

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 比較自由與限制行動大鼠之錳離子增強功能性磁振造 *
* 名稱 影 *
* ***** *

執行計畫學生： 林愷翊
學生計畫編號： MOST 103-2815-C-040-061-B
研究期間： 103年07月01日至104年02月28日止，計8個月
指導教授： 田雨生

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學影像暨放射科學系

中華民國 104年03月30日

摘要

大腦功能造影是目前最重要的科研方向之一，而某些研究需要先經過動物實驗方可轉譯至人腦研究上，而目前非侵入式研究動物大腦功能常使用磁振造影，其中又以血氧濃度相依功能性磁振造影技術(blood oxygenation level dependent contrast functional MRI, BOLD fMRI)最為普遍，但在 BOLD fMRI 實驗過程中，動物需要在麻醉的情況下給予刺激，如此一來會改變動物的生理狀況，其次是由於常搭配 EPI (echo planar imaging) 等成像技術，BOLD fMRI 的影像解析度不高且容易有嚴重的假影產生。因此我們發展錳離子增強磁振造影技術(manganese-enhanced magnetic resonance imaging, MEMRI)，並透過大腦皮質區直接注射錳離子顯影劑的方式，不僅能夠避開血腦障壁(blood-brain barrier, BBB)的阻擋，提高錳離子的注射劑量與影像的訊雜比(signal to noise ratio, SNR)，並且使用 MEMRI 技術，大鼠能在正常的生理狀態下接受刺激，在大鼠接受刺激的同時，錳離子會經由鈣離子通道進入活化的神經細胞並累積在神經細胞內，刺激時不需同時取像，取像時也不需要 EPI 等快速造影技術，而改為使用傳統的 gradient echo 及 spin echo sequence 進行造影，影像的解析度較好也較不容易產生假影，神經活化的區域將有錳離子累積，並在 T1 權重影像下呈現亮訊號，提供更精確的功能區位置資訊。本研究希望能利用 MEMRI 技術的上述優點，並透過比較限制行動大鼠與自由活動大鼠的錳離子顯影情形，驗證運動行為和運動皮質間的神經傳導關係，希望能透過本次實驗，提供動物神經科學實驗上限制行動大鼠與自由活動大鼠之間大腦功能反應的差異，證實此新技術應用於神經科學實驗的可行性。

目 錄

摘要	i
目錄	ii
第一章、導論	1
(一)研究動機與研究問題	1
(二)文獻回顧與探討	1
第二章、研究方法與步驟	3
(一)研究方法	3
(二)研究步驟	4
第三章、結果與討論	6
(一)平均影像	6
(二)R1 mapping影像	7
(三)相減及t-test影像	7
(四)Signal Intensity Ratio直方圖	8
第四章、結論	9
參考文獻	10

第一章、導論

(一) 研究動機與研究問題

目前動物實驗上非侵入式觀察動物大腦功能反應常使用血氧濃度依賴功能性磁振造影技術(BOLD fMRI)，在 BOLD fMRI 實驗過程中，動物需要在麻醉的情況下給予刺激，如此一來會改變動物的生理狀況，降低實驗的準確度，其次是由於常搭配使用 EPI 技術造影，BOLD fMRI 的影像解析度不高且容易有嚴重的假影產生。為了解決上述缺點，我們發展錳離子增強磁振造影技術(MEMRI)技術，配合大腦皮質區直接注射錳離子的方式，不僅能夠避開血腦障壁(BBB)的阻擋，還能提高錳離子的注射劑量與影像的訊雜比(SNR)，在 MEMRI 實驗過程中，我們能夠在正常的動物生理狀況下直接給予動物刺激，整個實驗的過程中動物無須麻醉，在取像時也不需要 EPI 等快速造影技術，而改為使用傳統的 gradient echo 及 spin echo sequence 進行造影，影像的解析度較好也較不容易產生假影，並提供了腦功能反應區高度的空間精確度。

