牛 精 液 の 細 菌 汚 染 防 止 に 関 す る 研 究

I. 原 精 液 の 細 菌 汚 染 の 実 態 調 査

橋 本 和 典

(農林省家畜衛生試験場 中国支場)

精液の細菌汚染を防除することは、精液の保存の上からも、人工授精に供用した場合の雌性生殖器への感染防止、また受胎率の向上のためにも重要である。1939 年 SALISBURY ら⁷⁾が精液の細菌汚染と混入菌の抑制の重要性について、この分野の研究者の注意をひいてから、精液内に混在する細菌の種類および数、細菌混入精液の受胎に及ぼす影響、あるいは混入細菌の抑制剤とその効果などについて多くの研究者により報告されている。

わが国においては西川ら⁴⁾の研究によって、sulfa 剤を加えた精液希釈液が創製され、さらに混入細菌の抑制剤として penicillin (PC), dihydrostreptomycin (SM) の合剤が添加され、人工授精に広く応用されて優れた効果を収めている。

最近の人工授精には、受胎率の向上をはかるため、子宮内深部注入法が行なわれており、精液の細菌汚染の防止ないし混入細菌の抑制ということ、細菌性繁殖障害を防ぐ意味からきわめて重要な問題と考えられる。

著者は、このような観点から牛精液の細菌汚染防止につき若干の検討を行なってきたが、その第 1 報として、牛原精液の細菌汚染の実態について報告する。

検査材料および方法

被検精液はおもに京都、兵庫、岡山、鳥取の各府県下で繁殖に供用中の乳牛および和牛の種雄牛からえられた延 221 例である。精液は人工腔により採取ののち、ただちにその 0.1~0.5 ml を滅菌小試験管にとり、約 4°C に保ちながら研究室に輸送し細菌検査に供した。精液の採取から検査までの時間は輸送距離の関係により区々であるが、1~36 時間、その多くは約 24 時間を経たものであった。

Studies on the prevention of bacterial contamination of bull semen. I. Bacterial contamination of original semen and effects of preputial douche.

HASHIMOTO Kazunori (Chugoku Branch, National Institute of Animal Health, Wadayaama, Hyogo) *Jap. J. Animal Reprod.* 12 (3), 1966.

混入細菌数の測定：原精液を生理食塩水で 10^{-8} ~ 10^{-6} まで希釈し、各希釈段階を 2 枚ずつ牛血清加寒天平板に混積培養を行ない、37°C で 48 時間培養して、その発育集落数の平均から、原精液 1 ml あたりの混入細菌数を求めた。

細菌叢の検査：10 倍に希釈した原精液を 1 滴あて 5% 牛血液加寒天およびサプロー寒天の平板培地に滴下し、コンラージ棒で各培地に 2 枚ずつ連続塗抹した。血液加寒天は 37°C 48 時間、サプロー寒天は 30°C 72 時間培養し、グラム陽性菌については BERGEY'S Determinative Bacteriology (7 版, 1957) により、またグラム陰性菌は坂崎、波岡共著「腸内細菌検索法」により、それぞれ発育した細菌の同定を行なった。なお同定が困難であった菌種は、末同定のグラム陽性菌、陰性菌として、それぞれ一括した。

検査成績

混入細菌数：原精液の細菌汚染度は一般にいちじるしく高く、その混入菌数は区々であって 10^3 ~ 10^7 コ/ml にわたっており、最低は 2,000 コ/ml、最高は 1.7×10^7 コ/ml におよんでいた。すなわち Table 1 に示したように、221 例のうち 10^4 コ/ml 以下はわずか 4.1% にすぎず、 10×10^4 コ/ml 以下が 26.3%、 30×10^4 コ/ml 以下のものが 53.9% で、全体の約 8 割の 78.3% の精液では混入菌数が 100×10^4 コ/ml 以内であった。しかし 100×10^4 コ/ml を越えるものが 21.7% の例に認められ、さらに混入菌数が $1,000 \times 10^4$ コ/ml 以上のものが 0.9% にみられた。

