

Prototheca 属 4 種を用いたマウス乳房炎モデルの病理学的解析

清水貴瑛・上川昭博・豊留孝仁・高橋英二・古岡秀文

(受付 : 2022 年 11 月 10 日, 受理 : 2023 年 6 月 30 日)

Pathological study of mouse mastitis model infected with four different *Prototheca* species

Kie SHIMIZU, Akihiro KAMIKAWA, Takahito TOYOTOME, Eiji TAKAHASHI,
Hidefumi FURUOKA

摘 要

Prototheca 属は、クロレラ科の 1 属であり、植物表面、動物の消化管内、土壌、湖沼、汚水中などの湿潤環境に広く分布している。*Prototheca* 属は牛乳房炎の原因菌でもあり、*P. bovis*, *P. ciferrii*, *P. blaschkeae* を原因する乳房炎では乳房の腫脹、硬結、乳汁中の著しい凝塊、乳量低下などの症状がみられる。1990 年代以降 *Prototheca* 属による牛乳房炎の報告は増加傾向にあり、日本を含む世界各国で確認されている。本研究では、異なる *Prototheca* 属 4 種の病原性に関する知見を得るために、免疫不全モデルマウスや健全な授乳期マウスの乳腺組織に各 *Prototheca* 属を実験的に感染させて病理学的比較検討を行った。*P. ciferrii* と *P. bovis*, *P. blaschkeae*, *P. vistulensis* を実験に用いた。まず、未経産の SCID マウスに尾静脈から接種することで、血流感染における *Prototheca* 属の病原性と各臓器への親和性を病理学的に検討した。次に、授乳期の BALB/c マウス乳腺に *Prototheca* 属菌を乳頭口接種し、乳房での感染成立および乳飲みマウスへの経口的感染の有無を病理学的に検討した。SCID マウスへの感染実験の結果、*P. bovis* のみがマウスへ感染性を示し、脳と腎組織に病変を形成した。乳腺組織への *P. bovis* の血行性移行は認められなかった。授乳期 BALB/c マウスに対する乳頭口接種では、*P. bovis* を接種した乳腺で肉眼的に褪色、腫脹、硬結感が認められ、組織学的に乳腺上皮細胞の消失と乳腺腔内で著しい増殖がみられた。*P. ciferrii* および *P. blaschkeae* 接種乳腺では、肉眼的に乳腺組織の褪色が認められ、組織学的には菌の軽度増殖を伴う巣状の炎症がみられた。*P. bovis*, *P. ciferrii* および *P. blaschkeae* は BALB/c マウスの泌乳期乳腺へ上行感染し、乳腺炎を引き起こした。牛乳房炎の原因菌としての報告が少ないことから病原性が不明であった *P. ciferrii* と *P. blaschkeae* は、少なくともマウス泌乳期乳腺組織に中等度炎症を引き起こすことがわかった。

キーワード : プロトテカ症、牛乳房炎、マウス乳房炎モデル、感染実験

帯広畜産大学獣医学研究部門

連絡先 : 古岡秀文, furuoka@obihiro.ac.jp

緒 論

Prototheca は Chlorophyta (緑藻植物門)、Trebouxiophyceae (トレボウキシア藻綱)、Chlorellales (クロレラ目)、*Chlorellaceae* (クロレラ科) の 1 属であり、腐生性または寄生性であり、植物表面、動物の消化管内、世界中の土壌、湖沼、汚水中などの湿潤環境に広く分布している。発育様式は *Chlorella* 属と同様である (Jagielski et al. 2019; Kano 2020)。直径約 10.5 μm の娘細胞が成長し、細胞内多数の胞子嚢胞子を形成して直径約 25 μm の胞子嚢となり、やがて破裂し直径約 6.5 μm の胞子嚢胞子を放出し、胞子が成長して娘細胞となる生活環によって増殖する。クロレラ属とは異なり、葉緑素を持たず光合成を行わないため、無色透明である。この増殖は環境中及び、宿主内でも同様である (加納 2016; Kano 2020)。発育至適温度は 25-30°C とされているが、感染症個体から分離されたものは 37°C 及びそれ以上でも発育可能なものが多く、寒天培地上のコロニーは白色酵母様である。1894 年に Krüger らがその特徴的な形態や生理、発育環から *Chlorella* に近い新種として報告した (Krüger 1894)。2019 年にミトコンドリア *cytb* 遺伝子をマーカーとする分類法が報告され、*P. zopfii*, *P. bovis*, *P. ciferrii*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora*, *P. ulmea*, *P. blaschkeae*, *P. cutis*, *P. miyajii* など計 14 種に分類することが提唱されている (Jagielski et al. 2019)。

Prototheca 属菌のうち、*P. bovis*, *P. ciferrii*, *P. wickerhamii* は犬や猫の *Prototheca* 感染症を引き起こす病原菌として知られている (Stenner et al. 2007; Shank et al. 2015; Masuda et al. 2021)。犬や猫の *Prototheca* 感染症は消化器、眼、神経系、皮膚への感染のほか、稀ではあるが全身感染も報告されている。畜産分野では、1990 年代以降 *Prototheca* 属菌による牛乳房炎が増加傾向にあり、日本を含め世界各国から報告されている (Jagielski et al. 2017; Kano 2020; Bozzo et al. 2022)。*Prototheca* 属菌のうち、*P. zopfii* による牛乳房炎は Lerche (1952) により初めて報告され、ドイツ、デンマーク、イギリスなどで同様の症例が報告された

