

—— 研究助成報告 ——

家族性自然発症性てんかん猫における海馬および 扁桃体の神経病理学的特徴

Neuropathological features of the hippocampus and
amygdala in familial spontaneous epileptic cats

長谷川 大 輔¹⁾, 湯 祥 彦¹⁾, 濱 本 裕 仁¹⁾,
ジェームズ・ケン・チェンバース²⁾, 内 田 和 幸²⁾

要旨：家族性自然発症性てんかん猫（FSEC）における、てんかん関連性神経病理学的変化を検討した。

6頭のFSECs, 9頭の健常対照猫, および3頭の臨床的に発作を呈さないFSECsの親猫を本研究に用いた。

海馬硬化, 扁桃体硬化, 苔状線維の発芽, および顆粒細胞の病理学的変化を, 免疫組織化学によって評価した。FSEC群および健常対照群間にて, 統計学的比較を実施した。

FSECsの海馬CA3および扁桃体中心核において, gliosisを伴わない神経細胞数の減少を認めた。この変化はFSECsの親猫においても同様の傾向が認められた。またFSECsでは, 腹側海馬のCA4に神経細胞脱落を伴わないgliosisが認められた。一方で, 苔状線維の発芽および顆粒細胞の病理学的変化は認められなかった。

海馬CA3および扁桃体中心核における神経細胞数の減少はFSECsのendophenotypesである可能性が示唆された。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2018；29：31-42

Key Words：てんかんモデル, 猫, 海馬硬化, 扁桃体, 家族性内側側頭葉てんかん

1. 緒言

海馬硬化hippocampal sclerosis (HS) は内側側頭葉てんかん mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) の外科手術によって摘出された海馬組織において最も頻繁に遭遇する組織病理学的所見である^{1, 2)}。HSは海馬におけるastrogliosisを伴う選択的神経細胞脱落として定義される²⁾。さらに, 顆粒細胞の病理学的変化granule cell pathology (GCP) および苔状線維の発芽mossy fiber sprouting (MFS) は海馬硬化に関連して海馬にてしばしば認められる^{2, 3, 4, 5, 6)}。

加えて, TLE患者における神経病理学的研究によって扁桃体における神経細胞脱落とgliosis（扁桃体硬化 amygdaloid sclerosis [AS] と言及される）もまた示されてきた^{7, 8)}。獣医学領域では, てんかん患者における脳の病理学的変化は, ほとんどが逸話的な症例報告として記載されてきているが, てんかんの猫を対象とした, 一つの大規模コホート研究においてHSおよびGCPが報告されている⁹⁾。

家族性自然発症性てんかん猫（FSEC）は, 自然発症性てんかんを呈する唯一の猫の系統であり, その家族集積性から遺伝的素因が強く疑わ

¹⁾ 日本獣医生命科学大学臨床獣医学部門治療学分野I
〔〒180-8602 東京都武蔵野市境南町1-7-1〕

²⁾ 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室
〔〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1〕

れている。FSECは2009年にコロニーとして確立されて以降¹⁰⁾、日本獣医生命科学大学にて系統維持されている。FSECコロニーは多数のてんかん発症個体を含む、大規模な多世代の核家族から構成される。FSECsは反復性のてんかん発作以外は健常であり、それらは多様な発作頻度を呈する。FSECsは2つの臨床的発作型を示し、いくつかのFSECsは2つ、あるいは1つの発作型を示すが、中には臨床的な発作を呈さないFSECsも存在する。二次性全般化を伴う、あるいは伴わない自然発症性の焦点性辺縁系発作はFSECsにて認められる発作型の1つである。この発作型は辺縁系キンドリグおよび/あるいはカイニン酸てんかんモデルに類似し¹¹⁾、同時にペットの猫においても最も一般的な発作型である^{12, 13)}。一方、前庭刺激誘発性全般性てんかん発作はFSECsにおいて認められる、もう一つの発作型であり、これは遺伝性てんかんを呈するELマウスが示す発作型に類似する¹⁴⁾。キンドリグ/カイニン酸モデルおよびELマウスはいずれもMTLEのモデルとして、てんかん研究で広く用いられているため、FSECsは人および猫の自然発症の遺伝性TLEモデルとなりうる。我々はこれまでに、臨床的、電気生理学的、および磁気共鳴画像 (MRI) 所見を報告しており、それらはMTLEの所見に類似する^{15, 16, 17, 18)}。これらの研究によって、FSECは家族性内側側頭葉てんかんfamilial mesial temporal lobe epilepsy (FMTLE) の動物モデルであることが示唆されている。

本研究の目的は、FSECsの海馬および扁桃体における微小構造変化を評価することである。そのため、我々はHS、AS、MFS、およびGCPといったてんかん関連性病理学的変化を調査し、臨床的に正常かつFSECsと血縁のない猫と比較した。

2. 材料および方法

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て行われている (承認番号: 26K-29, 27K-10, 28K-4; 研究代表者: 長谷川大輔)。

2. 1 供試動物

本研究には、前述した日本獣医生命科学大学臨床獣医学部門治療学分野Iにて飼育・維持されているFSECコロニーより、てんかん発作を呈する6頭のFSECs (反復性自発性辺縁系発作を呈する3頭および前庭刺激誘発性全般性発作を呈する3頭) が供された。発作を呈する6頭のFSECsの発作頻度は散発的または稀であり、概して1年間に平均1または2回の発作頻度であった。これらの猫の発作発症年齢の中央値は8.5ヶ月齢であり (範囲: 3-16ヶ月)、てんかん罹患期間の中央値は41.4ヶ月 (範囲: 7-87ヶ月) であった。これらFSECsがsubclinical seizuresを呈していた可能性は否定できない。FSECsは3頭がオスであり、3頭がメスであった。FSECsの年齢中央値は52.5ヶ月齢 (範囲: 15-96ヶ月) であり、体重中央値は3.8 kg (範囲: 3.4-4.4 kg) であった。

