たすために改善する際、いつ、十分かつ正当なレベルの保護が達成されるのかを知るために、抗微生物薬の放出に関する透明性のあるデータが必要となる。現在起こっている環境への抗微生物薬排出の後、排出量が減少した際に、その地域の環境が回復する(すなわち環境中の抗微生物薬濃度の基準値に戻る)までにどのくらいの時間を要するかは不明である。これは、私たちが介入の進捗状況とインパクトを正確に測る際に影響するかもしれない。長期的な環境回復を評価するには、測定基準と概算時間を見積もる必要がある。これは、現在選択しているリアルタイム評価の慣行を周知し、また、リスクまたはハザードに基づいてリスク緩和が管理されているか判断するためである。非常に重要なことは、耐性の拡大または新しい耐性の進化に寄与してきた抗微生物薬の放出は、病院や農場で発見された耐性^[209, 210]と同様に、不可逆的であろうことである。いったん新たな形の耐性が病原菌の中に現れると、環境中のレジストームの中で残留し、そこで増殖や伝播をして、潜在的に人体の健康に影響を及ぼし得る^[211, 212]。

リスク緩和策に対するインセンティブと規制

インセンティブと規制は、抗微生物薬製造時に排出される物質による環境への影響を最小限にするための良好な製造慣行を促進するのに役立つ。廃棄物および排出データの公表を奨励している薬剤耐性ベンチマーク^[213]は、グリーン購入の基準を提供することができる。グリーン購入とは、排出を減らすための最善慣行を採用している設備で生産された抗微生物薬を優先的に購入、使用することである。残念なことに、規制の慣行とキャパシティは世界各地によって異なり、これらの方針が最も有益と思われるエリアにおいて最も不足している。例外は、インド政府が2020年までにそのような基準を設定し実施する意向があるということである。しかし、政府、政策組織、科学コ

ミュニティ、製薬業界は次に記す事項を含むベストな慣行を決定するために協力する必要がある。

- 基準の設定
- 基準のための適切な対策を伝えること
- 基準を満たすために、製造プロセス内で手順の変更を行う最善の方法、または介入を適用する最善の方法を施設に知らせること
- 評価基準と、誰がその評価を行うのかを定めること
- 施設およびサプライチェーン内でこれらの戦略を実践するための説明責任ガイドラインを開発すること
- データと進捗状況を集合的に報告するシステムを提供すること

農薬として用いられる抗微生物剤

著者

- Professor Stéphane Bayen (McGill University)
- Dr. Karlyn Beer (U.S. Centers for Disease Control and Prevention)
- Dr. Hubert Dirven (Norwegian Institute of Public Health)
- Dr. Brendan Jackson (U.S. Centers for Disease Control and Prevention)
- Professor Jeff LeJeune (Ohio State University)
- Dr. Virginia Stockwell (U.S. Department of Agriculture)
- Professor James Tiedje (Michigan State University)

要約

- 抗微生物剤は、一般的に作物の病気を制御するための農薬として世界中で汎用されている。作物の病気を制御せずに放置した場合、以降の栽培の管理が困難を極めるとともに、農家の所得に大きな損害を与え、さらには地域的、そして地球規模の食料供給にも影響を及ぼす可能性がある。
- 抗微生物剤をベースとする農薬が、人の健康およびより広範な環境・生態系に影響を及ぼしうるのかを確定するためには、さらなる研究が必要であり、農薬が臨床で使用される抗微生物薬と同等もしくは密接に人の健康に関与しうることに關しての懸念がある。
- 数多くの研究により、人の真菌感染症の原因真菌として知られる *Aspergillus fumigatus* が、環境でのトリアゾール系抗真菌剤の使用により、抗真菌薬耐性を獲得し得ることが示唆されている。
- 抗微生物剤を農薬として使用することによって環境中の微生物が薬剤耐性化し、その薬剤耐性菌が人々に感染を引き起こす可能性だけでなく、臨床で使用される抗微生物薬に対する薬剤耐性 (AMR) が他の微生物へ伝達することが懸念されている。
- 銅のような抗微生物活性のある重金属は臨床では使用されないが、臨床で使用される抗微生物薬に対する薬剤耐性にも寄与している可能性がある。
- 医学的に重要な抗微生物薬を農薬として使用することを回避または制限するための方策があり、作物病発生の高リスク期間を予測するためのモデル化、作物病原体の拡散を減じるための具体策の実施、および作物病を低減する代替的な治療法が挙げられる。しかしながら、これらの方策は必ずしも世界的に汎用されるわけではなく、農場主はこれらの治療法実施および研修への斡旋等の支援を必要としている。

知識格差の是正

科学的レビューは、以下に述べる行動が我々の理解を向上し、さらなる行動へと導くことを示唆している：

- 人、動物および周辺環境への抗微生物剤の曝露の影響をよりよく理解するための研究を行い、曝露を最小限に抑えるために、抗微生物剤を農薬として適用する際の最良な管理と実施のための要領を策定し、推進する。
- 毎年作物に使用される抗微生物剤の量や種類などの情報を収集し共有することにより、農薬としての抗微

生物剤使用に関する世界的な透明性を高める。

- 農薬としての有効性が実証され、代替手段がない場合にのみ、人の医薬品として使用される抗微生物薬を農薬として適正に使用することを指導するために、その有効性に関するデータを各国間で共有する。
- 作物病を予防または治療するための抗微生物剤に代わる有効かつ実行可能な代替法を開発し、栽培者が代替治療法を確実に利用するための研究を実施する。
- 臨床で重要な抗微生物薬が使用され共選択が懸念される場合に、薬剤耐性の増加が生じているか判定するための適切で再現性のある野外および周辺環境のモニタリング法を開発する。
- 抗微生物剤を農薬として使用するための受託責任原則を含めた AMR アクションプランを、各国独自の慣行に基づいて更新することを検討する。

背景

抗微生物剤は、作物病制御のための農薬として広く使用されている。これらの抗微生物剤の中には、臨床で使用される抗菌薬（例えば、テトラサイクリン、アミノグリコシド、およびトリアゾール）と同一か、密接に関係したものがある。作物農薬として抗微生物剤を使用することにより、環境中に存在する薬剤耐性微生物を選択する可能性が生じる。懸念すべき事項として、その薬剤耐性微生物が人の感染症を引き起こしたり、もしくは人の感染症を治療するために一般的に使用される抗微生物薬に対する薬剤耐性機構を伝達することが挙げられる。例えば、農薬としてのストレプトマイシンの使用は、プラスミド上に保持される *strA-strB* 遺伝子対によってコードされるアミノグリコシドホスファターゼなどを環境細菌へ伝達し、ストレプトマイシン耐性を獲得させることができる^[214, 215]。すべてのアミノグリコシドに対する薬剤耐性を与える新しいタイプのプラスミド性の耐性が、院内感染関連細菌において出現している。16S-メチラーゼ遺伝子による薬剤耐性は農業関連では見出されていないが、医学的に重要な抗微生物薬の農業での使用が、人の重篤な感染症を治療する際に影響を及ぼさないよう、警戒が必要である。特に注意を払うべきことは、農業における抗微生物剤の使用の増加と農薬の曝露によって、環境が多剤耐性微生物で汚染されることである。

アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) は、環境中で一般的な真菌である。ヨーロッパで初めて報告されたすべてのトリアゾール系抗真菌剤に耐性を示す *Aspergillus fumigatus* による感染は、この 10 年間でいまや世界中で検出・同定されるようになった。この真菌は吸入により人に感染し、増加傾向にある免疫不全患者において重篤でしばしば致命的な侵襲性真菌感染症を引き起こす。トリアゾール系抗真菌剤は農業で広く使用されており、いくつかの国においては最も主要な抗真菌剤である (<https://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps/> および <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>)。作物用のトリアゾール系抗真菌剤に構造的に類似する臨床用のトリアゾール系抗真菌薬がある。この薬剤は、表在性皮膚感染症および多くの生命を脅かす真菌症を治療するために使用される。トリアゾール系抗真菌薬は、これら真菌感染症の治療の中心となっている；しかしながら、薬剤耐性株に対しては効果がなく、高い死亡率につながっている^[216]。農業および他の環境におけるトリアゾールの使用が、TR34/L98H として知られる汎トリアゾール耐性 *A. fumigatus* 株型を選択したことを示唆する研究結果が報告されている (<http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/risk-assessment-impact-environmental-usage-triazolesdevelopment-and-spread>)^[214, 217]。特筆すべきことに、薬剤耐性株に感染した患者の大部分は以前にトリアゾール系抗真菌薬で治療された履歴がなかったことから^[218]、もともと耐性変異を有していた株に感染したことが示唆された。この薬剤耐性株の起源は不明であるが、患者が感受性株に感染した後に、その株が患者内で耐性を発現した可能性は低い。

農薬としての抗微生物剤使用が人の健康に及ぼすリスクを評価する場合、以下を評価することが重要である：

- 抗微生物剤がその薬剤そのものに対する耐性を選択する可能性
- 関連する薬剤に対する耐性（すなわち、交差耐性）

- 薬剤耐性決定因子間の遺伝的連鎖による無関係な薬物に対する耐性(耐性の共選択)
- 人の病原体に対する薬剤耐性伝達の可能性

以下を理解することも重要である:

- どの程度、農薬として使用される抗微生物剤が野外で越境して環境を汚染する可能性があるのか
- 抗微生物剤が環境中でどのくらい間、活性を示すのか
- 農場内の抗微生物剤が、農場内またはその近くで働く作業員に及ぼすリスクがあるのか(例えば、抗微生物剤による人の微生物叢のかく乱による有害な健康事象の発生)

農薬として抗微生物剤を使用するリスクを軽減するために、以下の情報が必要となる:

- 使用する抗微生物剤の種類と範囲
- 人への曝露の制限が有効であることを実証するための方策
- 作物に抗微生物剤を使用する必要性を低減または排除するための方策

科学的課題

A. 農薬としての抗微生物剤使用の現状: どのような薬剤がどれくらい使用されているのか?

本節では、人の感染症の治療に使用される抗微生物薬と同一または密接に関連する、植物病害の制御のために農作物に適用される抗微生物剤について説明する(表 4)。これらの抗微生物剤の中には、畜産や水産養殖においても使用されるものもある。

銅を除いて、臨床や動物では使用されないが、植物に使用される抗微生物剤については言及しない。銅製剤は、細菌性および真菌性の植物病を予防するために最も一般的に使用される農薬である。銅製剤は臨床では使用されないが、それらは薬剤耐性決定因子の共選択に関与し得る。

なぜ農作物に抗微生物剤が使用されるのか

抗菌剤

作物における細菌性感染症は、制御することが困難であり、非常に有害で、予防や治療がなされることなく放置された場合、農場の収入を著しく減少させる。抗菌薬の発見以来、いくつかの化合物については、植物における細菌性感染症を抑制する能力が評価されている(例えば、ペニシリン、ストレプトマイシン、アウレオマイシン、クロラムフェニコール、およびオキシテトラサイクリン)^[219]。これらの抗菌薬のうちストレプトマイシンは、低用量(100 ppm)で適用した場合いくつかの細菌性感染症に対して優れた制御効果を示し、植物に対しては無毒であった。ストレプトマイシンは 1958 年に米国で植物防護のために最初に登録された抗菌剤である。

一般に、抗菌剤は付加価値の高い作物、主に樹木果実における細菌性感染症を抑制するために使用される。ほとんどの細菌性植物病原体は環境中および感染した組織中で越冬して生存し、一方、他のものは、植物の全身、種子または塊茎で生存している。細菌性植物病原体は、植物に感染するために、新鮮な表面創傷部または気孔や分泌孔などの開口部を必要とする。

創傷部または開口部は、細菌の植物組織内部への侵入を可能にする。気象現象(凍結、雹嵐、風など)、昆虫、または園芸(樹木の剪定や機器による損傷)により創傷が生じる。

多くの細菌性植物病の感染プロセスにおける別の重要なステップは、病原体が植物の表面で増殖し、感染前に大きな集団(約 100 万 CFU)に増殖する着生増殖期である。環境条件は、病原菌の増殖速度に影響を及ぼす。病原体にとって好ましくない条件では、その増殖が抑えられ、感染は不成立に終わる。感染前の着生増殖期の間、病原体は植物表面にさらされているため、感染を制御するための様々な手段に対して脆弱である。抗菌剤は一般に予防的処置のために使用され、着生増殖期を止め、その後の感染を防止する。

感染した植物に抗菌剤を噴霧しても、植物を治療する効果は無いため、植物病の症状が現れた後では抗菌剤の使用は推奨されない。さらに、植物組織中の病原菌の集団サイズが増加するにつれて、薬剤耐性をもつ植物病原菌を選択してしまう可能性が増大する。

抗真菌剤

植物病原体の多くが真菌に分類される。抗真菌剤は、真菌感染症を予防し治療するために、植物農業において広く使用され、中でもトリアゾールは多様な農作物に広く使用されている(<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/risk-assessment-impact-environmental-usage-of-triazole-s-on-Aspergillus-spp-resistance-to-medical-triazoles.pdf>)。トリアゾールは広域スペクトルの抗真菌活性を有し、植物全身に行き渡る移行性があるので(吸収後に再分配され、葉内でも活性を保持する)、接触タイプの抗真菌剤よりも扱いやすい。以前は果樹やブドウなどの付加価値の高い作物に多く使用されていたが、現在では小麦、トウモロコシ、大豆などの商品作物にも多く使用されている。さらに、2006 年から 2015 年にかけて、トリアゾール使用量はすべての作物で約 5 倍に増加したと算出されている(<https://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps>)。この使用量の増加は、一部には栽培者が大豆さび病、小麦赤カビ病およびトウモロコシ南方さび病などの新しい作物病に直面したことにより、効果的で経済的なトリアゾールを用いたことが原因と考えられる^[220, 221]。

米国で公開されている農業使用データ

いくつかの米国政府機関において、植物や農業土壌に適用される化学物質に関するデータが収集され、報告されている：米国環境保護局 (https://www.epa.gov/sites/production/files/201701/documents/pesticides-industry-sales-usage2016_0.pdf)；米国農務省 (United States Department of Agriculture: USDA) の農業統計局 (National Agricultural Statistics Service: NASS)；カリフォルニア州 (<https://www.cdpr.ca.gov/docs/pur/purmain.htm>)。アメリカ地質調査所 (USGS) 内の全国水質評価プロジェクト (National Water-Quality Assessment Project) は、農業の使用量を推定するために公的および独自のデータソースを使用している。

NASS 農業化学物質使用プログラムのデータは、農場での化学物質使用と有害生物管理の実践に関する情報を提供している。化学物質使用データは農家から直接収集され、調査年に使用された農業の有効成分の量、利用回数、処理された面積の割合などの情報が含まれている。作物に利用された物質のデータは、QuickStats データベース (<https://quickstats.nass.usda.gov>) で利用可能である。

全国水質評価プロジェクトは、米国農作物報告地域内にある特定農場からの機密報告および収穫作物調査に基づいて、農業で用いられた農業の年間使用量を推定している。農場固有のデータは、ある地域の農作物の作付面積に基づいて、より広い地域での農業使用を予測するために活用され、米国農務省農業統計調査によって報告されている^[222]。USGS は農業使用の年間の推定値を提供している (<https://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps/county-level>)。

米国外での農業の使用に関する調査も必要である。さらに、抗微生物剤がどの程度使用されているかを評価し、人の健康に対するリスクの可能性を評価するためには、データの集中化およびデータ報告の標準化が必要である。

作物植物に使用される抗微生物剤の種類

抗菌剤

ストレプトマイシン

ストレプトマイシンは臨床で使用するアミノグリコシド系抗菌薬であり、重篤な細菌感染症の治療に使

用される。すべてのアミノグリコシドに耐性を示す因子は可動性遺伝エレメントに存在し、水平伝達による遺伝子伝播のリスクを増大させる。

米国では 1950 年代から、植物における細菌性感染症を制御するためにストレプトマイシンが使用されてきた。ストレプトマイシンは腐敗を防止するため、野外に植える前に温室でジャガイモの種イモ、またはトマトおよびタバコの接ぎ木に適用される。屋外で植え付けた後でのこれらの作物に対するストレプトマイシンの使用は制限されているか、または許可されていない。表 5 は、米国における各種作物に対するストレプトマイシンの用途をまとめたものである。

米国で作物の防護に使用されているストレプトマイシンの 90% 以上は、ナシおよびリンゴ果樹園においてエルウィニア属菌 (*Erwinia amylovora*) による火傷病を防止するために使用されている^[223]。ストレプトマイシンはまた、カナダ、イスラエル、メキシコおよびニュージーランドでも、火傷病対策のために登録されている。オーストリア、ドイツおよびスイスでは、2016 年までは厳格な規制の下、非常用としてのみ火傷病の抑制・予防のために使用されていたが、それ以降スイスおよび EU での使用は承認されていない^[223, 224]。

火傷病は、ナシおよびリンゴの最も重篤な細菌感染症である。樹木は春の開花の期間、*E. amylovora* による感染に対して最も脆弱となる。本菌は木の幹や茎に生じた潰瘍部で、冬の数ヶ月生存する。春になると、本菌が潰瘍部から滲み出て、昆虫、風や雨によって花に運ばれる。病原菌は栄養豊富な柱頭にコロニーを形成し、良好な気象条件下では、一つの花あたり 10^6 CFU 以上に急速に増殖する^[225]。雨や大きい結露などの水分は、本菌が花の蜜腺組織に移動するのを助け、ここで *E. amylovora* は蜜腺分泌孔を通過して植物組織に侵入する。花の細胞間隙の内部で、本菌は植物組織を壊すエフェクタータンパク質を産生し、花茎や枝に移る。まもなく、この病気は花を壊し、火傷病の症状が現れる。この段階で、病変部とその周囲の組織を除去することで感染の拡大を抑える必要がある。この病気の第二段階には、新芽または果実への感染が含まれる。花や新芽から枝や幹への火傷病の広がり、植物にとって致命的である。果樹園や苗床の若木は、特に火傷病に弱い。広範囲にわたる火傷病の流行による地域的損失は推定 4,000 万ドルから 7,000 万ドルの範囲と見積もられている^[219, 226]。全米の生産者は、この病気と戦う

ために年間 1 億ドル以上を費やしているとも見積もられている^[227]。

ストレプトマイシンが火傷病に対して有効であることの発見により、栽培者は火傷病の制御が可能になった。しかしながら、1960 年代にはその病原菌および感染症に対する疫学は十分に理解されていなかった。農繁期ではストレプトマイシンを頻繁に噴霧する傾向があった。ストレプトマイシンがナシおよびリンゴ果樹園で最初に使用されてから 20 年の内に、ストレプトマイシンによる火傷病の制御失敗事例が報告された^[228]。その後 *E. amylovora* におけるストレプトマイシン耐性は、米国、カナダ、イスラエル、メキシコおよびニュージーランドの多くの地域で報告されている^[215, 219, 226, 229]。*E. amylovora* におけるストレプトマイシン耐性の多くは、*rpsL* として知られる遺伝子の突然変異に起因し、アミノ酸コドン 43 番目でのリジンからアルギニンへのアミノ酸置換[K43R]に起因する^[230]。ミシガン州で分離された *E. amylovora* 株も、抗菌剤を不活性化するアミノグリコシドホスファターゼをコードする *strA-strB* を介してストレプトマイシン耐性を獲得した^[219, 231]。

