

# 清掃方式の違いによる駅トイレ床面の細菌の定量・定性評価

川崎 たまみ\* 京谷 隆\* 潮木 知良\* 吉江 幸子\*

## Quantitative and Qualitative Research of Surface Bacteria on the Floor of Station Restrooms with Two Types of Cleaning Methods

Tamami KAWASAKI Takashi KYOTANI

Tomoyoshi USHIOGI Sachiko YOSHIE

There are two types of methods for cleaning of restrooms in railway stations. One is a cleaning method that does not use water for cleaning floors, and the other is one that uses water for cleaning floors. In this study, quantitative and qualitative research were performed for surface bacteria on floors of station restrooms where each type of cleaning method was done. The concentrations of surface bacteria were analyzed by conventional culture method, and microbiomes on floors of station restrooms were analyzed with bacterial 16S rRNA genes. As a result, the floor of restroom where water is not used for floor cleaning, shows that the concentration of bacteria is less and similarity of microbiome is higher compared with those of the floor of restroom where water is used for floor cleaning.

キーワード：駅トイレ，清掃，床面，細菌，マイクロバイオーム解析，16S rRNA 遺伝子

### 1. はじめに

公共性の高い交通手段である鉄道において、主要な旅客設備の一つに、駅トイレがある。駅トイレは、利用者が多様で使用頻度も高いことから、鉄道事業者と清掃業者の協力のもと、快適な空間を維持管理するための努力が日々なされているところである。一方、筆者らが過去に行った利用者意識調査の結果、駅トイレ内においての利用者の関心が高いことが分かっている<sup>1) 2)</sup>。トイレ内においての主成分の一つであるアンモニアは、床面に存在するアンモニア産生菌が尿汚れに含まれる尿素を分解することで発生すると考えているため<sup>3)</sup>、アンモニア発生を低減させる対策案の一つとして、アンモニア産生菌の除去が考えられる。

駅トイレの清掃には、旅客が利用する中で随時行われている軽易な拭き掃除などの「日常清掃」と、駅を閉鎖する深夜（終電と初電の間）の時間帯に、時間をかけて洗剤等を使用しながら、床面等を洗い上げて行う「夜間清掃」がある。この夜間清掃の方法は、床構造に応じて「湿式清掃」と「乾式清掃」の2種類に大別される。湿式清掃は、従前より駅トイレ清掃として一般的に採用されている、磁器タイルと目地からなる床構造に適用されるもので、清掃時に水を床にまき、ブラシ等で汚れをこすり落とす清掃方法である。一方、乾式清掃は、近年、採用例が増加しつつある、塩ビ等のシートやタイルを使用し

た床構造に適用されるもので、床に水をまかずに、乾いた状態でゴミ等を掃除機で除去し、乾いたモップ等で汚れをふき取る清掃方法である。現在は、乾式清掃を適用する床構造も増えつつあるが、湿式清掃を適用する床構造のほうが一般的である。湿式清掃は、床にまいた水を清掃後に乾燥または拭き取る作業が必要であるため、乾式清掃と比較して清掃に時間を要し、人手も多く必要とする。また、両清掃方式の駅トイレに対する利用者の評価では、湿式清掃を実施する駅トイレにて、においの許容率が低いという結果を得ている<sup>2)</sup>。このように、駅トイレの清掃方式の違いが駅トイレ内の快適性に影響を与えている可能性が示唆されるが、現状では清掃方法による床面における細菌の状態や特徴の違いを科学的に調査した報告例は少ない。我々は、これまでに駅トイレの設備等、鉄道車両設備、及び駅トイレ内外の空気中から細菌を採取し、DNAを抽出して次世代シーケンサを用いて16S rRNA遺伝子によるマイクロバイオーム解析を実施してきた<sup>4) ~8)</sup>。マイクロバイオームとは、微生物叢とも言い、ある環境中の微生物の集団のことである<sup>9)</sup>。そこで、本報告では異なる清掃方法を実施する駅トイレ床面の細菌に注目し、その量と特徴の把握を試みた。

