

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 廣東住血線蟲引發大鼠嗜酸性腦膜炎之磁振造影順時 *
* 名稱 : 分析 *
* ***** *

執行計畫學生： 王怡馨
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040-029-B
研究期間： 101年07月01日至102年02月28日止，計8個月
指導教授： 翁駿程

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 102年03月17日

摘要

廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*, *A. Canlonensis*) 在台灣為造成嗜酸性白血球腦膜炎之主要致病原因，近年來，感染地區已由東南亞與太平洋地區擴展至全球各地。無論在適當終宿主大鼠或非適當宿主包括人，若食入感染性第三期幼蟲其發育過程均會至腦組織蛻皮二次，形成第五期幼蟲^[1]；在大鼠第五期幼蟲會至肺動脈及心臟形成成蟲；而人體多停留於腦部造成病害。廣東住血線蟲症的確診診斷，偏重於腰椎穿刺取得腦脊髓液檢測青年蟲體或嗜酸性球的增加及血清抗體檢測，前者可能因穿刺不當造成脊髓傷害，且二者都需要有免疫反應才可偵測出。而這些病變有機會以磁共振造影及組織病理切片，找出感染廣東住血線蟲的表徵和臨床表現上相互驗證，本研究使大鼠接受不同程度廣東住血線蟲的感染，在不同感染期對大鼠腦部組織進行磁共振造影與病理切片檢查，由於感染程度對應之變化有所不同所以我們傾向將感染 300 隻與 100 隻廣東住血線蟲的大鼠分類為重度感染組；感染 50 隻與 20 隻分類為中輕度感染組，顯示不同感染程度的病程演進具有差異性，能夠適當建立廣東住血線蟲症腦部病變之磁共振造影影像學及對照組織病理病變與臨床表徵，以尋求早期診斷之依據。

關鍵字：磁共振造影、廣東住血線蟲、腦膜炎

目 錄

摘要.....	i
目錄.....	ii
第一章、導論.....	1
(一) 研究動機.....	1
(二) 文獻回顧與討論.....	2
第二章、材料與方法.....	6
(一) 材料.....	6
(二) 研究方法.....	8
第三章、結果與討論.....	10
第四章、結論.....	15
參考文獻.....	16

第一章、導論

(一) 研究動機

廣東住血線蟲症的確認診斷，包含有直接抽取腦脊髓液找蟲體，但發現蟲體的機率不高，且脊髓穿刺術(spinal tap)有其危險性，普遍存在有穿刺盲目性及腦脊液流出不可控等缺點，常見的併發症有頭痛或穿刺部位痛楚，潛在之嚴重併發症包括頭顱內壓突變、腦脊液洩漏、出血、細菌感染、損壞脊椎神經及產生植入性皮囊瘤等。目前，診斷大多結合腦脊髓液的嗜酸性白血球計數和血清免疫分析，利用蟲體萃取液為抗原發展數種免疫診斷方法檢測病人血清抗體，但因蟲體成份複雜導致與其他感染交叉反應的發生而造成偽陽性，使得免疫診斷的敏感性及特異性無法達到滿意程度，且自受到感染至測定出抗體的時間延遲久。磁振造影(magnetic resonance imaging, MRI)，是一種非侵犯性的影像診斷技術，其可提供精確而詳細的解剖構造影像，且在臨床影像學上，較傳統放射線學及斷層掃描提供更多的好處，諸如多方面影像及較強的軟組織對比影像以輔助診斷。

在這次的研究中主要針對大鼠腦部組織受廣東住血線蟲感染後的傷害作為探討，其典型臨床表現為急性嗜酸性白血球腦膜腦炎，並伴隨其它腦脊髓等中樞神經障礙。因此我們選擇了一個非侵入性且非游離輻射的磁振造影技術作為觀察受廣東住血線蟲感染後大鼠的腦

部變化。我們將大鼠接受不同程度廣東住血線蟲的感染，對他們的大腦進行磁共振造影與病理切片檢查，期望建立廣東住血線蟲症腦部神經病變之磁共振造影影像學及對照組織病理病變與臨床表徵，尋求早期診斷之依據。

