

駅トイレ内空気中に含まれる微生物の検出に関する予備的検討

○川崎たまみ 吉江幸子 京谷 隆 潮木知良（鉄道総研）

池田佳樹（JR 東日本）

Preliminary study on detection of airborne bacteria contained in air in restrooms of railway stations

○Tamami Kawasaki, Sachiko Yoshie, Takashi Kyotani, Tomoyoshi Ushiogi
(Railway Technical Research Institute)
Yoshiki Ikeda (East Japan Railway Company)

It is very important to provide a more comfortable station space for railway customers from the view of publicness of railway. Microorganisms in the environment of railway facilities have been focused. The microbiome analysis of surface bacteria on floors of restrooms of railway stations was reported last year, but there are very few reports that studies microbiome in indoor air of restrooms at stations. Therefore, microbiome analysis of indoor air in restrooms of railway stations is reported in this study.

キーワード：駅、トイレ、微生物、屋内空気、マイクロバイオーム、清掃

Key Words：Railway station, restroom, microorganisms, indoor air, microbiome, cleaning

1. はじめに

公共性の高い鉄道においては、より快適な駅空間を提供することは重要である。これまでに駅空間中に浮遊する細菌とカビについては、培養法により定量後その分布の違いを明らかにし^{1,2)}、駅構内において気がなる利用者の割合は、空間中に浮遊するカビ量との間に相関があることを報告した³⁾。また駅トイレについては、床面に存在する微生物がにのいの要因の一つであることを報告し、微生物の観点からより効率的な駅トイレ清掃について知見を蓄積しているところである。一方、駅トイレ清掃には、乾式清掃と湿式清掃の2方式があるが、これらの清掃方式は清掃対象の床構造に起因する。昨年は、清掃方式別の駅男子トイレ床面に存在する細菌の遺伝子解析後得られたマイクロバイオーム結果の一部について報告した⁴⁾。しかし、駅トイレの各清掃方式別に空気中の微生物を調査した報告例は極めて少ない。そこで本報告では、清掃方式別に駅トイレ内外の空気中の細菌を採取し遺伝子解析によるマイクロバイオーム解析を試みたので、その結果について報告する。

2. 調査内容

2.1 調査対象

調査対象箇所は、乗降者人数が同定度のA駅とC駅の男子トイレとした（表1）。A駅男子トイレ床はゴムタイルであり、乾式清掃を実施する。C駅男子トイレ床は磁器タイルと目地からなり、湿式清掃を実施する。また、比較対象として、両駅ともトイレ外の駅構内の空気を採取した。

2.2 調査日時

調査は、2019年6月21日（A駅）、27日（C駅）深夜の夜間清掃に合わせて実施した。具体的な調査時間は、終電前の0:00頃から駅構内にてトイレ外空気採取を開始し、夜間清掃直後（02:30頃）に両駅男子トイレ内に空気採取を開始した。

表1 調査対象駅諸元

	A 駅	C 駅
清掃方式	乾式清掃	湿式清掃
乗降者人数（万人）	約7	約7
小便器数	7	4
床構造	ゴムタイル	磁器タイル 目地

2.3 調査方法

（1）サンプル採取：空気サンプリングには、PTFE フィルターカセット（0.3 μm、直径 37 mm、SKC 社）を使用した。フィルターカセットを接続したポンプは三脚を用いるか、そのままトイレ内荷棚に設置し、流速を 3L/分に設定し約 60 分間吸引することで空気中の微生物をフィルター上に捕獲した。採取後のフィルターは、滅菌済みメスで切断し 1.5ml 容器に入れ以降のライブラリ調整に使用した。

（2）DNA 抽出：DNA 抽出には、DNA 抽出キット（QIAGEN 社製）を用いた。抽出した DNA 量は、Agilent 2200、Tape station system により確認した。抽出した DNA を鋳型とし、細菌の 16SrRNA 遺伝子 V3-V4 領域を

標的としたプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction：PCR）を行った。なお1stPCRのサイクル数は35サイクルで実施した²⁾。得られたPCR産物は、ピークサイズの確認後インデックスを付加し精製を行った後、次世代シーケンサ（MiSeq; Illumina, Inc.）を用い300塩基読み取りにより解析を実施した。得られた遺伝子情報は、解析ソフトQIIMEにより実施した。

