

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 ISAAC JOSRED MAKUNDI

題 目 : Molecular Characterization and Transmission Dynamics of Animal Viruses in Tsushima leopard cat (*Prionailurus bengalensis euptilura*) with special reference to Feline leukemia virus and *Felis catus* gammaherpesvirus 1  
(ツシマヤマネコにおける猫白血病ウイルスと猫ガンマヘルペスウイルス 1 型の感染に関する研究)

論文要旨 : Infectious diseases spill-over from domestic animals to wildlife or vice versa may significantly impair health and production of the affected animal. For the small population of endangered animal species the risk of infectious diseases may accelerate its extinction. Increased human activities such as agriculture, deforestation, development projects including roads construction have caused not only loss of habitat to wildlife but also enhances the contact between the wildlife and domestic animals. This interaction between wildlife and domestic animals has been the main pathway of disease transmission.

Tsushima leopard cat (TLC) is a small wild cat inhabiting Tsushima Island, Japan. TLC is classified as a critically endangered species due to drastic decrease of its population caused by several factors including habitat loss (deforestation), road kills, and infectious diseases. Several diseases and pathogens have been reported to infect TLCs.

In chapter one, I studied Feline leukemia virus (FeLV) infections in domestic cats and TLCs on Tsushima Island. Although FeLV is the most pathogenic infectious disease in cats, there was no epidemiological study conducted to investigate FeLV infections in this region. The prevalence of FeLV in domestic cats was 6.4% based on FeLV antigen p27. FeLV was not detected in TLC by either FeLV antigen p27 or PCR. To determine whether FeLV could potentially infect TLCs, I infected primary skin fibroblasts from TLCs with FeLV-A and FeLV-B strains. The TLC fibroblasts were susceptible to both viral strains indicating that FeLV replicate in TLC cells. These results suggest that there is high probability of cross-species transmission of FeLV infections from domestic cats to TLCs.

Sequence and phylogenetic analyses of FeLV strains in domestic cats on Tsushima revealed that all FeLV isolates belong to genotype I clade 3. The viruses in genotype I clade 3 were prevalent and widespread on Kyushu, Japan based on previous studies of FeLV epidemiology. Furthermore, FeLVs strains on Tsushima were clearly separated into two areas, genotype I clade 3-1 in Kamijima and genotype I clade 3-2 in Shimojima according to geographical regions. The source of FeLV infections on Tsushima could be explained by how does the Tsushima is connected with other regions. Sea routes link the ports of Hitakatsu and Izuhara from the side of Tsushima and port of Hakata in Fukuoka. Air transportation connects Tsushima

airport and Fukuoka and Nagasaki airports. This connection method between Tsushima and Fukuoka and or Nagasaki may probably be the main source of FeLV on Tsushima.

In second chapter, I explained about identification of *Felis catus* gammaherpesvirus 1 (FcaGHV1) in TLCs on Tsushima Island. Previous epidemiological data suggests that territorial aggression and fighting are commonly modes of FcaGHV1 and Feline Immunodeficiency Virus (FIV) transmission. Previous reports detected FIV in TLCs and its prevalence was significantly higher in domestic cats on Tsushima compared to other regions of Japan. I developed new FcaGHV1 virus-specific nested PCR system to detect FcaGHV1 in TLCs. FcaGHV1 DNA was detected in 3 out of 89 TLCs investigated. For the purpose of TLCs management and determining the source of FcaGHV1 infection in TLCs, I tested domestic cats on Tsushima and I found 28 out of 215 were positive for FcaGHV1 DNA.

Sequence and phylogenetic analyses revealed that FcaGHV1 strains in TLCs and domestic cats were of the same identity. On nucleotide sequence alignments, all three positive TLCs had similar nucleotide sequences forming one FcaGHV1 pattern which was also shared by domestic cats. Two other different patterns of FcaGHV1 strains were found only in domestic cats. The three patterns of FcaGHV1 strains were classified based on nucleotide polymorphisms. These results demonstrated that domestic cats on Tsushima harbor all three patterns of FcaGHV1 strains probably due to the fact that domestic cat is the natural host of this virus. The probability of FcaGHV1 transmission from domestic cats to TLCs is supported by the following findings; first, FcaGHV1 was originally isolated from domestic cats, the high frequency of FcaGHV1 DNA detection in domestic cats than in TLCs suggest that the infections is endemic in domestic cats, and lastly, TLCs and domestic cats FcaGHV1 strains formed one genetic cluster on phylogenetic analyses.