(二) 文獻回顧與討論

2.1 廣東住血線蟲症的成因與人類腦部病變

廣東住血線蟲症主要是食入廣東住血線蟲(*A. Cantonensis*)的第三期幼蟲所致(Fig. 1)。其成蟲寄生於鼠類的肺動脈，在此交配產卵後，卵隨著血液流到肺微血管中孵化成為第一期幼蟲，而後移行至腸管隨糞便排出體外。此幼蟲在自然環境中被做為中間宿生的軟體動物攝食後經兩次蛻皮而發育成具感染性的第三期幼蟲(Fig. 2)。在台灣地區，這些中間宿主包括至少六種以上的水生或陸生蝸牛和蛞蝓。當鼠類吃進受感染的中間宿主後，第三期幼蟲即穿過老鼠腸管，移行至腦部；繼續蛻皮發育成第四或第五期幼蟲，最後至達肺動脈發育為成蟲而完成整個生活史。人類偶爾感染廣東住血線蟲而成為其意外宿主，多半是吃了生的或未煮熟且含有廣東住血線蟲(*A. cantonensis*)第三期幼蟲的中間宿主所致。幼蟲進入人體後即移行至腦部、脊椎、肺部和眼睛，然後死亡。死亡的蟲體會引起明顯的炎症反應，使得腦脊髓液和末梢血液的嗜伊紅性白血球增加。臨床的表徵蟲體的數目和所在