ストレプトマイシンはその耐性の危険性にもかかわらず、ナシおよびリンゴ果樹園で依然として使用されており、現在でもなお火傷病対策のための最良の化学的制御法の 1 つである。薬剤耐性化を緩和するために、ストレプトマイシンはしばしば、カスガマイシンとローテーションで利用されるか、またはオキシテトラサイクリンとローテーションもしくは併用で利用される。ラテンアメリカ諸国では、ストレプトマイシンは単一薬剤として、もしくはオキシテトラサイクリンとの組み合わせや、オキシテトラサイクリンおよび銅と組み合わせで販売されている(表 6)。

米国の商業農場における作物防護のためのストレプトマイシン使用に関する推定値は、以下に引用される米国の農薬使用データベースから得られる。USGS は、有効成分として 18,000~19,800 kg のストレプトマイシンが 2015 年に作物に使用されたと推定した。図 2 は、NASS QuickStats データベースから求められた、米国における 1991 年から 2015 年までのストレプトマイシン使用に関する概要である。一般に、ストレプトマイシンの量および使用パターンは、この間の 24 年間で類似していた。表 7 は、2015 年のストレプトマイシン使用量の要約であり、樹木や果実に使用されたストレプトマイシンの 92%がリンゴに利用されたことを示している。作物に噴霧されるストレプト

マイシンの総量によって、農薬としての使用に関する一般的な情報を知ることができるが、生長期の平均的な使用回数と使用された果樹園の面積の割合を考慮することが重要である。表 7 は、ストレプトマイシンが、2015 年の全リンゴ栽培面積の 26%に平均 2 回使用されたことを示す。ナシは、2015 年の栽培面積の 16%で、生長期に平均 3 回使用された(表 7)。リンゴの木には、ナシの木よりも少ない頻度でストレプトマイシンが散布されたが、ナシの栽培面積(20,823 HA)と比較して、リンゴ果樹園のほうがはるかに大きな栽培面積(136,358 HA)であることから、総量としてはリンゴに使用されたストレプトマイシンの方が多くなった(表 7)。

総じて、米国のナシおよびリンゴ果樹園に利用されるストレプトマイシンの総量は、添付文書に基づいて許容される総量に比べほんのわずかである(表 5)。添付文書に基づけば、栽培者は生長期間にストレプトマイシンを 10~15 回、栽培面積の 100%に適用することが可能である。栽培者のストレプトマイシンの使用が少ないことの要因として、一部には、火傷病判定のためのガイドラインならびに Maryblyt や Cougarblight らによる発症リスクモデルがある^[230, 231]。これらは、火傷病発症リスクを推定し、栽培者に抗菌剤の使用による介入をするべき時期を示すことができる。使用されるモデルは、果樹園または周囲の果樹園における火傷病の最近の発生履歴や、花の組織における火傷病原菌の急速な増殖と拡散を増長する環境条件、開花時期であるかどうかといったパラメータに基づいている^[225, 232-234]。これらのモデルは、栽培者が最も効果的なストレプトマイシン噴霧のタイミングを決定することに役立つ。また、ストレプトマイシンの過剰使用および薬剤耐性化の減少に貢献する。

米国 EPA は最近、フロリダ州およびカリフォルニア州の限定された特定の地域において、柑橘グリーニング病(または黄龍病)と呼ばれる病気を制御するため、ストレプトマイシンの柑橘系樹木に対する緊急使用登録を許可した。EPA は、州の収益および経済的損失に加えて、代替化合物が利用可能でないことを受けて、個々の州からの申請に応じて特定の作物に対しての緊急使用登録を許可した。緊急使用の登録許可は時限的であり、ストレプトマイシンの使用量および使用方法が制限されており、これは特殊使用文書で規定されている。これら限定された緊急用途下での柑橘類に対するストレプトマイシンの使用に関

するデータは、現時点では未公開である。

農業用ストレプトマイシンは、認定された農場主による商業用農場での使用に加え、家庭菜園の植物病害防除のために、市販品としても利用可能である。USGS または USDA データベースは、非商業的な農作業におけるストレプトマイシン使用の全ての捕捉はできないと考えられる。家庭菜園で使用されるストレプトマイシンの量は不明である。

オキシテトラサイクリン

オキシテトラサイクリンは、テトラサイクリン系抗菌剤の中でも熱安定性を有する。テトラサイクリンは臨床において一般に使用され(ドキシサイクリン等)、1種類のテトラサイクリンに対する薬剤耐性は、しばしば、他のテトラサイクリン類にも耐性を示す^[235]。

オキシテトラサイクリンは、1972 年に米国で作物防護のために登録されたが、これは特にストレプトマイシン耐性 *E. amylovora* が拡散している地域で栽培されたナシのために、火傷病制御のための代替抗菌剤の役割を担うものである。オキシテトラサイクリンはまた、モモおよびネクタリンで *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* により発症する斑点細菌病の防除目的としても登録されている。作物用農薬として、オキシテトラサイクリンはオキシテトラサイクリン塩酸塩またはオキシテトラサイクリンカルシウム塩として適用される。火傷病の制御のために、栽培者はオキシテトラサイクリンをストレプトマイシンと組み合わせて同時に使用することができる。テトラサイクリン類は薬剤耐性化のリスクが高いと考えられているが、オキシテトラサイクリンの野外での用量に対する薬剤耐性化は、火傷病病原体 (*E. amylovora*) またはモモおよびネクタリンの斑点細菌病体 (*Xanthomonas arboricola* pv *pruni*) において、いまだ報告されていない。

斑点細菌病制御のために、オキシテトラサイクリンはモモおよびネクタリンに 150 ppm の用量で処方される。噴霧は落花時期から始まり、収穫前 21 日まで 4~7 日間隔で続けることができる。病気の重症度、環境条件および罹患歴に応じて、モモまたはネクタリンに年間最大 9 回のオキシテトラサイクリン処方が許可されている。

火傷病を制御するためには、オキシテトラサイクリンはナシおよびリンゴに 200 ppm で処方される。開花早期に処方し、火傷病の発症に適した開花条件および気象条件下で 3~6 日間隔で継続することができ

る。リンゴでは最大 6 回のオキシテトラサイクリンの処方が許可されており、ナシでは年間最大 10 回の処方が許可されている。ナシおよびリンゴにおけるオキシテトラサイクリンが使用できる期間は、収穫前 60 日までである。

図 3 は、NASS QuickStats データベースから要約されたデータに基づく、1991 年から 2015 年までの米国の果樹園におけるオキシテトラサイクリンの使用量を示している。オキシテトラサイクリンの使用量は、20 年間にわたって全く変化はなかったが、2011 年にリンゴ栽培での使用およびモモへの適用が増加したことから、最後の 2 報告期間では増加を認めた(図 3)。2015 年、NASS データベースは、合計 12,020 kg のオキシテトラサイクリンが果樹園に使用されたことを報告した(表 7)。USGS は同様の推計を行っており、2015 年には 12,470~13,998 kg のオキシテトラサイクリンが使用されたとしている。

2015 年にオキシテトラサイクリンが最も頻繁にナシに散布されたのは、ナシが本来火傷病に対し先天的な感受性をもっていることと、商業的に大部分のナシが栽培されている米国西部の州においてストレプトマイシン耐性 *E. amylovora* が検出されたことによる(表 7)^[226]。ストレプトマイシン使用量の調査結果と同様に、米国における植物防護のために使用されるオキシテトラサイクリンの量は、添付文書で許容される量よりもはるかに少ない。

ストレプトマイシンとともに、米国 EPA は柑橘グリーニング病を制御するために、フロリダ州およびカリフォルニア州において、柑橘に対するオキシテトラサイクリンの緊急使用登録を許可した。これらの限定された緊急用途下での柑橘類に関するオキシテトラサイクリンの使用データは、現時点では未公開である。

米国に加えて、ラテンアメリカは作物防護のためのオキシテトラサイクリンの使用を許可している(表 6)。オキシテトラサイクリンは、単一の抗菌剤として、またはオキシテトラサイクリン+ストレプトマイシンまたはオキシテトラサイクリン+ストレプトマイシン+銅の組合せとして使用される。これらは、メキシコの梨状果の火傷病を制御するために使用される(表 6)。オキシテトラサイクリンはまた、ラテンアメリカで花や野菜の病気を制御するために、ゲンタマイシンや銅と組み合わせて使用されている。ラテンアメリカ諸国で作物に使用されるオキシテトラサイクリンの量については不明である。

カスガマイシン

カスガマイシンは、日本において *Streptomyces kasugaensis* から最初に単離精製された、新規で独特な構造を有するアミノグリコシドである。カスガマイシンはカスミンとも呼ばれ、他のアミノグリコシドとは異なる機構によってタンパク質合成を阻害する^[236]。カスガマイシンは、イネ、キウイフルーツ、クルミおよび果樹の細菌性感染症の制御のために使用される(表 8)^[22]。植物病原体におけるカスガマイシン耐性は、*ksg* オペロン(ジメチルトランスフェラーゼ)または 16S リボソーム RNA(16S rRNA)における自然突然変異、もしくはアセチルトランスフェラーゼ酵素による修飾を介して生じる。カスガマイシンは臨床または獣医の領域では適用されていない。臨床で使用されるアミノグリコシドとカスガマイシンとの間の交差耐性は知られていない。加えて、カスガマイシン耐性が臨床で使用される抗菌薬に対する薬剤耐性に関連しているのかも知られていない。これらの理由から、農薬としてのカスガマイシン使用が、現在の人の健康に影響を及ぼす薬剤耐性の選択において危険性があるとは考えられていない。カスガマイシンの交差耐性および共選択能について、定期的にモニタリングすることが重要である。

ゲンタマイシン

ゲンタマイシンは、ラテンアメリカ諸国のアガベ、野菜、唐辛子、ナシ、イネ、トマトおよびタバコのいくつかの細菌性感染症を制御するために使用されるアミノグリコシドである。また、重篤な細菌感染症の治療を含む臨床において一般的に使用される抗菌薬である。添付文書によれば、ゲンタマイシンは単一の抗菌剤として販売されておらず、むしろオキシテトラサイクリンまたは銅化合物と組み合わせて販売されている(表 6)。ゲンタマイシン含有製品の添付文書は、ウェブサイトで見ることができる(www.terralia.com/agroquimicos_de_mexico/composition_index)。作物を防護するために、ゲンタマイシンを含有する薬剤は、7 日間隔で 2~4 回、野外で使用される。使用された範囲への再投入は、使用後 12 時間とされることが多い。収穫前の使用間隔は、21~30 日の間と指定のあるナシを除いては指定されていない。ラテンアメリカ諸国におけるゲンタマイシンの使用データは見つからなかった。

オキシリシン酸

オキシリシン酸は酵素 DNA ジャイレースを阻害する合成キノロンである。オキシリシン酸は、臨床で一般的に処方されるフルオロキノロン系合成抗菌薬に関係が深い。オキシリシン酸は 1998 年 *E. amylovora* のストレプトマイシン耐性株が出現して以降、西洋ナシの火傷病を抑制するためにイスラエルで使用されてきた。薬剤耐性化によって、ナシの火傷病抑制に対するオキシリシン酸の効力は漸減している^[237, 238]。オキシリシン酸は日本および他の国でイネの細菌性感染症を制御するために使用されてきた^[239, 240]。農薬としてオキシリシン酸の使用を許可する国がどれくらいあるのか、どの作物に対して使用されているのかについては明らかでない。

銅

銅は、細菌および真菌の植物病害を制御するために最も広く使用されている化合物である。銅を含有する農薬は、ほとんどすべての食用作物、動物飼料用および観賞用植物に使用されている。農薬として、銅は植物毒性を有し、特に新しく生長する新芽、葉および果実表面に損傷を与える可能性がある。植物毒性をもたらす土壌中の銅の蓄積も懸念されている。銅はまた、薬剤耐性の共選択に関連することが示されている。この課題は広く検討されている^[241-243]。

銅は、2017 年に米国 EPA により再登録審査を受けた。EPA は、対象としない地域の土地や大気への噴霧を低減する方法を含むよう、添付文書を修正した。さらに、すべての銅を含有する農薬の使用間隔を、農場で 48 時間、温室で 24 時間に設定した。潜在的な環境有害性、特に魚類、水生無脊椎動物および水圏生態系への毒性に関する記述を添付文書に追加した。最終的に、一使用当たりの銅の最大量、再使用間隔、および全ての作物に対する 1 エーカー当たりの銅の最大年使用率が設定された。その概要は <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2010-0212-0061> で入手可能である。上記の再登録された添付文書における作物に対する銅の実際の使用率については、付録 A を参照されたい。食用作物に許容される銅イオンの年間最大使用率は、穀物の 1.2 kg/HA からマンゴーの 53 kg/HA まで大きく異なる。

米国における銅の使用量の推定値を USGS データベースから得た。作物農薬の銅成分は製品によって様々である。例えば、銅は金属銅、水酸化銅、オクタン酸銅、オキシ塩化銅、硫酸銅、または他の様々

な形態として製品に含まれている。銅を基本とした農薬の使用データについて、製品中に存在する銅(活性成分)の量に対して標準化し、作物農薬として使用される銅の総量を全製剤に対する総計として算出した。2015年には、約 4,216,580~4,588,046 kg の銅が米国の植物に利用された。

USGS からのデータは、銅の商業的農場での使用の実績を示している。また、銅含有製品は、庭園、景観植物、芝生におけるコケ防除のための住宅用としても販売されている。住宅での銅を含む農薬の使用量の見積もりは不可能である。

抗真菌剤

少なくとも 36 種類のトリアゾール系農業用抗真菌剤が存在するが、現在どの国でも使用されているのは一部のみである。ほとんどのトリアゾール系抗真菌剤は接尾辞「-アゾール」で終わるが、いくつかのトリアゾールは「-アゾール」で終わらず(例えば、ミクロブタニル、トリアジメフォンおよびフルトリアホル)、一方、その接尾辞を持ついくつかの抗真菌剤は別の抗真菌剤に属する(例えば、イミダゾール、ベンゾイミダゾール)。特定の農業用トリアゾール(ブロムコナゾール、ジフェノコナゾール、エポキシコナゾール、プロピコナゾールおよびテブコナゾール)は、医療用トリアゾールと同様の作用機序で *A. fumigatus* のタンパク質と相互作用し、他のトリアゾール抗真菌薬(例えば、トリアジメフォン)と比較して、交差耐性の可能性を有する^[214]。

世界の中でも米国は、農業におけるトリアゾール使用に関する入手可能で最も詳細な公的データを有している。使用推定量を算出している USGS の Pesticide National Synthesis Project によれば、トリアゾールの総使用量は 1992 年に比べて 2015 年は 6 倍以上に増加していた(図 4)。トリアゾール使用量の推定値は、1992 年には約 350~600 トンであったが、2015 年には約 2,600~3,750 トンに増加していた(予測推定値)。1992 年に最も多く使用された 3 種類のトリアゾールのうち、2 種は顕著に使用量が減少していた: トリアジメフォン(131 トン → 0.09 トン)とミクロブタニル(129 トン → 46 トン)。一方、1992 年に 3 番目に多く使用されたトリアゾールであるプロピコナゾールの使用量は著しく増加していた(274 トン → 1,012 トン)。1992 年から導入されたトリアゾールのうちいくつかは、2015 年に最も多く使用されたと推定されている(図 5): テブコナゾール(1,256 トン)、プロチオコナ

ゾール(412 トン)、メトコナゾール(217 トン)、およびジフェノコナゾール(176 トン)。

認定を受けた農業事業主によって商業的に利用されるトリアゾール類に加え、ミクロブタニル、プロピコナゾール、テブコナゾールおよびトリチコナゾールといった家庭の芝生や庭の植物に対する真菌病を治療するために利用可能な製品がある。住宅でのトリアゾールの使用量に関する情報は入手できない。

他国のデータは、国連食糧農業機関(FAO)の FAOSTAT ウェブサイトを通じて入手可能である。この情報は、加盟国から提出されたアンケートに基づいている。これらのデータにおいて、トリアゾールはイミダゾール(ジアゾールとしても知られる)と共にグループ化されており、個別に集計することができない。米国では 2015 年のイミダゾール使用量はトリアゾール使用量の 1% 未満であった。2014 年のデータを報告した国のうち、トリアゾールとイミダゾールの使用量が多かったのは、ウクライナ(2,996 トン)、ドイツ(2,705 トン)、フランス(2,241 トン)、英国(1,430 トン)、ポーランド(1,230 トン)であった。トリアゾールとイミダゾールの使用量は、2005 年から 2014 年の間にポーランドで 3 倍以上に増加し、ウクライナで 180%、英国で 125%、ドイツで 70% 増加した(フランスは 2005 年のデータを報告していない)。特にウクライナ、ドイツ、フランスでは、はるかに広い耕地面積を有する米国とほぼ同程度のトリアゾールとイミダゾールの使用を報告しており、耕地面積比のデータ調整を含め、これらのデータに対するさらなる精査が必要である。

他の抗微生物剤

アジア諸国では、他の天然または合成の抗微生物剤が作物防護のために使用されている。その 1 つの例は、ジンガンマイシン(バリダマイシン A)であり、*Streptomyces* 属菌によって生合成される。ジンガンマイシンはトレハラーゼと呼ばれる酵素を阻害し^[244]、アジアでは病原真菌 *Rhizoctonia solani* によるイネの紋枯病の制御に使用される^[245]。ニンナンマイシンは、合成ピリミジンヌクレオシド系抗菌剤であり、うどん粉病などのウイルス性・真菌性の感染症に対して使用されている(製品情報: <http://www.cdxzy.com/en/proC/201209/156.html>)。これらのような作物防護薬剤が、臨床で使用する抗菌薬に対する耐性と関連性があるのかどうか確認はされていない。農作物を防護するために各国個別に利用される抗微生物剤は他にも存在するが、これらの使用についてはほとんど

ど知られていない。

B. 抗微生物剤を農薬として使用する場合、農産物を消費する人や農場の近くで働く人々の曝露はどのようなものか？ この曝露によるリスクはどれくらいか？

多くの国では、農薬として使用される抗微生物剤を含めて、農薬全体の使用を規制している。これらの規制基準は国によって異なる。いくつかの国では、規制はほとんどないか、全く実施されていない。本節では曝露リスクを評価し、米国および欧州における抗微生物剤の人への曝露を低減するための規制戦略について簡単な要約を述べる。