綜合以上優點，本研究希望能透過 MEMRI 技術，有效的避免 BOLD fMRI 影像解析度不高且容易有嚴重的假影產生等缺點，藉由錳離子具有順磁性，在 T1 權重的 MR 影像下，錳離子累積的地方訊號會增強，呈現亮訊號，比較限制行動大鼠與自由活動大鼠錳離子顯影情形，驗證運動行為和運動皮質間之間的神經傳導關係，希望能透過本次實驗，提供動物神經科學實驗上限制行動大鼠與自由活動大鼠之間大腦功能反應差異，證實此新技術應用於神經科學實驗的可行性。

(二) 文獻回顧與探討

2-1 錳離子造影劑

MEMRI 使用錳離子(Mn^{2+})做為造影劑，錳離子是一種陽性造影劑(positive contrast agent)，所謂的陽性造影劑是指可以用來縮短 T1，在 T1 加權影像上面可以增強訊號，呈現明亮的影像。此種造影劑大部分為包含釧系元素、錳或是鐵離子的小分子量化合物。這些元素皆具有未成對電子和長的鬆弛速度[1]。由於錳離子具有和鈣離子相似的生理特性，可模仿鈣離子在生化環境中所扮演的角色[2]，藉由此特性錳離子可經由鈣離子通道進入活化的神經細胞，並累積在神經細胞內，錳離子在 3d 電子軌域中有 5 個未成對的電子，具有順磁性，它可以降低周圍氫原子的 T1 回復時間，在 T1 權重的 MR 影像下，錳離子子累積的地方訊號會增強，呈現亮訊號，提高影像的 SNR 可作為神經傳導路徑的示蹤劑及應用在視覺化自由活動動物的神經傳導路徑[3]。

然而，高濃度的錳離子同時也具有神經毒性(表 1: 錳離子的致死劑量[4])，腦細胞若長期暴露在高濃度的錳離子環境下，會出現錳中毒的症狀，在臨床上，

長期暴露在高濃度的錳離子環境中，會對運動神經系統產生影響[5]，這是MEMRI發展上一個很大的限制，目前MEMRI還停留在動物實驗，若將來欲應用在人體實驗，錳離子顯影劑並須先經過去毒性之藥物修飾。

表一: Toxicity data (LD₅₀) for MnCl₂

物種	途徑	劑量	備註
大鼠	口服	250 mg/kg	
	腹腔注射	147 mg/kg	嗜睡，活動能力降低，抽搐或癲癇發作
	靜脈注射	92.6 mg/kg	嗜睡，活動能力降低，抽搐或癲癇發作
	肌肉注射	700 mg/kg	
小鼠	口服	1031 mg/kg	顫抖，抽搐或癲癇發作
	腹腔注射	121 mg/kg	
	靜脈注射	38 mg/kg	嗜睡，活動能力降低，ataxia
	肌肉注射	255 mg/kg	
狗	靜脈注射	202 mg/kg	
幾內亞的豬	口服	916 mg/kg	顫抖

2-2 MEMRI

皮質和皮質下神經元的連接是理解大腦功能的一個重要層面。動物實驗上觀察動物腦部功能反應常使用BOLD fMRI，BOLD fMRI的改變受到CBF (cerebral blood flow), CBV(cerebral blood volume)及氧氣的消耗等等因素影響，進而在影像中形成對比[6]，考慮的因素較多，也較複雜。其次在BOLD fMRI實驗過程中，動物需要在麻醉的情況下給予刺激，如此一來會改變動物的正常生理狀況，降低實驗的準確度，由於BOLD fMRI必須快速取得影像，在造影過程中，會使用EPI技術，但EPI技術對被造物體的移動非常敏感，取得的影像解析度不高，容易在影像上產生嚴重的假影等種種問題仍尚待我們去解決。