部位不同而異，成蟲在腦部和眼部的移行往往會造成組織的破壞和其他反應，此病的致死率並不高(< 5%)，失明是主要的後遺症之一^[2]。

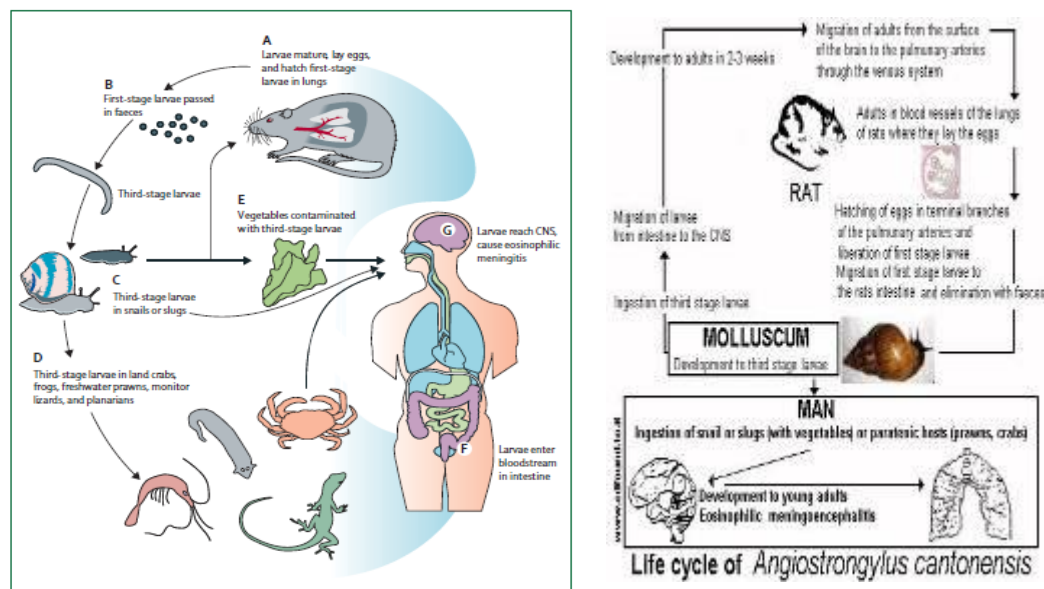


Fig. 1 廣東住血線蟲生活史

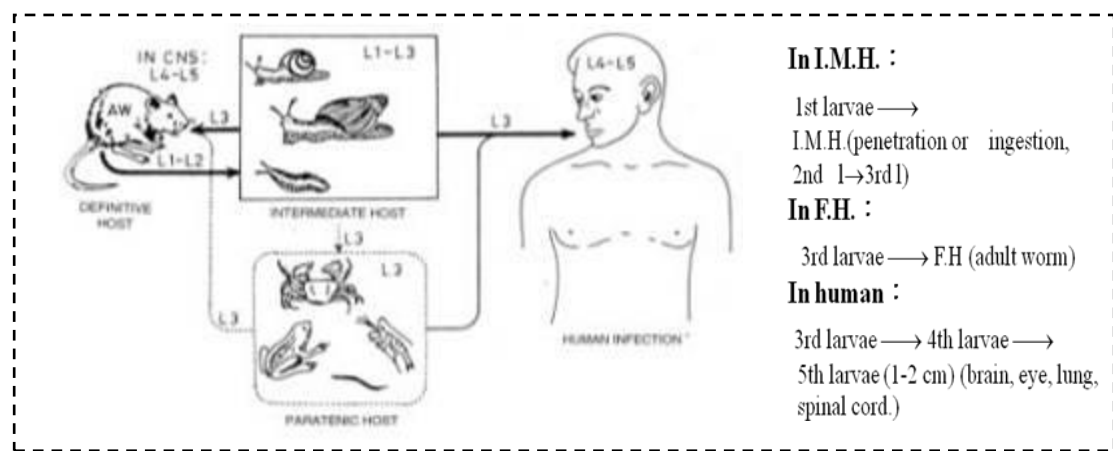


Fig. 2 廣東住血線蟲的感染途徑

2.2 廣東住血線蟲症在顯微鏡觀察下腦部病變

攝入感染性幼蟲後，蟲體易從腸胃道經由血液傳播遷移至中樞神經系統。經感染四小時後幼蟲可能在腦部出現，但是他們大多在第二天時開始聚積，在大約十天時主要出現在後顱窩的蛛網膜下腔(延

髓，小腦，脊髓，腦)而後漸漸地蔓延到大腦半球，幼蟲存在的八天到數個月期間引起嚴重的急性炎症反應，主要包括嗜伊紅性白血球的增加。線蟲的死亡通常可在大腦或小腦半球表面發現肉芽腫的發生，這些肉芽腫組織從上皮細胞、包含有破碎寄生蟲體的多核巨細胞以及單細胞型成，在蛛網膜下腔一些區域可指出蟲體但周圍及四周並無炎症反應發生，這表示即使感染三個月後蟲體仍然可能活著並持續遷移，在慢性炎症細胞的血管周圍偶爾可發現，腦室系統在適度炎症反應下的脈絡膜叢也可發現寄生蟲的蹤跡。中樞神經系統病變的發病機理可能是由寄生在中樞神經系統，並在其遷移活著和死去的寄生蟲的代謝產物或釋放抗原產生的直接或機械性損傷^[3]。

2.3 影像診斷技術

廣東住血線蟲症具有千變萬化的臨床表現，最常見的是初期寄生蟲在蛛網膜下腔所引起的瀰漫性嗜伊紅性腦膜炎，Hsu 及其他報告指出一位十個月大的女孩發燒及咳嗽的症狀持續了三個星期，經過腦脊髓液檢查發現嗜酸性細胞增加，使得血清學診斷成立，由腦部核磁共振成像發現，在 T2 權重影像中大腦皮質與腦室呈現高訊號，使用 Gadolinium 對比劑可發現在大腦皮質及小腦半球區域的腦膜與點狀區域有增強的現象，作者解釋此現象由於血管炎造成小面積梗塞，二次破壞血腦障壁或為寄生蟲損傷組織所造成的腦水腫結果。

Kanpittaya 與其他臨床報告也提出了 6 例使用 MRI 以及核磁共振頻譜發現廣東住血線蟲所引起的腦膜炎，他們發現核磁共振影像中的不正常現象包括血管周圍間隙異常突出、皮質下病變的增強以及腦室周圍異常高的 T2 訊號，這顯示了 MRI 是一項具有診斷價值的研究，並且有助於了解疾病的致病機制^[6]。文中使用的 Gadolinium 對比劑是為陽性造影劑(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。常見的陽性造影劑有用於中央神經系統和全身，例如 Gd-DTPA、Gd-HP-DO3A 和 Gd-DOTA。而 Mn-DPDP 特別用於觀察肝臟的損害^[4]。本研究預計採用 Gd-DTPA 做為造影劑使 T1 時間縮短，而能增強 T1 加權影像的對比度，可幫助我們判讀大鼠感染之後蛛網膜下腔的改變。