米国では、EPA が植物に適用される物質の規制を司る連邦機関である。多くの国は、どの物質を農産物に使用することができるかを規制する同様の機関を有している。米国ではそれぞれの活性成分に従って、特定の作物または作物群に区分けして使用許可が出される。例えば、「梨状果」の作物グループには、リンゴ、野生リンゴ、サンザシ、アジアナシ、マルメロ、カリン、クサボケおよび西洋ナシが含まれる。これら農作物のいずれにも、梨状果グループに登録された薬剤を用いることができる。梨状果グループの中でも西洋ナシのみに使用が許可されている薬剤もある。各州は個別に、使用できる農薬を追加で制限することができる。

作物防護のための物質の使用登録の許可の前に、EPA は提案された使用量での有効成分や構成成分が環境に与えるインパクトおよび人、動物、昆虫、その他の標的としない生物や水圏生態系に対する有害な影響を評価する。さらに、EPA は収穫された農作物の中または表面に残存する農薬の許容量を設定する。EPA 承認薬剤の添付文書には、使用説明書とその制限事項が記載されている。例えばストレプトマイシンおよびテトラサイクリンであるが、EPA はストレプトマイシンを使用する作業者のための防護衣の着用および防護装置の使用、使用後 12 時間以内の再使用の制限、および収穫前の薬剤の使用間隔の遵守を要求している。作物に使用される薬剤の添付文書に記載されているそれぞれの使用方法、注意事項、および制限事項には法的拘束力がある。

欧州連合の法律は、植物防護剤の使用およびマーケティングについて手引きしている (Regulation (EC) No1107/2009)。植物防護剤を市場に出す場合は、事前の認可が必要である。EFSA が活性物質

(植物病害に対して使用される植物防護製品の活性成分)を評価し、かつ加盟国がそれぞれの国家レベルでその製剤を評価する、二重の評価システムが設置されている。活性物質が安全であることが証明されている場合、すなわち、その物質およびその残留物が人および動物の健康に直ちにまたは遅発的に有害な影響を及ぼさず、環境、特に標的としない生物種および生物多様性に容認できる範囲を超えて影響を及ぼさない場合において承認される。活性物質は 15 年間を期限に承認される。申請者(製剤メーカー等)は、有効期限前までに承認の更新を求めることができる。EFSA は最大残留レベル(MRL)を提示する責任を負う。

農薬の曝露限界は、人に対する毒性の推定値に基づくが、実験動物における毒性試験によってその推定値が求められる。しかしながら、この試験では、薬剤に曝露された場合の微生物叢に対する効果が判定されていない。曝露される可能性のある人の微生物叢に抗微生物剤が及ぼす影響についてはほとんど知られていない。さらなる研究が必要である。

EFSA は、許容可能な曝露量を次のように定義する:

- 一日摂取許容量 (ADI): 顕著な健康上のリスク無く、生涯にわたって摂取することができる一日当たりの摂取量
- 急性参照用量 (ARfD): 経口摂取した場合に、短時間には健康に悪影響が出ないと推定される一日当たりの摂取量
- 作業曝露許容量 (AOEL): 作業者が健康に悪影響を及ぼすことの無い最大曝露量

ADI および ARfD 値は無毒性量 (NoAEL) に基づき、いずれも動物毒性試験において検出可能な有害事象が生じない物質の最大濃度または量を安全係数で割ったものとして定義される。安全係数は、試験動物と人との間の差異 (因数 10)、ならびに個人の感受性で生じる差異 (別の因数 10) を盛り込み 100 に設定される。アミノグリコシド、テトラサイクリン、およ

びキノロンは、ヨーロッパでは農薬としての使用が承認されていないが、トリアゾールは使用されている。トリアゾールについて EFSA により設定された ADI、ARfD および AOEL 値を表 9 に示す。

ヨーロッパでは、モデル化のためのデータが不足しているため、製剤が使用された時の周囲の人や住民への曝露を評価することは困難である。ヨーロッパの抗微生物剤を取り扱う作業員において、血液また

は血清中の化合物または代謝産物の濃度のモニタリングができれば、より現実的な曝露情報を把握することが可能となるであろう。いくつかの抗微生物剤は、家庭用庭園で利用可能である。添付文書は安全な取扱法を提供するが、規制当局は、説明書を読み製品を適正かつ安全に使用することを消費者に委ねている。

C. 農薬として使用されている抗微生物剤は、農場周辺の環境をどの程度汚染しているのだろうか？ 拡散を制限するためにはどのような措置が効果的か？

農場周辺の環境中で検出される抗微生物農薬の例

抗微生物剤は多くの環境分野ではより広くモニターされているが、農薬として使用される抗微生物剤に関するデータは多くない。例えば、オキシテトラサイクリンは、農業用水路で頻繁に検出されるが、これは、家畜への広範な使用の結果であると考えられる^[246]。現在のところ、自然界におけるオキシテトラサイクリンの検出と農薬としての使用を関連付ける実験データはない。オキシソリン酸およびアミノグリコシド系についても同様のことが言える。トリアゾール系抗真菌剤に関しては、プロピコナゾールとテブコナゾールが米国全土の水路で検出されている^[247]。これらの抗真菌剤は農業で広く使用されており、採取場所でのプロピコナゾールの濃度が上流域における抗真菌剤使用量の推定値と相関したことから、この濃度は上流地域での本剤の使用に関連している可能性が高い。プロピコナゾールおよびテブコナゾールは、スイスの表層水からも検出され^[248]、十分な確認が行われていないものの、これは農業での利用または都市から流出した雨水に起因するものと推定された。別の研究では、テブコナゾールが、カリフォルニア州シエラネバダ山脈のヨセミテ国立公園および他の場所からの堆積物および両生類の組織サンプルから検出された^[249]。この抗真菌剤はこれらの場所では使用されておらず、風下の農場地域 Central Valley では大量に使用されており、研究者らは大気による抗真菌薬の移動と沈着を疑った。総じて、米国でのトリアゾールの使用は 2005 年以降大幅に増加しているにも関わらず、その環境中の量についての研究はほとんどない (https://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps/compound_listing.php)。

生態系および人の健康に関するリスク評価は、主にモデルから予測された環境濃度に依存してきた。例えば EPA は、ストレプトマイシンおよびオキシテトラサイクリンの上限値を、その使用によって地表水および地下水中に検出され得る値から算出した（ストレプトマイシンはリンゴへの空中散布による使用を（U.S. EPA streptomycin, 2006 年）、オキシテトラサイクリンはモモやネクタリン果樹園での使用を（U.S. EPA oxytetracycline, 2006 年）想定している）。河川への流出水中エポキシコナゾールの最大濃度（1.215 mg/L）は、地球上で報告された中で最も高い環境濃度から得られた^[49]。トリアゾール系抗真菌剤の大豆に対する使用のモデルでは、これらの抗真菌剤が、人の健康維持のための曝露の閾値を超える濃度で自然河川および地下水中に存在することが推定された^[250]。

環境中の抗菌剤の拡散に影響を及ぼすパラメータ

いくつかの要因、例えば、その物理化学的特性（紫外線による分解に対する感受性など）、使用法、土壌および水分条件、または気候条件などは、農薬の環境内動態に影響を与える。オキシテトラサイクリンやアミノグリコシドの化合物は極めて水溶性が高いが（Royal Society of Chemistry, 2017）、トリアゾールは比較的水溶性が低い。その水溶性の程度により、環境中での移動や安定性に違いがある。例えば、農薬がスプレーとして使用される場合、大雨が降るとオキシテトラサイクリンは数分以内に葉の表面から除去される^[251]。しかしながら、柑橘類の幹に注射した場合、オキシテトラサイクリン残基は数ヶ月の間、葉および根に残存し得る^[39]。

pH、イオン強度、金属イオン、有機物含量などの土壌特性は、抗微生物剤の吸着過程とその移動特性に影響する^[252, 253]。最近の研究では、土壌は化合物を吸着する可能性はあるが、その土壌に曝露された細菌にはまた選択圧がかかり、耐性が発現するリスクが高まることが示されている^[254]。土壌中における抗微生物剤の選択圧のより良い理解が必要である^[255]。

環境中における抗微生物剤の残留性

環境中の農薬の残留性とその消長を把握するためには、非生物的な分解、生物的な分解、および野外での消散に関する研究が必要である。コントロールされた研究条件下で、バリダマイシン A のような化合物は土壌中で比較的迅速に消散し、噴霧使用 7 日後には検出されなくなった^[256]。他の化合物の中には、より持続的に残存するものもある。例えば、オキシテトラサイクリンは若い未結果樹への注入後、1 年半後においても土壌中に低濃度でなお検出され得る^[255]。Kahle らは湖のモニタリングデータから、トリアゾール化合物（フルコナゾール、プロピコナゾール、テブコナゾール）が水生環境では比較的長く残存する可能性を示した^[248]。

加水分解および光分解（水との反応または光による化合物の分解）は、非生物的な分解の主要なメカニズムであり、環境因子（例えば、光曝露、pH および温度）もまた、それらの分解に影響を及ぼし得る^[251, 257]。天然有機物もまた、これらの化合物の消長において役割を果たし得る。例えば、天然有機物への吸着により、アミノグリコシドの光変換が増強されることが示されている^[258]。

親化合物の消失が、抗菌活性の喪失とは必ずし

も一致しないことにも留意されたい。例えば、ストレプトマイシンの分解産物は残留抗菌活性を示す^[257]。ほとんどの抗微生物剤の代謝産物および分解産物はまだ完全には同定されていないため、薬剤耐性に対する影響はほとんど未知のままである。質量分析分野における進歩により、最近になって初めて作物および環境中のいくつかの代謝産物の同定が可能になった^[259]。

抗微生物剤の拡散の抑制

農薬の添付文書には、水や、表層水が存在するエリア、または平均水位より下の潮間帯などには直接使用しないこと等を始めとした、製造元からの一般的な推奨事項が含まれている。添付文書はその化学物質が、浸透性の高い土壌や、特に水面が浅い領域における使用によって地下水汚染を引き起こす可能性があることを警告している。添付文書内の推奨事項には、以下のものも含まれる：

- 器具の洗浄水やすすぎ水（希釈した農薬混液）を放置しないこと
- 環境条件（例えば、風）が原因で目標使用エリアを越えて漂う可能性のある場合には使用しないこと
- 1 シーズン当たりの最大使用回数を超えないこと
- 処理区域内での家畜放牧を行わないこと
- 収穫時期が近い場合または収穫時期を超えた場合は使用を控えること

農薬の拡散を回避するために推奨される使用方法は、データ駆動モデルに基づいている。予測モニタリングによって、親化合物とその代謝産物または分解産物の拡散の効果的な制限が可能となる。

D. 抗微生物剤は農場や周辺環境において薬剤耐性をどの程度選択するのか？この薬剤耐性は人間の健康に対して脅威になるのだろうか？

作物に使用されている抗微生物剤のリスクを評価するための一般的な原則

薬剤耐性の選択は、主として曝露時間の長さおよび微生物集団が曝露される抗微生物剤の濃度に基づいている。薬剤耐性の選択の可能性に寄与するその他の要因は以下のとおりである：

- 微生物集団の規模（薬剤耐性の出現や自然発生は一般的ではないため）
- 耐性形質を増幅する物質の存在
- 耐性を可能にする形質の発生し易さ

曝露の長さは抗微生物剤がどれくらい頻繁に使用

されるのか、および微生物の生息場所における抗微生物剤の安定性(しばしば半減期で表現される)によって決定される。抗微生物剤の消失は、(薬剤耐性)微生物による生分解、光化学的変換または化学的加水分解、大気への揮発または共蒸発、浸出および水による希釈によって起こる。ほとんどの抗微生物剤は蒸気圧がとても低く、揮発による消失はごくわずかである。微生物が曝露される抗微生物剤の濃度は、微生物に対する化学物質の生物学的利用能(細胞に侵入し、その重要な機能に影響を及ぼす量)によっても決定される。多くの抗微生物剤の生物学的利用能は、土壌粒子または有機物への吸着によって土壌中で減少し、このことで薬剤耐性の選択性は低下する。しかしながら、発育阻止濃度(微生物の増殖および複製を阻害することができる濃度)より低い濃度でも、薬剤耐性を付与する水平伝達の誘導を含めた他の効果を有することが知られている^[30, 260]。

抗微生物剤が使用される場所もまた、薬剤耐性選択に少なからず影響を及ぼす。葉および未成熟の果実へ使用した場合(多くの抗微生物剤がこのように使用される)、微生物集団の密度は低く、また抗微生物剤が光化学的分解を起こしやすくなるため、微生物への曝露は比較的弱い。いくつかの抗微生物剤は樹幹に注射されるが、これによる微生物への曝露は非常に少ない。相対的な意味では、作物に対するこれらの使用方法は、抗微生物剤を含む肥料や畜産あるいは都市で使用された水を土壌で再利用する場合に比べて、耐性選択に及ぼす影響ははるかに低いと予測される。抗微生物剤とは対照的に、トリアゾール抗真菌剤は空中および地上での噴霧を含め広く使用されている。

環境における薬剤耐性選択はまた、その場に現存する微生物のタイプおよびこれらの微生物の密度に依存する。環境中の微生物は一般的に、自然発生した耐性機構を保有している。環境中に抗微生物剤が存在すると、耐性をもつ環境細菌の増加につながる可能性がある。これらの細菌がもつ薬剤耐性遺伝子が、プラスミドのような水平伝達可能な遺伝因子に移ることも可能である。これらの可動因子は、ある細菌から別の細菌への薬剤耐性の伝達を可能にするが、これが水平伝達として知られるプロセスである。細菌間で水平伝達が起こるためには、次の条件が必要である:

- 薬剤耐性遺伝子が可動性エレメント上にある

- 遺伝的に類縁する微生物が高密度に存在する(微生物同士の接触と、それらの遺伝子の相同性が必要なため)
- 微生物が増殖するために利用可能な炭素源が存在する

最も危険性の高いシナリオは、人の病原体もしくは人の病原体と同じ環境に生存する常在菌への薬剤耐性遺伝子の水平伝播である。別の高リスクシナリオは、人や動物の排泄物によって、耐性をもつ人の病原体が環境中に存在することである。この場合、抗微生物剤の存在は、耐性をもつ人の病原体の増加につながる。作物への抗微生物剤の使用による、この遺伝子水平伝播のシナリオに対するリスクはごくわずかかもしれないが、そのモニタリングは必要であり、特に環境中に人の病原体が存在する場合においてはなおさらである。

人の健康に対する薬剤耐性の脅威

抗微生物剤を農薬として使用するリスクと薬剤耐性菌を選択する可能性を評価する場合、抗菌剤と抗真菌剤は化合物として異なるだけでなく、異なる種類の微生物を標的とするため、別物として考慮すべきである。抗菌剤が有意な耐性選択につながる可能性については、その用途が非常に特殊で限られていること、適用対象がリンゴおよびナシであること、適用部位の微生物は低密度であること、および生物学的利用能が低いことから、様々な意見があるものと考えられる。植物に適用される抗微生物剤による人の健康へのリスクは非常に低く、特に薬剤耐性選択にかかわる多くの他の(非作物性の)環境因子と比較すると、それは明らかである。抗菌剤と比較しトリアゾールは環境に対し、はるかに大量で長期間かつ多様な用途で使用されており、また環境中での安定性も高いため、その薬剤耐性選択圧ははるかに大きいことはすでに実証されている。現在、農業用抗真菌剤の使用による抗真菌剤耐性に対する懸念は、主に *A. fumigatus* に限定されているが、他の臨床上問題となる病原真菌については多くのことが不明のままである。例えば、病原性酵母 *Candida auris* によって引き起こされる重要な真菌感染症は、ここ数年、世界のいくつかの地域で急速に広がっている。*C. auris* の臨床分離株のほとんどは、トリアゾールやフルコナゾールに耐性である。臨床上重要な真菌およ

び酵母の薬剤耐性に対する農業用トリアゾール抗真菌剤の使用の関連性については、さらなる研究が必要

要である。

E. 抗微生物剤および薬剤耐性菌による環境汚染をどのようにモニターすべきか？

農業における抗微生物剤（すなわち、いくつかの抗菌剤およびトリアゾール）の使用と薬剤耐性をもつ人の病原体の出現との間の関連性について議論するためには、標準化された方法を用いた継続的なモニタリングによるデータが必要である。

グローバルな農業使用データベース

作物農業において使用された抗菌剤および抗真菌剤（トリアゾール）に関する入手可能な公的データの提供によって、研究者が農薬使用と薬剤耐性とを関連付けるための地理的および時間的な関係を評価することが可能になる。多くの国では、これらの化学物質の使用に関するデータは限定されているか、または入手できない。データの提供は、小規模な地域（例えば、郡ごと）での使用に関する形や、年および作物ごとによってグループされた形が有用であり好ましい。利用可能なデータの形式は多様であるため、データ集約システムの構築が研究利用をサポートする。

環境モニタリング：抗微生物剤

選択された抗微生物剤およびその代謝物の残留性を調べる研究は多くはない。これらの抗微生物剤およびその代謝産物や分解産物の水中、底泥やその他の場所（例えば、空気中のトリアゾール）のモニタリングを強化し、その環境分布を理解する必要がある。これらの抗微生物剤を対象として、野生動物の組織中の濃度をモニターすることも有用であろう^[249]。このような調査モニタリングで得られた知見は、環境分布をより広く推定するためのモデルとして使用することができる。特にトリアゾールは、過去 20 年間に使用量が大幅に増加したことから、さらなる研究が必要とされている。環境中のトリアゾールの残留性は、しばしば数日から数週間と報告されている。しかしながら、トリアゾールは環境中で数ヶ月以上残留する可能性もあり、環境条件がその分解速度に大きな影響を与えている^[261]。

環境モニタリング：抗微生物剤耐性

農業環境およびその周辺で分離された環境細菌および真菌における薬剤耐性についてもモニタリングが必要である。データは抗微生物剤の残留濃度データと同じ手順で適正に収集し、疾患を引き起こし得る微生物の薬剤耐性の検出については優先的に行うべきである。人の病原体ではない細菌および真菌における薬剤耐性に関するデータも有用であろう。例えば、アスペルギルス属真菌のうち植物病原体である *Aspergillus flavus* 等である。トリアゾール系抗真菌剤は葉および茎の病気を防除するために穀物作物に適用されるが、一般的にアスペルギルス属真菌によって引き起こされる穂腐れや穀粒腐敗の防除には使用されない。しかし、植物病原性および環境中のアスペルギルス属真菌への抗真菌薬の偶発的な曝露および薬剤耐性の出現を推定するためにも、作物に対するトリアゾール系抗真菌剤の使用に関する広範なデータは有用であろう。人の病原真菌である *Aspergillus fumigatus* についてのトリアゾール曝露に関するデータはない。