### 2. 調査方法

乾式清掃を行う2駅（A駅，B駅）と、湿式清掃を行う2駅（C駅，D駅）において、各駅トイレの床面5箇所に対し、清掃方式の違いにより細菌量や細菌の特徴に

\* 人間科学研究部 生物工学研究室

表1 調査対象とした駅トイレ

駅	乾式清掃		湿式清掃	
	A	B	C	D
1日平均乗降者人数(万人)	約7	約3.5	約7	約3
小便器数	7	4	4	3
床構造	ゴムタイル		磁器タイル 目地	
				

違いがあるのかを確認するために、細菌の定量および定性調査<sup>8)</sup>を実施した。

### 2.1 調査対象

調査対象は、各駅トイレとも男子トイレとした。また、駅トイレの使用頻度や経年劣化等の条件をできる限り揃えるため、乗降者数がほぼ同等の規模で、かつ同様の時期にリニューアル工事が施工された駅を選定した。各駅の乗降者数とトイレの主な諸元を表1に示す。

A駅とB駅のトイレの床は、ゴムタイルからなる床構造で乾式清掃が、C駅とD駅のトイレの床は磁器タイルと目地からなる床構造で湿式清掃がそれぞれ実施されている。

### 2.2 調査日

A駅とC駅では、2018年10月、2019年1月、7月に、B駅とD駅では、2019年7月に定量調査を実施した。A駅とC駅では2018年1月8日、日中(営業時間帯中)に定性調査を実施した(表2)。調査時の温湿度条件を同表に記載した。

### 2.3 調査対象箇所

定量調査、定性調査とともに、各駅男子トイレ床面の5箇所、具体的には洗面台下、床(小便器下)、床(小便器間)、床(中央)、床(奥角)に対し、それぞれ実施した。

### 2.4 細菌の定量調査方法

床面からの細菌採取は2つの方法により実施した。一つは、床面に一辺10cmの正方形の枠を設置し、枠内を綿棒(ふきふきチェックII, 栄研化学)でふき取る方法(図1)で行った。ふき取り後の綿棒を、10mlのリン酸

緩衝生理食塩水で懸濁させ、洗剤等の効果を不活化させるレシチンとポリソルベート80が添加されたソイビーンカゼインダイジェスト培地上に懸濁液を一定量塗布して、32℃で48時間培養後に出現したコロニーを計測した。もう一つは、前記と同じソイビーンカゼインダイジェスト培地による面積25cm<sup>2</sup>の円形のスタンプ型寒天培地(25cm<sup>2</sup> SCDLP, 栄研化学)を用いて対象床表面の付着細菌を採取する方法で行った(図2左)。調査箇所1箇所

表2 細菌調査日と温湿度条件  
(\* 定性調査実施)

駅	調査日			
	2018年	2019年		
	10月	1月*	7月	
	10日	8日	23日	30日
A	26.7℃ 50.2%	12.6℃ 23.4%	29.7℃ 70.4%	-
B	-	-	-	33.1℃ 67.5%
C	27.1℃ 56.7%	10.5℃ 31.0%	29.0℃ 75.0%	-
D	-	-	-	32.0℃ 69.1%



図1 綿棒を利用した細菌採取の様子  
(定量調査と定性調査では異なる綿棒を使用)

所あたり2枚採取し、32°Cで48時間培養後、寒天培地上に出現した細菌コロニー（図2右）の数を計測した。2019年7月の調査は、同調査日にモニター調査<sup>2)</sup>も併せて実施したため、より操作が簡易なスタンプ型寒天培地による採取を実施した。