第二章、材料與方法

(一) 材料

1.1 第三期幼蟲的採集

實施寄生蟲感染前，從台中太平收集野外非洲巨螺 (*Achatina fulica*)，將非洲巨螺外殼打破後，直接均質搗碎以 1:30 比例加入人工胃蛋白酶消化液，以磁性攪拌子於 37°C 之恆溫箱、均勻攪拌消化 2 小時，接著使用紗布濾去雜質，加入生理食鹽水稀釋並靜置，每隔 30 分鐘倒去約一半的上清液，以滴管吸取下層之沈澱物，置於玻璃皿中，再加入生理食鹽水稀釋靜置，重複至完全清澈為止，置於解剖顯微鏡下，觀察並吸取第三期幼蟲^[5]。

1.2 實驗設備

使用機組：1.5Tesla SIEMENS Magnetom Sonata (Fig. 3A)

RF 射頻線圈 (Fig. 3G)

使用裝置：

A. 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、二氧化碳吸收裝置、導向活瓣、逸氣活閥

(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，三至五分鐘後以1.5-2.0%濃度作維持麻醉，可隨時調整吸入麻醉濃度，維持所需麻醉深度(Fig. 3D, 3E)。

(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，另一個出口連接面罩或氣體回收器(Fig. 3B)。

(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. 3F)。

B. 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. 3C)。

C. 動物架設系統(Fig. 3H)：

(1)表面線圈固定座-當使用表面線圈(surface coil)時，用以固定表

面線圈，減少震動雜訊。

(2) 牙齒勾桿(tooth bar)-勾住動物牙齒，以利固定麻醉中的動物。

(3) 耳朵固定桿(ear bar)-作用亦在固定動物頭部，以利實驗進行。

(4) 快速接頭-用以連接溫水循環系統，以保持動物體溫。

(5) 滑軌(slider)-用以將動物架設系統固定於射頻線圈內。

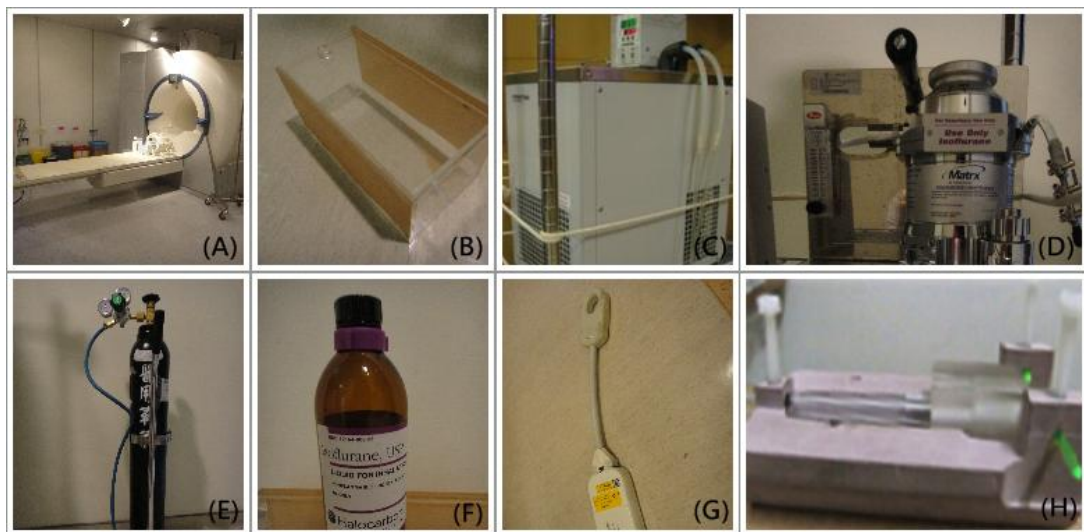


Fig. 3 實驗設備

(二) 研究方法

2.1 實驗方法

將成鼠分為兩組，一組是健康的成鼠作為對照組，另一組是接受餵食不同數量廣東住血線蟲的成鼠，實驗組裡所餵食的寄生蟲數量分別為 300 隻，100 隻，50 隻以及 20 隻，其目的是為了探討經過餵食不同數量的廣東住血線蟲後其對成鼠腦部的傷害會有不同的嚴重程度。分組完後，隨即進行不同階段的影像造影。先以氣麻 (isoflurane)