バイオモニタリング

環境中での曝露に起因する抗微生物剤の人体における濃度については、ほとんど知られていない。小規模な研究では、職場での殺真菌剤テブコナゾールとその代謝物の尿中濃度が調べられている^[262]。既存のバイオモニタリングシステムを介して収集された人のサンプルの系統的分析により、曝露の程度および可能性のある原因についての洞察が可能となる。このような分析は、被験者集団のレベルで、臨床用抗菌薬の使用によるものと、他の曝露原因によるものとで区別して行われる必要がある。ニコチンレベルを基としたタバコ服用に関するバイオモニタリングの結果、製品の直接的な使用と環境由来の曝露は区別することが可能であることが明らかとなっている^[263]。

薬剤耐性菌感染に対する公衆衛生サーベイランス

様々な因子が人の感染症における薬剤耐性に影響を及ぼすが、細菌および真菌感染症の公衆衛生サーベイランスは、薬剤耐性がもたらす負荷を理解し、抗微生物剤の環境中での使用と耐性微生物へ

の感染との関連を検討する研究を主導するためにも不可欠である。国家および軍研究所が管轄する多くの感染症サーベイランスの事例が存在する。米国およびカナダにおいて、*A. fumigatus* 感染に対するこのような広範なサーベイランスは存在しない。

F. 農作物に抗微生物剤を使用する必要性を減らす、または無くすためにどのような方策を用いることができるか？

農作物への経済的損失、ならびに人および環境へのリスクを最小限に抑えるように設計された「総合的病害虫管理 (IPM)」において確立された手段を使用することは、農業における抗微生物剤の使用を制限するための最良のアプローチである。植物病に対する IPM の主な構成要素は以下の通りである：

- 植物防護製品の適用タイミングを決定するための、疾患モデルおよび予測システムを含む正確な診断法やモニタリング法
- 耐病性の作物品種 (果実系および野菜系の両方における耐病性の台木を含む) の育種
- 病原体を含まない種子や植物を植え付ける素材、清潔な灌漑水の使用、植物から植物および農場間の病原体の伝播を防ぐ衛生対策等の、農作物への病原体の侵入を防ぐための各種方策の実践
- 植物の健康が最大限得られ、病原体に有利な環境因子が最小限となるような、栽培用地選択と土壌改良
- 病原体の蓄積を防止するための輪作やその他の農法の実践
- 病気の予防に有効性を示し且つ環境への影響の少ない生物学的製剤の使用
- 抗菌剤および抗真菌剤の適正使用

農場主が細菌性植物病を制御するためには、特定の作物に対する抗微生物剤の使用以外に複数の方法がある。疾患に対する遺伝的抵抗性の導入は、疾患を制御するための最良の方法である。この方法は、植物および畝作物におけるいくつかの細菌性疾患を制御するために使用されている。

残念なことに、ナシおよびリンゴにおける重度な疾患である火傷病について、交配によって火傷病耐性を示す品種を得ることはできていない^[227]。現在市販

されているナシの品種はすべて火傷病に対し脆弱で感染しやすい。リンゴのうち「レッドデリシャス」という品種は、火傷病に耐性をもっている。この耐性は、花への感染により果実の新梢は破壊されてしまうものの、茎へは病気が進行しにくくなっており、樹木そのものは破壊されないというものである。しかし、この品種には需要がなく、「レッドデリシャス」リンゴの大部分は、火傷病に弱い新しい品種 (例えば、「ガラ」、「ふじ」、「ハニークリップ」など) に置き換えられてしまった。ゲノム配列の決定、遺伝マーカーを指標にした育種およびゲノム編集といった最新技術により、耐病性の果実および核果の品種開発が迅速化する可能性がある^[227, 264]。ナシおよびリンゴのゲノム編集によって火傷病耐性の導入が可能だったとしても、これらの組換え樹木は果樹園で育たないかもしれない。また、栽培者は、このような組換え樹木の果実に市場性があり、数十年先の将来に消費者に受け入れられる保証がない状況では、このような組換え樹木を新しい果樹園に導入しようとしなくても知れない。

細菌性植物病を制御するために、栽培量を制限する方法がとられている。一年生の野菜や畝作物では、制御したい病原体の宿主となり得ない作物との輪作や、病原体フリーの種子および塊茎の使用、土壌の日光消毒といった方法の実践が可能であるが、果樹のような多年生作物では、作物の輪作は不可能である。火傷病の発生は、果樹園の地理的位置によって減少させることができる。1900 年代初頭、ナシ産業は、米国の東海岸からカリフォルニア州、ワシントン州、オレゴン州などの西部州に移った。アメリカ東部の、夏季の雨が多く暖かく湿った気候は、ナシの花での感染およびその後の枝の感染 (芽枯れ) を助長するものであり、このことは果樹園の壊滅をもたらした^[225]。西部の州の夏季は乾燥しており、火傷病病原菌によって引き起こされる、幹での二次的な感染の発生率を減らすことができる。

その他の果樹の細菌性疾患を制御するための栽培方法としては、以下のものがある：

- 衛生対策（病気の組織を取り除き、病気の無い植物を植えること）
- 使用する肥料の調整や、徒長枝形成を減少させ、植物の健康を維持するための植物生長調節剤の使用
- 葉や果実を濡らすことのない点滴灌漑
- 樹冠の風通しを良くするための剪定
- 病原体を運搬や、感染部位の創傷を引き起こす可能性のある有害昆虫の制御

ナシおよびリンゴの栽培者は火傷病管理のために IPM の手法を使用するが、その手法のみでは不十分である。樹木の果実を防護するためには、追加の手段が必要である。

抗微生物剤を用いない、化学的火傷病の制御方法

二酸化水素と過酢酸の混合物は、火傷病を含む真菌性および細菌性の植物病を制御するために使用できる一般的な消毒剤である。二酸化水素と過酢酸の混合物は、接触時に細菌を殺すが、残留活性はほとんどない。市販がされている。

石灰硫黄合剤は、火傷病病原体が感染できる花の数を減少させるために、開花中のリンゴの木に使用されることがある。この合剤は開花中のナシには使用されない^[265]。銅化合物は、休眠状態のナシおよびリンゴの木に使用される他、初期の開花期間には繰り返し使用される^[266, 267]。若い発育中の果実を有するナシおよびリンゴの木に銅を使用すると、植物毒性のために果実表面が損傷し、果実に変色や変形が生じ市場価値が低下する可能性がある。新しい銅殺菌剤配合物は植物毒性が少なく、開花後期の期間に使用しても果実の出来栄を損なうことなく、火傷病を制御することができる^[267]。

その他、殺菌性を有さない 2 つの化合物が、火傷病制御のために使用することができる。プロヘキサジオンカルシウムは、リンゴ用に登録されている植物成長調節剤である。プロヘキサジオンカルシウムは芽の成長を抑え、火傷病病原菌によって生じる徒長枝における有害な二次感染を減少させることができる。この二次感染は、米国東部のような湿った夏や頻繁な雨が降る地域の果樹園でよく見られる^[227]。ア

シベンゾラル-S-メチルは、植物全体の耐性活性化 systemic activated plant resistance と呼ばれる自然の作用を誘導することによって植物病の重症度を軽減する。この化合物は感染した木の治療のために土壤に撒くか、潰瘍部の拡大を減らすために感染した枝や幹に塗布することによって使用する^[265, 268]。

火傷病に対する生物学的防除剤

米国西部では、リンゴ果樹園およびナシ果樹園におけるストレプトマイシン耐性 *E. amylovora* 株の広範な出現により、火傷病の生物学的防除に対する関心が高まっている^[215, 226]。ストレプトマイシン耐性株の出現によって、抗菌剤を基本とした植物病制御プログラムが機能しづらくなり、果樹園全体が損なわれるような大流行が定期的に発生している。果樹園から数千の微生物が分離・収集され、疾患周期において重要な段階である、花の上での *E. amylovora* 増殖を抑制する能力についてのスクリーニングが行われている^[269-271]。生物学的防除剤による植物病防除および生物学的な防除剤が果実の品質に与える有害作用に焦点を当てた、更なる研究が行われている^[272-274]。

近年、火傷病を防ぐためのいくつかの生物学的防除剤が米国 EPA によって登録された。*Bacillus* 属菌を基本とした 2 つの製品が火傷病を管理するために販売されている。*Bacillus amyloliquefaciens* D747 株は、ナシおよびリンゴを含む多数の作物における真菌性および細菌性植物病の制御のために登録された。*Bacillus subtilis* QST 713 株は、生きている菌および培養中に産生されたリポペプチドの混合物を含む噴霧乾燥した発酵産物として販売されている。リポペプチドは本剤の効力発揮に必須であり、また、植物病の制御に植物表面での *Bacillus subtilis* QST 713 株の増殖は必要でない。抗微生物剤と同様に、この薬剤は予測される感染期間の直前に使用されるが、火傷病の制御のためには頻繁な使用が推奨されている。

先制排除法と呼ばれるメカニズムを用いた生物学的薬剤が火傷病制御に用いられている^[274]。先制排除法では、病原体が増殖するための栄養素を生物学的防除剤によって枯渇させることで、病原体はコロニーを形成できず感染部位から排除される。生物学的防除剤は増殖するのに時間がかかるため、病原体がコロニーを形成する前に生物学的防御剤が集

団として十分な大きさまで増殖できるように、開花早期から中期に使用する必要がある。先制排除法によって作用する生物学的制御剤としては、*Pseudomonas fluorescens* A506 株や種々の *Pantoea* 属菌、そして *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 株や DSM 14941 株が知られている。先制排除法に加えて、火傷病の生物学的防除に使用される *Pantoea* 属菌はしばしば、*E. amylovora* にとって有害な抗菌化合物を産生する^[275]。

生物学的防除剤の利点は抗微生物剤とは異なり、それ自体が増殖し、花から花に拡散することである。すなわち、生物防除剤として用いられる細菌は、コロニーが形成された花から、開花前の化学薬品の噴霧では防御できない、新たに開いた花にも拡散する^[276, 277]。開花中の生物学的細菌制御剤の適切なタイミングでの使用は、低～中等度の火傷病の発生を有意に減少させることができる^[270, 278, 279]。

生物学的防除の実施に向けた課題

生物学的制御剤を使用するには、栽培者の教育によって、彼らの火傷病の制御のためのアプローチを変える必要がある。従来の手引きにあるような植物病管理対策の必要性や介入のタイミングに代わり、病原体が花に到達する前に生物学的制御剤が定着し成長できるよう、開花早期に生物学的植物病管理プログラムを実施する必要がある。さらに栽培者は、その成長をサポートするような条件下で生物学的制御剤を適用する必要がある^[59]。病原体が花に移行する前に、生物学的制御剤の定着と成長がより確実に行われるように、生物学的制御剤を使用するタイミングを決定するための手引きが作成されている^[280]。

生物学的防除剤は、一般的に、開花が 1～3 週間に亘って進み、微生物の増殖をサポートする適度に温暖な環境条件のある、アメリカ合衆国西部の州で最も効果的に作用する。米国の他の地域では、開花が急速で、開花早期の環境条件が生物学的制御剤の急速な増殖をサポートするには寒冷すぎるため、その制御効力が低下してしまう可能性がある^[281]。

この技術の普及のもう一つの障壁は、生物学的制御剤の性能が環境によって大きく変わってしまうことである^[265, 281]。ある年ある場所において、生物学的制御剤が良好に作用したとしても、また違う年では植物病を制御することができない可能性がある^[279]。酵母菌 *Aureobasidium pullulans* はその優れた植物病制御能が報告されている一方、この酵母は寒い湿潤環境条件下ではナシおよびリンゴの特定の品種に変色や斑点を生じさせる可能性がある^[265]。変色は果実の見た目を損ない、市場価値を低下させる。このことは生産者に、特に涼しくて湿った春の天候になる地域の果樹園での *A. pullulans* 使用を躊躇させる要因となる。さらに、*A. pullulans* は、銅および果樹園の黒星病、うどん粉病および他の真菌性植物病を制御するために使用される多くの殺真菌剤に感受性を示す。この生物学的製剤と多くの殺真菌剤との不適合性は、開花から結実までの果樹園の管理を余計に複雑にする^[265, 281]。

要約すると、抗微生物剤はナシとリンゴの火傷病およびモモとネクタリンの斑点細菌病という2つの深刻な植物病を制御するために、環境および動物や人に対する有害な影響を鑑みることなく、何十年もの間使用されてきた^[282]。IPM の実践により、火傷病および斑点細菌病を制御するために必要とされる抗微生物剤の使用回数は減少した。抗微生物剤は基本的に、暖かい天候で、満開の開花時期にある果樹園において、その果樹園またはその近くの別の果樹園で植物病の発生歴があった場合に使用される。これらの条件が満たされない場合、抗微生物剤は使用されない。米国では、有機栽培のナシおよびリンゴの生産における抗微生物剤の使用許可が 2014 年 10 月に取り下げられたため、抗微生物剤未使用で市販用の果実生産が可能であるかどうか、有機栽培認証生産者が最前線で試行錯誤をしている。一般的に火傷病の流行が果実生産地域内で 5～10 年ごとに起こることを考えると、抗微生物剤未使用で火傷病のような病気を防除する手法の有効性が、今後 10 年以内に試される可能性が高い。

図表

表 1 耐性病原体および耐性遺伝子を検出するための主な方法

方法	対象	利点	欠点	コスト / 技術的要件
実験室培養	病原体	・定量的 ・高感度になり得る ・耐性表現型の検出 ・MIC の決定	・培養可能な生物に限定される	低 / 低
全ゲノムシーケンシング	病原体	・すべての既知耐性遺伝子を検出し得る ・耐性遺伝子を宿主生物と関連付けられる	・最初に微生物培養が必要 ・MIC を予測できない	中 / 高
qPCR	遺伝子	・定量的 ・培養不要	・検出限界は様々 ・限られた数の標的 ・耐性遺伝子を宿主生物と関連付けられない	中 / 中
メタゲノミクス	遺伝子	・すべての既知耐性遺伝子を検出し得る ・培養不要	・検出限界は不明 ・耐性遺伝子と宿主生物とを正確には関連付けられない	高 / 高

表 2 主な抗微生物薬の製造方法

製造方法	
発酵	抗微生物物質を生産する微生物は、通常 100,00～150,00 L の液体培地内で培養される。製造業者は、酸素濃度、温度、pH および栄養分を操作することにより、微生物の発育を維持し、最大量の抗微生物物質の収量を得ることができる。発酵が完了すると、抗微生物物質が抽出され、結晶生成物に精製される。これは、有機溶媒に可溶性である抗微生物物質の場合、またはプロセスの初めにイオン交換、吸着または化学沈殿が行われる場合に容易となる。
合成	抗微生物薬は実験室内での合成によっても作られる。このような抗微生物薬の例としてキノロン系抗菌薬があり、その中で最初に発見されたものはナリジクス酸であるとされている。
半合成	抗微生物薬は、生産効率を最大限に上げるために、自然発酵と実験室での合成の組み合わせによって生産されている。生産プロセスを操作することにより、抗微生物薬の有効性、生産量および効力(強度)を調節することができる。このプロセスは、抗微生物薬の種類とその利用目的によって異なる。

表 3 安全な排出制限のための提案された分析と測定基準

分析	報告される測定基準	参照
細菌分離株の標準的な薬剤感受性試験結果から得られる最小発育阻止濃度 (MIC) 分布データからの安全限界の推定。	選択に影響のない濃度	Bengtsson-Palme, 2016 ^[104]
液体培養で増殖する細菌株 (耐性/野生型) のペアワイズ競合に対する抗微生物薬の効果の測定と、株が等しく十分に成長する抗生物質濃度の外挿。	選択のおこる最小濃度	Gullberg, 2011 ^[29]
試験管または流水システムの中での下水由来の複雑な微生物バイオフィルム集団に対する抗生物質の効果の測定。複数のエンドポイントにおける、薬剤耐性の表現型、分類学的変化および薬剤耐性遺伝子または転移因子の選択に対する抗微生物薬の効果の測定。	選択のおこる最小濃度 最小作用濃度 最大無作用濃度	Lundstrom, 2016 ^[206] Kraupner, 2018 ^[205]

表4 農薬として使用される抗微生物剤の交差選択および共選択性

農薬として用いられる 抗微生物剤	臨床で使用される抗菌薬との関係	臨床で使用される抗菌薬に対する 交差選択または交差耐性
ストレプトマイシン & ゲンタマイシン	ストレプトマイシンとゲンタマイシンは臨床で使用され、アミカシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、プラゾマイシンなどのように、グラム陰性菌とグラム陽性菌の両方によって引き起こされる重篤な感染症の治療に用いられる。	ストレプトマイシンおよびゲンタマイシンは、これらの薬物およびすべてのアミノグリコシドに対する耐性を付与するプラスミド媒介性耐性機構を選択することができる。
オキシテトラサイクリン	テトラサイクリン系抗菌薬の一つで、グラム陰性菌およびグラム陽性菌の両方によって引き起こされる感染症を治療するために、臨床で一般的に使用されている。	テトラサイクリン系抗菌剤の間で交差耐性を付与するいくつかの耐性機構が存在する。
カスガマイシン	カスガマイシンは人には使用されず、アミノグリコシドのような人に使用される抗菌薬とは構造的に異なる。	交差耐性の証拠はない。共選択の証拠もない。カスガマイシンに対する耐性機構は、人に使用されるアミノグリコシドに対する耐性を選択せず、人に使用されるアミノグリコシドに対する耐性は、カスガマイシンに対する耐性を付与しない。
オキシリニン酸	オキシリニン酸はキノロンであり、シプロフロキサシンやレボフロキサシンなど、臨床で一般的に使用されているフルオロキノロンに関連する。	キノロン耐性は、フルオロキノロンに対する交差耐性を付与する ^[283] 。
銅	銅は重金属であり、臨床で使用される抗微生物薬とは無関係である。	銅は、共選択能を有する。感染症を引き起こす細菌は、プラスミド(可動性遺伝因子)に重金属耐性をもち、臨床で使われる抗菌薬にも耐性をもつことがある。
トリアゾール	トリアゾールは殺真菌剤であり、フルコナゾールおよびイントラコナゾールのような人の真菌感染症の治療に一般的に用いられるアゾール系抗真菌薬に関連する。	交差耐性は、臨床で使用されるトリアゾールおよびアゾールとの間で生じる。