The third chapter of this dissertation was the study about FcaGHV1 DNA detection in feline lymphoma/leukemia tissues that were submitted for investigation of B- or T-lymphocyte clonal growth. FcaGHV1 is a panlymphotropic gammaherpesvirus. Feline lymphoma remains to be the most common malignancy of domestic cats. Studies engaged to explore the association between lymphoma and various etiologies specifically FcaGHV1, are of significant importance for the welfare of domestic cats. I found no significant differences in FcaGHV1 DNA detection between lymphoma/leukemia tissues of B-cell/T-cell type and non B-cell/T-cell type clonality matched for age and sex. FcaGHV1 DNA was detected in feline blood, lymph node, effusions, biopsies, spleen, intestine and peritoneal masses. These results suggest that FcaGHV1 DNA is exclusively distributed in lymphoma/leukemia tissue irrespective of their clonal growth. Cats aged over 5 years and co-infected with retroviruses, particularly FIV, were found to be the risk factors for FcaGHV1 infection.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Isaac Josred Makundi
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 西垣一男
	副 査：鹿児島大学 教授 遠藤泰之
	副 査：山口大学 教授 水野拓也
	副 査：山口大学 教授 日下部 健
	副 査：山口大学 准教授 柳田哲矢
題 目	Molecular Characterization and Transmission Dynamics of Animal Viruses in Tsushima leopard cat ( <i>Prionailurus bengalensis cuptilura</i> ) with special reference to Feline leukemia virus and <i>Felis catus</i> gammaherpesvirus 1 (ツシマヤマネコにおける猫白血病ウイルスと猫ガンマヘルペスウイルス 1 型の感染に関する研究)
審査結果の要旨： ツシマヤマネコは日本の長崎県対馬島に生息する小型の野生の猫です。ツシマヤマネコは、交通事故、生息地の喪失（森林減少や地域開発）、感染症などの要因によって急激に減少するため、絶滅危惧種に分類されています。ツシマヤマネコは家猫との接触によって、家猫の保有する病原体が伝播していることが示唆されており、種保全のためには対馬島における家猫の感染症について把握する必要があります。本研究では家猫で問題となっている猫白血病ウイルスおよび家猫ガンマヘルペスウイルス I について、疫学調査、異種間伝播、ウイルスの病原性について解析を行い、全 3 章から構成されている。  【第 1 章】 第 1 章では、対馬島の家猫とツシマヤマネコにおけるネコ白血病ウイルス (FeLV) 感染について調査を行った。家猫の FeLV の保有率は 6.4%であった。ツシマヤマネコにおける調査では 1 例が偽陽性を示したが、遺伝子検査の結果陰性であることが確認された。FeLV が潜在的にツシマヤマネコに感染する可能性について検討した結果、FeLV はツシマヤマネコ初代 C 線維芽細胞に感受性を示し、細胞中で複製することを確認した。これらの結果は、家猫からツシマヤマネコへの FeLV 感染の異種間伝播の可能性が高いことを示唆している。対馬の家猫の FeLV 系統解析では、すべての FeLV は遺伝子型 I クレード 3 に属した。また、地理的な位置関係に従って、上島で見られるウイルスは遺伝子型 I クレード 3-1 と下島の遺伝子型 I クレード 3-2 の 2 つに分	

類され、ウイルスの遺伝的多様性についても極めて低いことから、近年に、九州で蔓延している異なるウイルス株が少なくとも 2 回、上陸し対馬に蔓延していることが示唆された。対馬の FeLV 感染の原因は、海路や航空輸送によってウイルスが持ち込まれていることが原因であり、ツシマヤマネコの保護管理には家猫の移動管理などを含めた対策が必要である事を提示している。

### 【第 2 章】

第 2 章では、対馬島の家猫とツシマヤマネコにおける家猫のウイルスである *Felis catus gammaherpesvirus 1* (FcaGHV1) の感染について調査を行った。調査を行うために、感度の良い FcaGHV1 ウイルス特異的ネステッド PCR システムを開発した。89 匹のツシマヤマネコのうち 3 匹で FcaGHV1 DNA が検出された。家猫では 215 匹中 28 匹が FcaGHV1 DNA 陽性であった。ウイルスの系統解析では、ツシマヤマネコおよび家猫の FcaGHV1 が同一のものであることを明らかにした。FcaGHV1 の自然宿主は家猫であると考えられており、ウイルスの一塩基多型による分析からも、家猫が保有するウイルス株がツシマヤマネコへ伝播したと結論された。FcaGHV1 の異種間伝播が本研究で初めて確認された。

### 【第 3 章】

第 3 章では、FcaGHV1 の病原性が不明であるため、ウイルス感染と疾患、特に家猫のリンパ腫・白血病との関連性について検討を行った。B 細胞性および T 細胞性リンパ腫・白血病を示す家猫において、腫瘍細胞が浸潤している滲出液、リンパ節、脾臓、腸、などにおいてウイルス核酸が検出された。疫学調査では猫免疫不全ウイルス (FIV) に関連したリンパ腫・白血病の発生において、FcaGHV1 の感染が統計的に関連して検出されることが明らかとなった。一方で、FeLV 感染に関連したリンパ腫・白血病の発生において、FcaGHV1 の関連性を示さないことを明らかにした。

申請者の研究はツシマヤマネコの保護管理を目的とした、対馬の家猫およびツシマヤマネコの感染症に焦点を当て、ウイルスの疫学調査、ウイルス遺伝子の遺伝的多様性、ウイルス異種間伝播、ウイルスの病原性について研究を行った。これらの知見は、ツシマヤマネコの保護管理において大きく寄与するものである。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値があり、優秀であることを認める。