図2 スタンプ型寒天培地を利用した細菌採取の様子と培養後出現したコロニー

## 2.5 細菌の定性調査方法

細菌の定性調査方法には、細菌に固有の16S rRNA遺伝子を利用し、マイクロバイームを解析する手法を用いた。

### 2.5.1 マイクロバイーム解析

マイクロバイーム解析の流れを図3に示す。以下に詳細を説明する。

#### (1) サンプルング方法

定量調査を実施した位置に近接する位置に一辺10cmの正方形の枠を置き（図1左）、枠内を乾燥状態の綿棒（4N6FLOQSwabs, Copan Flock Technologies）を用いてふき取った。採取は一箇所につき一サンプルとし、ふき取り後の綿棒は、1.5ml容器に、綿棒の綿部のみを切り落として密閉し、以降のDNA抽出作業に用いた。

#### (2) DNA抽出

DNA抽出には、PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (QIAGEN) を用いた。抽出したDNAの濃度測定にはQubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

#### (3) ライブラリ調製

抽出したDNAを鋳型とし、細菌の16S rRNA遺伝子V3-V4領域を標的としたプライマーを用いてPCR (polymerase chain reaction) を行った。PCRの増幅回数は、これまでと同じ35サイクルとした<sup>8)</sup>。得られたPCR産物はLabChip GX Touch HT (PerkinElmer) によりピークサイズの確認後、インデックスの付加及び精製を行い、ライブラリ調製を実施した。

#### (4) 菌叢解析

次世代シーケンサ MiSeq (Illumina) を用いて300塩基読み取りにより遺伝子配列を決定した。得られた遺伝子配列情報は、QIIME (ver1.9.0) により解析した。

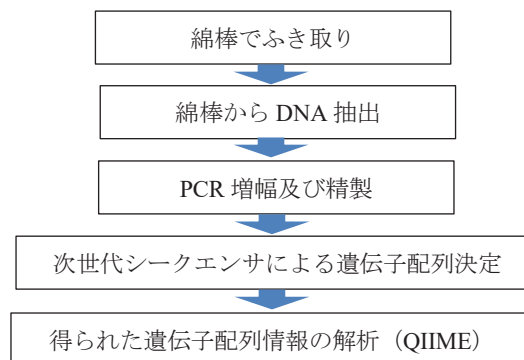


図3 マイクロバイーム解析のフロー図

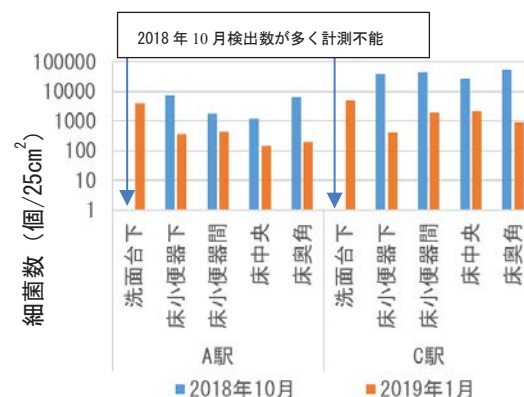


図4 A駅C駅の細菌量調査結果（採取方法：綿棒によるふき取り）

## 3. 結果

培養法により実施した細菌の定量調査結果と、遺伝子解析手法を応用した細菌の定性調査結果について、それぞれ報告する。

### 3.1 定量調査結果

A駅とC駅で、2018年10月、2019年1月に実施した男子トイレ床面からふき取りにより採取した付着細菌を定量した結果を図4に示す。同図において、2018年10月、A駅およびC駅の洗面台下における付着細菌量