表 5 米国において登録されている作物防護のためのストレプトマイシンの使用法

作物	疾患(原因微生物)	規定
樹果		
リンゴ	火傷病 (<i>E. amylovora</i>)	開花初期から満開時まで 100 ppm を噴霧、開花中は 4～7 日毎。 採取の 50 日前まで 7～14 日毎に噴霧を続ける。 開花後 6～8 回適用。
ナシ	火傷病 (<i>E. amylovora</i>)	開花初期に 100 ppm の噴霧を開始し、開花中は 3～5 日毎に噴霧。 採取の 30 日前まで 5～14 日毎に噴霧を続ける。 栽培中は 15 回まで適用。
野外に植付けられるまで温室で育成される苗		
セロリ(フロリダ州のみ)	白葉枯病 (<i>Pseudomonas cichorii</i>)	200 ppm で適用する。 双葉の段階で最初に適用し、次いでセロリが野外に移植されるまで 4～5 日間隔で適用する。
唐辛子、トマト	斑点細菌病 (<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> , <i>Xanthomonas perforans</i>) (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>)	200 ppm で適用する。 双葉の段階での最初に適用し、次いで野外に移植されるまで 4～5 日間隔で適用する。
畝植え作物		
じゃがいも	軟腐病 (<i>Pectobacterium spp.</i>)	切断した種イモを 100 ppm のストレプトマイシンに数分間浸漬し、次いで野外に植える。
たばこ	青カビ病 (<i>Peronospora tabacina</i>) 野火病 (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>)	植物が双葉である場合、または発症している場合 100 または 200 ppm を適用する。 植物が野外に定着するまで、5～7 日間隔で繰り返す。 週に 1 回、継続使用しても良い。
観賞用植物		
リンゴ、ナシ、コトネアスター、ピラカンサ	火傷病 (<i>E. amylovora</i>)	開花初期に 100 ppm で適用し、次いで 3～4 回毎に適用する。 開花後、果実が生じるまで 5～7 日毎に噴霧する。
切り花: 菊、ディフェンバッキア	青枯病 (<i>Erwinia spp.</i>) 萎ちょう細菌病 (<i>Pseudomonas spp.</i>)	ストレプトマイシン 50 ppm に 4 時間または 200 ppm に 20 分間、切片を浸漬する。 滅菌した培養液に植える。
多くの植物 (カーネーション、レンギョウ、ライラック、フィロデンドロン等)	葉腐細菌病 (<i>Xanthomonas campestris</i>)	4～5 日毎に 200 ppm で適用する。 症状が認められた場合は、腐敗した葉を除去し、4 日ごとに噴霧する。
バラ(ニュージャージー州のみ)	根頭がん腫病 (<i>Agrobacterium spp.</i>)	200 ppm のストレプトマイシン中で病変部を除去、根系を 15 分間浸漬した後表面を切断、清浄な土壌に移植する。

なお、緊急登録されるオキシテトラサイクリンおよびストレプトマイシンの柑橘系樹への使用については、本表には記載されていない

表 6 ラテンアメリカにおける農薬としての抗微生物剤の使用

作物	疾病	抗微生物剤 [§]						
		Gm +oTc	Gm +oTc +銅	oTc	oTc +銅	oTc +Sm	oTc +Sm +銅	Sm
リュウゼツラン	軟腐病	X [¥]	X	—	—	—	—	—
リンゴ	火傷病	—	—	—	—	—	—	X
アスパラガス、ニンニク、球根腐敗、白葉枯病 タマネギ、新タマネギ		X	—	—	—	—	—	—
カーネーション	斑点細菌病	X	—	—	X	—	—	—
セロリ	白葉枯病	—	—	—	—	—	—	X*
キク	軟腐病	X	—	—	X	—	—	—
キュウリ、メロン、カボチ	角斑病、根腐病	X	X	—	X	—	—	—
ナス、チリ、唐辛子、ジャガイモ、 トマト、トマティロ	斑点細菌病	X	X	—	X	—	—	X*
観賞植物	根頭がん腫病、火傷病	—	—	—	—	—	—	X
ナシ	火傷病	X	—	X	—	X	X	—
ジャガイモ	葉腐細菌病	X	—	—	—	—	—	X*
イネ	白葉枯病	X	—	—	—	—	—	—
タバコ	青枯病、野火病	X	—	—	X	—	—	—

[§] 単一の抗菌剤および包装された混合物。Cu=銅、Gm=ゲンタマイシン、oTc=オキシテトラサイクリン、Sm=ストレプトマイシン。

[¥] X は作物に使用される抗微生物剤を示す。

— 作物について記載のない抗微生物剤。

* 種子または塊茎への適用のみを示す。

表 7 2015 年の米国における作物防護のための抗微生物剤の使用

2015 年 ^a の農作物への 抗微生物剤の使用						
作物	果物の 作付面積 (HA) ^b	標的病原体	抗微生物剤	平均適用数	処理面積 (%)	有効成分 総量 (kg)
リンゴ	136,358	<i>Erwinia amylovora</i>	カスガマイシン	1.2	4	590
			オキシテトラサイクリン	1.5	18	6,033
			ストレプトマイシン	1.9	26	15,241
モモ	43,797	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	オキシテトラサイクリン	2.2	6	771
ナシ	20,823	<i>E. amylovora</i>	カスガマイシン	1.3	8	181
			オキシテトラサイクリン	2.9	49	5,216
			ストレプトマイシン	3.2	16	1,315
計 ^c	200,978		カスガマイシン	1.3	4	771
			オキシテトラサイクリン	2.2	18	12,020
			ストレプトマイシン	2.5	25	16,556

^a NASS ウェブサイト「USDA に関する 2015 年調査」からの作物に適用された抗微生物剤の使用データ <https://quickstats.nass.usda.gov/>.

^b USDA、NASS ウェブサイト「2012 年農業センサス」からのヘクタール単位の土地面積 (HA)。

^c 総使用量: 1) 作物全体の適用回数の平均、2) 処理面積は抗微生物剤で処理された各作物の HA の合計を作物の総 HA の合計で割った値、3) 作物全体に適用された有効成分総量の合計。

表 8 カナダ、ニュージーランドおよび米国における現状でのカスガマイシンの使用登録

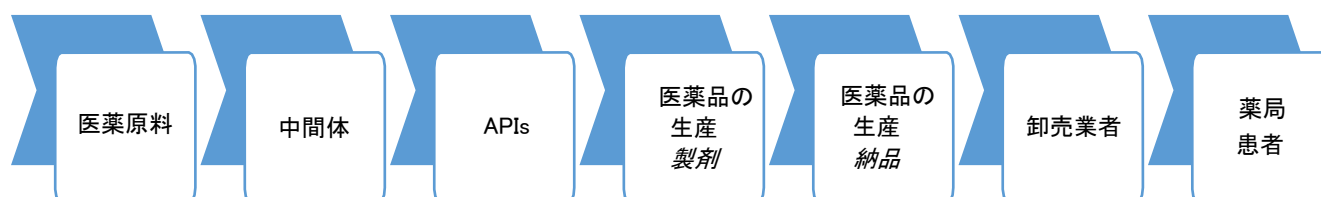
作物、国	植物病・原因微生物
サクランボ、米国	胴枯れ病および潰瘍病 (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>)
結実野菜(ナス、唐辛子、トマティロ、トマト)、 カナダ	斑点細菌病(<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>)
キウイフルーツのつる、ニュージーランド 梨状果(リンゴやナシなど)、 カナダおよび米国	潰瘍病(<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>) 火傷病(<i>Erwinia amylovora</i>)
クルミ、米国	クルミ黒斑細菌病(<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandis</i>)

表 9 EFSA によって定められたトリアゾールの ADI、ARfD、AOEL

トリアゾール	ADI、mg/kg 体重/日	ARfD、mg/kg 体重	AOEL、mg/kg 体重/日
プロピコナゾール	0.04	0.3	0.1
テブコナゾール	0.03	0.03	0.03
エポキシコナゾール	0.008	0.23	0.008
ジフェノコナゾール	0.01	0.16	0.16
ブロムコナゾール	0.01	0.1	0.025

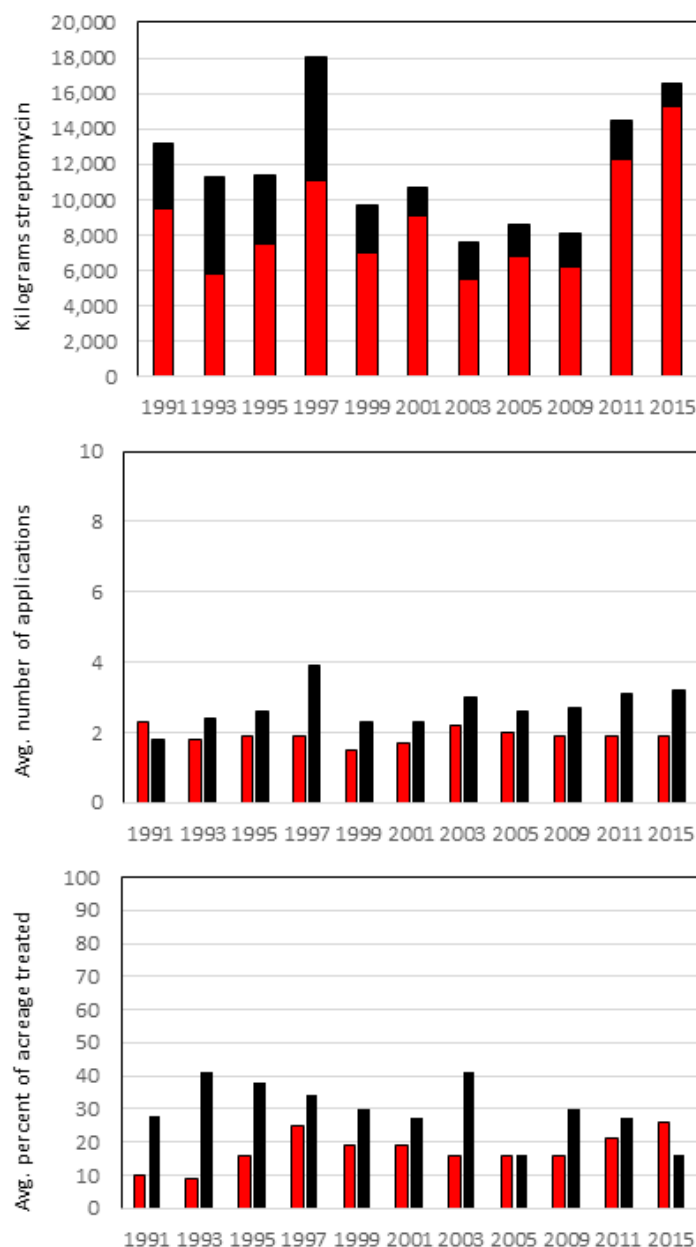
ADI、一日摂取許容量; ARfD、急性参照用量; AOEL、作業曝露許容量

図 1 抗生物質のサプライチェーン：複雑な問題



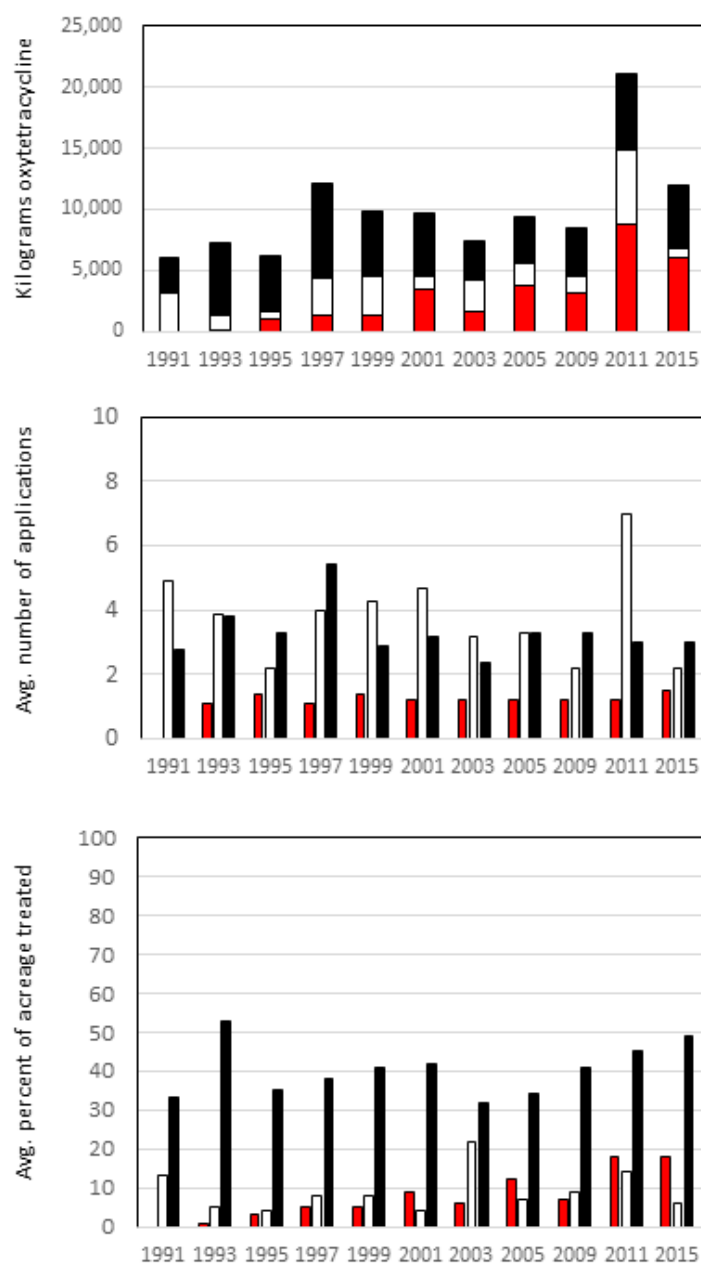
APIs (Active pharmaceutical ingredients): 医薬品成分(原薬)

図 2 米国におけるリンゴ(赤色バー)およびナシ(黒色バー)へのストレプトマイシンの使用(1991～2015 年)



上のグラフは、毎年適用されるストレプトマイシンの総量(キログラム)である。中央のグラフは作物へのストレプトマイシンの適用の平均数を示す。下のグラフは、ストレプトマイシンで少なくとも1回処理した作物の総作付け面積の平均パーセントを示す。
出典: 使用データは、USDA National Agricultural Statistics Service QuickStats データベースから入手した。

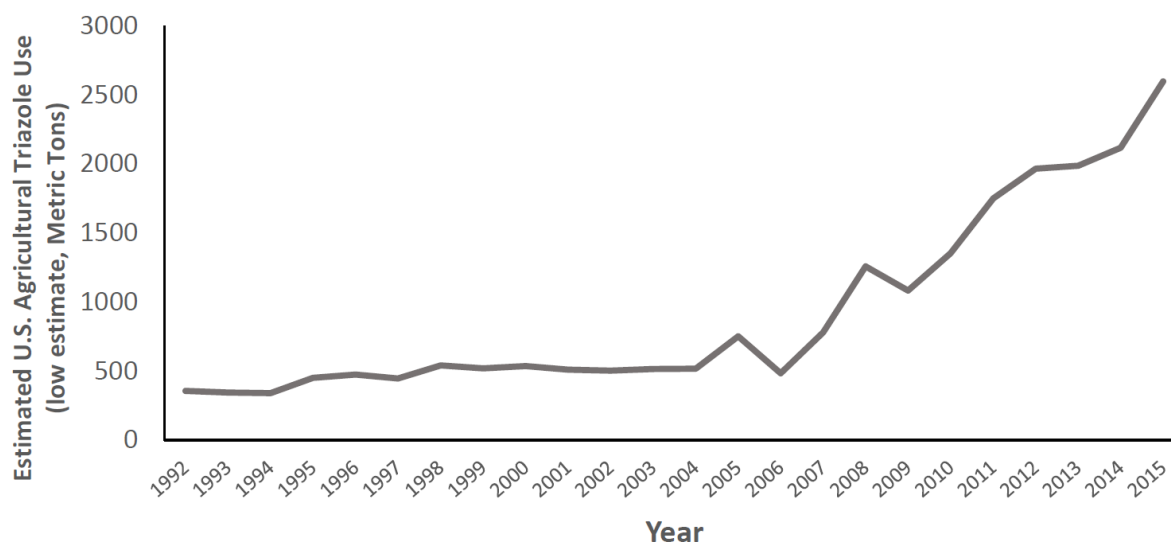
図3 米国におけるリンゴ(赤色バー)、モモ(白色バー)およびナシ(黒色バー)へのオキシテトラサイクリンの使用(1991~2015年)



上のグラフは、毎年適用されるオキシテトラサイクリンの総量(キログラム)である。中央のグラフは、作物に対するオキシテトラサイクリンの適用の平均数を示す。下のグラフは、オキシテトラサイクリンで少なくとも1回処理した作物の総作付面積の平均パーセントを示す。

出典:使用データは、USDA National Agricultural Statistics Service QuickStats データベースから得た。

図 4 米国における殺真菌剤トリアゾールの農業での使用量

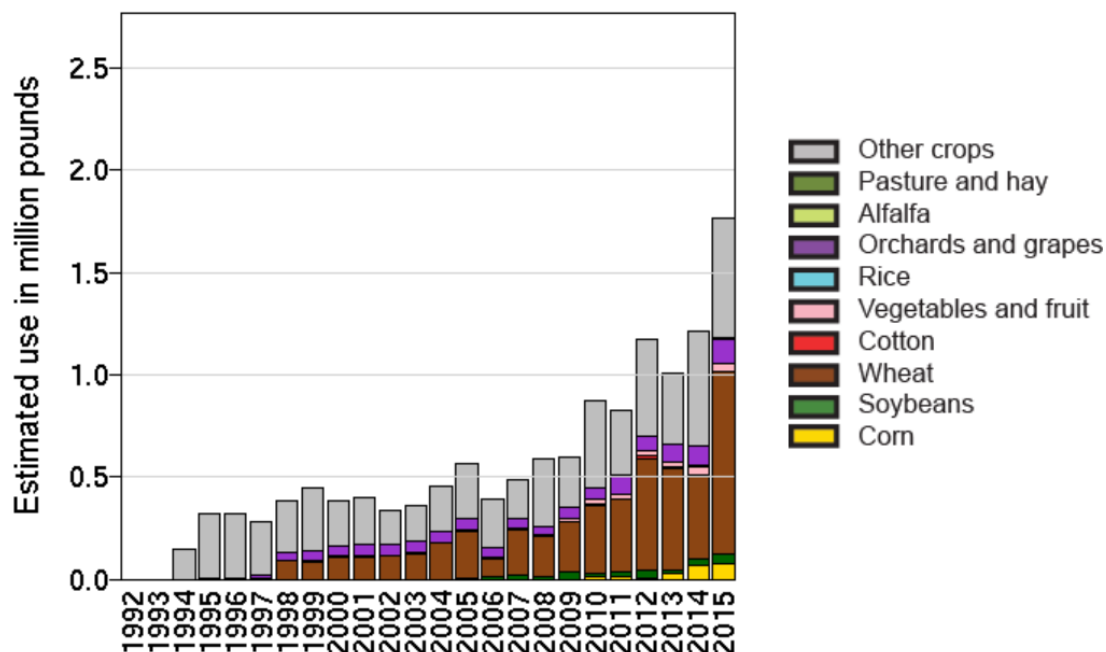


米国における農業用トリアゾール殺真菌剤の年間使用量の低推定値。2013～2015 年のデータは、最新の作付面積データに基づいて修正される予備的な推定値である。2015 年のデータには、種子の処理用途の推定値は含まれていない。