(Dion 1979)。これら菌の分類は、菌の糖分解能に基づいて 3 種に分類され (Blaschke-Hellmessen et al. 1985)、さらに 3 つの genotype に分類された (Roesler et al. 2003)。遺伝子解析の結果、genotype I と genotype II の遺伝子相同性は 99.4% であるのに対し、genotype I, II と genotype III の遺伝子相同性は 98.1% であった。そのため、genotype III は新たに、*P. blaschkeae* として分類された (Roesler et al. 2006)。さらに、*P. zopfii* genotype I, II は遺伝子的には非常に相同性が高いが、genotype II による乳房炎報告が多いことから、genotype I が *P. ciferrii*、genotype II が *P. bovis* と命名され、現在に至っている (Jagielski et al. 2019)。

Prototheca 乳房炎は、臨床的に、乳房の腫脹、硬結、乳汁中の著しい凝塊、乳量低下などの症状が認められ、いったん牧場内で発生するとその清浄化は難しい (Jagielski et al. 2017; Bozzo et al. 2022)。原因菌として *P. bovis*, *P. blaschkeae*, *P. wickerhamii* が報告されている (Marques et al. 2006; Marques et al. 2008; Ricchi et al. 2010; Park et al. 2019)。このうち *P. blaschkeae* は乳房炎の症例報告が少なく (Marques et al. 2008; Marques et al. 2015)、乳房炎起因菌としての病原性については明らかでない。*P. ciferrii* は乳牛乳腺への感染実験において、臨床症状は示さないものの乳腺組織で増殖し、肉芽腫性炎症を引き起こすことが報告されている (Ito et al. 2011)。

今回、*P. ciferrii*, *P. bovis*, *P. blaschkeae*, *P. vistulensis* の 4 種の異なる *Prototheca* 属について、免疫不全モデルマウスである SCID マウスおよび泌乳期マウスを用いて感染実験を実施し、これらの菌の血流を介した全身感染および泌乳期マウス乳腺内の感染について、その病理像について菌種間で比較検討した。

材料と方法

Prototheca 株とその培養

Prototheca bovis は乳房炎個体の乳汁より分離された

株を感染実験に用いた。*P. blaschkeae* と *P. vistulensis* は十勝管内牧場のフリーストール牛舎近辺の湿潤土壌水より *Prototheca* isolation medium (PIM) 上で 35°C 2 日間培養によって分離された株を感染実験に用いた。*P. ciferrii* は NITE バイオテクノロジーセンターより分与いただいた NBRC 6994 株 (JCM 9346 株) を用いた (表 1)。分離に用いた PIM は次の通り調製した。1L の PIM に対して、フタル酸水素カリウム 10g、NaOH 0.9g、MgSO₄・7H₂O 0.2g、KH₂PO₄ 0.2g、NH₄Cl 0.3g、Glucose 10g、5-Fluorocytosine 0.25g、Chloramphenicol 0.1g、Agar 20g を順に加え、溶解した (Pore 1973)。121°C で 20 分間オートクレーブにかけた。オートクレーブ後、安全キャビネット内で 1% Thiamine・HCl 水溶液 (濾過滅菌済み) を 1mL 加えて混ぜた。シャーレ 1 枚につき、20mL 分注し、蓋を開けたまま 30 分間乾燥させた。乾燥後、実験に使用するまで室温で保存した。また、通常の培養にはポテトデキストロース寒天培地を使用した。

表 1. 研究に使用した *Prototheca* 属株

菌種	分離環境	発育温度	乳房炎報告
<i>P. ciferrii</i>	じゃがいも皮	25, 35°C	なし
<i>P. bovis</i>	乳房炎乳汁	25, 35°C	あり
<i>P. blaschkeae</i>	湿潤土壌	25, 35°C	あり
<i>P. vistulensis</i>	湿潤土壌	25, 35°C	なし
<i>Prototheca</i> sp.	湿潤土壌	25°C	

接種実験

4 種類の *Prototheca* 属細胞を PBS で懸濁して 10⁶CFU/mL の菌液を作製し (Chandler et al. 1970; Chang et al. 2013) 接種実験に用いた。以下の動物実験はいずれも本学動物実験委員会にて承認されている (承認番号 19-197 号)。

SCID マウスに対する感染実験は次の通り行った。8 週齢メスの ICR-SCID マウス (日本クレア株式会社) のメスを 12 匹購入した。マウスを 1 週間馴致の後、3 匹ずつの 4 群に分け、それぞれの菌液をイソフルラン麻酔下で尾静脈より接種 (50 μl/匹) した。接種後は圧迫止血を行なった。その後、毎日体重測定、被毛の変化、活動性を経過観察した。接種後 7 日、8 日、10 日目に各群 1 匹

ずつ安楽殺し解剖を行なった。肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、消化管、脳、第 4 乳頭周囲乳腺、左大腿部筋肉を採材し、15% ホルマリンで固定した。HE 染色、PAS 染色を用いて病理学的検索を行なった。