3. 結果と考察

得られた菌叢解析の結果、属まで解析できた上位14属を表2に示す。全てのサンプルに共通に検出されたのは *Kocuria* 属、*Propionibacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Streptococcus* 属、*Sphingomonas* 属であった。このうち *Kocuria* 属 *Streptococcus* 属 *Pseudomonas* 属は異なる日に採取した乾式清掃を実施する駅トイレ床、湿式清掃を実施する駅トイレ床からも、共通して検出された属であり⁴⁾ アンモニア産生菌を含む細菌属であった。*Kocuria* 属については、土由来またヒトの常在菌である細菌種も含まれるとの報告がある^{5,6)}。*Streptococcus* 属は、公共トイレ⁷⁾、大学図書館⁸⁾、ヒトの腸内細菌として存在するとの報告⁹⁾がある。*Pseudomonas* 属も家庭¹⁰⁾、土等¹¹⁾からの検出が報告されている。A、C両駅トイレ外空気から共通して検出し、トイレ内では不検出だったのは、*Enhydrobacter* 属と、*Neisseria* 属であった。*Enhydrobacter* 属は美術館内¹²⁾、*Neisseria* 属も大学図書館内⁸⁾での空気から検出が報告されている。トイレ外空気の測定時間帯は、終電前であったため駅構内には利用者が存在していたことから、ヒトや環境それぞれに由来する細菌属の検出がみられたことが考察された。一方、A、C両駅トイレ内空気のみ共通して検出された属は見られなかった。

またサンプル内細菌属構成比の均等度（ α 多様性）を評価する指標である Shannon 指数¹³⁾を算出した結果を図1に示す。Shannon 指数値は、A駅トイレ内外とC駅トイレ外についてはほぼ同等であったが、C駅トイレ内では低かった（図1）。これらのことから、C駅トイレ内は、A駅トイレ内外及びC駅トイレ外に比べ、細菌属構成比の均等度が低いことが示唆された。C駅トイレ内空気だけ特徴が異なったが、これが清掃直後だからなのか、それとも清掃後の時間経過と共に傾向が変化していくのかどうかについては、今後検討していきたい。

4. まとめ

本報告で実施した手法により駅トイレ内の空気中のマイクロバイーム解析を実施できることを確認した。今後は構造や清掃方式が異なる様々な駅トイレにて調査を行い、駅トイレ内環境の細菌叢に関する知見を蓄積し、駅トイレの維持管理に反映していく予定である。

参 考 文 献

1) Kawasaki T, Kyotani T, Ushiogi T, Lee H. Distribution of airborne bacteria in railway stations in Tokyo, Japan. *J Occup Health*. 2013;55(6):495-502.
2) Kawasaki T, Kyotani T, Ushiogi T, Izumi Y, Lee H, Hayakawa T. Distribution and identification of airborne fungi in railway stations in Tokyo, Japan. *J Occup Health*. 2010;52(3):186-93.
3) 川崎たまみ、京谷隆、潮木知良、伊積康彦、早川敏雄：「駅における鉄道利用者の主観評価と浮遊微生物量

表2 トイレ内外空気から検出された細菌属

細菌属	トイレ			
	A 駅 外	A 駅 内	C 駅 外	C 駅 内
<i>Kocuria</i>	○	○	○	○
<i>Propionibacterium</i>	○	○	○	○
<i>Pseudomonas</i>	○	○	○	○
<i>Sphingomonas</i>	○	○	○	○
<i>Streptococcus</i>	○	○	○	○
<i>Agrococcus</i>	—	○	○	○
<i>Bacillus</i>	○	○	—	○
<i>Corynebacterium</i>	○	○	—	○
<i>Hydrogenophilus</i>	○	—	○	○
<i>Enhydrobacter</i>	○	—	○	—
<i>Neisseria</i>	○	—	○	—
<i>Amaricoccus</i>	—	—	○	—
<i>Cellvibrio</i>	—	○	—	—
<i>Ralstonia</i>	—	—	—	○

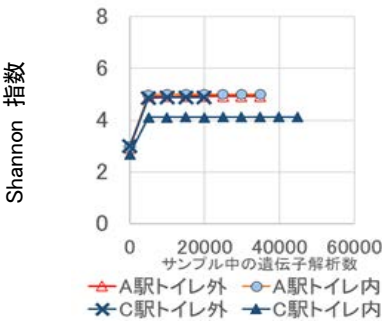


図1 Shannon 指数（ α 多様性）の比較

との相関、鉄道総研報告、2010 9月号、p45-p50
4) 川崎たまみ、吉江幸子、京谷隆、村澤浩、異なる清掃方式を実施する駅トイレ床面に生息する細菌のマイクロバイーム解析、2019 年度室内環境学会術大会講演要旨集、2019
5) 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
6) Lee K, et al., Complete Genome Sequence of *Kocuria indica* CE7, Isolated from Human Skin. *Microbiol Resour Announc*. 2019 Jul 11; 8(28). pii: e00607-19.
7) Flores Ge, et al., Microbial biogeography of public restroom surfaces, *PLoS One*. 2011; 6(11):e28132. Epub 2011 Nov 23
8) S. FH., et al., Microbiological Quality of Indoor Air in University Libraries, *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4(Suppl 1): S312-S317
9) 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.
10) 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.
11) Chang DH. et al., *Pseudomonas kribbensis* sp. nov., isolated from garden soils in Daejeon, Korea, *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2016 Nov;109(11):1433-1446. Epub 2016 Jul 26.
12) Gaüzère C, et al., Stability of airborne microbes in the Louvre Museum over time, *Indoor Air*. Feb;24(1):29-40. doi: 10.1111/ina.12053. Epub 2013 Jun 18.2014
13) 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.pdf2020 年 2 月 28 日現在)