出典: USGS Pesticide National Synthesis Project <https://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps/county-level/>

データソースと推定値の説明: <https://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps/about.php>

図 5 米国における各年および各作物におけるテブコナゾールの農業での使用



出典: : USGS Pesticide National Synthesis Project <https://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps/county-level/>

参考文献

1. Ansari, F., et al., The European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) Point-Prevalence Survey of Antibacterial Use in 20 European Hospitals in 2006. *Clinical Infectious Diseases*, 2009. 49(10): p. 1496-1504.
2. CDC, Antibiotic Use in the United States, 2017: Progress and Opportunities. 2017, US Department of Health and Human Services, CDC: Atlanta, GA.
3. Finley, R.L., et al., The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin Infect Dis*, 2013. 57(5): p. 704-10.
4. Kotay, S., et al., Spread from the Sink to the Patient: In Situ Study Using Green Fluorescent Protein (GFP)-Expressing *Escherichia coli* To Model Bacterial Dispersion from Hand-Washing Sink-Trap Reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017. 83(8).
5. Hocquet, D., A. Muller, and X. Bertrand, What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of Hospital Infection*, 2016. 93(4): p. 395-402.
6. Varela, A.R., et al., Vancomycin resistant enterococci: From the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment*, 2013. 450-451: p. 155-161.
7. Varela, A.R., et al., Genetic characterization of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* from urban streams and municipal and hospital effluents. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015. 91(5): p. fiv015- fiv015.
8. Islam, M.A., et al., Environmental Spread of New Delhi Metallo- β -Lactamase-1-Producing Multidrug-Resistant Bacteria in Dhaka, Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017. 83(15).
9. Diwan, V., et al., Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *BMC Public Health*, 2010. 10(1): p. 414.
10. Devarajan, N., et al., Occurrence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Markers in a Tropical River Receiving Hospital and Urban Wastewaters. *PLoS ONE*, 2016. 11(2): p. e0149211.
11. Proia, L., et al., Occurrence and persistence of carbapenemases genes in hospital and wastewater treatment plants and propagation in the receiving river. *Journal of Hazardous Materials*, 2018. 358: p. 33-43.
12. Lamba, M., D.W. Graham, and S.Z. Ahammad, Hospital Wastewater Releases of Carbapenem-Resistance Pathogens and Genes in Urban India. *Environmental Science & Technology*, 2017. 51(23): p. 13906-13912.
13. Lamba, M., Graham, DW, Sreekrishnan, TR, Ahammad, Carbapenem resistance exposures via wastewaters across New Delhi. *Environment International*, 2018.
14. Quintela-Baluja, M., Urban water cycle and antibiotic resistance genes dissemination. 2018, Newcastle University.
15. Varela, A.R., et al., Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system. *Water Research*, 2014. 54: p. 327-336.
16. Graham, D.W., et al., Underappreciated Role of Regionally Poor Water Quality on Globally Increasing Antibiotic Resistance. *Environmental Science & Technology*, 2014. 48(20): p. 11746- 11747.
17. Homem, V. and L. Santos, Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – A review. *Journal of Environmental Management*, 2011. 92(10): p. 2304-2347.
18. Bouki, C., D. Venieri, and E. Diamadopoulos, Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013. 91: p. 1-9.

19. Wang, Q., P. Wang, and Q. Yang, Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. *Science of The Total Environment*, 2018. 621: p. 990-999.
20. Sobsey MD, A.L., Andremont A, Ashbolt NJ, Husman AM de R, Gin KY-H, Hunter PR, Meschke JS, Vilchez S. Briefing Notes - Antimicrobial Resistance: An Emerging Water, Sanitation and Hygiene Issue. 2014, World Health Organization.
21. Karanika, S., et al., Fecal Colonization with Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases*, 2016. 63(3): p. 310-318.
22. LaPara, T.M., et al., Tertiary-Treated Municipal Wastewater is a Significant Point Source of Antibiotic Resistance Genes into Duluth-Superior Harbor. *Environmental Science & Technology*, 2011. 45(22): p. 9543-9549.
23. Singer, A.C., et al., Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Frontiers in Microbiology*, 2016. 7: p. 1728.
24. Sauer, E.P., et al., Detection of the human specific *Bacteroides* genetic marker provides evidence of widespread sewage contamination of stormwater in the urban environment. *Water Research*, 2011. 45(14): p. 4081-4091.
25. Verhoughstraete, M.P., et al., Linking fecal bacteria in rivers to landscape, geochemical, and hydrologic factors and sources at the basin scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015. 112(33): p. 10419-10424.
26. Peal, A., Evans, B., Blackett, I., Hawkins, P., Heymans, P, A review of fecal sludge management in 12 cities. World Bank - Water and Sanitation Program. 2015.
27. Zhang, T. and B. Li, Occurrence, Transformation, and Fate of Antibiotics in Municipal Wastewater Treatment Plants. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2011. 41(11): p. 951- 998.
28. Pharmaceuticals in drinking-water. 2012, World Health Organization.
29. Gullberg, E., et al., Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLOS Pathogens*, 2011. 7(7): p. e1002158.
30. Andersson, D.I. and D. Hughes, Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 2014. 12: p. 465.
31. Basic Information about Biosolids. [cited 2018 June 25]; Available from: <https://www.epa.gov/biosolids/basic-information-about-biosolids>.
32. Wellington, E.M.H., et al., The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 2013. 13(2): p. 155-165.
33. Leonard, A.F., et al., Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environ Int*, 2015. 82: p. 92-100.
34. Leonard, A.F.C., et al., Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environ Int*, 2018.
35. Chantziaras, I., et al., Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014. 69(3): p. 827-834.
36. Hoelzer, K., et al., Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? *BMC Veterinary Research*, 2017. 13: p. 211.
37. Pal, C., et al., Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, 2015. 16: p. 964.
38. Pal, C., et al., Chapter Seven - Metal Resistance and Its Association with Antibiotic Resistance, in *Advances in Microbial Physiology*, R.K. Poole, Editor. 2017, Academic Press. p. 261-313.
39. Hu, J. and N. Wang, Evaluation of the Spatiotemporal Dynamics of Oxytetracycline and Its Control Effect Against Citrus Huanglongbing via Trunk Injection. *Phytopathology*, 2016. 106(12): p. 1495- 1503.

40. Johnson, T.A., et al., Clusters of Antibiotic Resistance Genes Enriched Together Stay Together in Swine Agriculture. *mBio*, 2016. 7(2).
41. Zhu, Y.-G., et al., Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. 110(9): p. 3435-3440.
42. Wang, Y., et al., Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nature Microbiology*, 2017. 2: p. 16260.
43. Muziasari, W.I., et al., The Resistome of Farmed Fish Feces Contributes to the Enrichment of Antibiotic Resistance Genes in Sediments below Baltic Sea Fish Farms. *Frontiers in Microbiology*, 2017. 7(2137).
44. Brooks, J.P., A. Adeli, and M.R. McLaughlin, Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems. *Water Research*, 2014. 57: p. 96-103.
45. Cook, K.L., A.M. Netthisinghe, and R.A. Gilfillen, Detection of pathogens, indicators, and antibiotic resistance genes after land application of poultry litter. *J Environ Qual*, 2014. 43(5): p. 1546-58.
46. FDA, National Antimicrobial Resistance Monitoring System – Enteric. Bacteria (NARMS). 2015: Rockville, MD: U.S.
47. Mollenkopf, D.F., et al., Genotypic and epidemiologic characterization of extended-spectrum cephalosporin resistant *Salmonella enterica* from US beef feedlots. *Preventive Veterinary Medicine*, 2017. 146: p. 143-149.
48. Bearson, B.L., et al., The agricultural antibiotic carbadox induces phage-mediated gene transfer in *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology*, 2014. 5: p. 52.
49. Chambers, J.E., et al., Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: a case study with the azole fungicide epoxiconazole. *Critical Reviews in Toxicology*, 2014. 44(2): p. 176- 210.
50. Pornsukarom, S. and S. Thakur, Horizontal dissemination of antimicrobial resistance determinants in multiple *Salmonella* serotypes following isolation from the environment of commercial swine operations after manure application. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017.
51. Jechalke, S., et al., Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, 2014. 22(9): p. 536-545.
52. Liu, J., et al., Soil-borne reservoirs of antibiotic-resistant bacteria are established following therapeutic treatment of dairy calves. *Environmental Microbiology*, 2016. 18(2): p. 557-564.
53. Durso, L.M., et al., Assessment of Selected Antibiotic Resistances in Ungrazed Native Nebraska Prairie Soils. *J Environ Qual*, 2016. 45(2): p. 454-62.
54. Wolters, B., et al., Transferable antibiotic resistance plasmids from biogas plant digestates often belong to the IncP-1 ϵ subgroup. *Frontiers in Microbiology*, 2015. 5(765).
55. Xie, W.-Y., et al., Changes in antibiotic concentrations and antibiotic resistome during commercial composting of animal manures. *Environmental Pollution*, 2016. 219: p. 182-190.
56. Pornsukarom, S. and S. Thakur, Assessing the Impact of Manure Application in Commercial Swine Farms on the Transmission of Antimicrobial Resistant *Salmonella* in the Environment. *PLOS ONE*, 2016. 11(10): p. e0164621.
57. Udikovic-Kolic, N., et al., Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. 111(42): p. 15202-15207.
58. Kyselková, M., et al., Tetracycline resistance genes persist in soil amended with cattle feces independently from chlortetracycline selection pressure. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015. 81: p. 259-265.
59. Fahrenfeld, N., et al., Effect of Manure Application on Abundance of Antibiotic Resistance Genes and Their Attenuation Rates in Soil: Field-Scale Mass Balance Approach. *Environmental Science & Technology*, 2014. 48(5): p. 2643-2650.
60. Marti, R., et al., Safely Coupling Livestock and Crop Production Systems: How Rapidly Do Antibiotic Resistance Genes Dissipate in Soil following a Commercial Application of Swine or Dairy Manure? *Applied and Environmental Microbiology*, 2014. 80(10): p. 3258-3265.

61. Williams-Nguyen, J., et al., Antibiotics and Antibiotic Resistance in Agroecosystems: State of the Science. *Journal of Environmental Quality*, 2016. 45(2): p. 394-406.
62. Muurinen, J., et al., Influence of Manure Application on the Environmental Resistome under Finnish Agricultural Practice with Restricted Antibiotic Use. *Environmental Science & Technology*, 2017. 51(11): p. 5989-5999.
63. Rahube, T.O., et al., Impact of Fertilizing with Raw or Anaerobically Digested Sewage Sludge on the Abundance of Antibiotic-Resistant Coliforms, Antibiotic Resistance Genes, and Pathogenic Bacteria in Soil and on Vegetables at Harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014. 80(22): p. 6898-6907.
64. Tien, Y.-C., et al., Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of The Total Environment*, 2017. 581-582: p. 32-39.
65. Poirel, L., et al., Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France. *Emerging Infectious Diseases*, 2012. 18(3): p. 523-525.
66. Al Bayssari, C., et al., Emergence of OXA-48-Producing *Escherichia coli* Clone ST38 in Fowl. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015. 59(1): p. 745-746.
67. Webb, H.E., et al., Carbapenem-Resistant Bacteria Recovered from Faeces of Dairy Cattle in the High Plains Region of the USA. *PLOS ONE*, 2016. 11(1): p. e0147363.
68. Chen, B., et al., Class 1 Integrins, Selected Virulence Genes, and Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolates from the Minjiang River, Fujian Province, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. 77(1): p. 148-155.
69. Coleman, B.L., et al., Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Water Research*, 2013. 47(9): p. 3026-3036.
70. Allen, H.K., et al., Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 2010. 8: p. 251.
71. Cytryn, E., The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013. 63(Complete): p. 18-23.
72. Rothrock, M.J., et al., How Should We Be Determining Background and Baseline Antibiotic Resistance Levels in Agroecosystem Research? *Journal of Environmental Quality*, 2016. 45(2): p. 420-431.
73. Durso, L.M. and K.L. Cook. Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Current Opinion in Microbiology*, 2014. 19: p. 37-44.
74. FAO, STATISTICS FISHERIES AND AQUACULTURE STATISTICS STATISTIQUES DES PÊCHES. 2017.
75. Henriksson, P.J.G., et al., Unpacking factors influencing antimicrobial use in global aquaculture and their implication for management: a review from a systems perspective. *Sustainability Science*, 2017.
76. Smith, P., Antimicrobial resistance in aquaculture. *Rev Sci Tech*, 2008. 27(1): p. 243-64.
77. Nguyen Dang Giang, C., et al., Occurrence and Dissipation of the Antibiotics Sulfamethoxazole, Sulfadiazine, Trimethoprim, and Enrofloxacin in the Mekong Delta, Vietnam. *PLOS ONE*, 2015. 10(7): p. e0131855.
78. Welch, T.J., et al., IncA/C Plasmid-Mediated Florfenicol Resistance in the Catfish Pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009. 53(2): p. 845-846.
79. McIntosh, D., et al., Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008. 61(6): p. 1221-1228.
80. Verner-Jeffreys, D.W., et al., High Prevalence of Multidrug-Tolerant Bacteria and Associated Antimicrobial Resistance Genes Isolated from Ornamental Fish and Their Carriage Water. *PLoS ONE*, 2009. 4(12): p. e8388.
81. Chanda, M., et al., The use of antibiotics and disinfectants in ornamental fish farms of West Bengal, India. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 2011. 2(2): p. 139-140.

82. H., S.C., et al., Stress and welfare in ornamental fishes: what can be learned from aquaculture? *Journal of Fish Biology*, 2017. 91(2): p. 409-428.
83. Storteboom, H., et al., Identification of Antibiotic-Resistance-Gene Molecular Signatures Suitable as Tracers of Pristine River, Urban, and Agricultural Sources. *Environmental Science & Technology*, 2010. 44(6): p. 1947-1953.
84. Graham, D.W., et al., Appearance of β -lactam Resistance Genes in Agricultural Soils and Clinical Isolates over the 20th Century. *Scientific Reports*, 2016. 6: p. 21550.
85. Agga, G.E., et al., Antimicrobial-Resistant Bacterial Populations and Antimicrobial Resistance Genes Obtained from Environments Impacted by Livestock and Municipal Waste. *PLOS ONE*, 2015. 10(7): p. e0132586.
86. Karkman, A., et al., High-throughput quantification of antibiotic resistance genes from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016. 92(3): p. fiw014-fiw014.
87. Cavé, L., et al., Efficiency and sensitivity of the digital droplet PCR for the quantification of antibiotic resistance genes in soils and organic residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016. 100(24): p. 10597-10608.
88. Rački, N., et al., Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods*, 2014. 10(1): p. 42.
89. Spencer, S.J., et al., Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *The ISME Journal*, 2016. 10(2): p. 427-436.
90. Tyson, G.H., et al., WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015. 70(10): p. 2763-2769.
91. McDermott, P.F., et al., Whole-Genome Sequencing for Detecting Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016. 60(9): p. 5515-5520.
92. Tyson, G.H., et al., Using whole-genome sequencing to determine appropriate streptomycin epidemiological cutoffs for *Salmonella* and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 2016. 363(4): p. fnw009-fnw009.
93. Zhao, S., et al., Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016. 82(2): p. 459-466.
94. Nguyen, M., et al., Developing an in silico minimum inhibitory concentration panel test for *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 2018. 8(1): p. 421.
95. Biswas, S. and J.-M. Rolain, Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Journal of Microbiological Methods*, 2013. 92(1): p. 14-24.
96. Choquet, M., et al., Comparison of MALDI-ToF MS with the Rapidec Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2018. 37(1): p. 149-155.
97. De Carolis, E., et al., A rapid diagnostic workflow for cefotaxime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* detection from blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLOS ONE*, 2017. 12(10): p. e0185935.
98. Idelevich, E.A., et al., Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. *Clinical Microbiology and Infection*, 2017.
99. Miltgen, G., et al., Detection of carbapenemase activity in *Pseudomonas aeruginosa* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Journal of Microbiological Methods*, 2018. 145: p. 66-68.
100. Oviaño, M., et al., Quantitative and automated MALDI-TOF MS-based detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *aac(6')-Ib-cr* in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017. 72(10): p. 2952-2954.
101. Luby, E., et al., Molecular Methods for Assessment of Antibiotic Resistance in Agricultural Ecosystems: Prospects and Challenges. *Journal of Environmental Quality*, 2016. 45(2): p. 441-453.
102. CLSI. M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2018; Available from: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>.

103. Standardization, I.O.f., ISO 20776-1:2006 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems -- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices -- Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. 2006.
104. Bengtsson-Palme, J. and D.G.J. Larsson, Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment International*, 2016. 86: p. 140-149.
105. Guo, J., et al., Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Research*, 2017. 123: p. 468-478.
106. Yang, Y., et al., Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water Research*, 2014. 62: p. 97-106.
107. Fróes, A.M., et al., Distribution and Classification of Serine β -Lactamases in Brazilian Hospital Sewage and Other Environmental Metagenomes Deposited in Public Databases. *Frontiers in Microbiology*, 2016. 7: p. 1790.
108. Munk, P., et al., A sampling and metagenomic sequencing-based methodology for monitoring antimicrobial resistance in swine herds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017. 72(2): p. 385- 392.
109. Petersen, T.N., et al., MGmapper: Reference based mapping and taxonomy annotation of metagenomics sequence reads. *PLOS ONE*, 2017. 12(5): p. e0176469.
110. Auffret, M.D., et al., The rumen microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance and pathogenicity genes is directly affected by diet in beef cattle. *Microbiome*, 2017. 5: p. 159.
111. Fitzpatrick, D. and F. Walsh, Antibiotic resistance genes across a wide variety of metagenomes. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016. 92(2): p. fiv168-fiv168.
112. Thomas, M., et al., Metagenomic characterization of the effect of feed additives on the gut microbiome and antibiotic resistome of feedlot cattle. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): p. 12257.
113. Vikram, A., et al., Impact of “Raised Without Antibiotics” Beef Cattle Production Practices On Occurrences of Antimicrobial Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017.
114. Lanza, V.F., et al., In-depth resistome analysis by targeted metagenomics. *Microbiome*, 2018. 6: p. 11.
115. Robicsek, A., et al., Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 2005. 12: p. 83.
116. Knudsen, B.E., et al., Impact of Sample Type and DNA Isolation Procedure on Genomic Inference of Microbiome Composition. *mSystems*, 2016. 1(5).
117. Albertsen, M., et al., Back to Basics – The Influence of DNA Extraction and Primer Choice on Phylogenetic Analysis of Activated Sludge Communities. *PLOS ONE*, 2015. 10(7): p. e0132783.
118. Mullany, P., Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance. *Virulence*, 2014. 5(3): p. 443-447.
119. dos Santos, D.F.K., et al., Functional Metagenomics as a Tool for Identification of New Antibiotic Resistance Genes from Natural Environments. *Microbial Ecology*, 2017. 73(2): p. 479-491.
120. Allen, H.K., et al., Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil. *The Isme Journal*, 2008. 3: p. 243.
121. Donato, J.J., et al., Metagenomic Analysis of Apple Orchard Soil Reveals Antibiotic Resistance Genes Encoding Predicted Bifunctional Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010. 76(13): p. 4396-4401.
122. Marathe, N.P., et al., Functional metagenomics reveals a novel carbapenem-hydrolyzing mobile β -lactamase from Indian river sediments contaminated with antibiotic production waste. *Environment International*, 2018. 112: p. 279-286.
123. Sommer, M.O.A., G. Dantas, and G.M. Church, Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science (New York, N.Y.)*, 2009. 325(5944): p. 1128- 1131.