泌乳期マウス乳腺への感染実験は次の通り行った。8 週齢の BALB/c マウス (日本クレア株式会社) メス 8 匹をオスと交配し、妊娠、分娩を誘導した。分娩日を授乳 0 日目として授乳 10 日目の母マウスを感染実験に用いた。3 種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン 0.3mg/Kg bw + ミダゾラム 4.0mg/Kg bw + 酒石酸ブトルファンール 5.0mg/Kg bw) を腹腔内投与し、5 対 10 箇所乳腺のうち乳糖が膨大し吸入されていることが明らかな発達した乳腺を選択して、乳頭口接種を行った。授乳マウスのうち 6 匹は接種後も授乳を継続する授乳群とし、乳牛の感染条件の再現を試みた。また 2 匹については、感染モデルマウス (Chang et al. 2013) を作製するために、接種後に授乳を停止し、単独で飼育した (非授乳群)。授乳群では全ての右乳頭口から 4 種の *Prototheca* 属のうちのいずれか一種の菌液 (50 μl/乳頭) を、左乳頭口から同量の PBS を、33G のナノニードルを用いて実体顕微鏡下で接種した。泌乳期マウスの乳腺に、乳頭口感染させることで、臨床症状の比較及び病理学的検索を行った。非授乳群の 1 匹には右側乳頭より *P. bovis* (50 μl/乳頭) を、左側乳頭より同量の PBS を接種し、もう 1 匹には *P. blaschkeae* と *P. ciferrii* を左右の乳頭口よりそれぞれ接種 (50 μl/乳頭) した。すべてのマウスは接種後、塩酸アチパメゾール (3.0mg/Kg bw) で覚醒させた。接種後毎日経過観察を行い、接種後 5 日目にイソフルランおよび頸椎脱臼による安楽殺を行い、母マウスの乳頭下乳腺、および授乳を継続した乳飲みマウスの五大臓器 (肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺) を採材し、15% ホルマリンで固定した。HE 染色、PAS 染色を用いて病理学的検索を行なった。

これら感染実験において、*Prototheca* 属の細胞、および孢子嚢胞子が複数確認できることと、孢子嚢胞子放出後の空の孢子嚢がその周囲にみられることを増殖条件とした。また、*Prototheca* 細胞周囲に好中球やマクロファ-

ジなどの炎症性細胞浸潤を認めた場合、感染性があると判断した。

結果

SCID マウスへの感染性

P. bovis を感染させた SCID マウスのみ、接種後 5 日目頃から体重の減少 (図 1) と立毛が認められた。肉眼所見では、腎臓表面の白斑が *P. bovis* を感染させた 3 匹すべての SCID マウスで確認された。組織所見では、腎皮質から髄質にかけて菌の増殖を伴う巣状の炎症反応

が多数見られた (図 2a)。また、大脳新皮質、海馬、及び小脳分子層では *P. bovis* を含む塞栓と周囲組織での軽度の増殖が認められた。炎症反応は軽度であった (図 2b)。肝臓、脾臓、心臓、肺、消化管、乳腺、左大腿部筋肉では *P. bovis* の増殖や炎症反応は認めなかった。*P. ciferrii* 感染マウスでは、体重減少や被毛の逆立ち等の臨床症状および肉眼所見に異常はみられなかった。組織学的に、脳に菌体による塞栓が散在していたが、*P. ciferrii* の増殖や炎症反応はみられなかった。*P. blaschkeae*, *P. vistulensis* 感染マウスでは、臨床症状、肉眼所見、組織所見の全てにおいて異常は認められなかった。

