

各種採取法における家禽精液の細菌汚染について

橋 本 秀 夫
(広島大学水畜産学部畜産学科)

突 永 悟・高橋 利男・山根 甚信
(広島農業短期大学)

Comparison of Bacterial Contamination in Fowl Semen with Various Collecting Methods

Hideo HASHIMOTO

*Department of Animal Husbandry, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University, Fukuyama, Japan*

Satoru TSUKUNAGA, Toshio TAKAHASHI and Jinshin YAMANE

Hiroshima Agricultural College

(Text-fig. 1: Tables 1-5)

近年ニワトリの多羽数飼育化に伴い、バタリーあるいはケージ養鶏法が広く行なわれるようになった結果、ニワトリにおいても人工授精の必要性が高まってきた。

一般に人工授精を行なうに当っては、精液の採取方法が簡便であると共に、採取された精液は細菌汚染の少ないことが要求されるのは当然である。しかしながら、ニワトリでは総排泄腔の構造からみて、採精時には糞便による細菌汚染をうけ易い。

われわれ¹⁾は先に、ニワトリ精液の採取方法について、広島法と名づけた一改良法を報告した。本法は従来の採取方法に比べると簡単で、より自然に近く、しかも精液の採取量が多いことなど種々の点で優れていた。

今回は、この著者らの改良法（広島法）と、従来から行なわれている他の採精法によって得られた各精液について、細菌汚染の点を比較検討したので報告する。

材 料 お よ び 方 法

精液採取には、教室飼育の白色レグホン種4羽を使用した。採取方法は下記の4方法を用いた。これらの採精鶏と4採取方法を組合わせて、同一条件で順次精液の採取を行なったが、その組合わせはTable 1に示すとおりである。

Aは著者らの改良法である広島法、BはBURROWS & QUINN²⁾の原法である旧法（腹部マッサージ法）、Cは同じくBURROWS & QUINN²⁾によるMilkingと呼ばれる新法、Dがコンドーム法である。

採精に当っては、総排泄腔の周囲を滅菌生理食塩水で充分洗浄を行なった。

試験期日は、昭和38年5月~6月で、精液は1週間間隔で採取した。ただし、第II回目のBとCは同

Table 1. Combination of collecting methods of semen and cocks used

Cock No.	Order of collecting method			
	I	II	III	IV
1	A : Hiroshima method	D	C	B
2	B : Old method (Abdominal massage)*	A	D	C
3	C : New method (Milking)**	B	A	D
4	D : Condom method	C	B	A

* : Original method of BURROWS & QUINN (1935)

** : Modified method of BURROWS & QUINN (1937)

時に採精出来なかったため、この2回のみは再試験を行なった。

採取した精液は、原液のまま滅菌小試験管にとり、直ちに冷蔵庫に入れて4°Cで保存し、約20時間後に検査に供した。

細菌検査には、各精液の採取量が極めて少ないため、滅菌緩衝生理食塩水で100倍に希釈した後、一般生菌数と糞便汚染指標菌である大腸菌群および腸球菌群の検査を行なった。また精液内の細菌叢についても調査を行なった。

培地は、生菌数については標準寒天培地(栄研)と酵母エキス寒天培地(栄研)の両者を併用し、37°C 6日間培養で行ない、大腸菌群数はB.G.L.B.培地、腸球菌群数はB.T.B. Azide Dextrose培地⁴⁾を使用した。精液内の菌叢については、ヒツジ血液寒天培地を用いて観察分離した。

検査成績

1. 一般生菌数

本成績はTable 2に示すごとく、4回の試験を通じて、およそ $10^4 \sim 10^6$ 程度の菌数を示した。

Table 2. Total count* per ml in cock semen collected by various methods

Collecting method	Experiment No.			
	I	II	III	IV
Hiroshima method	3.8×10^4	4.1×10^4	3.8×10^5	1.6×10^6
Old method	7.4×10^5	1.2×10^7	3.4×10^6	4.5×10^5
New method	5.0×10^6	1.5×10^6	2.9×10^5	6.0×10^6
Condom method	1.4×10^6	8.6×10^5	3.4×10^5	1.4×10^6

* : The plates were incubated for six days at 37°C

採取方法別にみると、BURROWS & QUINNの旧法、新法によるものが共に菌数が多く、ついでコンドーム法によるものであり、広島法によるものが最も少なかった。

2. 大腸菌群

糞便汚染指標菌としての大腸菌群の検査成績はTable 3に示すとおりである。

出現菌数は何れも 10^4 以下を示したが、出現状態は必ずしも一定した成績を示さなかった。広島法による採精液は、第II、III回目とも最少の菌数を示したが、第IV回目のごとく、他法によるものよりも若干多い場合もみられた。