発作の既往歴または神経学的異常を有さず、かつFSECsと血縁関係にない9頭のage matchingされた健常猫 (3頭のオスと6頭のメス) が対照群として供された。対照群の中央年齢値は81.0ヶ月齢 (範囲: 31-138ヶ月齢) であり、これはFSECsと有意な差は呈さなかった ($P = 0.175$; Mann-Whitney U検定)。体重の中央値は3.4 kg (範囲: 3.2-3.8 kg) であった。

さらに、FSECコロニーの第一世代の親であり、てんかん発作を呈さない3頭の個体 (2頭のメス, 1頭のオス) も含められた。中央年齢値は130ヶ月 (範囲: 108-142ヶ月)、および体重の中央値は3.3 kg (範囲: 2.5-4.2 kg)。

2. 2 脳組織採取

すべての猫はペントバルビタール (100mg/kg) の静脈経由過剰投与により安楽死された。6頭のFSECs, 3頭の健常猫, および3頭のFSECsの親猫は10%中性緩衝ホルマリン液にて直ちに固定された。残りの6頭の健常猫に関しては、脳の片側半球のみが10%中性緩衝ホルマリン液にて直ちに固定され、残りの半球は今後の研究のため、凍結保存された。

固定完了後、脳は前頭葉、線条体、扁桃体、海馬、中脳、延髄および小脳のレベルにて横断

面にて切断された。すべての脳スラブは、段階的濃度のエタノール浸漬に続く、キシレンにより脱水を行った。組織はパラフィンにて包埋され、4 μm のスライス厚にて薄切された。

2. 3 組織学的および免疫組織化学的解析

常法を用いて、H&E染色およびKlüver-Barrera染色を実施した。免疫組織化学は、神経細胞数およびgliosis, GCP, MFSを評価するために neuron-specific nuclear protein (NeuN), GFAP, およびdynorphin Aを用いて実施した。組織断面は脱パラフィンされ、GFAP染色を除くすべての免疫組織化学において、抗原賦活化のため10 mMクエン酸緩衝液に浸漬した状態で120 $^{\circ}\text{C}$ 、10分間の熱処理をオートクレーブにて行った。その後、スライド標本は内因性ペルオキシダーゼ活性の不活化のため3%過酸化水素メタノール溶液で30分浸漬し、5%スキムミルク入りトリス緩衝生理食塩水にて37 $^{\circ}\text{C}$ 、30分処理し、非特異的な抗原結合を抑制した。その後、スライド標本はトリス緩衝生理食塩水にて希釈した一次抗体を用いて、室温10分、37 $^{\circ}\text{C}$ 40分、室温10分にて反応させた。二次抗体としてhorseradish peroxidase (HRP) 標識ポリマー試薬（抗ウサギまたはマウスIgG, EnVision+ System, DAKO, CA, USA）を使用し、室温10分、37 $^{\circ}\text{C}$ 40分、室温10分で反応させた。発色にはトリス塩酸バッファーにて過酸化水素と3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩（同仁化学研究所、熊本、日本）を溶解し、行った。発色後、抗NeuNスライドではメチル・グリーンを、その他のスライドではメイヤー・ヘマトキシリンを用いて細胞質染色を行った。

2. 4 形態解析およびデジタル画像の取得

海馬の垂領域であるCA1-4¹⁹⁾を評価した。海馬においては、神経細胞数, gliosis, GCP, MFSを評価した。本研究では、既報の研究にて扁桃体の詳細な核に関して、記載された局在位置および命名法を用いた²⁰⁾。しかし、扁桃体のそれぞれの領域において正確にそれらを区別することは困難な場合がある²¹⁾。その

ため、我々は視覚的に判断が容易な3つの扁桃体の核において、神経細胞数およびgliosisを評価した（すなわち、中心核、外側核、および基底外側核）。さらに、海馬および扁桃体以外の領域を含むすべての標本は、限局性皮質形成異常症やその他の異常の存在の有無に関して評価された。すべての標本における組織像は、デジタルカメラ（DXM 1200F, Nikon, 東京、日本）およびソフトウェア（ACT-1 software, Nikon, 東京、日本）を搭載した顕微鏡（BX 50, Olympus, 東京、日本）を用いて撮影した。画像解析は画像解析ソフト（Image J, NIH, MD, USA）を用いて、すべての解析はブラインド条件下で、ひとりの測定者が実施し、神経細胞数の計測に関してはすべての標本において4回計測した平均値が統計解析に用いられた。

2. 5 神経細胞数の評価

各垂領域における100 $\times$ 倍率像の領域（830 $\times$ 664 μm ）内に存在するNeuN陽性神経細胞核を、Image J（National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA；<https://imagej.nih.gov/ij/>）を用いて、手動的にタグ付けすることにより測定した。計測時に標本は匿名化された。NeuN免疫反応性細胞核はコンピューター・スクリーン上にてタグ付けされ、それぞれの海馬垂領域（つまり、CA1-4）、歯状回の顆粒細胞層、および扁桃体の3つの核（つまり、中心核、外側核、および基底外側核）ごとに計測された。細胞はそれぞれの領域において4回、独立に計測された。さらに、CA4の計測に関しては2つの重複しない関心領域（830 $\times$ 664 μm の範囲内にてそれぞれ300 $\times$ 300 μm ）を含んだ。これはCA4垂領域において、いくつかの画像に置いてCA4以外の構造物の含有が存在したため、CA4計測時に特異的に本計測方法を用いた。CA4を除いて、すべての細胞数測定はそれぞれのスライドにおけるNeuN免疫反応神経細胞の総数の平均値の算出により得られた；ユニット領域（0.55 mm^2 ）ごとの神経細胞数が算出された。CA4におけるユニット領域は2つの関心領域に相当し（0.18 mm^2 ）、総細胞数の平均値はユニットごとに決定された。