2%將成鼠麻醉，將經麻醉的成鼠放置於 1.5Tesla 的 MR 下進行造影。在造影過程中會利用溫水循環加熱墊的設備並維持在 37 度，使成鼠不至於在麻醉的情況下失溫而死亡。造影結束後將資料以 Mathematica 及 Matlab 進行影像分析，觀察成鼠腦部組織的變化。

2.2 實驗取像與分析

我們將選用四種參數設定取像以及用於後續分析，分別為 T1WI、T2WI、t2_flair 以及 t2_multiecho。

為了確定大鼠感染之後蛛網膜下腔的改變，藉由注射陽性造影劑，進行成像取得 T_1 加權影像，TR/TE 為 513/46ms，Voxel Size 為 $0.19 \times 0.39 \times 1.5 \text{ mm}^3$ ，由於陽性造影劑可縮短 T_1 ，在 T_1 加權影像上面增強訊號，呈現明亮的影像，可幫助我們判讀。利用 Multi-slice 的 TSE(turbo spin echo)序列，TR/TE 為 3760/114ms，以及 FLAIR(fluid attenuation inversion recovery)，TR/TE/TI 為 8420/155/2500ms，進行成像得到 T_2 加權影像，Voxel Size 皆為 $0.19 \times 0.39 \times 1.5 \text{ mm}^3$ ，觀察腦室以及蛛網膜下腔的長期大小變化。為了提升由於廣東住血線蟲的感染造成一定範圍內 T_2 變化的偵測敏銳性，使用 single-slice 的 multi-echo spin echo 序列去執行以獲得 32 組各對應 32 個不同 TEs 的影像，TR/TE 為 2000/15ms，範圍從 15 到 480 ms，沿橫向磁化衰減取樣，並只保有一半的空間解析度，得到 R2 mapping 以利後續定量分析。

第三章、結果與討論

由於大鼠屬於適當終宿主，食入感染性第三期幼蟲其發育過程均會至腦組織蛻皮二次，形成第五期幼蟲。我們可藉由對照組及實驗組比較腦部病變的特徵以及經由病理切片對照影像的顯示結果，可發現在不同程度感染下成鼠的腦部組織變化會有差異性。

將大鼠感染完成後我們每隔 7 天造影一次，以追蹤腦部變化及趨勢，發現無論何種感染程度下在 T1WI 中腦膜的發炎範圍有增大又回復的趨勢，在 T2WI 中也可以發現蛛網膜下腔有相同的趨勢，腦室區域則是會逐漸擴大。FLAIR 的影像中可以看到腦膜處訊號上升後又下降，R2 mapping 的部分則是蛛網膜下腔以及腦室的趨勢與 T2WI 相似。但對於中輕度感染(20 及 50 隻幼蟲)組的大鼠而言，從影像中可以觀察到腦膜變大的高峰期約為 28 天，明顯早於重度感染(300 及 100 隻幼蟲)組的大鼠之高峰期 35 天，腦室也較早達到訊號高峰 (Fig.4)。