なお、第I回目の検査において、コンドーム法のみ陽性で、他は陰性を示しているが、これは試料の

Table 3. Most probable number of coliform bacteria per ml in cock semen collected by various methods

Collecting method	Experiment No.			
	I	II	III	IV
Hiroshima method	—	2.4×10^2	1.6×10^2	2.7×10^4
Old method	—	2.4×10^2	3.1×10^3	1.5×10^4
New method	—	1.6×10^4	3.5×10^2	4.9×10^4
Condom method	1.6×10^3	5.4×10^3	4.0×10^2	1.3×10^3

精液が既に100倍に稀釈されていることも考慮することが必要である。

3. 腸球菌群

大腸菌群と同様、汚染指標菌としての見地から調べた腸球菌群の成績は Table 4 に示すとおりである。

Table 4. Most probable number of enterococcus group bacteria per ml in cock semen collected by various methods

Collecting method	Experiment No.			
	I	II	III	IV
Hiroshima method	$< 2.3 \times 10^2$	—	$< 2.4 \times 10^2$	1.6×10^4
Old method	4.9×10^2	$< 2.3 \times 10^2$	$> 1.8 \times 10^4$	2.4×10^3
New method	7.9×10^2	5.4×10^3	—	2.4×10^3
Condom method	9.2×10^3	$> 1.8 \times 10^4$	$< 2.3 \times 10$	7.9×10^2

本菌群の成績は、第II、III回目の試験のごとく陰性例もみられたが、およそ 10^4 以下であった。一般生菌数あるいは大腸菌群の成績同様、本菌群の菌数も第IV回目の成績が一般に多く、そのうちでも広島法によるものが多かった。

4. 出現菌叢

菌数検査と同時に、原精液を一白金耳量ずつヒツジ血液寒天培地に塗抹培養して、精液中の細菌叢について調査を行なった。方法は 37°C 48時間培養後、平板上に同一集落が2個以上みられたものを出現陽性菌として釣菌分離した。16例からの分離菌76株の分類成績は Table 5 に示すとおりである。

Table 5. Frequency of occurrence of bacteria in 16 semen samples

Organisms	No. of strains isolated	No. of samples detected
<i>Micrococcus</i>	21	13
<i>Diphtheroid</i>	9	9
Gram negative rods	9	9
<i>Streptococcus</i>	10	6
Enterococcus group	6	6
Coliforms	6	6
<i>Bacillus</i>	3	2
<i>Staphylococcus</i>	2	2
Unknown	10	7

本表にみられるように、出現菌種は *Micrococcus* が最も多く、試験精液の 81.2% (13/16) から出現した。ついで *Diphtheroid*, グラム陰性桿菌 (大腸菌群を除く), *Streptococcus* の順に出現した。

汚染指標菌としての大腸菌群および腸球菌群はそれぞれ 6 例ずつにみられたが、Table 2 および 3 に示したように、選択培地による検出成績はそれぞれ 13 例および 14 例が陽性であったから、血液寒天培地における検出率は、これらに比べると 50% 以下の成績であった。

同定不能の菌は、不明として最後に一括した。

なお血液寒天培地の他に *Salmonella* の検出の目的で、DHL 寒天培地 (栄研) も用いたが、何れも陰性に終わった。

考 察

家畜の人工授精に関する研究において、精液の細菌汚染についても報告は多数あるが、その多くはウシ、ウマおよびブタ等に関するもので、家禽精液についての報告は少ない。SMITH⁵⁾ はニワトリ、GALE & BROWN⁶⁾ は七面鳥について、輸精管から直接採取した精液を調べた結果、無菌であったと報告しているが、普通の採精法では多かれ少なかれ、糞便による細菌汚染をさけることは出来ない。

ウシやウマの精液採取に当っては、採精前に包皮腔の洗浄を行なうことによって、細菌数を少なくさせるなどの効果をあげているが、ニワトリにおいては総排泄腔の周囲をよく洗浄しても、その解剖学上の構造からみて、糞便に由来する汚染は避けられないようである。そこで本試験においては、糞便による細菌汚染を比較する意味で、一般生菌数の他に、糞便汚染指標菌として知られている大腸菌群と腸球菌群を取上げて検討した次第である。