2. 6 Gliosisの評価

gliosisの評価は、Image JプラグインRGB法を用いて、GFAP免疫反応性の決定により定量的に評価した。gliosisは、100倍視野にて撮影した、GFAP染色標本において(830×664 μm)、CA1-CA3にかけて評価された。神経細胞数の評価と同様に、CA3や歯状回といった他の構造物の混入をさけるべく、2つの重複しない関心領域(830×664 μmの範囲内にて2つの300×300 μmの関心領域)にてGFAP免疫反応性は同様に測定された。

2. 7 苔状線維の発芽の評価

MFSは人の組織サンプルにおいて用いられるgrading system^{3, 22)}を適用することにより、dynorphin A染色標本において評価された。Grade 0はCA3およびCA4における正常な苔状線維経路、Grade 1は内分子層における限局性のMFS、Grade 2は分子層におけるMFSの広い帯の存在に相当する。

2. 8 顆粒細胞層の病理学的変化の評価

Blümcke et al¹⁴⁾によって、提案された顆粒細胞の病理学的変化に関する分類と定義を、本研究では歯状回の評価に用いた。歯状回は、構造のそれぞれ1/3を構成する3つの領域に分割された：歯状回の内側部分(内脚)、CA2およびCA4の間に位置する歯状回の外側部分(外脚)、内脚と外脚の間に位置する中部^{4, 23)}。垂直線上にて細胞層の細胞数により反映される、顆粒細胞層の厚みはNeuN染色標本において、内脚および外脚における3つの湾曲していない領域にて計測した。それら3つの領域のそれぞれにおける細胞層の平均の長さおよび平均細胞層数が統計解析に用いられた。

2. 9 統計解析

海馬の背側面および腹側面を独立して評価した。3頭のFSECsの親個体と他の2群との統計学的比較は行わなかった。その代わりに、FSEC群と対照群との比較の結果を考慮するときに、それらの所見を支持的な根拠として用いた。

したがって、FSEC群と対照群のみを統計

学的に比較した。データは中央値と四分位範囲(QD)にて示された。FSEC群と対照群間のすべての統計学的解析は、統計ソフトウェア(EZR, さいたま医療センター, 埼玉, 日本)にてMann-Whitney U検定を用いて実施した。統計解析結果は $P < 0.05$ にて有意であると示した。

3. 結果

3. 1 組織学的検査および免疫組織化学解析

海馬および扁桃体のスライドを除いて、H&E染色およびKlüver-Barrera染色を施した全脳の精査にて、いずれの群においても、明白な構造的異常(例えば、限局性皮質形成異常症)は認められなかった。

対照群と比較した際、FSEC群の海馬の背側面($P = 0.010$)および腹側面($P = 0.002$)のCA3において有意なNeuN陽性神経細胞の減少が認められた(Fig. 1)。CA3の結果と対照的に、海馬の背側面および腹側面のCA1, CA2およびCA4において、FSEC群と対照群間に有意差は認められなかった。それぞれのFSECs個体間にて海馬における明白な病理学的差異は存在しなかった。さらに、FSEC群、対照群、およびFSECsの第一世代の親猫の海馬における背側および腹側面のCA3の神経細胞数を比較すると、見かけの減少傾向が認められた(Fig. 1)。

海馬のGFAP免疫反応性において、FSEC群と対照群間に、海馬の腹側面のCA4において有意差が認められた($P = 0.015$)(Fig. 2)。

さらに、対照群と比較し、FSECs群は扁桃体の中心核にて神経細胞数の有意な減少($P < 0.001$)を呈した。しかし、2群間において、扁桃体の基底外側核と外側核における神経細胞数に関して、有意差は認められなかった(Fig. 3)。各々のFSECs間において、扁桃体の明白な病理学的差異は認められなかった。さらに、扁桃体のいずれの核においてもGFAP免疫反応性に関して有意差は認められなかった。加えて、FSECsの親猫の中心核においても、神経細胞数の見かけの減少傾向が認められた(Fig. 3)。