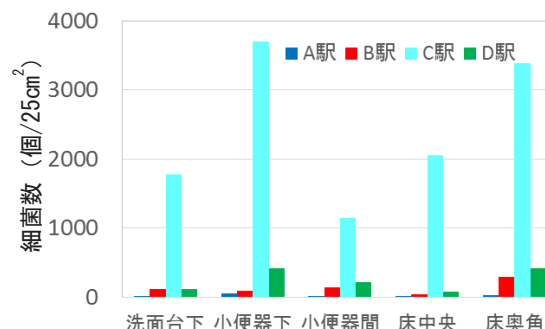


図5 4駅の細菌量調査結果（2019年7月）（採取方法：スタンプ型寒天培地の接触）

が示されていないのは、寒天培地に出現したコロニー数が非常に多く、計測が困難であったからである。全ての採取箇所において、10月と1月の細菌量を比較すると、10月のほうが1月よりも細菌量が多く、両駅共に付着細菌数は洗面台下にて最も多く検出される傾向がみられた。乾式清掃を行うA駅と湿式清掃を行うC駅で、洗面台下を除く4箇所について10月と1月の平均付着細菌数を比較すると、乾式清掃を行うA駅では663～3,831個/25cm<sup>2</sup>、湿式清掃を行うC駅では14,550～27,169個/25cm<sup>2</sup>であり、C駅のほうがA駅よりも統計的に有意に多かった(p<0.05, t検定)。なお、10月と1月の付着細菌量を比較すると、A駅では有意差は見られなかったが、C駅では有意差が見られた(p<0.05, t検定)。

次に、2019年7月にA駅、B駅、C駅、D駅において床面の細菌をスタンプ型寒天培地で採取した結果を図5に示す。全ての調査箇所において、付着細菌数はC駅>D駅>B駅>A駅の順に多く検出された。また、調査箇所別にみると、床(小便器下)、床(奥角)で、平均付着細菌数が多く検出された。

### 3.2 定性調査結果

#### 3.2.1 検出された属

細菌の分類は、界、門、綱、目、科、属、種の階層で分類される<sup>10)</sup>。これまでに報告されている地下鉄におけるマイクロバイオーム解析は、属までの同定結果を用いていたことから<sup>11)</sup>、本報告でも属までの同定結果を用いて駅トイレ床面の細菌の特徴を把握することとした。マイクロバイオーム解析により検出された細菌属数を表3に記す。この結果、採取した5箇所のうち床中央を除くすべての箇所で、A駅のほうがC駅よりも属数が多く検出された。

次にA駅とC駅の各採取箇所から検出した細菌属の特徴を表4に示す。A駅とC駅の両駅トイレ内全サンプルで共通に検出されたのは*Kocuria*属と*Deinococcus*属であった。*Kocuria*属は、アンモニア産生菌を含むことが報告されており環境中の水や土またヒトの皮膚の常在菌である細菌種も含まれるとの報告がある<sup>12) 13)</sup>。なお*Kocuria*属はA駅とC駅のトイレ内空気中及び両駅構内空気中からも検出されている<sup>6)</sup>。*Deinococcus*属は活性汚泥からの検出が報告されている<sup>14)</sup>。

一方、A駅の床サンプルのみから検出されたのは、アンモニア産生菌を含む*Streptococcus*属であった。*Streptococcus*属は、家庭のトイレから検出されたり<sup>15)</sup>、ヒトの腸内細菌として存在するとの報告<sup>16)</sup>もある。また、C駅のサンプルのみから検出されたのは、いずれもアンモニア産生菌を含む*Pseudomonas*属、*Acinetobacter*属であった。これらも、家庭からの検出<sup>17) 18)</sup>や、

表3 同定された細菌属の数

	A 駅	C 駅
洗面所下	249	226
小便器下	326	154
小便器間	305	164
床中央	220	252
床奥角	235	204

表4 A駅C駅に検出された細菌属例と由来例

A 駅 乾式清掃	B 駅 湿式清掃
<i>Kocuria</i> 属 (ヒト, 水や土壌)	
<i>Deinococcus</i> 属 (活性汚泥)	
<i>Streptococcus</i> 属 (ヒト)	<i>Pseudomonas</i> 属 <i>Acinetobacter</i> 属 (土壌)
その他	その他