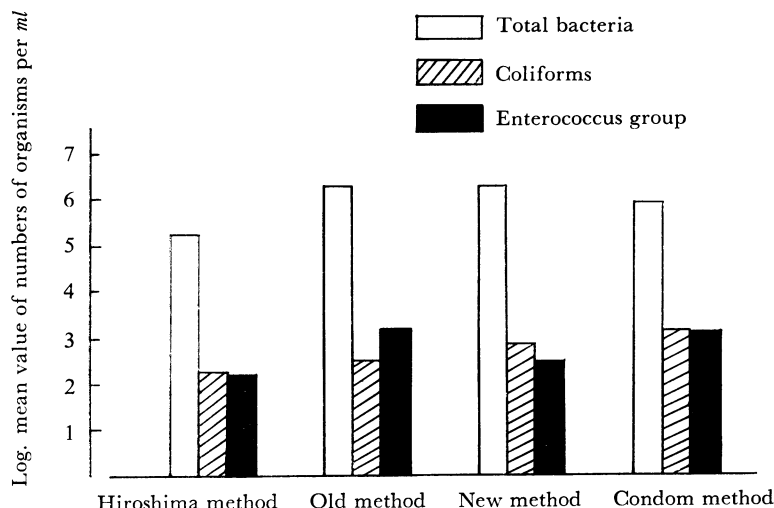
まず採精時の事前処置についてみると、広島法では既報¹⁾のごとく、総排泄腔の周囲を生理食塩水で充分洗浄した後、綿タンポンを直腸内に挿入した。これは採精時に糞便が混入することを防ぐためである。他の採精法においても広島法と同様に、総排泄腔の周囲を洗浄、清拭したが、タンポンは使用しなかった。しかし今回の試験では、タンポン未使用例においても、精液に直接糞便が混入しないよう注意した。

さて一般生菌数の検査において、使用培地は出来るだけ多くの菌が確実に発育するものであることが望ましい。WILCOX & SHORB⁷⁾ は Eugon agar を用い、37°C で 3 日間培養し、De MUELENAERE & QUICKE⁸⁾ は Bacto nutrient agar を使用し、しかも 30°C で 3 日間の培養を行なっている。著者らは、竹内ら⁹⁾ の報告を参考として標準寒天培地を取上げ、更に酵母エキス寒天培地を加えて、本試験に先だち 2 回の予備的な比較試験を行なった結果、前者の方が菌数が多く出現することを認めたが、検体によっては後者の方が多い場合も認められたことから、結局両培地を併用することにした。また培養時間は 37°C 48 時間では、集落が微小で計測に充分なだけの発育がみられないものが多数あった。そこで、更に培養を続けて観察した結果、5~7 日目まで計測可能にまで発育することを知ったので、本試験においては 37°C 6 日間の培養を行なった。なお好気性菌の他に、嫌気性菌の成績をみるため、Thioglycollate 培地も使用したが、成績が不定であったため、今回の成績からは除外した。

以上の検討を基礎にして、ニワトリ精液中の細菌汚染を調べた結果、一般生菌数、大腸菌群および腸球菌群の成績は、Table の 2~4 に示したとおりである。いまこれら 3 者の成績を比較するため、まとめて図示すると Text-fig. 1 のごとくである。菌数は対数平均値をもって示した。

本図にみられるように生菌数の成績では、BURROWS & QUINN の方法によるものが、旧法、新法とも多く、広島法によるものは、これらに比べると $\frac{1}{10}$ の菌量を示している。大腸菌群ならびに腸球菌群の成績においても広島法によるものが最低で、前者ではコンドーム法、後者では旧法によるものが最も高い菌数を示した。

以上のごとく、広島法による採取精液は、3 種類の菌数検査の何れにおいても最低の成績を示した。これは既報¹⁾でも述べたごとく、広島法による精液の採取は、特別の精液受容器を用いることによって外界からの細菌汚染が防止できるためと、清拭と糞便の侵入防止を兼ねた、綿タンポンの直腸内への挿



Text-fig. 1. Logarithmic mean value of numbers of total bacteria, coliform bacteria and enterococcus group bacteria in cock semen

入が、効果をあげていたものと思われる。

次に精液の細菌叢について調べた結果は、Table 5 に示したような成績であった。これらの成績は、ニワトリ⁹⁾、七面鳥⁶⁾の精液における菌叢の調査成績とほぼ同様の出現傾向を示すものである。またウシ¹⁰⁾あるいはブタ¹¹⁾精液の検査成績とも類似しているが、これらは何れも精液の汚染が糞便による汚染と関係が深いことから、同じような菌叢が出現してくるものと思われる。

ただし今回の成績では、上記の報告^{6) 10) 11)}にみられたような *Proteus* の出現例は無かった。これは採精時における総排泄腔周囲の洗浄が、効果をあげていたためであるかも知れない。