CA4とCA3はdynorphin Aに強い染色性を示

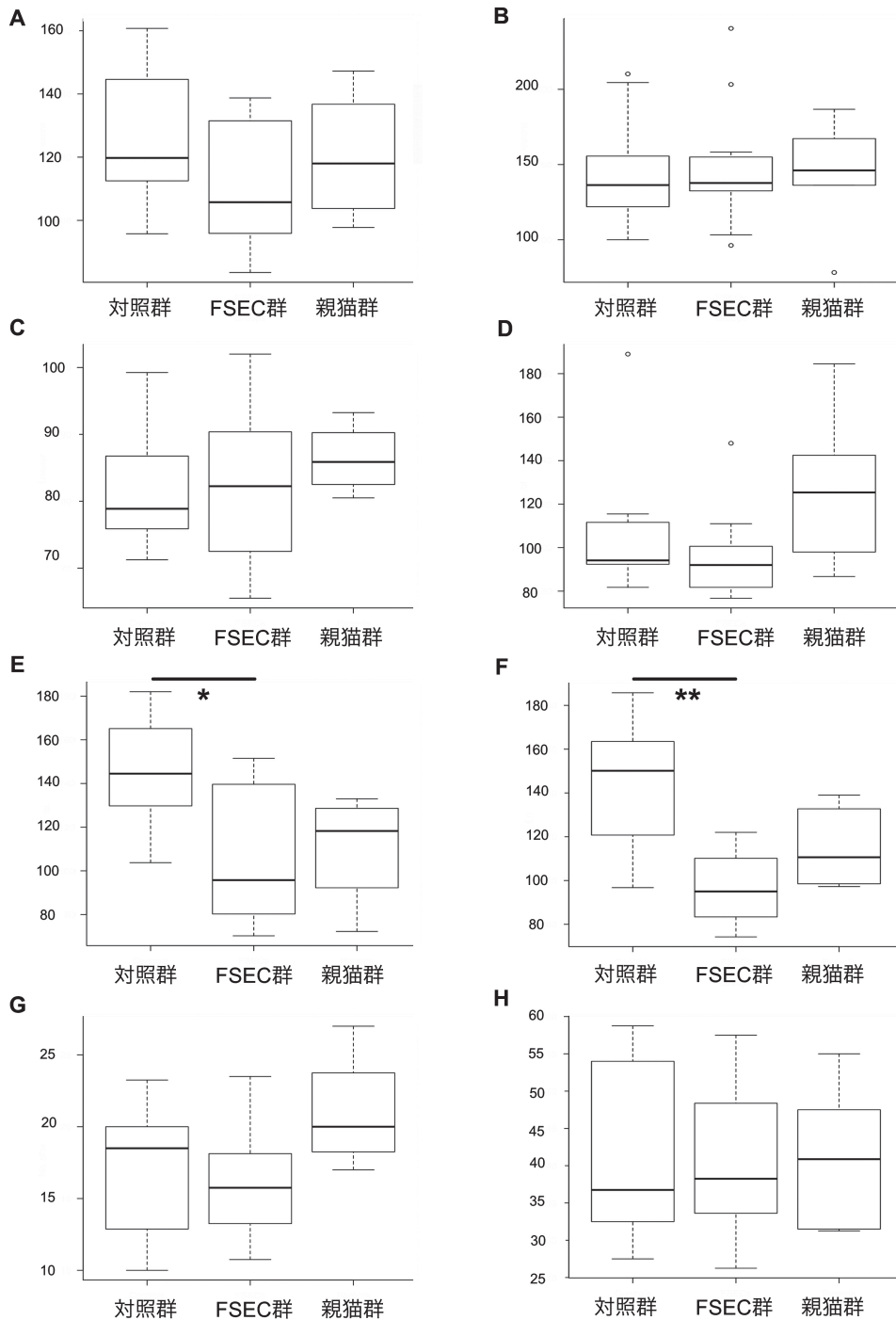


Fig. 1 健常対照群, FSEC群および未発症の親猫群の海馬の背側 (A,C,E,G) および腹側面 (B,D,F,H) のCA1 (A,B), CA2 (C,D), CA3 (E,F), およびCA4 (G,H) におけるNeuN陽性細胞数の箱ひげ図。全てのパネルにおいて, y軸は神経細胞数を示す。箱ひげ図において, それぞれの箱は四分位範囲の上限および下限を示し, 水平線は中央値を示し, ひげは外れ値を除いた最大値および最小値を示す。外れ値は円で示した。パネルごとにy軸のスケールが異なることに注目。*, **海馬の背側あるいは腹側面内の亜領域内において, 対照群の値と有意に値が異なる (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