図 1. *Prototheca* 細胞を静脈内接種した SCID マウスの体重変化

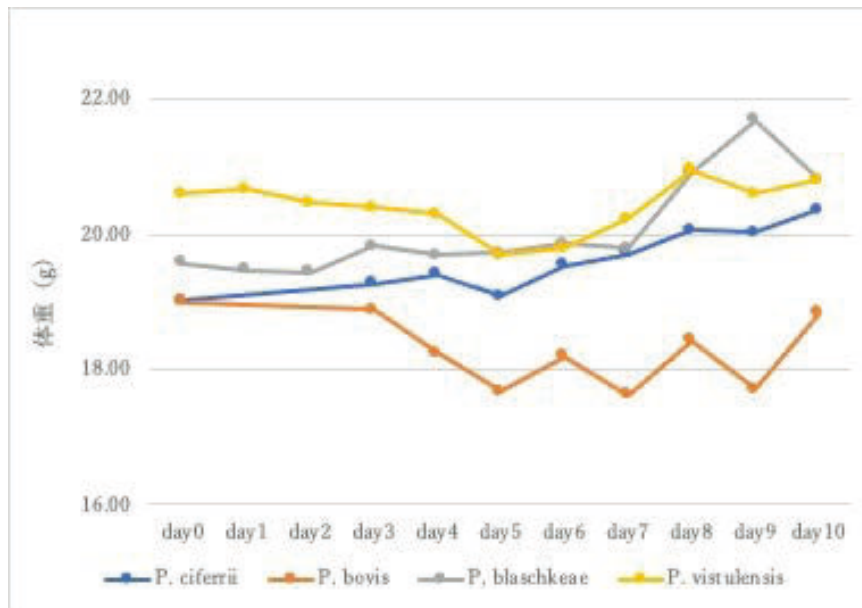
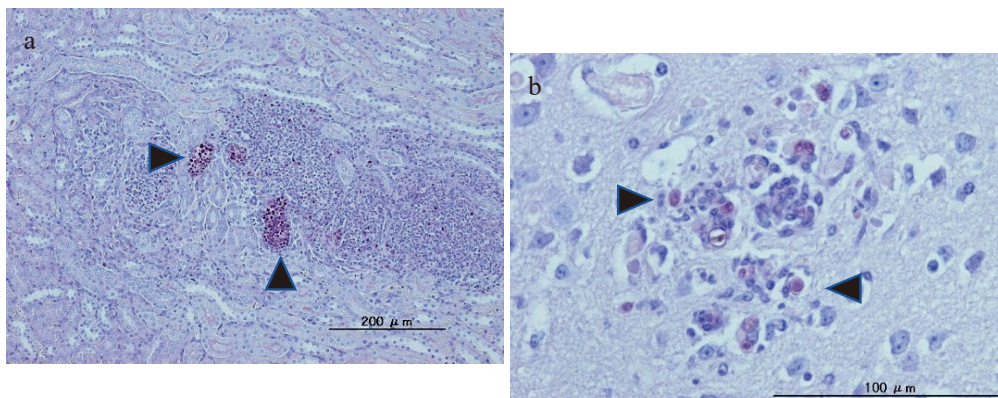


図 2. *P. bovis* 静脈内接種 マウス腎臓 (PAS 染色)

- 腎髄質における巣状の炎症反応と菌の増殖 (矢頭)
- 大脳皮質における菌塞栓 (矢頭) と軽度の炎症反応



泌乳期マウス乳腺への感染実験

授乳群では、*P. bovis*, *P. vistulensis* 接種個体で一過性の体重減少が認められた (図 3)。*P. ciferrii* および *P. blaschkeae* を含む 4 種の菌全てについて、剖検時肉眼的に発達した乳腺組織が観察され、組織学的にも乳腺組織に炎症性変化および *Prototheca* 属菌の菌体は認められなかった。乳飲みマウスの五大臓器にも著変は認められなかった。

非授乳群では、著しい体重の減少が見られた (図 4)。PBS 接種乳腺と比較し、*P. bovis* 接種乳腺は剖検時肉眼的に著しい腫脹と褪色を示し、硬結感が認められた (図

5a)。*P. ciferrii* 接種乳腺および *P. blaschkeae* 接種乳腺は軽度から中等度の腫脹と硬結感および軽度の褪色がみられた (図 5b)。組織学的に PBS 接種乳腺は軽度のリンパ球浸潤を伴う薄い結合組織に区画される腺腔構造が明瞭で、腺腔内腔には脂肪滴と蛋白の分泌がみられている (図 6 a)。*P. bovis* 接種乳腺の間質脂肪組織の残存はわずかで、菌体が腺腔内に充満し、乳腺上皮細胞が消失し腺腔基底膜の残存により構造が保持されていた (図 6 b)。*P. ciferrii* と *P. blaschkeae* 感染乳腺では、乳腺組織が退縮し、脂肪組織中に残存する腺腔を中心に菌体の増殖を伴う炎症性反応が多巣性にみられた (図 6 c, d)。