これらを授精前に包皮腔洗浄を実施した群 (68 例) と実施していない群 (153 例) とに区分すると、混入菌数が 10×10^4 コ/ml 以下のものは洗浄群では 45.6%、無洗浄群では 17.8% となり、 100×10^4 コ/ml 以上は前者では 7.3%、後者では 28.3% であって、洗浄群の混入菌数は非洗浄群に比べて少なくなっている傾向が認められた。

Table 1. Number of bacteria recovered from original bull semen

Number of isolated bacteria $10^4/\text{ml}$	Number of semen samples (%)		
	Preputial douche before semen collection		Total
	+	-	
<1.0	9 (13.2)	0	9 (4.1)
1.1~10.0	22 (32.4)	27 (17.8)	49 (22.2)
10.1~20.0	11 (16.2)	24 (15.8)	35 (15.8)
20.1~30.0	10 (14.7)	16 (10.4)	26 (11.8)
30.1~40.0	5 (7.4)	7 (4.6)	12 (5.4)
40.1~50.0	1 (1.5)	12 (7.9)	13 (5.9)
50.1~60.0	2 (2.9)	6 (3.9)	8 (3.6)
60.1~70.0	1 (1.5)	7 (4.6)	8 (3.6)
70.1~80.0	1 (1.5)	5 (3.3)	6 (2.7)
80.1~90.0	1 (1.5)	4 (2.6)	5 (2.3)
90.1~100.0	0	2 (1.3)	2 (1.3)
100.1~200.0	2 (2.9)	21 (12.5)	21 (9.5)
200.1<	3 (4.4)	24 (15.8)	27 (12.2)
Total	68	153	221

また菌数を対数変換して両群の混入菌数を比較すると、Fig. 1 にみられるように、無洗浄群における出現頻度の分布はほぼ正規型を示しており、その平均値は 5,602 (実数 39.9×10^4 コ/㎖) であった。洗浄群の菌数の分布は不規則であるが、出現頻度は無洗浄群に比してかなり低位に偏り、その平均値は 4,979 (実数 9.5×10^4 コ/㎖) であった。これらの点から、両群間の細菌汚染の状況はあきらかに異なり、包皮腔の洗浄により原精液への混入菌数はいちじるしく減少することが認められた。

なお、洗浄群の混入菌数の分布が正規型を示さなかったことは、洗浄の方法が場所により異なり、様々な方法で行なわれていることに起因すると思われ、衛生的に十分な洗浄が実施されている某人工授精センターでの採取精液では、混入菌数が 10×10^4 コ/㎖ を越えるものが少なかった事実はそれを裏付けるものであろう。

つぎに包皮腔洗浄の効果を実験的に確認するため、場内繋養の雄牛について、包皮腔洗浄と洗浄後の採取精液間の混入細菌数の比較を行なった。まず第 1 回目は包皮腔洗浄をしないで精液を採取し、約 1 時間後に包皮腔を洗浄してから第 2 回目の採精をした。洗浄には滅菌生理食塩液を用い、1 回あたり約 200~300 ml を洗浄嘴管で包皮腔内に注入し、包皮口を閉じて十分にマッサージしながら洗浄し、これを 3 回反覆した。なお包皮

Fig. 1. Distribution of number of bacteria by logarithmic change**Table 2.** Comparison of number of bacteria from bull semen collected before and after preputial douche

Bull	Number of bacteria from bull semen($10^4/\text{ml}$)		Rate of decreased (Mean)
	Preputial douche*		
	After	Before	
F-1	97.5	1.1	1/88.5
B-1	614.5	52.9	1/11.6
F-2	30.3	2.9	1/10.4
B-2	524.5	15.3	1/34.2
F-3	124.5	11.8	1/10.6
B-3	48.7	3.3	1/14.8
			(1/28.3)

Control; Preputial douche was not performed

	1 st collection	2 nd collection	
A	271.4	78.3	1/3.5
B	54.5	33.0	1/1.7
C	67.0	28.4	1/2.2
D	91.2	50.5	1/1.8
E	40.8	18.2	1/2.2
F	118.0	38.0	1/3.1
			(1/2.4)

* Preputial douche with 200~300 ml of sterilized saline was performed 3 times successively.