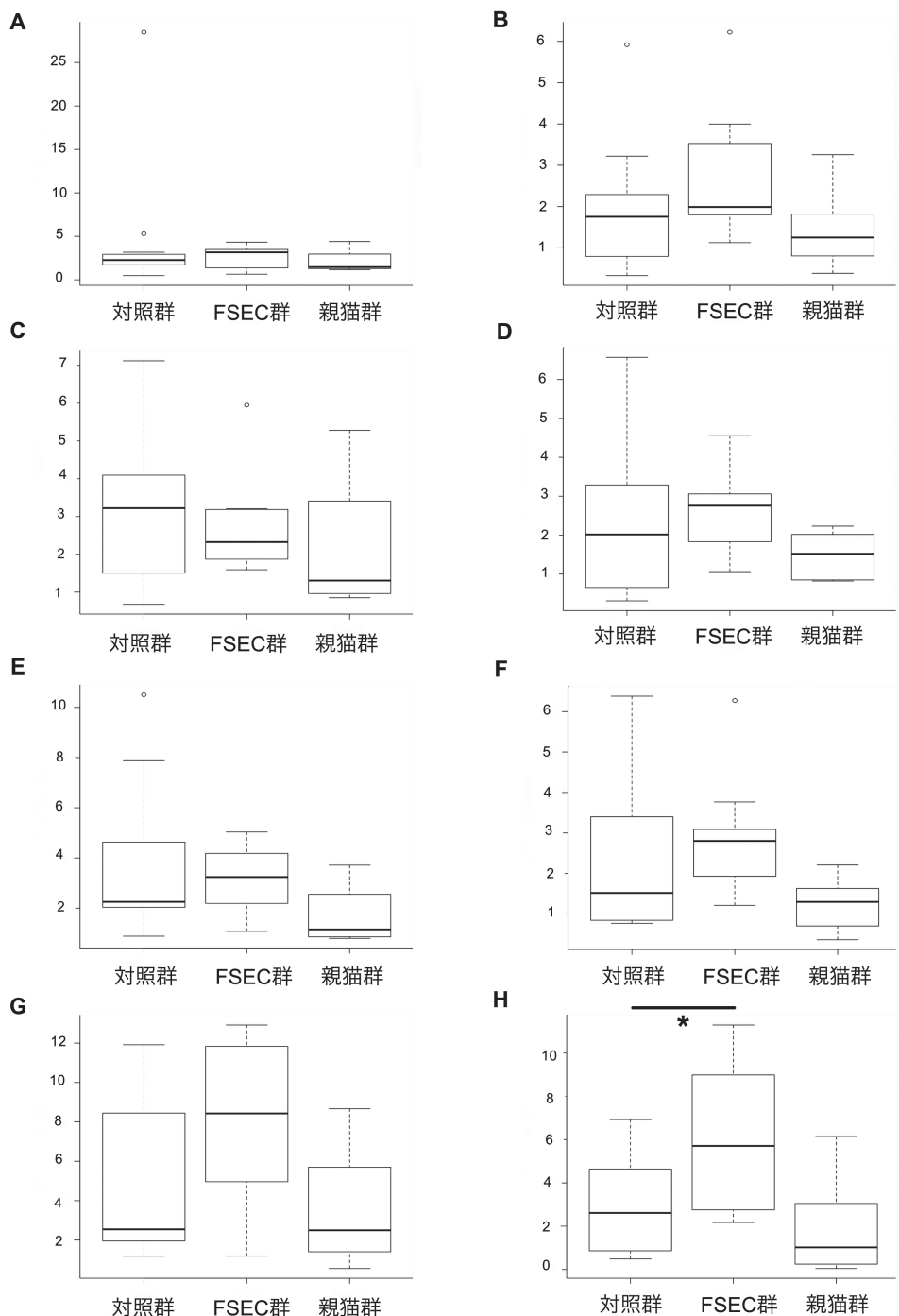


Fig. 2 健常対照群、FSEC群および未発症の親猫群の海馬の背側 (A,C,E,G) および腹側面 (B,D,F,H) のCA1 (A,B), CA2 (C,D), CA3 (E,F), およびCA4 (G,H) におけるGFAP免疫反応性の箱ひげ図。全てのパネルにおいて、y軸はGFAP免疫反応率を示す。箱ひげ図において、パネルごとにy軸のスケールが異なることに注目。残りの点に関してはFig. 1を参照のこと。

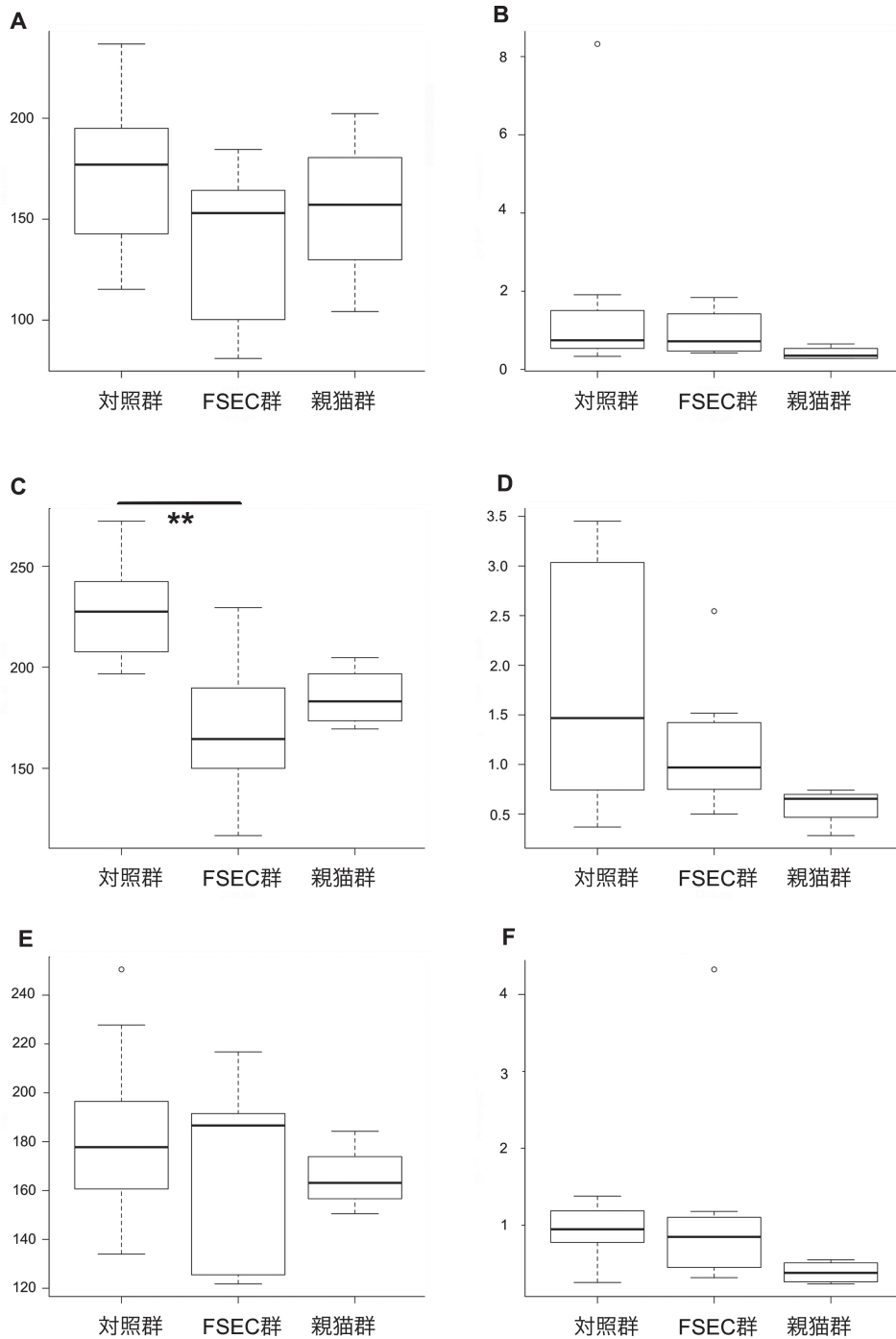


Fig. 3 健常対照群、FSEC群および未発症の親猫群の扁桃体の基底外側核 (A,B), 外側核 (C,D), および中心核 (E,F) におけるNeuN陽性の神経細胞数 (A,C,E) およびGFAP免疫反応性 (B,D,F) の箱ひげ図。パネルA,C,Eにおいてy軸は神経細胞数を示し、パネルB,D,Fにおいてy軸はGFAP免疫反応率を示す。箱ひげ図において、パネルごとにy軸のスケールが異なることに注目。残りの点に関してはFig. 1を参照のこと。