相較之下，最新發展的錳離子增強磁振造影技術(MEMRI)提供了新的方法來視覺化體內的神經傳導路徑與功能反應區[7]。錳離子(Mn²⁺)具有和鈣離子(Ca²⁺)相似的離子半徑和相同的價電荷，因為這種特性，錳離子可經由鈣離子通道進入神經細胞[8]，由於神經系統沒有代謝錳離子之機制，因此錳離子會累積在神經細胞內，錳離子在3d電子軌域中有5個未成對的電子，具有順磁性，它可以降低周圍氫原子的T1回復時間，在T1加權影像上含有錳離子的神經細胞可以被突顯出來，錳離子累積的多寡正比於細胞活化的程度，與CBF, CBV及氧氣的消耗等等因素的改變無關，相較於BOLD fMRI受到CBF, CBV及氧氣的消耗等因素影響神經細胞的活化程度，MEMRI技術能夠更直接的反映神經細胞的活化的程度及神經活化的位置[6]，此外MEMRI是透過錳離子累積在活化的神經細胞中在影像上呈現亮訊號，動物接受刺激時不需同時造影，所以不需使用EPI等快速造影的技術，可直

接利用傳統的gradient echo及spin echo sequence進行造影，影像的解析度較好也較不容易產生假影。藉著施打錳離子到腦的特定位置及其周圍區域，MEMRI已經在許多不同的注射方式以及應用在不同的物種中得到驗證，如透過鼻內注射[9, 10] 或腦內注射[11]觀察齧齒動物嗅覺途徑；透過水晶體內注射觀察視覺路徑[9, 12, 13, 14]；採用立體定位注射觀察體感覺路徑[15, 16]和基底節途徑[17, 18] 相較於功能性核磁共振顯影，錳離子增強磁振造影顯影的信號提升率較高，提供一個能直接追蹤神經活動之方法。

第二章、研究方法與步驟

(一) 研究方法

1-1 實驗設定

為了最佳化錳離子注射劑量及濃度，我們事先調配20mM、25mM、30mM、35mM數種不同濃度的錳離子水溶液，由於每隻大鼠接受的錳離子水溶液的濃度及劑量皆不相同，打藥速率也不會相同，我們推算，最佳的打藥速率範圍約介於每分鐘0.12至0.18 μ l，接著將每種濃度的錳離子水溶液各取5 μ l、10 μ l、15 μ l以每分鐘0.12至0.18 μ l的速率注射到不同大鼠的運動皮質區並放入正常大小的籠子中觀察大鼠的生理狀況，在注射錳離子24、48、72、96、120小時各進行一次MR造影觀察錳離子在影像中的顯影情形，綜合以上的結果，決定最佳的錳離子注射劑量、注射濃度及活動時間。

決定好錳離子注射劑量、注射濃度、注射速度及活動時間後，我們將大鼠分為限制組及自由組二個組別，使用三維的立體定位手術將錳離子直接注射進大鼠的運動皮質區後縫合，並在確認大鼠清醒後將限制組大鼠放在較小的籠子，自由組大鼠放在正常大小的籠子，經數天後進行造影，造影前先以氣麻將成鼠麻醉，將經麻醉後的成鼠置於1.5Tesla的MRI中造影，在造影進行的同時以溫水循環墊維持大鼠的體溫，避免大鼠在造影的過程中因失溫而死亡，造影結束後，將得到的影像以FSL及Matlab做數據分析。

本實驗設定的造影參數如下，gradient echo T1WI為TR/TE = 17/7.57 ms, flip angle = 70°, resolution = 0.19x0.39x1.5 mm³ ; R1 mapping為TR=490~5000ms, TE=15ms, resolution = 0.39x0.78x1.5 mm³。

1-2 實驗設備

使用機組：1.5 Tesla SIEMENS Magnetom Sonata

RF射頻線圈

使用裝置

1. 氣麻裝置：壓縮氣鋼筒、壓力錶、減壓裝置、流量計、吸入麻醉藥汽化器

(1) 汽化器：用於氣體麻醉機的汽化器，確保蒸氣凝聚度不受氣流速度、溫度變化、使用時間、液體水平或回壓波動的影響，汽化器的濃度最初設定在全開的1/2到2/3(如果汽化器最高濃度是8%，可設定4-5%)，必要時調整低一點，吸入麻醉開始時，可以5%濃度作快速吸入，3-5 min 後以1.5-2.0%濃度作維持麻醉。吸入麻醉期間，可隨時調整吸入麻醉濃度，維持所需麻醉深度。(Fig. 1A)