腔洗浄をしなくても連続採取による 2 回目精液への混入菌数が減少する可能性を考慮して、べつに包皮腔を洗浄しないで 30 分間隔で採精し、この場合の混入菌数の状態をしらべこれを対照とした。

その結果、Table 2 に示したように、洗浄後の採取精液では洗浄前のそれに比べて 1/10.4~1/88.5, 平均 1/28.3 といちじるしく減少した。また洗浄しないで連続採取した場合も、2 回目の精液では 1 回目比べて 1/1.7~1/3.5, 平均 1/2.4 に減少したが、その減少率は洗浄群より明らかに低かった。

これらの結果から、原精液への細菌汚染原としては包皮腔内付着細菌が大きな役割を演じており、十分な包皮腔洗浄は精液の細菌汚染を防止するためにきわめて有効であることが、実態調査のうえからも実験的にも確認することができた。

検出菌種：219 例の原精液から分離した菌株数は 750 株であって、Table 3 に示したように、検出菌種は

Table 3. Species of microorganisms from 219 bull semen samples

Species of organism	Number of strains recovered %		Recovery of per semen sample %
<i>Micrococcus</i>	145	19.3	66.3
<i>Diphtheroid</i>	90	12.0	41.1
<i>Staphylococcus</i>	65	8.7	29.7
unidentified Gram positive rods, non-spore	59	7.9	27.0
<i>Alcaligenes</i>	45	6.0	20.5
<i>Escherichia coli</i>	42	5.6	19.4
<i>Bacillus</i>	42	5.6	19.4
<i>Streptococcus</i>	40	5.3	18.3
<i>Achromobacter</i>	36	4.8	16.4
<i>Proteus</i>	34	4.5	15.5
<i>Yeasts</i>	31	4.1	14.3
<i>Gaffkya</i>	23	3.1	10.5
<i>Providencia</i>	23	3.1	10.5
<i>Corynebact. renalis</i>	19	2.5	8.5
<i>Pseudomonas</i>	16	2.1	7.3
<i>Chromobacterium</i>	15	2.0	6.9
unidentified Gram negative rods	10	1.3	4.6
<i>Klebsiella</i>	7	0.9	3.2
<i>Saricina</i>	4	0.5	1.8
<i>Hemophilus</i>	4	0.5	1.8
Total	750		

きわめて多岐にわたっていた。これらのほかに数種の糸状黴類 (Mold) も発育した例もあったが、それらはこの集計から除外した。分離菌株は 20 種 (属) に分類され、そのうち、もっとも多く検出されたのは *Micrococcus* で 145 株, 19.3% をしめ、その検出頻度は 66.3% であった。それについて *Diphtheroid* が 90 株, 12.0% でその検出頻度は 41.1% あった。以下おもなものを順挙すると、*Staphylococcus* 8.7% (検出頻度は 29.7%), 末同定 グラム陽性桿菌 7.7% (27.0%), *Alcaligenes* 6.0% (20.5%), *Escherichia* 5.6% (19.4%), *Bacillus* 5.6% (19.4%), *Streptococcus* 5.3% (18.3%), *Achromobacter* 4.8% (16.4%), *Proteus* 4.5% (15.3%), *Yeast* 4.1% (14.3%) となっていた。

また個々の原精液の検出菌種数は、3 種 (属) 検出されたものが 219 例中 79 例 (39.1%) ともっとも多く、ついで 4 種, 5 種, 2 種, 6 種, 1 種, 7 種の順であった。

なお前述の包皮腔洗浄試験を行なった際の洗浄排出液の含有の菌類は $10^6 \sim 10^9$ コ/ ml であり、その検出菌種は原精液のそれとほぼ同様な傾向が認められた。