124. Uyaguari, M.I., et al., Characterization and Quantitation of a Novel β -Lactamase Gene Found in a Wastewater Treatment Facility and the Surrounding Coastal Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. 77(23): p. 8226-8233.
125. Maiden, M.C.J., et al., Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. 95(6): p. 3140-3145.
126. Huijbers, P.M.C., et al., Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. *Environmental Science & Technology*, 2015. 49(20): p. 11993-12004.
127. Leonard, A.F.C., et al., Is it safe to go back into the water? A systematic review and meta-analysis of the risk of acquiring infections from recreational exposure to seawater. *International Journal of Epidemiology*, 2018: p. dx281-dyx281.
128. Griffith, J.F., et al., Epidemiologic evaluation of multiple alternate microbial water quality monitoring indicators at three California beaches. *Water Res*, 2016. 94: p. 371-81.
129. Thapaliya, D., et al., Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* on Public Recreational Beaches in Northeast Ohio. *GeoHealth*, 2017. 1(10): p. 320-332.
130. Schijven, J.F., et al., Fate of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Faecal Sources in Surface Water and Probability of Human Exposure through Swimming. *Environ Sci Technol*, 2015. 49(19): p. 11825-33.
131. Ruppé, E., A. Andremont, and L. Armand-Lefèvre, Digestive tract colonization by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in travellers: An update. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2018. 21: p. 28-35.
132. Coleman, B.L., et al., The role of drinking water in the transmission of antimicrobial-resistant *E. coli*. *Epidemiology and Infection*, 2011. 140(4): p. 633-642.
133. Walsh, T.R., et al., Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*, 2011. 11(5): p. 355-62.
134. Davison, A., G. Howard, M. Stevens, P. Callan, L. Fewtrell, D. Deere, J. Bartram, Water Safety Plans Managing drinking-water quality from catchment to consumer. 2005, World Health Organization.
135. Wulf, M.W.H., et al., Infection and colonization with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 versus other MRSA in an area with a high density of pig farms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2012. 31(1): p. 61-65.
136. Bisdorff, B., et al., MRSA-ST398 in livestock farmers and neighbouring residents in a rural area in Germany. *Epidemiol Infect*, 2012. 140(10): p. 1800-8.
137. Casey, J.A., et al., High-density livestock operations, crop field application of manure, and risk of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Pennsylvania. *JAMA internal medicine*, 2013. 173(21): p. 1980-1990.
138. Paget, J., et al., MRSA Carriage in Community Outpatients: A Cross-Sectional Prevalence Study in a High-Density Livestock Farming Area along the Dutch-German Border. *PloS one*, 2015. 10(11): p. e0139589-e0139589.
139. Hau, S.J., et al., Single Nucleotide Polymorphism Analysis Indicates Genetic Distinction and Reduced Diversity of Swine-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST5 Isolates Compared to Clinical MRSA ST5 Isolates. *Frontiers in microbiology*, 2018. 9: p. 2078-2078.
140. Hau, S.J., et al., Antimicrobial Resistance Distribution Differs Among Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type (ST) 5 Isolates From Health Care and Agricultural Sources. *Frontiers in microbiology*, 2018. 9: p. 2102-2102.
141. Davies, P., Livestock associated MRSA: What are the risks to human health? Allen D. Leman Swine Conference, 2012. 39.
142. Zhu, Y.-G., et al., Microbial mass movements. *Science*, 2017. 357(6356): p. 1099-1100.
143. Gillings, M.R., et al., Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The Isme Journal*, 2014. 9: p. 1269.

144. Mao, D., et al., Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 2015. 85: p. 458-466.
145. Ahammad, Z.S., et al., Increased Waterborne bla_{NDM-1} Resistance Gene Abundances Associated with Seasonal Human Pilgrimages to the Upper Ganges River. *Environmental Science & Technology*, 2014. 48(5): p. 3014-3020.
146. Graham, D. Newcastle University.
147. Jong, M.-C., et al., Co-optimization of sponge-core bioreactors for removing total nitrogen and antibiotic resistance genes from domestic wastewater. *Science of The Total Environment*, 2018. 634: p. 1417-1423.
148. Munck, C., et al., Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome. *Nature Communications*, 2015. 6: p. 8452.
149. Bengtsson-Palme, J., et al., Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. *Science of The Total Environment*, 2016. 572: p. 697-712.
150. Christgen, B., et al., Metagenomics Shows That Low-Energy Anaerobic–Aerobic Treatment Reactors Reduce Antibiotic Resistance Gene Levels from Domestic Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 2015. 49(4): p. 2577-2584.
151. Lüddecke, F., et al., Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Research*, 2015. 69: p. 243-251.
152. Examples of Equivalent Processes: PFRP and PSRP. [cited 2018 July 7]; Available from: <https://www.epa.gov/biosolids/examples-equivalent-processes-pfrp-and-psrp>.
153. Burch, T.R., M.J. Sadowsky, and T.M. LaPara, Fate of Antibiotic Resistance Genes and Class 1 Integrins in Soil Microcosms Following the Application of Treated Residual Municipal Wastewater Solids. *Environmental Science & Technology*, 2014. 48(10): p. 5620-5627.
154. Sandberg, K.D. and T.M. LaPara, The fate of antibiotic resistance genes and class 1 integrons following the application of swine and dairy manure to soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016. 92(2): p. fiw001-fiw001.
155. Nicholas, P., et al., Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology*, 2007. 9(1): p. 143-151.
156. Burch, T.R., M.J. Sadowsky, and T.M. LaPara, Aerobic digestion reduces the quantity of antibiotic resistance genes in residual municipal wastewater solids. *Frontiers in Microbiology*, 2013. 4: p. 17.
157. Burch, T.R., M.J. Sadowsky, and T.M. LaPara, Air-Drying Beds Reduce the Quantities of Antibiotic Resistance Genes and Class 1 Integrins in Residual Municipal Wastewater Solids. *Environmental Science & Technology*, 2013. 47(17): p. 9965-9971.
158. Burch, T.R., M.J. Sadowsky, and T.M. LaPara, Effect of Different Treatment Technologies on the Fate of Antibiotic Resistance Genes and Class 1 Integrins when Residual Municipal Wastewater Solids are Applied to Soil. *Environmental Science & Technology*, 2017. 51(24): p. 14225-14232.
159. Lengeler J. W., D.G., and Schlegel H. G., *Biology of the Prokaryotes*. 2009, Stuttgart, Germany.
160. Clardy, J., M. Fischbach, and C. Currie, The natural history of antibiotics. *Current biology : CB*, 2009. 19(11): p. R437-R441.
161. Guardabassi, L., et al., Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. Isolated from Sewers Receiving Waste Effluent from a Hospital and a Pharmaceutical Plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998. 64(9): p. 3499-3502.
162. EPA, U.S., *Pharmaceutical Industry: Hazardous Waste Generation, Treatment, and Disposal*. 1976.
163. Bbosa, G.S., et al., Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, 2014. Vol.06No.05: p. 16.
164. Resurgence, T.W. Antibiotic abuse is driving antibiotic resistance 2015; Available from: <https://www.twm.my/title2/resurgence/2015/301-302/health1.htm>.
165. Van Boeckel, T.P., et al., Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015. 112(18): p. 5649-5654.

166. Agency, E.M., Environmental risk assessment of medicinal products for human use. 2006: London.
167. Larsson, D.G.J., Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014. 369(1656): p. 20130571.
168. Larsson, D.G.J., C. de Pedro, and N. Paxeus, Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 2007. 148(3): p. 751-755.
169. Lübbert, C., et al., Environmental pollution with antimicrobial agents from bulk drug manufacturing industries in Hyderabad, South India, is associated with dissemination of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing pathogens. *Infection*, 2017. 45(4): p. 479-491.
170. Li, D., et al., Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. *Environ Toxicol Chem*, 2008. 27(1): p. 80-6.
171. Kristiansson, E., et al., Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements. *PLOS ONE*, 2011. 6(2): p. e17038.
172. Khan, G.A., et al., Occurrence and Abundance of Antibiotics and Resistance Genes in Rivers, Canal and near Drug Formulation Facilities – A Study in Pakistan. *PLOS ONE*, 2013. 8(6): p. e62712.
173. Sim, W.-J., et al., Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere*, 2011. 82(2): p. 179-186.
174. Bielen, A., et al., Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. *Water Research*, 2017. 126: p. 79-87.
175. Bengtsson-Palme, J., et al., Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. *Frontiers in Microbiology*, 2014. 5: p. 648.
176. Pal, C., et al., The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. *Microbiome*, 2016. 4(1): p. 54.
177. Marathe, N.P., et al., A Treatment Plant Receiving Waste Water from Multiple Bulk Drug Manufacturers Is a Reservoir for Highly Multi-Drug Resistant Integron-Bearing Bacteria. *PLOS ONE*, 2013. 8(10): p. e77310.
178. Li, D., et al., Antibiotic Resistance Characteristics of Environmental Bacteria from an Oxytetracycline Production Wastewater Treatment Plant and the Receiving River. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010. 76(11): p. 3444-3451.
179. da Costa, P.M., L. Loureiro, and A.J.F. Matos, Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria between Intermingled Ecological Niches: The Interface between Humans, Animals and the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2013. 10(1): p. 278-294.
180. González-Plaza, J.J., et al., Functional Repertoire of Antibiotic Resistance Genes in Antibiotic Manufacturing Effluents and Receiving Freshwater Sediments. *Frontiers in Microbiology*, 2017. 8: p. 2675.
181. Andrašević, A.T., et al., Surveillance for Antimicrobial Resistance in Croatia. *Emerging Infectious Diseases*, 2002. 8(1): p. 14-18. 2018 Antimicrobial Resistance Benchmark.
182. 2018, Access to Medicine Foundation. p. 59.
183. Davies, S.C., Reducing inappropriate prescribing of antibiotics in English primary care: evidence and outlook. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018. 73(4): p. 833-834.
184. O'Neill, J., & The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016; Available from: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf.
185. Le Page, G., et al., Antibiotic risk assessment needs to protect both environmental and human health. *Environ Int*, 2018.
186. Method 1671, Revision A: Volatile Organic Compounds Specific to the Pharmaceutical Manufacturing Industry by GC/FID. 1998, U.S. Environmental Protection Agency.
187. Method 1667, Revision A: Formaldehyde, Isobutyraldehyde, and Furfural by Derivatization Followed by High Performance Liquid Chromatography. 1998, U.S. Environmental Protection Agency.
188. Seifrtova, M., et al., An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta*, 2009. 649(2): p. 158-179.

189. Petrovic, M., et al., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A*, 2005. 1067(1-2): p. 1-14.
190. Hao, C., X. Zhao, and P. Yang, GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007. 26(6): p. 569-580.
191. Diaz-Cruz, M.S. and D. Barcelo, Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006. 386(4): p. 973-985.
192. Wang, J., ANALYSIS OF MACROLIDE ANTIBIOTICS, USING LIQUID CHROMATOGRAPHY- MASS SPECTROMETRY, IN FOOD, BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL MATRICES. *Mass Spectrometry Reviews*, 2009. 28(1): p. 50-92.
193. Gros, M., S. Rodríguez-Mozaz, and D. Barceló, Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2013. 1292: p. 173-188.
194. Hao, C.Y., X.M. Zhao, and P. Yang, GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2007. 26(6): p. 569-580.
195. Aga, D.S., et al., Challenges in the Measurement of Antibiotics and in Evaluating Their Impacts in Agroecosystems: A Critical Review. *Journal of Environmental Quality*, 2016. 45(2): p. 407-419.
196. Moreno-Bondi, M.C., et al., An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009. 395(4): p. 921-946.
197. Speltini, A., et al., Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2011. 30(8): p. 1337-1350.
198. Aga, D.S., et al., Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2005. 53(18): p. 7165-71.
199. Eichhorn, P. and D.S. Aga, Identification of a Photooxygenation Product of Chlortetracycline in Hog Lagoons Using LC/ESI-Ion Trap-MS and LC/ESI-Time-of-Flight-MS. *Analytical Chemistry*, 2004. 76(20): p. 6002-6011.
200. Gunnar, C., Ö. Stefan, and L.D.G. Joakim, Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009. 28(12): p. 2656-2662.
201. Pruden, A., et al., Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environ Sci Technol*, 2006. 40(23): p. 7445-50.
202. Bengtsson-Palme, J., D.G.J. Larsson, and E. Kristiansson, Using metagenomics to investigate human and environmental resistomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017. 72(10): p. 2690-2703.
203. Bengtsson-Palme, J. and D.G.J. Larsson, Protection goals must guide risk assessment for antibiotics. *Environ Int*, 2018. 111: p. 352-353.
204. Le Page, G., et al., Integrating human and environmental health in antibiotic risk assessment: A critical analysis of protection goals, species sensitivity and antimicrobial resistance. *Environ Int*, 2017. 109: p. 155-169.
205. Kraupner N, E.S., Bengtsson-Palmer J, Fick J, Kristiansson E, Flack C-F, Larsson JDG, Selective concentrations for ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* grown in complex aquatic bacterial biofilms. *Environ Intl*, 2018.
206. Lundstrom, S.V., et al., Minimal selective concentrations of tetracycline in complex aquatic bacterial biofilms. *Sci Total Environ*, 2016. 553: p. 587-595.
207. AMR Industry Alliance. AMR Industry Alliance. 2017 [cited 2018; Available from: <https://www.amrindustryalliance.org/>].

208. National Action Plan on Antimicrobial Resistance, G.o.I. Ministry of Health & Family Wellfare, Editor. 2017.
209. Sundqvist, M., Reversibility of antibiotic resistance. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 2014. 119(2): p. 142-148.
210. Price, L.B., et al., The Persistence of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* in Poultry Production. *Environmental Health Perspectives*, 2007. 115(7): p. 1035-1039.
211. Bengtsson-Palme, J. and D.G.J. Larsson, Antibiotic resistance genes in the environment: prioritizing risks. *Nature Reviews Microbiology*, 2015. 13: p. 396.
212. Larsson, D.G.J., et al., Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment International*, 2018. 117: p. 132-138.
213. AMR Benchmark. AMR Benchmark. 2018 [cited 2018; Available from: <https://amrbenchmark.org/>].
214. Snelders, E., et al., Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLOS ONE*, 2012. 7(3): p. e31801.
215. Jones, A.L., and E. L. Schnabel, The development of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora*. *Fire Blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. 2000: CAB International.
216. Verweij, P.E., et al., Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2016. 62(3): p. 362-368.
217. Anuradha, C. and M.J. F., Emergence of azole resistant *Aspergillus fumigatus* and One Health: time to implement environmental stewardship. *Environmental Microbiology*, 2018. 20(4): p. 1299-1301.
218. van der Linden, J.W.M., et al., Clinical Implications of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands, 2007–2009. *Emerging Infectious Diseases*, 2011. 17(10): p. 1846-1854.
219. McManus, P.S., et al., ANTIBIOTIC USE IN PLANT AGRICULTURE. *Annual Review of Phytopathology*, 2002. 40(1): p. 443-465.
220. Rupe, J.a.L.S. Soybean Rust. *The Plant Health Instructor* 2008; Available from: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/SoybeanRust.aspx>.
221. McMullen, M., R. Jones, and D. Gallenberg, Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease*, 1997. 81(12): p. 1340-1348.
222. Baker, N.T., and Stone, W.W., Estimated annual agricultural pesticide use for counties of the conterminous United States, 2008–12, in *U.S. Geological Survey Data Series 907*. 2015.
223. Stockwell, V.O. and B. Duffy, Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev Sci Tech*, 2012. 31(1): p. 199-210.
224. Gusberti, M., et al., Fire Blight Control: The Struggle Goes On. A Comparison of Different Fire Blight Control Methods in Switzerland with Respect to Biosafety, Efficacy and Durability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015. 12(9): p. 11422-11447.
225. Thomson, S.V., Epidemiology of fire blight, in *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, J.L. Vanneste, Editor. 2000, CAB International: Wallingford, UK.
226. Loper JE, H.M., Roberts RG, Grove GG, Willett MJ, Smith TJ, Evaluation of streptomycin, oxytetracycline, and copper resistance in *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington State. *Plant Disease*, 1991. 75: p. 287–290.
227. Norelli, J.L., A.L. Jones, and H.S. Aldwinckle, Fire Blight Management in the Twenty-first Century: Using New Technologies that Enhance Host Resistance in Apple. *Plant Disease*, 2003. 87(7): p. 756-765.
228. Schroth, M.N., Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 1979. 69: p. 565-568.
229. Smits, T.H.M., et al., Whole-Genome Sequencing of *Erwinia amylovora* Strains from Mexico Detects Single Nucleotide Polymorphisms in rpsL Conferring Streptomycin Resistance and in the avrRpt2 Effector Altering Host Interactions. *Genome Announcements*, 2014. 2(1): p. e01229-13.
230. Jones, C.-S.C.A.L., Molecular Analysis of High-Level Streptomycin Resistance in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant Pathology*, 1995. 85(3): p. 324–328.