(2) 麻醉箱：清醒的動物很難直接安裝面罩，可以先將清醒的動物放入該箱進行預麻醉，一個入口連接麻醉氣體。(Fig. 1B)

(3) 異氟醚 (Isoflurane)：誘導即恢復期快，肝毒性較小適合藥物代謝或毒理試驗時使用，對心血管抑制作用較小同樣具有呼吸抑制作用，其呼吸抑制作用比氟烷強。(Fig. 1C)

2. 熱水循環裝置(Water bath, temperature controller)：有自我調控溫度控制器，其主機裝置用於連接一水冷熱毯，其包括一水箱，在該水箱上設置有連接所述水冷熱毯的進水快速接頭和出水快速接頭，用於形成水循環通道；還包括一保溫箱，在該保溫箱與所述水箱之間隔離設置為一導熱板，並在該水箱中設置有一加熱裝置，在所述水循環通道中設置有一水泵，用於驅動水流循環流動通過一單片機控制電路板控制其加熱、水泵工作，此裝置手術中及術後恢復失溫加熱保暖。(Fig. 1D, 1E)

3. 立體定位儀：立體定位儀可用於功能性立體定位手術。在本實驗中，立體定位儀用於立體定位手術結合腦定位開顱術並配合其他儀器使用。立體定位儀可將大鼠的頭顱固定，並依照儀器兩旁的刻度調整，將探針定位在運動皮質區。(Fig. 1F)

4. 微量注射器：由微型電動機來準確地控制推進和停止 hamilton 注射器，注射器可以方便地固定在腦立體定位儀上。可以通過平臺選擇注射器的型號，設定注射容量、注射速度。流速範圍：0.01 μ l/min 到 200 μ l/min。(Fig. 1G)

5. 鑽腦器：鑽腦器的轉速最低為每分鐘5000轉最高為每分鐘35000轉，可因應不同的手術情況調整速度(Fig. 1H)

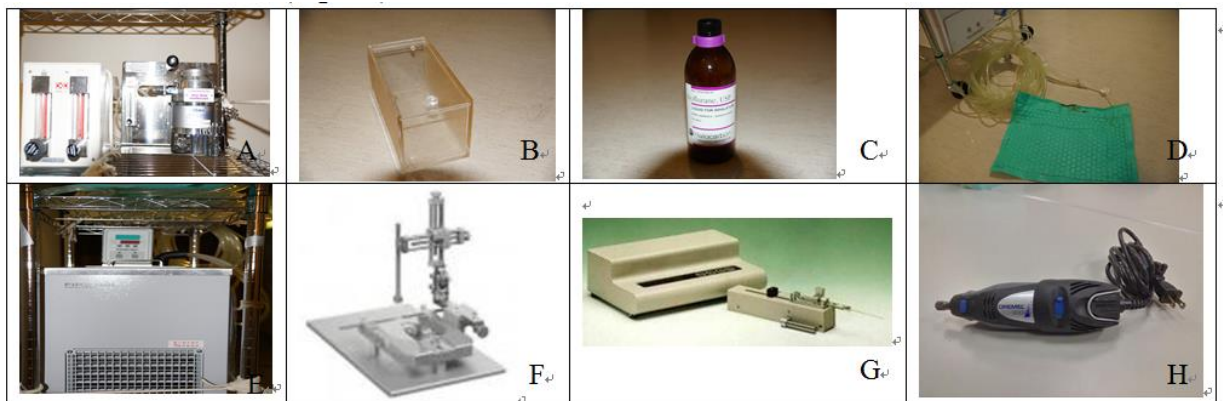


Fig1

(二) 研究步驟

2-1 研究步驟

(1) 最佳化錳離子顯影劑濃度：調配20mM、25mM、30mM、35mM數種不同濃度的錳離子水溶液25ml，每種濃度各取5 μ l、10 μ l、15 μ l注射到不同大鼠的運動皮質