なお血液寒天培地からの分離菌の成績とは別に、選択培地から分離した大腸菌群21株、腸球菌群23株について分類した結果、前者においては *E. coli* I 型が 95.2% (20/21)、後者では *Str. faecium* が 86.9% (20/23) と、何れも糞便系の菌が大部分を占めていることが判明した。

ウシやブタの人工授精においては、採取精液の細菌汚染、あるいは保存中の細菌の増殖を防ぐため、保存稀釈液に抗生物質を添加して、混入細菌の発育を抑制することが試みられている。しかしながら、混入細菌が余りにも多い場合は、たとえ抗生物質を精液に加えても、抑制効果が充分で無かったと報告されている^{9) 10)}。

ニワトリの人工授精においては、現在ウシなどのように、保存精液を応用するまでには至っていないが、何れはその方向に進むものと思われ、それとともに抗生物質の添加も当然必要になってくるであろう。その場合においては、上述の報告にもあるように、採取精液は出来るだけ細菌汚染の少ないものであることが望まれる。これはまた、雌鶏生殖器への種々なる細菌の感染防止という点からも重要な事柄である。その点広島法による採取精液は、他法によるものに比べて細菌汚染が最も少なかった。

以上今回の各種採精法によるニワトリ精液の細菌汚染の比較試験では、従来の方法によって得られた精液に比べて、広島法によって得られた精液の汚染が最も少なかった。すなわち広島法は糞便による精液の細菌汚染を少なくするという点からも、優れた方法であることが認められた。

要 約

各種採精法によって得られた、ニワトリ精液の細菌汚染について比較検討した結果、広島法による精液の細菌汚染が最も少なかった。また精液からの出現菌叢の成績は、他の報告者のそれと同様の傾向を

示していた。それらの成績は以下のごとく要約される。

1. 一般生菌数の成績は、BURROWS & QUINN の新、旧両法によるものが多く、広島法によるものはこれら両法によるものの約1/10の菌量で最少を示した。
2. 汚染指標菌としての大腸菌群の成績は、コンドーム法によるものが最も多く、広島法のそれが最少であった。
3. 腸球菌群の成績は、旧法によるものが多く、広島法によるものが最も少なかった。
4. ニワトリ精液からの出現菌種を調べた結果、*Micrococcus*, *Diphtheroid*, グラム陰性桿菌, *Streptococcus*, Enterococcus group, Coliforms, *Bacillus*, *Staphylococcus* の順で検出された。

終りに本研究は文部省科学試験研究費補助金によったものであることを付記して、ここに謝意を表す。

文 献

- 1) YAMANE, J., S. TSUKUNAGA & T. TAKAHASHI, 1962. Bull. Hiroshima Agr. Coll., **2**: 17—26.
- 2) BURROWS, W. H. & J. P. QUINN, 1935. Poultry Sci., **14**: 251 & 253—254.
- 3) —————, 1937. Ibid., **16**: 19—24.
- 4) 橋本, 1963. メディアサークル, No.41: 111—119.
- 5) SMITH, A. U., 1949. J. Agr. Sci., **39**: 194—200.
- 6) GALE, C. & K. I. BROWN, 1961. Poultry Sci., **40**: 50—55.
- 7) WILCOX, F. H. & M. S. SHORB, 1958. Am. J. Vet. Res., **19**: 945—949.
- 8) De MUELENAERE, H. J. H. & G. V. QUICKE, 1958. South African J. Agr. Sci., **1**: 139—149.
- 9) 竹内ら, 1960. 日獣会誌, **13**: 19—22.
- 10) 橋本(和), 1963. 家衛試研究報告, No. 46: 36—44.
- 11) 田中ら, 1951. 農技研報告, G. 第1号: 61—69.

SUMMARY

Bacterial contamination in fowl semen collected by four methods, Hiroshima method of the authors, Old method (Abdominal massage) and New method (Milking) of BURROWS & QUINN, and Condom method were investigated comparatively.

The total bacterial count was the largest in the semen by New and Old method, and was the smallest in the one by Hiroshima method. The bacterial number in the latter semen was about one-tenth of the former.

Most probable numbers of coliform bacteria and enterococcus group bacteria as an indicators of faecal contamination were the smallest in the semen by Hiroshima method, of the four collecting methods.

From these results, Hiroshima method is the most useful method for collecting of semen from the cock, in the viewpoint of bacterial contamination.

Examination of 16 semen samples revealed the presence of the following bacteria: *Micrococcus*, *Diphtheroid*, Gram negative rods, *Streptococcus*, Enterococcus group, Coliforms, *Bacillus* and *Staphylococcus*.