土壌等<sup>19) 20)</sup>からの検出が報告されている。

#### 3.2.2 検出されたマイクロバイオームについて

サンプル内で検出された細菌属の中に含まれる細菌の種類の数と、その種類の構成比の均等度を示す指標として、Shannon 指数<sup>21)</sup>がある。本マイクロバイオーム解析で得られた Shannon 指数値の結果を図6に示す。Shannon 指数は値が大きいほど細菌種数と種構成比の均等度が高いことを示す。図6から、A駅はC駅に比べ平均して Shannon 指数が高かったことから、トイレ床面の細菌種数及び種構成比の均等度は高いことが示唆された。Shannon 指数は、A駅床(小便器間)にて最も高く、C駅床(小便器下)にて最も低かった。つまり、A駅床(小便器間)に存在する細菌種数はより多く、その種構成比はより均一であるが、C駅床(小便器下)では、細菌種がより少なく種構成比の均等度も低く、ある特定の細菌種が分布している可能性が示唆された。

各サンプルについて、主座標分析を行った結果を図7に示す。A駅では、5箇所のデータプロットが近いことから(実線円)、床面5箇所のマイクロバイオームが類似していることが示唆された。一方、C駅では、A駅と比べて各データプロットが広範囲に存在していることから(点線円)、5箇所のマイクロバイオームの類似性はA駅と比べて低い傾向が示された。特に床(小便器下)は、やや外れて位置しており、上述した通り Shannon 指数値も低いことから、他の採取箇所とはマイクロバイオームが異なることが示唆された。これより、C駅の中でも床(小便器下)は特に細菌種数が少なく、特定の細菌種が分布している可能性が示唆された。

#### 4. 考察

得られた細菌の定量調査結果及び定性調査結果から、乾式清掃と湿式清掃の特徴を考察する。

##### 4.1 定量調査結果から

各駅の調査時において、細菌が多く検出される時期及び箇所は、細菌増殖条件の、水分、温度、養分（トイレの場合は尿汚れ）から以下の通り考察する。

3.1で述べたように気温差がある10月と1月（表2）の細菌量に、A駅では有意差がなく、C駅では有意差があった（図4）。水を使用する湿式清掃の場合は、水をまいた後完全に乾くまでに時間がかかるため、利用者の靴裏の土が床面につきやすい。湿式清掃の床は、外部から持ち込まれた微生物が、湿式清掃時の水分により、より増殖しやすい環境にある。細菌増殖には気温が影響し、より気温が高い時期に多くの細菌が増殖しやすい環境になっていることが考えられる。一方、乾式清掃では水をまかないため、A駅床面の細菌量は、C駅ほど、気温の影響を受けにくいことが考えられる。

湿式清掃の際に床にまく水の他、駅トイレの洗面台下では、手洗い時の水滴が床面に落ちる状況にあるため、水分が他箇所よりも多いことが考えられる。また、尿汚れについても、小便器付近にて多いことが考えられるが、複数の小便器利用者が利用後洗面台へ移動するすると、洗面台下には尿汚れも利用者の靴底を介して運ばれることが想定される。各駅の調査時において、細菌が多く検出される箇所は毎回必ずしも同一ではなかったが、これらのことから細菌増殖条件である水分や、養分が多くなる箇所にて、細菌量が多く検出されたことが考えられる。

##### 4.2 マイクロバイオーム解析の結果から

マイクロバイオーム解析の結果から、駅トイレ床面からアンモニア産生菌を含む *Kocuria* 属、*Streptococcus* 属、*Pseudomonas* 属、*Acinetobacter* 属が検出されたことから、これらの細菌属を清掃により除去することができれば、アンモニア産生菌数を低減でき、結果的に駅トイレ内のアンモニア発生を低減させる可能性があることが示唆された。

C駅では、小便器下の細菌量が他の箇所に比べ1月は少なかったが、7月では多く検出された（図4、5）ことから、床面の細菌量の多い箇所が年間を通して定常的に決まっているわけではないことが分かった。このことから、細菌種構成比に変動は無いが細菌量に変動があるのか、細菌種構成比の変動を伴って細菌量に変動が生じるのか等については、今後異なる季節で調査を行い、調査時におけるマイクロバイオーム変動の有無を確認して検討をしていきたいと考えている。