考 察

牛の原精液から検出された細菌の種類は、研究者により、精液採取法により、また種雄牛の飼養管理状態によりさまざまであるが、ブルセラ病、ビブリオ病など特異的な感染症のような場合を除き、外見上健康な種雄牛の精液からは、通常 *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Diplococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Diphtheroid* など種々の細菌が検出されている。

精液内混入細菌の有害性について、WILLIAM ら¹³⁾ および GILMAN²⁾ は授精能力の低下している種雄牛の精液には、正常種雄牛のそれに比べて多数の混入細菌が認められたことを報告しており、WEBSTER¹²⁾ は授精成績の不良な種雄牛の精液中に多数の溶血性レンサ球菌を検出し、同様に GUNSALUS ら³⁾ は *Pseudomonas* を、PRINCE ら⁵⁾ はグラム陽性双球菌およびグラム陰性桿菌が多かったことをそれぞれ報告している。

また細菌の精子生存性におよぼす影響について、EDOMONDSON ら¹⁾ は菌種によりことなり、溶血性を有する細菌は精子の生存に有害に働くが、ある種の非溶血性細菌はその代謝過程で精子の生存に好影響をおよぼすことを述べている。TRUBLOOD¹¹⁾ は精液に種々の細菌を加え、酸素消費量を測定して、細菌の中間代謝産物が精子細胞に

対して metabolic substance, または stimulatory agent として働きうることを観察している。これらの報告にみられるように、ある種の細菌の存在はときに精子生存に有効に作用する場合もありうるが、一般には決して好ましいものではないといえよう。

今回の調査の結果、原精液の細菌汚染度はきわめて高いことが明らかとなったが、一般に原精液の細菌汚染源としては次の四つの経路が挙げられよう。すなわち、1) 種雄牛が特異的にブルセラ病、ビブリオ病に罹患し、生殖器およびその付属器官に病巣を有し、これらの病原菌が一次的に精液内に出現する場合、2) 大腸菌、コリネバクテリア菌、ブドウ球菌などの尿路感染によって泌尿器官に炎症があって、これらの起因菌が射精時に混入する場合、3) 包皮腔または尿道に付着した種々の細菌が精液採取時に混入する場合、4) 精液の採取、処理作業中の汚染ならびに使用器具の滅菌不完全、などである。

RUEBKE⁶⁾ は 50 頭の雄牛生殖器の細菌検査を行ない、細菌検出部位は包皮腔、亀頭、尿道下部に限局していて、その他の部分はまったく無菌であったと報告し、田中ら¹⁰⁾も雄豚についてほぼ同様なことを認めている。われわれの調査および実験において、包皮腔洗浄によって精液えの混入菌数がいちじるしく減少すること、さらに原精液からの検出菌種は *Staph. aureus*, *Coryne. pyogenes* などを除いては、ほとんどが腸管内生棲菌あるいは自然界に広く分布している死物寄生菌の範ちゆうに入るもので、これらの細菌が土壌、糞便、敷藁などを介して包皮腔内に侵入付着したものと考えられる。

したがって、実際に精液の細菌汚染源の主役を演じているものは包皮腔内の付着細菌であって、これらが採精時に精液内に混入するものであろう。そしてその他の汚染経路は、通常、量的にはほとんど無視することも可能と考えられるので、精液の細菌汚染の防止に採精前の包皮腔洗浄のもつ意義はきわめて大きいものがあるといえよう。

しかしながら、包皮腔洗浄によっても精液の汚染を完全に防除することはもとより困難である。人工授精に使用する希釈精液には抗生物質の添加が行なわれているが、武原ら⁹⁾および高松⁸⁾らは原精液の混入菌量がきわめて多い場合には、添加した抗生物質の細菌抑制効果が不十分で、希釈精液中に細菌が生き残りうることを述べている。