し、CA1に向かって徐々に染色性は低下した。すべての猫はMFSに関して、Grade 0を呈した。

顆粒細胞層の長さとの中央値に関して、FSEC群と対照群間にて、顆粒細胞の病理学的変化に差異は認められなかった。同様に、いずれの群においても、異所性細胞、二分層化、集簇、あるいは顆粒細胞層の乖離といった多様な変化は認められなかった。顆粒細胞層の厚みの長さおよび層の数（細胞数）は、背側歯状回において、FSEC群では外脚が76.81 μm (QD: 6.82 μm) および6.33個 (QD: 0.41個)、内脚が77.73 μm (QD: 5.79 μm) および6.67個 (QD: 0.54個) に対し、対照群では外脚が73.65 μm (QD: 2.62 μm) および6.33個 (QD: 0.08個)、内脚が65.36 μm (QD: 5.35 μm) および6.17個 (QD: 0.38個) であった。腹側歯状回において、FSEC群では外脚が71.48 μm (QD: 3.96 μm) および5.50個 (QD: 0.50個)、内脚が70.30 μm (QD: 3.18 μm) および5.67個 (QD: 0.50個) に対し、対照群では外脚が70.28 μm (QD: 7.00 μm) および6.00個 (QD: 0.38個)、内脚が69.67 μm (QD: 5.86 μm) および5.67個 (QD: 0.33個) であった。FSEC群および対照群間にて、有意差は認められなかった ($P \geq 0.05$)。

4. 考察

獣医学領域において、猫における海馬硬化あるいは海馬壊死症 feline hippocampal necrosis についての病理学的報告がされてきているが^{9, 24, 25, 26)}、これらとは対照的に、我々はFSECsにおける海馬の背側および腹側面のCA3における、gliosisを伴わない神経細胞数の有意な減少を認めた。CA3に認められた、gliosisを伴わない神経細胞の減少はFSECコロニーにおける遺伝的浮動によって生じている可能性は考えられるが、この微かな海馬の変化はてんかん発作を引き起こす因子の一つである可能性は存在する。人のFMTLEにおける、ある研究において、孤発性MTLEと同様の細胞脱落が報告されている一方¹⁾、別の研究では、FMTLEのある患者では錐体細胞層または歯状回における神経細胞脱落の根拠は存在しないと報告された²⁷⁾。これら

以前に報告された研究と本研究の結果を考慮すると、FMTLEは臨床的所見のみならず、顕微鏡的所見の観点からも不均一な疾患であることが示唆される。さらに、FSECsの扁桃核中心核にもgliosisを伴わない有意な神経細胞数の減少が認められた。TLEの人患者^{21, 28)}やてんかん患者の突然死²⁹⁾における扁桃体の外側核における神経細胞脱落、さらに実験的に誘発されたてんかん重積を呈する動物における扁桃体の基底外側核³⁰⁾および複合領域³¹⁾における神経細胞脱落が報告されており、それらは重度なてんかん発作の結果であると考えられている。対照的に、本研究は、対照群と比較した際のFSECsにおける扁桃体中心核および海馬CA3での神経細胞数の減少を報告する。

FSECsは海馬CA3および扁桃体中心核において神経細胞の減少を呈しており、それらは部分的に発作発生に関連している可能性がある。人における海馬異常は遺伝する可能性があるが、それが必ずしもてんかんにつながるわけではないことが示唆されている^{32, 33)}。本研究において、FSECsの発作を呈さない親個体においても、海馬CA3および扁桃体中心核において、神経細胞数の見かけの減少が認められた。したがって、本研究によって、海馬と扁桃体における神経細胞数の減少はFSECsのendophenotypeである可能性あり、それらは発作感受性に関連しているのかもしれないことが示唆される。このFSECにおけるendophenotypeの可能性は、FMTLEは海馬および扁桃体異常につながる主要な遺伝子を包含しており、表現型はさらなる遺伝性または環境因子によって影響を受けている可能性³⁴⁾を支持するかもしれない。

前述した神経細胞数の減少に加えて、gliosisはFSECsのCA4に限局しており、これはHSの国際的コンセンサス²⁾におけるカテゴリー上“*No hippocampal sclerosis, gliosis only*”に相当する。TLE症例において、海馬の病理学的変化のこの型は20%にて認められていると報告されている。“*No hippocampal sclerosis, gliosis only*”カテゴリーに相当するこの所見は、TLEの自然モデルであるELマウスに認められると報告されている³⁵⁾。しかしながら、“No

hippocampal sclerosis, gliosis only”は、HSがてんかんの原因であり結果であるのと同様に、原因であるのか結果であるのかを結論付けることは単純ではない³⁶⁾。しかし、FSECsとそれらの親の両者にて認められた神経細胞数の減少とは対照的に、発作を呈するFSECsのみにてgliosisが認められた事実は、この病変がてんかんに関連していることを示唆するだろう。海馬の腹側面においてCA4のgliosisが認められ、これは猫の海馬の腹側面が、人において、てんかん関連性変化が最も一般的に生じる³⁷⁾、海馬頭部のhomologueである³⁸⁾という事実と一致する。したがって、“No hippocampal sclerosis, gliosis only”がてんかん発作の原因または結果であることを確定することは不可能であるものの、FSECsのCA4におけるgliosisは反復性の発作の結果である可能性を我々は推測する。

HSまたは、それに関連する変化（すなわち、GCPやMFS）は本研究における猫では認められなかった。HSの程度とGCPとの関連性が人⁵⁾と猫⁹⁾において報告されている。さらに、dynorphin A免疫反応性を用いたMFSのgradeはGCPと相関することも報告されている⁶⁾。これら報告は、FSECsがGCPまたはMFSのいずれも呈さなかった理由となるだろう。

本研究は幾らかの制限を含む。まず、本研究に用いられたFSECsの発作頻度は比較的少ない。FSECコロニーは世界で唯一の遺伝性（が疑われる）てんかんの猫としての価値を考慮すると、発作頻度の高い猫を本研究に優先的に用いることが困難であった。さらに、本研究に利用可能であったFSECsの数も限定的であった、本研究ではいくらかの要因（例えば、HS、GCP、およびMFS）の組織学的検査が実施される必要があった。したがって、神経細胞数計測のため組織を粉碎する必要性のあるisotropic fractionator法を用いることはできなかった³⁹⁾。しかしながら、本研究で用いられた神経細胞マーカーであるNeuNは確立されたマーカーであり⁴⁰⁾、視覚検査による手動測定方法を容易に実施することができる。我々は立体解析学を用いていないため、微かな測定誤差が生じた可能性を除外することはできないものの、NeuN免