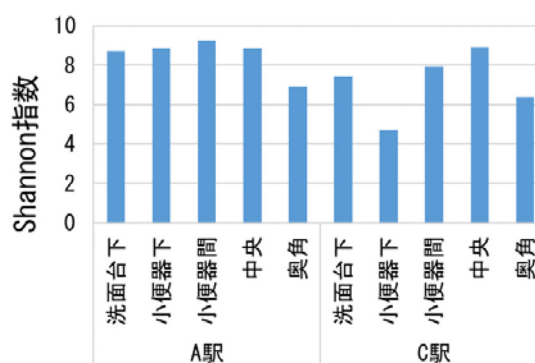


図6 各サンプルの Shannon 指数値

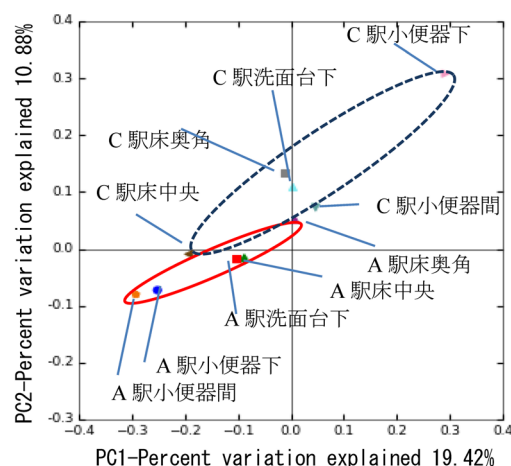


図7 主座標分析結果

#### 5. まとめ

乾式清掃と湿式清掃とを実施する男子トイレ床面に付着する細菌の定量調査及び遺伝子解析による定性調査を実施した。その結果、湿式清掃のC駅トイレ床のほうが、乾式清掃のA駅トイレ床よりも、細菌量が多く、マイクロバイオームがばらつく傾向が見られた。今後は、清掃によるおのの発生抑制の効果を高めるため、湿式清掃と乾式清掃におけるアンモニア産生菌の分布の特徴を踏まえ、清掃後のアンモニア産生菌の低減を確認していきたいと考えている。

#### 文献

- 1) 鈴木 浩明, 藤浪浩平, 斎藤 綾乃, 川崎たまみ, 伊積康彦, 飯野 直志: 衛生・清潔に関する利用者意識の実態と要需の分析, 鉄道総研報告 Vol. 19, No. 1, p. 15-20, 2005
- 2) 京谷 隆, 川崎たまみ, 菊地史倫, 大石洋之, 村澤 浩: 駅トイレの清掃評価項目の見直しに向けた利用者意識の調査, 鉄道総研報告 Vol. 34, No. 1, p. 37-42, 2020
- 3) 川崎たまみ, 京谷隆, 潮木知良, 早川敏雄, 亀田暁子, 坂本圭司: 駅トイレの臭気対策に関する研究 (その2), 平