231. Chiou C-S, J.A., Expression and identification of the strA-strB gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*. *Gene*, 1995. 152: p. 47–51.
232. Billing, E., Fire blight risk assessment systems and models, in *Fire Blight: The disease and its causative agent*. 2000, CAB International: Wallington, UK.
233. Lightner, G., Steiner, P.W. , MARYBLYTTM: A computer model for predicting of fire blight disease in apples and pears. *Computers and Electronics in Agriculture*, 1992: p. 249-260.
234. T., S., A predictive model for forecasting fire blight of pear and apple in Washington state. *Acta Horti*, 1993(338): p. 153–160.
235. Roberts, M.C., Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 2005. 245(2): p. 195-203.
236. Yoshii, A., H. Moriyama, and T. Fukuhara, The Novel Kasugamycin 2'-N-Acetyltransferase Gene *aac(2')-IIa*, Carried by the IncP Island, Confers Kasugamycin Resistance to Rice-Pathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012. 78(16): p. 5555-5564.
237. Kleitman, F., et al., *Erwinia amylovora* populations resistant to oxolinic acid in Israel: prevalence, persistence and fitness. *Plant Pathology*, 2005. 54(2): p. 108-115.
238. Shtienberg, D., et al., The Incessant Battle Against Fire Blight in Pears: 30 Years of Challenges and Successes in Managing the Disease in Israel. *Plant Disease*, 2015. 99(8): p. 1048-1058.
239. Hikichi, Y., Noda, C., and Shimizu, K , Oxolinic acid. *Jpn. Pestic. Inf.* , 1989. 55: p. 21-23.
240. Maeda, Y., et al., New method to detect oxolinic acid-resistant *Burkholderia glumae* infesting rice seeds using a mismatch amplification mutation assay polymerase chain reaction. *Journal of General Plant Pathology*, 2004. 70(4): p. 215-217.
241. Baker-Austin, C., et al., Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*. 14(4): p. 176-182.
242. Seiler, C. and T. Berendonk, Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 2012. 3(399).
243. Wales, A. and R. Davies, Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics*, 2015. 4(4): p. 567.
244. Shigemoto, R., T. Okuno, and K. Matsuura, Effects of Validamycin A on the Growth of and Trehalose Content in Mycelia of *Rhizoctonia solani* Incubated in a Medium Containing Several Sugars as the Sole Carbon Source. *Japanese Journal of Phytopathology*, 1992. 58(5): p. 685-690.
245. Kim, Y.-S., I.-K. Lee, and B.-S. Yun, Antagonistic Effect of *Streptomyces* sp. BS062 against Botrytis Diseases. *Mycobiology*, 2015. 43(3): p. 339-342.
246. Dungan, R.S., D.D. Snow, and D.L. Bjorneberg, Occurrence of Antibiotics in an Agricultural Watershed in South-Central Idaho. *J Environ Qual*, 2017. 46(6): p. 1455-1461.
247. Battaglin, W.A., et al., Occurrence of Azoxystrobin, Propiconazole, and Selected Other Fungicides in US Streams, 2005–2006. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2011. 218(1): p. 307-322.
248. Kahle, M., et al., Azole Fungicides: Occurrence and Fate in Wastewater and Surface Waters. *Environmental Science & Technology*, 2008. 42(19): p. 7193-7200.
249. Smalling, K.L., et al., Accumulation of pesticides in pacific chorus frogs (*Pseudacris regilla*) from California's Sierra Nevada Mountains, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013. 32(9): p. 2026-2034.
250. Deb, D., et al., Investigating Potential Water Quality Impacts of Fungicides Used to Combat Soybean Rust in Indiana. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2010. 207(1): p. 273-288.
251. Christiano, R.S.C., et al., Oxytetracycline Dynamics on Peach Leaves in Relation to Temperature, Sunlight, and Simulated Rain. *Plant Disease*, 2010. 94(10): p. 1213-1218.
252. Wang, F.-H., et al., Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. *Journal of Hazardous Materials*, 2015. 299: p. 215-221.
253. Laak, T.L.t., W.A. Gebbink, and J. Tolls, The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006. 25(4): p. 904-911.

254. Chen, Z., et al., Bioavailability of Soil-Sorbed Tetracycline to *Escherichia coli* under Unsaturated Conditions. *Environmental Science & Technology*, 2017. 51(11): p. 6165-6173.
255. Gonsalves, D. and D.P.H. Tucker, Behavior of oxytetracycline in Florida citrus and soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1977. 6(1): p. 515-523.
256. Xu, P., et al., Determination and study on degradation dynamics of fungicide validamycin a residue in soil using pre-column derivatization and capillary gas chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 2009. 64(8): p. 818-822.
257. Shen, Y., et al., Degradation of streptomycin in aquatic environment: kinetics, pathway, and antibacterial activity analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017. 24(16): p. 14337-14345.
258. Li, R., et al., Photochemical Transformation of Aminoglycoside Antibiotics in Simulated Natural Waters. *Environmental Science & Technology*, 2016. 50(6): p. 2921-2930.
259. Bauer, A., et al., Identification and characterization of pesticide metabolites in Brassica species by liquid chromatography travelling wave ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TWIMS-QTOF-MS). *Food Chemistry*, 2018. 244: p. 292-303.
260. Davies, J., G.B. Spiegelman, and G. Yim, The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*, 2006. 9(5): p. 445-453.
261. Mosquera, C.S., M.J. Martínez, and J.A. Guerrero, ¹⁴C tebuconazole degradation in Colombian soils. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 2010. 75(2): p. 173-181.
262. Fustinoni, S., et al., Biological monitoring of exposure to tebuconazole in winegrowers. *Journal Of Exposure Science And Environmental Epidemiology*, 2014. 24: p. 643.
263. Sexton, K., L. L.Needham, and J. L.Pirkle, Human Biomonitoring of Environmental Chemicals: Measuring chemicals in human tissues is the "gold standard" for assessing people's exposure to pollution. *American Scientist*, 2004. 92(1): p. 38-45.
264. Yang, N., et al., Mapping quantitative trait loci associated with resistance to bacterial spot (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) in peach. Vol. 9. 2012.
265. Johnson, K.B., and T. N. Temple, Evaluation of strategies for fire blight control in organic pome fruit without antibiotics. *Plant Disease*, 2013. 97(3): p. 402-409.
266. Psallidas, P.G., and J. Tsiantos, Chemical Control of Fire Blight, in *Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, Erwinia amylovora*. 2000, CAB International: Wallingford, UK. p. 199-234
267. Elkins, R.B., et al., Evaluation of Dormant-Stage Inoculum Sanitation as a Component of a Fire Blight Management Program for Fresh-Market Bartlett Pear. *Plant Disease*, 2015. 99(8): p. 1147- 1152.
268. Johnson, K.B., et al., Integration of acibenzolar-S-methyl with antibiotics for protection of pear and apple from fire blight caused by *Erwinia amylovora*. *Crop Protection*, 2016. 88: p. 149-154.
269. and, K.B.J. and V.O. Stockwell, MANAGEMENT OF FIRE BLIGHT: A Case Study in Microbial Ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 1998. 36(1): p. 227-248.
270. Lindow, S.E., Integrated control and role of antibiosis in biological control of fire blight and frost injury. *Biological Control on the Phylloplane*, 1985: p. 83-115
271. Pusey, P.L., V.O. Stockwell, and M. Mazzola, Epiphytic Bacteria and Yeasts on Apple Blossoms and Their Potential as Antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 2009. 99(5): p. 571-581.
272. Pusey, P.L., V.O. Stockwell, and D.R. Rudell, Antibiosis and Acidification by *Pantoea agglomerans* Strain E325 May Contribute to Suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 2008. 98(10): p. 1136-1143.
273. Stockwell, V.O., et al., Antibiosis Contributes to Biological Control of Fire Blight by *Pantoea agglomerans* Strain Eh252 in Orchards. *Phytopathology*, 2002. 92(11): p. 1202-1209.
274. Wilson, M., and S. E. Lindow, Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology*, 1993. 83(1): p. 117-123.
275. Pusey, P.L., et al., Antibiosis Activity of *Pantoea agglomerans* Biocontrol Strain E325 Against *Erwinia amylovora* on Apple Flower Stigmas. *Phytopathology*, 2011. 101(10): p. 1234-1241.

276. Johnson, K.B., et al., Assessment of Environmental Factors Influencing Growth and Spread of *Pantoea agglomerans* on and Among Blossoms of Pear and Apple. *Phytopathology*, 2000. 90(11): p. 1285-1294.
277. Lindow, S.E. and T.V. Suslow, Temporal Dynamics of the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* Strain A506 in Flowers in Inoculated Pear Trees. *Phytopathology*, 2003. 93(6): p. 727- 737.
278. Johnson, K.B., V. O. Stockwell, R. J. McLaughlin, D. Sugar, J. E. Loper and R. G. Roberts, Effect of bacterial antagonists on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control. *Phytopathology*, 1993(83): p. 995-1002.
279. Stockwell, V.O., et al., Control of Fire Blight by *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Pantoea vagans* C9-1 Applied as Single Strains and Mixed Inocula. *Phytopathology*, 2010. 100(12): p. 1330- 1339.
280. Johnson, K.B., V.O. Stockwell, and T.L. Sawyer, Adaptation of Fire Blight Forecasting to Optimize the Use of Biological Controls. *Plant Disease*, 2004. 88(1): p. 41-48.
281. Sundin, G.W., et al., Field Evaluation of Biological Control of Fire Blight in the Eastern United States. *Plant Disease*, 2009. 93(4): p. 386-394.
282. McManus, P.S., Does a drop in the bucket make a splash? Assessing the impact of antibiotic use on plants. *Current Opinion in Microbiology*, 2014. 19: p. 76-82.
283. Barry, A.L. and R.N. Jones, Cross-resistance among cinoxacin, ciprofloxacin, DJ-6783, enoxacin, nalidixic acid, norfloxacin, and oxolinic acid after in vitro selection of resistant populations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1984. 25(6): p. 775-777.

用語集

非生物的分解 Abiotic degradation: 生物に活動によらない、化学的プロセスによる化合物の分解。

医薬品有効成分(原薬) Active pharmaceutical ingredients (APIs): 人、動物、および微生物に影響を及ぼす、抗微生物薬を始めとした医薬品内に含まれる生物活性物質。

適応免疫系 Adaptive immune system: 人や動物のもつ免疫系のうち、病原体を排除するか、それらの増殖を妨げる働きをするもの。

吸着 Adsorption: 気体または液体分子が固体表面へ結合すること。

好気性消化 Aerobic digestion: 細菌を用いた汚水処理法で、下水汚泥に酸素を加え、細菌に有機物を分解させることでその体積を減少させる。

増幅 Amplification: 宿主または環境中の、抗菌薬耐性細菌または真菌が増加すること。

嫌気性消化 Anaerobic digestion: 細菌を用いた汚水処理法のうち、酸素を使用せず細菌に有機物を分解させるもの。

薬剤耐性 Antimicrobial resistance (AMR): 微生物がもつ、感染症を治療または予防するために使用される薬物や化学物質、その他薬剤の有効性を低減あるいは無効化する能力のこと。これにより、微生物は殺菌されず、増殖し続けることができる。

抗菌薬適正使用支援 Antimicrobial stewardship: 抗菌薬の使用が、感染症の治療に必要な場合に、適切な選択および投与法により行われるように管理・支援すること。

水産養殖 Aquaculture: 水環境において魚類、貝類、植物、その他の生物の育種、飼育・栽培、収穫を行うこと。

生分解 Biotic degradation (biodegradation): 細菌や真菌などの生きた微生物によって有機物が無機物まで分解されること。生分解は、表流水や底質および土壌中で起こり得る。

殺生物剤 Biocide: 有害な微生物を殺滅し、あるいはその作活動を抑制又は制御することを目的とする化学的又は生物学的製品。

生物濃縮 Bioconcentrate: 化学物質が生物体内に蓄積すること。

バイオソリッド Biosolids: 下水処理施設で発生する栄養素に富む有機物で、肥料として作物に利用できる。下水汚泥とも呼ばれる。

細胞バイオアッセイ Cellular bioassay: 細菌や真菌等微生物の細胞を用いて、抗微生物薬の効果を試験する方法。

セファロスポリナーゼ Cephalosporinase: ペニシリンおよびセファロスポリン系抗菌薬のβ-ラクタム環を破壊し、無効化する酵素。多種の細菌によって産生される。

共選択圧 Co-selection pressure: 1種の抗微生物薬に対する耐性遺伝子の保有が、複数種類の抗微生物薬の耐性につながる可能性があるが、この場合に、使用した抗微生物薬によって、それとは異なる系統の抗微生物薬

の耐性を選択してしまうこと。

保菌 Colonization: 人を病気にすることなく、体内に病原体が存在すること。

片利共生 Commensal: 共生する生物のうち一方が共生によって利益を得る一方、他方には強制によって利害が生じない関係のこと。

汚染 Contamination: 環境への有害物質または異物の混入。本報告書では、自然に起こらない抗微生物薬や薬剤耐性微生物の環境への混入と定義する。

ドライバー Drivers: 抗微生物薬の過剰使用や薬剤耐性微生物感染症の流行など、薬剤耐性の発生・伝達拡散につながる外部因子。

生態毒性 Ecotoxic: 生態系および環境に有害な化学的・物理的・生物学的ストレス。

下水 Effluent: 排水される廃液や汚水。

電気化学的分解 Electrochemical degradation: 対象に電圧をかけることで、陰極で還元反応、陽極で参加反応を起こし、含有する有機化合物を化学分解する廃水処理方法。

腸管 Enteric: 腸、小腸。

環境 Environment: 大気や水、土壌など自然界を取り巻く環境。本報告書では表流水、底質および土壌に着目した。

エピマー化 Epimerize: 化合物の形態変化を表す化学用語で、二つ以上の不斉炭素原子をもつ化合物の、一つの不斉炭素原子についての立体配置が逆転すること。

休閑 Fallowing: 水産養殖において、底質を自然改善させるために、種苗の再導入前に一定期間を置くこと。

フェントン酸化 Fenton oxidation: フリーラジカルを産生するフェントン試薬(過酸化水素と鉄との溶液)によって化合物を酸化すること。

機能ゲノム学 Functional genomics: ゲノムデータを用いて、ゲノムレベルまたは生体システム全体のレベルで、遺伝子およびタンパク質の発現および機能を研究すること。

遺伝子増幅 Gene amplification: 遺伝子コピー数の増加。

生活雑排水 Grey water: 一般家庭や事業所等で発生した排水のうち、尿尿およびトイレの排水以外のもの。

遺伝子の水平伝播 Horizontal gene transfer: 親細胞と娘細胞間でなく、他生物間における直接的な遺伝子の移動。

人の微生物叢マイクロビオーム Human microbiome: 体内または体表面上(胃、腸、皮膚等)に自然に形成される微生物の集団。抗菌薬は、この微生物の集団に影響し、その構造に変化をもたらす。微生物叢が乱されると、薬剤耐性病原体に対する抵抗力が減弱し、治療不能な感染症のリスクにさらされることとなる。

加水分解 Hydrolyze: 水素原子と酸素原子で構成された水分子を反応相手物質として用いる化合物の分解反応。

統合的病害虫管理(Integrated Pest Management: IPM): 有害生物の発生予察情報等に基づき、利用可能なあらゆる有害生物防除方法を用いた、効果的且つ人および環境に対するリスクを最小限とするよう配慮された病原生物防除法。

厩肥施用 Manure amendments: 厩肥による、土壌の物理的・化学的性質改善。厩肥は病原体を保有し得る。

基質 Matrix: サンプルの構成成分のうち、分析の対象となる物質以外の成分。

メタゲノム Metagenomics: 土壌など環境サンプルから直接分離された微生物ゲノム DNA を扱う研究分野。

MIC クリープ MIC creep: 細菌または真菌の増殖を妨げる抗微生物薬の最低濃度(最小発育阻止濃度 Minimum inhibitory concentration: MIC)が徐々に上昇すること。MIC の増加は、微生物の抗微生物薬に対する感受性の低下や耐性の増加を示す。

可動性遺伝因子 Mobile genetic elements: 細菌の染色体間での遺伝因子の移動を促進し、ある細菌から別の細菌への薬剤耐性遺伝子の伝達の原因となる DNA 断片。

可動性耐性因子 Mobilized resistance determinants: プラスミド上に見出される耐性遺伝子。

菌糸体マット Mycelial mats: 真菌の栄養体を構成する菌糸が密生し、マット状の塊を形成したもので、ここから環境中の栄養素を吸収する。

中和 Neutralization: 排水の pH を、酸性や塩基性に振れすぎないように調整すること。

非病原性の細菌 Non-pathogenic bacteria: 宿主に無害で、疾患および死を引き起こさない細菌。

オゾン処理 Ozonation: 排水中にオゾンを導入し、微生物を破壊し、汚染物質を分解する処理プロセス。

パーティショニング Partitioning: 排水処理によって排水中の成分を分離すること。

病原体 Pathogen: 人、動物、植物などの宿主に疾患を引き起こす生物。

ピンリケッチア症 Piscirickettsiosis: *Piscirickettsia salmonis* の感染が原因で起こる、サケ、マス、スズキに起こる病気。リザーバー Reservoir: 感染症を引き起こす、細菌や真菌を始めとした病原体を保有している人、動物、昆虫、植物その他宿主のこと。病原体の中には、生存のため人を含めた動物宿主を必要とするものが存在する。本報告では、表流水、底質、土壌が、残留抗菌物質や薬剤耐性病原体・薬剤耐性遺伝子のリザーバーとしてどのような働きをするかについて考察する。

レジストーム Resistome: 病原性・非病原性問わず細菌全てに存在する抗微生物薬耐性遺伝子。

逆浸透 Reverse-osmosis: フィルターや膜を使って汚染物質を除去する水処理技術。

底質 Sediment: 水または他の液体の底に堆積した、風化・浸食によって分解・流出した岩石や鉱物などの固体粒子の層。

選択圧力 Selective pressure: 個体群の生存や増殖等に対して外的にかかる選択圧の強さ。

ソーカウェイ Soakaways: 地面に掘られた、粗い石で満たされた穴で、地表水が石を通して地中に濾過できるようにしたもの

固相抽出 Solid-phase extraction: 液体中に懸濁・溶解された化合物を、その物理的・化学的性質に基づいて分離する方法。

収着 Sorption: ある物質を別の物質に付着させる、物理的・化学的プロセス。

揮発 Volatilization: 化学物質が蒸発し、生じた蒸気が空気中に漂うこと。

排水 Wastewater: シンクやトイレに由来する使用済みの水で、排泄物や食品くず、石鹼のような他の物質を含む。暴風雨の際等、排水に雨水が流入する場合がある。

謝辞

本報告書は、国際環境抗菌剤耐性フォーラムに先立って設けられた専門家作業部会による提言に基づいて作成されました。ご協力いただいた技術専門家に深謝致します。

また、デザインを担当していただいた Wellcome Trust、並びに本報告書の作成についてご支援・ご協力いただいた、下記共同主催者、ワーキンググループ事務局担当者、文書コーディネーター、編集者に深く御礼申し上げます。

- Lacey Avery (Contractor within the U.S. Centers for Disease Control and Prevention):
文書コーディネーター、編集
- Stephanie Gumbis (U.S. Centers for Disease Control and Prevention): ワーキンググループ事務局
- Tara Henning (U.S. Centers for Disease Control and Prevention): ワーキンググループ事務局
- Tim Jinks (Wellcome Trust): 共同主催
- CarriAyne Jones (U.K. Science and Innovations Network): ワーキンググループ事務局、共催主催
- Jean Patel (U.S. Centers for Disease Control and Prevention):
共同主催、ワーキンググループ事務局、編集
- Lee Slater (Defra): ワーキンググループ事務局
- Kaytna Thaker (U.S. Centers for Disease Control and Prevention): 文書コーディネーター、編集
- Sian Wiliams (Wellcome Trust): ワーキンググループ事務局