區，觀察大鼠的生理狀況。

(2) 最佳化錳離子顯影神經活化時間：將注射不同濃度不同劑量錳離子的大鼠放入籠子中自由活動，在間隔24、48、72、96、120小時後，帶去MRI室造影，觀察影像的顯影情形。

(3) 將觀察到的大鼠生理狀況及錳離子在影像中的顯影情形結合，決定最佳的錳離子濃度、注射劑量及活動時間。

(4) 將大鼠分為限制組及自由組二組，注射錳離子後將限制組大鼠放在較小的籠子，自由組大鼠放在正常大小的籠子數天。

(5) 造影前需先以氣麻裝置將大鼠麻醉。

(6) 將經麻醉的大鼠置於1.5Tesla的MRI中進行造影。

(7) 造影過程中利用溫水加熱墊，維持大鼠的體溫，以防造影過程中大鼠失溫死亡。

(8) 將所得的數據以FSL (FMRIB Software Library)、Matlab與SPM ([Statistical Parametric Mapping](#))進行分析，觀察錳離子顯影的差異。

(9) 研究討論。

第三章、結果與討論

本研究藉由限制大鼠行動及讓大鼠自由活動比較錳離子在腦區中累積的情形，實驗的結果將分為自由組及限制組兩組，由於自由組大鼠會在籠子裡跑動，錳離子因為具有跟鈣離子相似的特性，所以會經由鈣離子通道進入大鼠的運動神經細胞並累積在大鼠的運動神經細胞內，我們預期自由組對側的運動皮質區會較限制組有更大量的錳離子累積，在 T1WI 的權重下自由組的對側運動皮質區會有較為明顯的亮訊號。由於一隻大鼠並不足以代表限制行動及自由活動的錳離子累積情形，為了得到更完整的資訊，限制組及自由組大鼠的錳離子累積情形分別由六隻大鼠的影像平均呈現，故下列呈現的圖皆以六隻大鼠的平均影像作分析。

(一) 平均影像

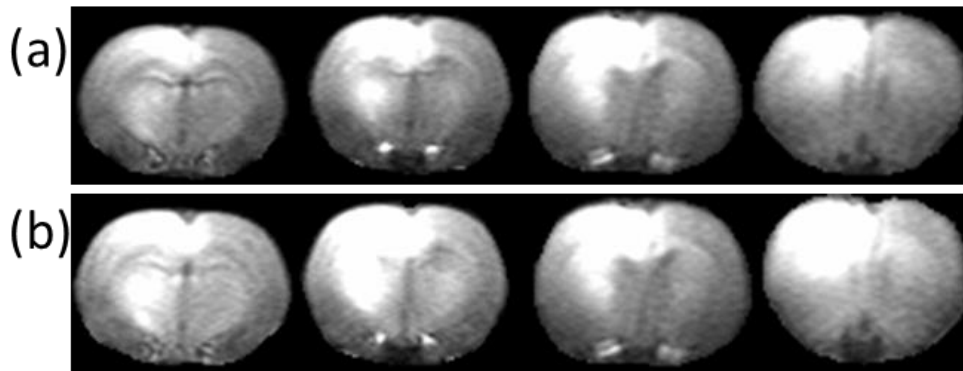


Fig2.