- 成 24 年室内環境学会学術大会演要旨集, 2012
- 4) 川崎たまみ, 吉江幸子, 京谷隆, 池田桂樹: 駅設備から採取した付着細菌の解析 (その 1), 平成 29 年室内環境学会学術大会講演要旨集, 2017
  - 5) 川崎たまみ, 吉江幸子, 京谷隆, 池田佳樹: 駅設備から採取した付着細菌のマイクロバイオーム解析, 平成 30 年室内環境学会学術大会講演要旨集, 2018
  - 6) 川崎たまみ, 吉江幸子, 京谷隆, 潮木知良: 駅トイレ内空气中に含まれる微生物の検出に関する予備的検討, 第 27 回鉄道技術連合シンポジウム (J-RAIL 2020) 論文集, S4-2-4, 2020
  - 7) 吉江幸子, 川崎たまみ, 京谷隆, 潮木知良, 池畑政輝: 通勤電車におけるマイクロバイオーム解析, 2020 年室内環境学会学術大会講演要旨集, 2020
  - 8) 川崎たまみ, 京谷隆, 潮木知良, 吉江幸子, 村澤浩: 清掃方式の異なる 2 つの駅トイレ床の微生物叢の検討, 2019 年度室内環境学会学術大会講演要旨集, 2019
  - 9) 国立研究開発法人科学技術振興機構 研究開発戦略センター: 微生物叢 (マイクロバイオーム) 研究の統合的推進 ~生命, 健康・医療の新展開~, <https://www.jst.go.jp/crds/pdf/2015/SP/CRDS-FY2015-SP-05.pdf> (参照日: 2020 年 12 月 22 日)
  - 10) 神奈川県衛生研究所: 目で見える微生物検査の基礎知識, 細菌の検査, 総論 [http://www.eiken.pref.kanagawa.jp/002\\_kensa/02\\_microbe/general/files/general.pdf](http://www.eiken.pref.kanagawa.jp/002_kensa/02_microbe/general/files/general.pdf) (参照日: 2020 年 12 月 23 日)
  - 11) Gohli J, *et al.*, The subway microbiome: seasonal dynamics and direct comparison of air and surface bacterial communities. *Microbiome*. 2019 Dec 19;7(1):160. doi: 10.1186/s40168-019-0772-9.
  - 12) Wu L, *et al.*, Degradation of phenol via ortho-pathway by *Kocuria* sp. strain TIBETAN4 isolated from the soils around Qinghai Lake in China. *PLoS One*. 2018 Jun 27; 13(6):e0199572, 2018.
  - 13) Lee K, *et al.*, Complete Genome Sequence of *Kocuria indica* CE7, Isolated from Human Skin. *Microbiol Resour Anounc*. 2019 Jul 11; 8(28). pii: e00607-19.
  - 14) Olga Sánchez, *et al.*, Assessing bacterial diversity in a seawater-processing wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing of the 16S rRNA and *amoA* genes, *Microbial Biotechnology*, 2013, 6(4), 435-442.
  - 15) Jeon YS, Chun J, Kim BS. Identification of household bacterial community and analysis of species shared with human microbiome. *Curr Microbiol*. 2013 Nov;67(5):557-63.
  - 16) Kumar R, *et al.*, Recent Advancements in the Development of Modern Probiotics for Restoring Human Gut Microbiome Dysbiosis. *Indian J Microbiol*. 2020 Mar; 60(1):12-25 Epub 2019. May 25.
  - 17) Marzia Miletto and Steven E. Lindow, Relative and contextual contribution of different sources to the composition and abundance of indoor air bacteria in residences. *Microbiome*. 2015; 3: 61. Published online 2015 Dec 10.
  - 18) Jerneja Zupancic, *et al.*, The dishwasher rubber seal acts as a reservoir of bacteria in the home environment, *BMC Microbiol*. 2019; 19: 300. Published online 2019 Dec 19.
  - 19) Chang DH. *et al.*, *Pseudomonas kribbensis* sp. nov., isolated from garden soils in Daejeon, Korea, *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2016 Nov;109(11):1433-1446.
  - 20) Marc Garcia - Garcera, *et al.*, Metagenomic assessment of the interplay between the environment and the genetic diversification of *Acinetobacter* *Environ Microbiol*. 2017 Dec; 19(12): 5010-5024. Published online 2017 Dec 1.
  - 21) 松田吉広他: 群衆アセンブリモデルを用いた種多様性の促進機構の検討, [http://www.alife.cs.is.nagoya-u.ac.jp/~reiji/publications/2009\\_chinousystem\\_matsuda.pdf](http://www.alife.cs.is.nagoya-u.ac.jp/~reiji/publications/2009_chinousystem_matsuda.pdf) (参照日: 2019 年 10 月 20 日)