図 3. *Prototheca* 細胞乳腺接種 BALB/c マウス (授乳群) の体重変化

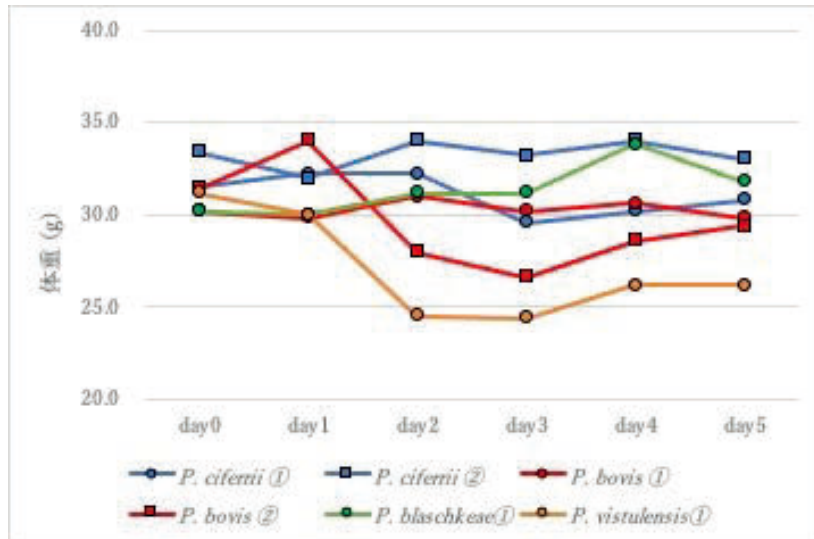


図 4. *Prototheca* 属菌乳腺接種 BALB/c マウス (非授乳群) の体重変化

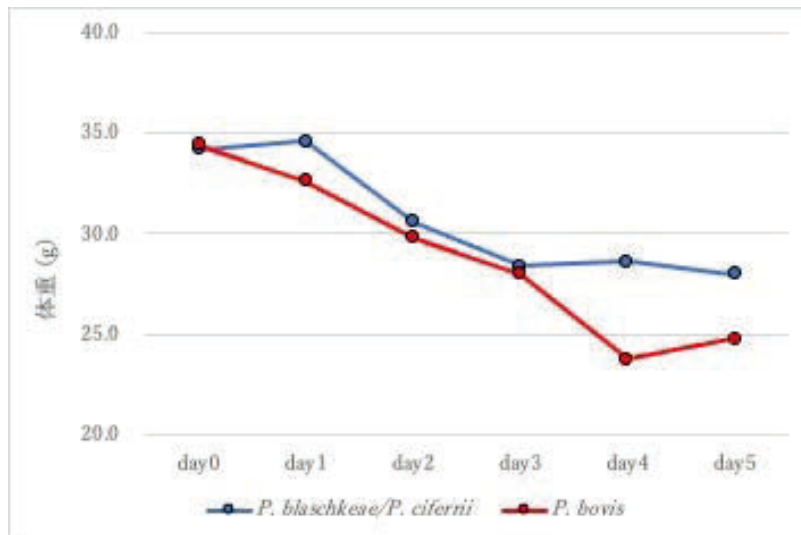


図5. PBS および *Prototheca* 属乳腺接種 BALB/c マウス（非授乳群）の肉眼所見

- a. PBS 接種乳腺（矢頭）に比較して *P. bovis* 接種乳腺（矢印）は著しく腫大し、退色している。
- b. *P. blaschkeae* 接種乳腺（矢頭）と *P. ciferrii* 接種乳腺（矢印）は軽度から中等度の腫脹と軽度退色がみられた。

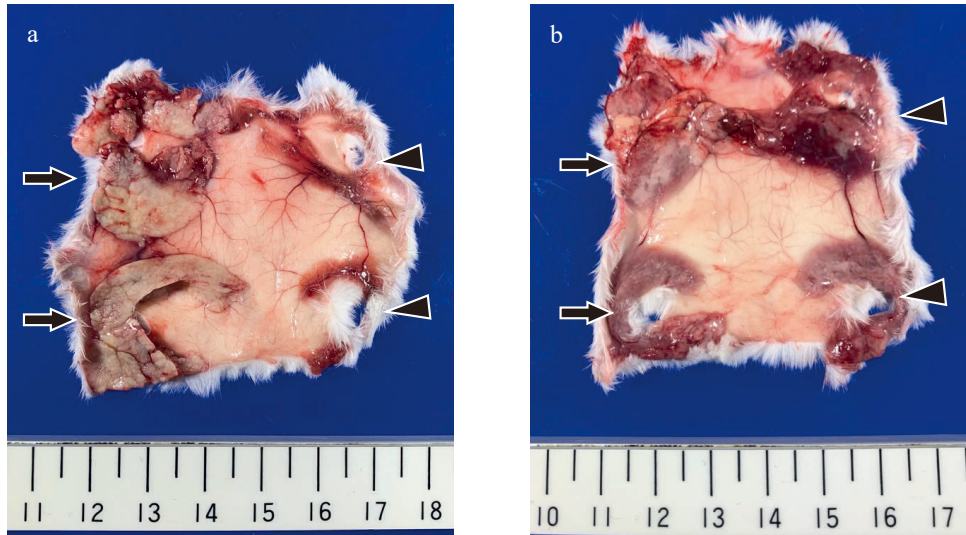
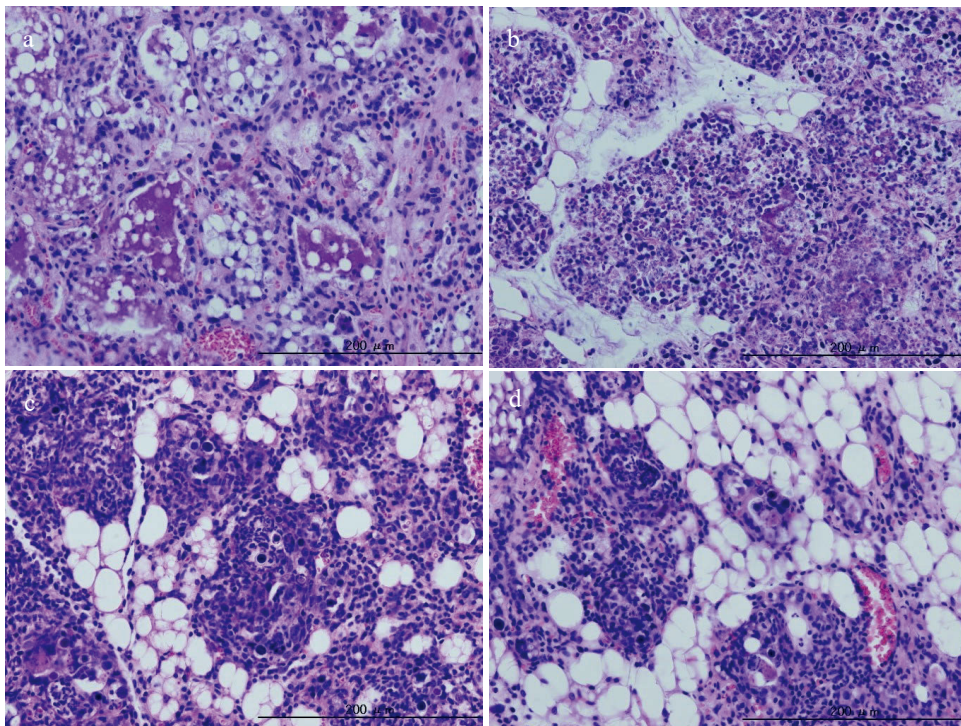