疫組織化学解析を含む容易な手動測定法を用いた。

5. 結語

FSECの海馬CA3および扁桃体中心核において、gliosisを伴わない神経細胞数の減少を認めた。この変化はFSEC家系におけるendophenotypeである可能性が示唆された。また、FSECでは海馬CA4において神経細胞脱落を伴わないgliosisを認めた、FSECのてんかんに関連していると考えられる。

6. 付記

なお、本研究は“Neuropathological features of the hippocampus and amygdala in familial spontaneous epileptic cats”としてAmerican Journal of Veterinary Research誌79号3巻、324～332項（2018年）にて公表されている。

7. 参考文献

- 1) Andrade-Valença LP, Valença MM, Velasco TR, Carlotti CG Jr, Assirati JA, Galvis-Alonso OY, et al. Mesial temporal lobe epilepsy: clinical and neuropathologic findings of familial and sporadic forms. *Epilepsia* 2008 ; **49** : 1046-54.
- 2) Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* 2013 ; **54** : 1315-29.
- 3) Bandopadhyay R, Liu JY, Sisodiya SM, Thom M. A comparative study of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis in epilepsy and dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014 ; **40** : 177-90.
- 4) Blümcke I, Kistner I, Clusmann H, Schramm J, Becker AJ, Elger CE, et al. Towards a clinicopathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. *Acta Neuropathol* 2009 ; **117** : 535-44.
- 5) Thom M, Sisodiya SM, Beckett A, Martinian L, Lin WR, Harkness W, et al. Cytoarchitectural abnormalities in hippocampal sclerosis. *J*

- Neuropathol Exp Neurol 2002 ; **61** : 510-9.
- 6) Thom M, Martinian L, Catarino C, Yogarajah M, Koepp MJ, Caboclo L, et al. Bilateral reorganization of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis: a postmortem study. *Neurology* 2009 ; **73** : 1033-40.
 - 7) Hudson LP, Munoz DG, Miller L, McLachlan RS, Girvin JP, Blume WT. Amygdaloid sclerosis in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1993 ; **33** : 622-31.
 - 8) Yilmazer-Hanke DM, Wolf HK, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD, Blümcke I. Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000 ; **59** : 907-20.
 - 9) Wagner E, Rosati M, Molin J, Foitzik U, Wahle AM, Fischer A, et al. Hippocampal sclerosis in feline epilepsy. *Brain Pathol* 2014 ; **24** : 607-19.
 - 10) Kuwabara T, Hasegawa D, Ogawa F, Kobayashi M, Fujita M, Suzuki H, et al. A familial spontaneous epileptic feline strain: a novel model of idiopathic/genetic epilepsy. *Epilepsy Res* 2010 ; **92** : 85-8.
 - 11) Kitz S, Thalhammer JG, Glantschnigg U, Wrzosek M, Klang A, Halasz P, et al. Feline Temporal Lobe Epilepsy: Review of the Experimental Literature. *J Vet Intern Med* 2017 ; **31** : 633-640.
 - 12) Pakozdy A, Sarchahi AA, Leschnik M, Tichy AG, Halasz P, Thalhammer JG. Treatment and long-term follow-up of cats with suspected primary epilepsy. *J Feline Med Surg* 2013 ; **15** : 267-73.
 - 13) Wahle AM, Brühshwein A, Matiassek K, Putschbach K, Wagner E, Mueller RS, et al. Clinical characterization of epilepsy of unknown cause in cats. *J Vet Intern Med* 2014 ; **28** : 182-8.
 - 14) King JT Jr, LaMotte CC. El mouse as a model of focal epilepsy: a review. *Epilepsia* 1989 ; **30** : 257-65.
 - 15) Hasegawa D, Mizoguchi S, Kuwabara T, Hamamoto Y, Ogawa F, Matsuki N, et al. Electroencephalographic features of familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Res* 2014 ; **108** : 1018-25.
 - 16) Mizoguchi S, Hasegawa D, Kuwabara T, Hamamoto Y, Ogawa F, Fujiwara A, et al. Magnetic resonance volumetry of the hippocampus in familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Res.* 2014 ; **108** : 1940-4.
 - 17) Mizoguchi S, Hasegawa D, Hamamoto Y, Yu Y, Kuwabara T, Fujiwara-Igarashi A, et al. Interictal diffusion and perfusion magnetic resonance imaging features of cats with familial spontaneous epilepsy. *Am J Vet Res.* 2017 ; **78** (3) : 305-310.
 - 18) Hamamoto Y, Hasegawa D, Mizoguchi S, Yu Y, Wada M, Kuwabara T, et al. Changes in the interictal and early postictal diffusion and perfusion magnetic resonance parameters in familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Res.* 2017 ; **133** : 76-82.
 - 19) Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 1934 ; **46** : 113-177.
 - 20) Marcos P, Coveñas R, Narváez JA, Diaz-Cabiale Z, Aguirre JA, Tramu G, et al. Immunohistochemical mapping of enkephalins, NPY, CGRP, and GRP in the cat amygdala. *Peptides* 1999 ; **20** : 635-44.
 - 21) Wolf HK, Aliashkevich AF, Blümcke I, Wiestler OD, Zentner J. Neuronal loss and gliosis of the amygdaloid nucleus in temporal lobe epilepsy. A quantitative analysis of 70 surgical specimens. *Acta Neuropathol.* 1997 ; **93** : 606-10.
 - 22) Martinian L, Catarino CB, Thompson P, Sisodiya SM, Thom M. Calbindin D28K expression in relation to granule cell dispersion, mossy fibre sprouting and memory impairment in hippocampal sclerosis: a surgical and post mortem series. *Epilepsy Res* 2012 ; **98** : 14-24.
 - 23) Pauli E, Hildebrandt M, Romstöck J, Stefan H, Blümcke I. Deficient memory acquisition in temporal lobe epilepsy is predicted by hippocampal granule cell loss. *Neurology* 2006 ; **67** : 1383-9.
 - 24) Pakozdy A, Gruber A, Kneissl S, Leschnik M, Halasz P, Thalhammer JG. Complex partial cluster seizures in cats with orofacial involvement.