本次研究將限制及自由組各六隻大鼠的影像藉由FSL進行影像對位，為了增加對位的準確性，我們在對位之前會先利用matlab程式將腦區以外的肌肉層去除，並選定一隻老鼠做為reference，接著使用FSL將影像對位後，以matlab將標準化之二組影像分別進行影像相加平均，平均影像的結果則呈現在Fig2. 影像以連續的切面表示錳離子在大鼠腦中累積的情形。Fig2-a代表的是限制組的影像平均結果，可以看到，錳離子在左側的打藥側及左側的下視丘區有著較高濃度的錳離子累積，而Fig2-b代表的是自由組的影像平均結果，和限制組影像相比，除了在左側的打藥側及左側的下視丘區有著較高濃度的錳離子累積，右側的運動皮質區也有錳離子累積。

(二) R1 mapping影像

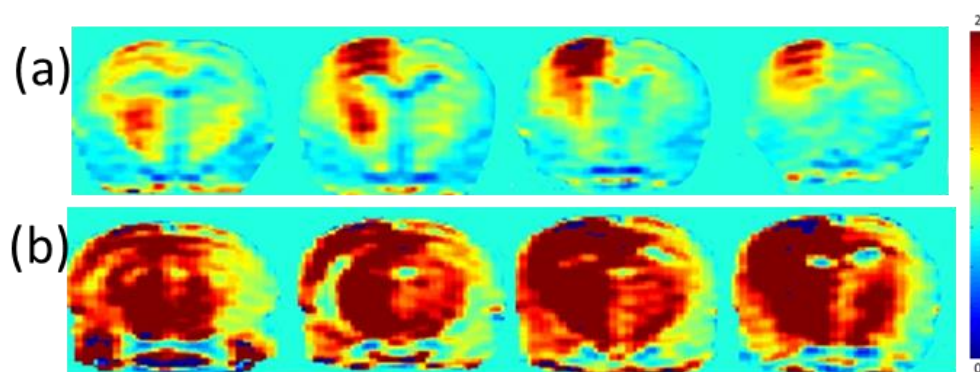


Fig3.

除了平均影像，本研究也做了R1 mapping影像的影像分析，R1 mapping的單位為秒分之一(1/s)可以表示錳離子累積的位置，Fig3-a代表的是限制組的R1 mapping結果，可以看到，錳離子在左側的打藥側及左側的下視丘區有著錳離子累積，而Fig3-b代表的是自由組的R1 mapping結果，和限制組影像相比，除了在左側的打藥側及左側的下視丘區有著錳離子累積，右側的運動皮質區及右側的下視丘區也有錳離子累積。