図6. PBS および *Prototheca* 属乳腺接種 BALB/c マウス（非授乳群）の組織学的所見

- a. PBS 接種乳腺は間質の軽度リンパ球浸潤と腺腔内に脂肪滴と蛋白分泌がみられる。
- b. *P. bovis* 接種乳腺では腺腔上皮細胞はみられず、基底膜が残存する腺腔内に多数の菌体が見られる。
- c. *P. ciferrii* 接種乳腺では菌体の増殖を伴う炎症細胞の巣状浸潤が多発性みられる。
- d. *P. blaschkeae* 接種乳腺では *P. ciferrii* と同様に菌体の増殖を伴う炎症細胞の巣状浸潤がみられる。



考 察

Prototheca 属は、2019 年に 14 種に分類することが提唱されている (Jagielski et al. 2019)。この分類以前は *P. zopfii* を原因菌とする乳房炎症例 (Furuoka et al. 1989; Janosi et al. 2001) として報告されている。その後、*P. zopfii* は遺伝子型から二つに分けられ genotype II は *P. bovis* と命名され、乳房炎からの分離例が相次いで報告されている (Ito et al. 2010; Chang et al. 2013; Park et al. 2019; Alvarez-Perez et al. 2021; Fidelis et al. 2021)。genotype I は *P. ciferrii* と命名されたが、乳房炎からの分離報告はほとんどみられず、乳房炎原因微生物としては否定的になっている (Jagielski et al. 2019)。*P. zopfii* genotype III は、*P. blaschkeae* に命名後分離例がいくつかみられるが、病原性を含め未だ不明な点が多い (Marques et al. 2008; Marques et al. 2010)。*P. vistulensis* は 35°C で生育が可能である種であるが、乳房炎を含めた感染症例からの分離報告はなされていないことから、感染実験による病原性の検討は有意義なデータになると考えられた。

SCID マウスは成熟 T 細胞と B 細胞が欠損し、病原微生物に対して高度の感受性を有することから (Okada 2017)、*Prototheca* 属のマウスへの感染性や、臓器親和性を検索することを目的として使用した。*P. bovis* はマウスに対し病原性を有し、脳組織および腎組織に親和性を有することがわかった。一方、*P. ciferrii* は脳組織に菌塞栓がみられたものの、菌の増殖は確認できなかったことからマウスに対する感染性は比較的低いものと考えられた。一方、*P. blaschkeae* と *P. vistulensis* では血流を介した感染進展が認められなかったことからマウスへの病原性は低いと考えられた。乳腺組織に対しては 4 種の *Prototheca* 属いずれにおいても静脈内接種による播種は認められなかった。本実験で使用した SCID マウスは未経産だったため、乳腺組織や乳腺組織への血管が未発達だったために血行感染が成立しなかった可能性も否定できない。一方、Chang ら (2013) は、*P. bovis* を用いて BALB/c マウスへ腹腔内、皮下、皮膚創傷部および乳腺組

織へ接種を行なったところ、乳腺組織の感染は直接接種以外成立しなかったことを報告している。このことから *Prototheca* 属の乳腺組織への感染には乳頭口からの上行感染が重要ルートであると考察している。生体組織に対する病原性や感染ルートの検証には授乳期の SCID マウスを用いて検討することでさらなる知見が得られるものとする。

今回、BALB/c マウスを用いた授乳群のマウスでは乳腺組織およびその乳飲みマウスについて感染が成立していなかった。過去の研究によると、*P. bovis* は感染後 4 時間で急速に増加することがわかっている (Shahid et al. 2020)。そのため、授乳期マウス乳腺に菌を接種後 4 時間以上乳飲みマウスを引き離し、乳腺に十分 *Prototheca* 細胞量を増大させてから暴露する必要があったかもしれない。また、乳飲みマウスを用いた経口感染の可能性についても、実験手技を含めた実験方法について今後検討の必要があると考えられた。