- J Feline Med Surg 2011 ; **13** : 687-93.
- 25) Klang A, Schmidt P, Kneissl S, Bagó Z, Vincent A, Lang B, et al. IgG and complement deposition and neuronal loss in cats and humans with epilepsy and voltage-gated potassium channel complex antibodies. J Neuropathol Exp Neurol 2014 ; **73** : 403-13.
 - 26) Fors S, Van Meervenne S, Jeserevics J, Rakauskas M, Cizinauskas S. Feline hippocampal and piriform lobe necrosis as a consequence of severe cluster seizures in two cats in Finland. Acta Vet Scand 2015 ; **57** : 41.
 - 27) Crompton DE, Scheffer IE, Taylor I, Cook MJ, McKelvie PA, Vears DF, et al. Familial mesial temporal lobe epilepsy: a benign epilepsy syndrome showing complex inheritance. Brain 2010 ; **133** : 3221-31.
 - 28) Yilmazer-Hanke DM, Faber-Zuschratter H, Blümcke I, Bickel M, Becker A, Mawrin C, et al. Axo-somatic inhibition of projection neurons in the lateral nucleus of amygdala in human temporal lobe epilepsy: an ultrastructural study. Exp Brain Res. 2007 ; **177** : 384-99.
 - 29) Thom M, Griffin B, Sander JW, Scaravilli F. Amygdala sclerosis in sudden and unexpected death in epilepsy. Epilepsy Res 1999 ; **37** : 53-62.
 - 30) Figueiredo TH, Qashu F, Aplan JP, Aroniadou-Anderjaska V, Souza AP, Braga MF. The GluK1 (GluR5) Kainate/ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor antagonist LY293558 reduces soman-induced seizures and neuropathology. J Pharmacol Exp Ther 2011 ; **336** : 303-12.
 - 31) Tuunanen J, Lukasiuk K, Halonen T, Pitkänen A. Status epilepticus-induced neuronal damage in the rat amygdaloid complex: distribution, time-course and mechanisms. Neuroscience 1999 ; **94** : 473-95.
 - 32) Kobayashi E, Li LM, Lopes-Cendes I, Cendes F. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal sclerosis in asymptomatic, first-degree relatives of patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. Arch Neurol 2002 ; **59** : 1891-4.
 - 33) Suemitsu LA, Yasuda CL, Morita ME, Beltramini GC, Coan AC, Bergo F, Lopes-Cendes I, Cendes F. Longitudinal analysis of hippocampal T2 relaxometry in FMTLE. Epilepsy Behav 2014 ; **36** : 154-8.
 - 34) Cendes F, Sakamoto AC, Spreafico R, Bingaman W, Becker AJ. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. Acta Neuropathol. 2014 ; **128** : 21-37.
 - 35) Drage MG, Holmes GL, Seyfried TN. Hippocampal neurons and glia in epileptic EL mice. J Neurocytol. 2002 ; **31** : 681-92.
 - 36) Walker MC. Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention. Semin Neurol 2015 ; **35** : 193-200.
 - 37) Thom M, Liagkouras I, Martinian L, Liu J, Catarino CB, Sisodiya SM. Variability of sclerosis along the longitudinal hippocampal axis in epilepsy: a post mortem study. Epilepsy Res 2012 ; **102** : 45-59.
 - 38) Sasaki M, Tohyama K, Matsunaga S, Nakamura M, Tomizawa N, Inoue T, et al. MRI identification of dorsal hippocampus homologue in human brain. Neuroreport. 2004 ; **15** : 2173-6.
 - 39) Herculano-Houzel S, von Bartheld CS, Miller DJ, Kaas JH. How to count cells: the advantages and disadvantages of the isotropic fractionator compared with stereology. Cell Tissue Res 2015 ; **360** : 29-42.
 - 40) Gusel'nikova VV, Korzhhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. Acta Naturae 2015 ; **7** : 42-7.

Summary

Neuropathological features of the hippocampus and amygdala in familial spontaneous epileptic cats

Daisuke Hasegawa, Yoshihiko Yu, Yuji Hamamoto, Chambers K. James, Kazuyuki Uchida

Familial spontaneous epileptic cat (FSEC) is a feline strain that exhibits limbic and generalized seizures, and it is recognized as a natural animal model of familial temporal lobe epilepsy (TLE). In this study, we investigated neuropathological changes, including hippocampal sclerosis (HS), amygdaloid sclerosis (AS), mossy fiber sprouting (MFS) and granule cell pathology (GCP) in FSECs. Neuropathological evaluations were conducted on FSECs and normal controls. The evaluations were performed immunohistochemically in addition to the conventional stainings. In FSECs, typical HS and AS were not found, however, significant neuronal decreases without gliosis in the CA3 of the dorsal and ventral hippocampi as well as the central nucleus (CE) of the amygdala were observed. In addition, gliosis without neuronal loss in the ventral CA4 was also found. No changes in MFS or GCP were detected. Meanwhile, more mild but similar changes were also observed in the asymptomatic parents of FSECs. Our findings suggest that decreased neuronal number in the hippocampal CA3 and amygdaloid CE are an endophenotype of FSEC, which could be associated with genetically prone epilepsy of FSEC. These findings support a hypothesis that some forms of genetic epilepsy, such as familial TLE, involve subtle hippocampal and amygdaloid abnormalities.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2018 ; 29 : 31-42