したがって、希釈精液の細菌汚染を防止して清浄な精

液を供給するためには、採精前の十分な包皮腔洗浄と希釈精液への抗生物質の添加とがきわめて必要かつ適切であると考えられる。

総 括

牛の原精液 219 例の細菌汚染の実態を調査して、つぎの結果をえた。

1. 原精液の細菌汚染度は高く、その混入菌数は 2×10^8 コ/㎖ から 1.7×10^7 コ/㎖ にわたっており、 10^6 コ/㎖ をこえるものが 21.7% に認められた。しかし採精前に包皮腔洗浄を行なった精液では、無洗浄採取精液に比べて混入菌数は明らかに減少していた。

2. 原精液から検出された大部分の細菌はいわゆる非病原菌であり、主として包皮腔内付着菌の混入によるものであり、原精液の細菌汚染防止には採精前の包皮腔洗浄が有効であることが実験的にもうかがされた。

3. 包皮腔洗浄はたんに原精液の細菌汚染度を減少させるばかりでなく、希釈精液に添加した抗生物質の細菌抑制効果を助長し、清浄な精液の供給に有益であることを論じた。

終わりにご指導ならびにご校閲をいただいた山内支場長にお礼申し上げます。

(1966. 7. 18 受付)

文 献

- 1) EDMONSON, J. E., K. L., TALLMAN & H. A., HERMAN.: *Missori Agric. Exp. Stat. Res. Bull.* **444**, 1949.
- 2) GILMAN, H. L.: *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **60**, 416, 1922.
- 3) GUNSALUS, I. C., G. W., SALISBURY, & E. L., WILLET.: *J. Dairy Sci.* **24**, 911, 1941.
- 4) 西川義正: 家畜人工授精法, 養賢堂, 東京, 1956.
- 5) PRINCE, P. W., J. O., ALMQUIST, & J. J. REID.: *J. Dairy Sci.* **32**, 849, 1949.
- 6) RUEBKE, H. J.: *Amer. J. Vet. Res.* **12**, 14, 1951.
- 7) SALISBURY, G. W.: *Proc. Amer. Animal Prod.*, 32nd Ann. Meet. 210, 1939.
- 8) 高松(泰)・倉益(茂)・今村(泰): 畜産の研究, **14**, 287, 1959.
- 9) 武原(文)・田口(資)・長南(茂)・瓜生(一): 神奈川衛生研年報, 第 8 集, 64, 1959.
- 10) 田中(宏)・丹羽(太)・瑞穂(当)・吉田(信): 農技研報告, No. 1, 61, 1959.
- 11) TRUBLOOD, M. S.: *J. Dairy Sci.* **40**, 149, 1957.
- 12) WEBSTER, W. M.: *Aust. Vet. J.* **8**, 199, 1932.
- 13) WILLIAMS, W. W.: *Cor-nell Vet.* **10**, 87, 1920.

Summary

It is very important to control bacterial contamination of bull semen not only for maintaining good fertility in artificial insemination by the semen but for preventing genital infection in the cow served by it. For this purpose sulfanilamide, penicillin and dihydrostreptomycin are customarily added to semen diluents. Since 1957 I have been studied on the prevention of bacterial contamination of bull semen.

The purpose of the work presented here was to investigate the actual condition of bacterial contamination of original bull semen. A total of 221 semen samples collected from breeding bulls were used as material. The results obtained were as follows;

1) Degree of the bacterial contamination of original bull semen was considerably high, the number of bacteria recovered being from $2 \times 10^8/\text{ml}$ to $1.7 \times 10^7/\text{ml}$. In 48 (21.7%) of the 221 semen samples examined, the number of bacteria was over $10^8/\text{ml}$ (Table 1).

2) The number of bacteria in semen from the bull in which preputial douche had been performed before semen collection decreased markedly as compared to that without preputial douch (Table 1 and Fig. 1). The effect of the preputial duoche for preventing bacterial contamination of semen was confirmed experimentally (Table 2).

3) From 219 original semen samples 750 strains of bacteria were recovered as shown in Table 3. Almost all of them were determined as non-pathogenic or saprophytic bacteria. It was supposed that the bacteria were derived primarily from the preputial cavity of the bull.