BALB/c マウス非授乳群の PBS 接種乳腺では、授乳を停止することにより乳腺の退縮が起こり、組織学的には腺房構造は縮小し、乳腺上皮は脂肪に置換されていた。接種した *Prototheca* 属のうち *P. bovis* のみが乳腺腔内で壊死性変化を伴い著しく増殖していた。*P. ciferrii* と *P. blaschkeae* では炎症変化を伴う菌の増殖がみられたが、その程度は *P. bovis* 感染乳腺に比較して軽度だった。このことから、*P. bovis* に関しては SCID マウスの結果と合わせマウスに対して強い感染性を有し、泌乳期乳腺組織にも強い親和性を示し、壊死性乳腺炎を呈することが明らかになった。牛乳房炎の原因菌として *P. ciferrii* および *P. blaschkeae* の報告は *P. bovis* に比較してわずかである (Jagielski et al. 2019)。*P. ciferrii* および *P. blaschkeae* は SCID マウスの一般臓器に対してはほとんど病原性がみられなかったにもかかわらず、BALB/c マウス乳腺組織に対してはいずれも炎症反応を引き起こし、菌の増殖も軽度ながらみられ、少なくともマウスに対しては乳腺炎を引き起こす菌と考えられた。牛に直接外挿するには更なる検討が必要であるが、今回得られたそれぞれの *Prototheca* 属菌のマウスに対する病原性の違いは

牛乳房炎からの菌分離傾向に一致していて興味深い知見と思われた。牛 *Prototheca* 乳房炎やそのマウスモデルにおいて *P. bovis* と *P. ciferrii* の病原性の違いは乳腺上皮細胞に対するアポトーシス誘発性の違いに由来すると報告されており、そのアポトーシス誘導能は *P. bovis* で強いと報告されている (Shahid et al. 2020)。今回 *P. bovis* 感染乳腺組織の乳腺上皮細胞が消失し、基底膜のみが残存する組織所見は *P. bovis* 感染による乳腺上皮細胞のアポトーシス誘導によることを示唆していると考えられる。

マウス感染モデルの報告は Chang ら (2013) によってもなされているが、今回得られた感染モデルを使うことにより病理学的、免疫学的な知見の集積、さらには治療試験への応用などに利用することが可能となり、牛 *Prototheca* 乳房炎における病態の解明に寄与することが望まれる。

参考文献

- Álvarez-Pérez S, Anega B, Díaz-de-Tuesta JA, González-Martín JV, Riesgo-Martínez M, García ME, Blanco JL. 2021. Susceptibility testing of *Prototheca bovis* isolates from cases of bovine mastitis using the CLSI reference broth microdilution method and the Sensititre YeastOne colorimetric panel. *Medical Mycology* 59:1257-1261
- Blaschke-Hellmessen R, Schuster H, Bergmann V. 1985. Differentiation of variants *Prototheca zopfii* Krüger 1894. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin* 39:387-397
- Bozzo G, Dimuccio MM, Casalino G, Ceci E, Corrente M. 2022. New approaches for risk assessment and management of bovine protothecosis. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 29:103368
- Chandler RL. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *Journal of Medical Microbiology* 1970; 3(2): 273-82.
- Chang R, Yang Q, Liu G, Liu Y, Zheng B, Su J, Han B. 2013. Treatment with Gentamicin on a murine model of protothecal mastitis. *Mycopathologia* 175:241-248
- Dion WM. 1979. Bovine Mastitis due to *Prototheca zopfii*. *Canada Veterinary Journal*. 20:221-222
- Fidelis CE, Franke M, de Abreu LCR, Jagielski T, Ribeiro MG, Dos Santos MV, Gonçalves JL. 2021. MALDI-TOF MS identification of *Prototheca* algae associated with bovine mastitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 33:1168-1171
- Furuoka H, Anri A, Arita Y, Tuzuki N, Satoh H, Itakura C. 1989. Protothecal Mastitis in Cow. *Japan Journal of Veterinary Science* 51:197-199
- Ito T, Kano R, Sobukawa H, Ogawa J, Honda T, Hosoi Y, Shibuya H, Sato T, Hasegawa A, Kamata H. 2010. Experimental Infection of Bovine Mammary Gland with *Prototheca zopfii* Genotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 73:117-119
- Jagielski T, Bakula Z, Di Mauro S, Casciari C, Cambiotti V, Krukowski H, Turchetti B, Ricchi M, Manuali E, Buzzini P. 2017. A comparative study of the in vitro activity of iodopropynyl butylcarbamate and amphotericin B against *Prototheca* spp. isolates from European dairy herds. *Journal of Dairy Science* 100:7435-7445
- Jagielski T, Gawor J, Bukula A, Decewicz P, Maciszewski K, Karnkowska A. 2018. *cytb* as a new genetic marker for differentiation of *Prototheca* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 56:e00584-18
- Jagielski T, Bakula Z, Gawor J, Maciszewski K, Kusber WH, Dylag M, Nowakowska J, Gromadka R, Karnkowska A. 2019. The genus *Prototheca*