(三)相減及t-test影像

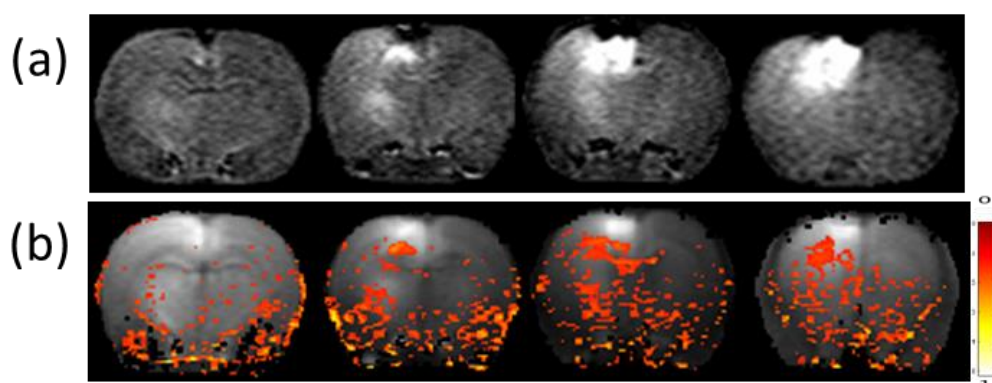
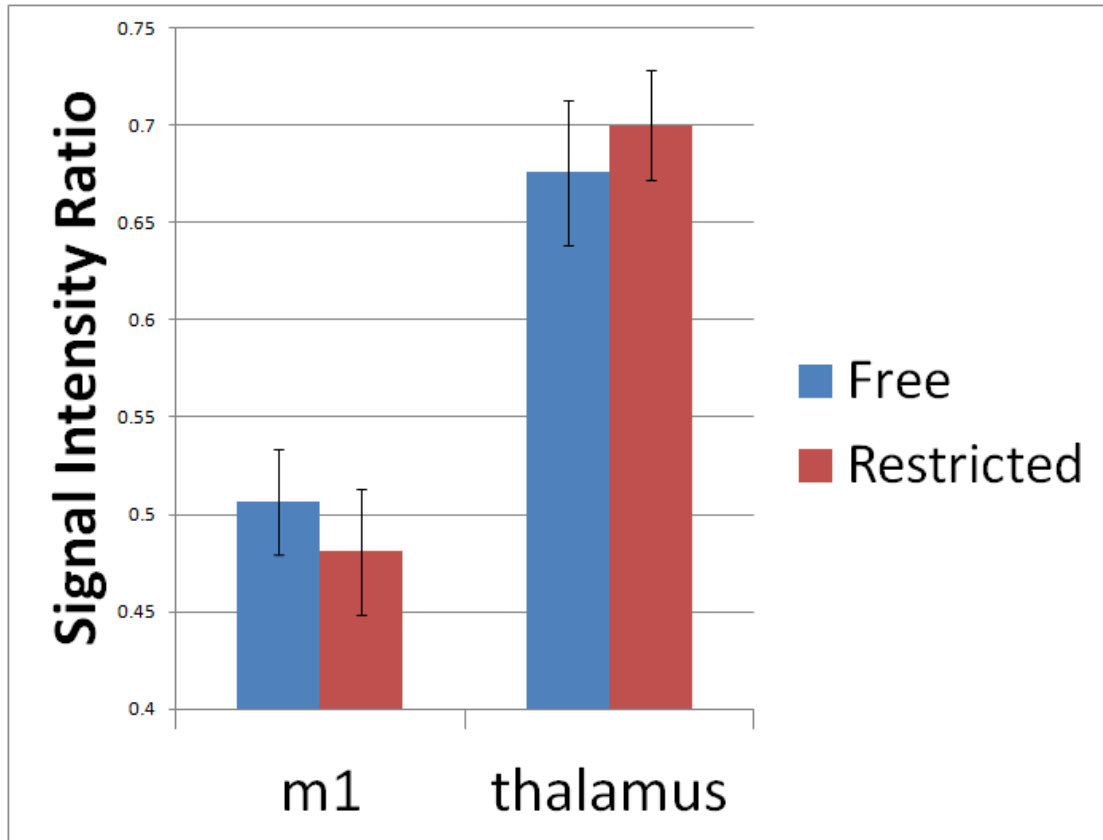


Fig4.

Fig4-a為自由組平均影像減去限制組平均影像後的結果，相減的結果可以看到錳離子主要累積在左側的打藥側及左側的下視丘區。Fig4-b為自由組及限制組做t-test結果，顏色偏紅的位置表示p value<0.05的有意義區，可以看到，有意義的區域都集中在左側的打藥側運動皮質區及左側的下視丘區。

(四)Signal Intensity Ratio直方圖



本實驗除了影像結果分析，也做了訊號強度的數據分析，訊號強度分析是利用Image J在標準化後的自由組六隻及限制組六隻共十二隻的大鼠影像中，分別在12隻大鼠的左側運動皮質區、右側運動皮質區、左側下視丘區、右側下視丘區圈選相同大小的ROI，並將個別得到的數值平均，再將平均後的右側運動皮質區數值除以左側運動皮質區數值，右側下視丘區數值除以左側下視丘區數值，並將數值畫成直方圖，可以看到，自由組的運動皮質區確實有比較高的錳離子傳導，但下視丘區則無顯著差異。

第四章、結論

我們的結果顯示自由組對側的運動皮質區與同側下視丘區較限制組有更大量的錳離子累積，在 T1WI 與 R1 mapping 下自由組的對側運動皮質區與同側下視丘區會有較為明顯的亮訊號，在相減與 t-test 等其它分析影像也顯示錳離子的確會有累積至對側運動皮質區的特異性。因此本實驗確實提供了動物神經科學實驗一種新的技術，將來此技術可以運用於實驗操弄或疾病引起的腦部影像診斷。