- (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. *Algal Research* 43:101639
- Janosi S, Ratz F, Szigeti G, Kulcsar M, Kerenyi J, Lauko T, Katona F, Huszenicza G. 2001. Review of the microbiological pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *The Veterinary Quarterly* 23:58–61
- Kano R. 2020. Emergence of fungal-like organisms: *Prototheca*. *Mycopathologia* 185:747–754
- Krüger W. 1894. Kurze Charakteristik einiger Organismen des in Saftflusses der Laubbäume, *Hedwigia* 33:241–266
- Kurtzman CP, Robnett CJ. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit(26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 35:1216–1223
- Lerche M. 1952. Eine durch Algen (*Prototheca*) hervorgerufene Mastitis der Kuh. *Berl. Münch. tierärztliche Wochenschrift*. 65:64–69
- Masuda M, Jagielski T, Danesi P, Falcaro C, Bertola M, Krockenberger M, Malik R, Kano R. 2021. Protothecosis in dogs and cats-new research directions. *Mycopathologia*. 186:143–152
- Marques S, Silva E, Carvalheira J, Thompson G. 2006. Short Communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science* 89:4202–4204.
- Marques S, Silva E, Kraft C, Carvalheira J, Videira A, Huss VA, Thompson G. 2008. Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. *Journal of Clinical Microbiology* 46:1941–1945
- Marques S, Silva E, Carvalheira J, Thompson G. 2010. Short communication: Temperature sensibility of *Prototheca blaschkeae* strains isolated from bovine mastitic milk. *Journal of Dairy Science* 93:5110–5113
- Marques S, Huss V, Pfisterer K, Grosse C, Thompson G. 2015. Internal transcribed spacer sequence-based rapid molecular identification of *Prototheca zopfii* and *Prototheca blaschkeae* directly from milk of infected cows. *Journal of Dairy Science* 98:3001–3009.
- Okada S. 2017. Application of highly immunodeficient mice for biomedical research. *Cytometry Research* 27:25–31
- Park H, Moon DC, Hyun B, Lim S. 2019. Short communication: Occurrence and persistence of *Prototheca zopfii* in dairy herds of Korea. *Journal of Dairy Science* 102:2539–2543
- Pore RS. 1973. Selective Medium for the Isolation of *Prototheca*. *Microbiology* 26: 648–649
- Ricchi M, Goretti M, Branda E, Cammi G, Garbarino A, Turchetti B, Moroni P, Arrigoni N, Buzzini P. 2010. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy herds. *Journal Dairy Science* 93: 4625–4631
- Roesler U, Scholz H, Hensel A. 2003. Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* 53:1195–1199
- Roesler U, Moller A, Hensel A, Baumann D, Truyen U. 2006. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* 56:1419–1425
- Shahid M, Cobo ER, Chen L, Cavalcante PA, Barkema

HW, Gao J, Xu S, Liu Y, Knight CG, Kastelic JP, Han B. 2020. *Prototheca zopfii* genotype II induces mitochondrial apoptosis in models of bovine mastitis. *Scientific Reports* 10:698

Shank AMM, Dubielzig RD, Teixeira LBC. 2015. Canine ocular Protothecosis: A review of 14 cases. *Veterinary Ophthalmology*. 18:437-442

Stenner VJ, Mackay B, King T, Barrs VRD, Irwin P, Abraham L, Swift N, Langer N, Bernays M, Hampson E, Martin P, Krockenberger MB, Bosward K, Latter M, Malik R. 2007. Protothecosis in 17 Australian dogs and review of the canine literature. *Medical mycology* 45:249-266

Abstract

The genus *Prototheca* is a member of the family Chlorellaceae, and is widely distributed in moist environments such as the surfaces of plants, the digestive tracts of animals, soil, lakes, and sewage. *Prototheca* spp. is known to be a causative agent of bovine mastitis. Bovine mastitis affected by *P. bovis*, *P. ciferrii* and *P. blaschkeae* reveals swelling of the breast, induration, secretion of milk containing white flakes, and reduction in milk production. Since the 1990s, bovine mastitis caused by *Prototheca* spp. have been increasing, and is distributed in worldwide, including Japan. We experimentally infected immunocompromised mice and the mammary gland of healthy lactating mice with each *Prototheca* spp. to obtain knowledge on the pathogenicity of four different *Prototheca* spp. In this study, we used four different *Prototheca* spp., *P. ciferrii*, *P. bovis*, *P. blaschkeae* and *P. vistulensis*. Initially, the pathogenicity and organ tropism of *Prototheca* spp. in bloodstream infection were pathologically investigated by inoculating the SCID mice via the tail vein. Next, we inoculated the mammary glands of lactating BALB/c mice with *Prototheca* spp. by the teat orifice

and examined pathologically for the establishment of the infection in the udder and oral transmission to the suckling mice. As a result of the experimental infection to SCID mice, only *P. bovis* showed infectivity in mice, and the pathological changes were observed in the brain and kidney. No blood-borne transfer of *P. bovis* to mammary tissue was observed. The mammary gland of lactating BALB/c mice, inoculated with *P. bovis* showed macroscopically discoloration, swelling, and hardening. Histopathology revealed loss of mammary gland epithelial cells and marked proliferation of organisms in the acinus. Mammary glands inoculated with *P. ciferrii* and *P. blaschkeae* showed macroscopically discoloration of mammary tissue and histologically focal inflammatory cell accumulations with mild organism proliferation. *P. bovis*, *P. ciferrii* and *P. blaschkeae* infected ascendingly in the lactating mammary glands of BALB/c mice. *P. ciferrii* and *P. blaschkeae*, whose virulence were unknown due to the few case reports of bovine mastitis, were found to infect the mammary gland of mice.

Keywords: Protothecosis, Bovine Mastitis, Mouse Mastitis Model, Experimental Infection