參考文獻

1. 劉志忠(2007)：Behavior of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents under Magic-Angle-Spinning. 國立中山大學化學系研究所論文.
2. Andre Obenaus ,Russell E. Jacobs(2007): Magnetic Resonance Imaging of Functional Anatomy: Use for Small Animal Epilepsy Models. *Epilepsia*,48, pp.11–17.
3. O. Eschenko, S. Canals, I. Simanova, M. Beyerlein, Y. Murayama, N.K. Logothetis(2009): Mapping of functional brain activity in freely behaving rats during voluntary running using manganese-enhanced MRI: Implication for longitudinal studies. *Neuroimage*. 49(3):2544–2555.
4. Afonso C. Silva, Jung Hee Lee 1, Ichio Aoki and Alan P. Koretsky(2004): Manganese-enhanced magnetic resonance imaging(MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR Biomed*. 17:532–543.
5. Ichio Aoki, Yi-Jen Lin Wu, Afonso C. Silva, Ronald M. Lynch, and Alan P. Koretsky(2004): In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage*. 22(3):1046–59.
6. Afonso C. Silva(2012): Using manganese-enhanced MRI to understand BOLD. *NeuroImage*. Pages 1009-1013.
7. Pautler RG(2004): In vivo, trans-synaptic tract-tracing utilizing manganese enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed*. 17(8):595–601.
8. Tobias Hoch, Silke Kreitz, Simone Gaffling(2013): Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging for Mapping of Whole Brain Activity Patterns Associated with the Intake of Snack Food in Ad Libitum Fed Rats
9. Pautler RG, Silva AC, Koretsky AP(1998): In vivo neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*. 40(5):740–8
10. Cross DJ, Minoshima S, Anzai Y, Flexman JA, Keogh BP, Kim Y, et al.(2004): Statistical mapping of functional olfactory connections of the rat brain in vivo. *NeuroImage*. 23(4):1326–35.
11. Chuang KH, Koretsky A.(2006) Improved neuronal tract tracing using manganese enhanced magnetic resonance imaging with fast T(1) mapping. *Magn Reson Med*. 55(3):604–11
12. Watanabe T, Michaelis T, Frahm J.(2001) Mapping of retinal projections in the living rat using high-resolution 3D gradient-echo MRI with Mn²⁺-induced contrast. *Magn Reson Med*. 46(3):424–9.
13. Thuen M, Singstad TE, Pedersen TB, Haraldseth O, Berry M, Sandvig A, et al.

- (2005) : Manganese-enhanced MRI of the optic visual pathway and optic nerve injury in adult rats. *Magn Reson Imaging*. 22(4):492–500.
14. Murayama Y, Weber B, Saleem KS, Augath M, Logothetis NK.(2006) : Tracing neural circuits in vivo with Mn-enhanced MRI. *Magn Reson Imaging*. 24(4):349–58.
 15. Leergaard TB, Bjaalie JG, Devor A, Wald LL, Dale AM.(2003) : In vivo tracing of major rat brain pathways using manganese-enhanced magnetic resonance imaging and three-dimensional digital atlasing. *Neuroimage*. 20(3):1591–600.
 16. Allegrini PR, Wiessner C. (2003) : Three-dimensional MRI of cerebral projections in rat brain in vivo after intracortical injection of MnCl₂. *NMR Biomed*. 16(5):252–6.
 17. Pautler RG, Mongeau R, Jacobs RE.(2003) : In vivo trans-synaptic tract tracing from the murine striatum and amygdala utilizing manganese enhanced MRI (MEMRI). *NMR Biomed*. 17(8):595–601.
 18. Saleem KS, Pauls JM, Augath M, Trinath T, Prause BA, Hashikawa T, et al.(2002): Magnetic resonance imaging of neuronal connections in the macaque monkey. *Neuron*.34(5):685–700.