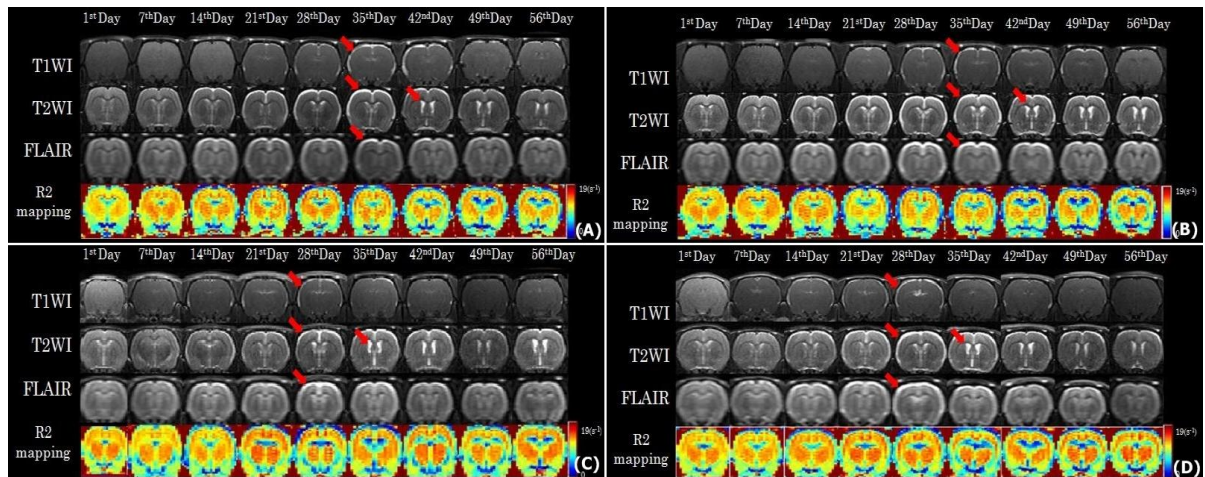


Fig. 4 不同感染程度大鼠腦部病程演進

(A)感染幼蟲隻數為 300 隻 (B) 感染幼蟲隻數為 100 隻 (C) 感染幼蟲隻數為 50 隻 (D) 感染幼蟲隻數為 20 隻的大鼠腦部影像。

定量分析的結果亦能呼應影像上的變化趨勢，我們將不同感染程度大鼠的分析結果做平均後以折線圖形式表現，在 T1WI 中腦膜由於受到蟲體侵害造成發炎反應，組織受到刺激增生去修復使得發炎範圍擴大後又縮小，重度感染組平均由 2.13% 上升至最大值 7.22% 後又降到 4.99%，而中輕度感染組平均由 1.57% 上升至 7.80% 後又降到 2.75%，並且重度感染組的腦膜擴大高峰期為 35 天較中輕度感染組的 28 天晚發生，是由於感染隻數較多，使蟲體回到肺的速度較慢，造成腦部的發炎反應較持續(Fig. 5A)。在 T2WI 中可發現由於腦膜發炎造成 CSF 的循環不良使得蛛網膜下腔的範圍擴大，隨後又會有回復的跡象，重度感染組平均由 1.26% 上升至 9.72% 後又降到 3.35%，而中輕度感染組平均由 1.34% 上升至 4.20% 後又降到 2.38%，腦室範圍則是逐漸擴大，並且無顯著回復的趨勢 (Fig. 5B.C)。在 FLAIR 影像分析中發現，由於腦膜受損造成發炎反應會有出血現象以及一些發炎造成的組織細胞，使得腦膜處的訊號量上升後又因為腦膜的自我修復機制而下降，重度感染組平均由 6.83 上升至 11.4 後又降到 8.35，而中輕度感染組平均由 6.39 上升至 9.27 後又降到 8.03(Fig. 5D)。最後將 R2mapping 得到的影像中每一個 pixel 計算 R2 值做平均，由於 CSF

的循環不良使得 R2 值有下降趨勢，重度感染組平均由 8.63 下降至 7.71，而中輕度感染組平均由 8.51 下降至 7.96(Fig. 5E)，接著設一個閾值，在閾值以下為長 T2 物質，可看腦室與蛛網膜下腔區域的範圍，逐漸擴大後隨著腦膜的修復又會下降，重度感染組平均由 33.17 升至 103.75 後又降到 89(pixel number)，而中輕度感染組平均由 34.63 上升至 89.74 後又降到 59.88(pixel number) (Fig. 5F)。

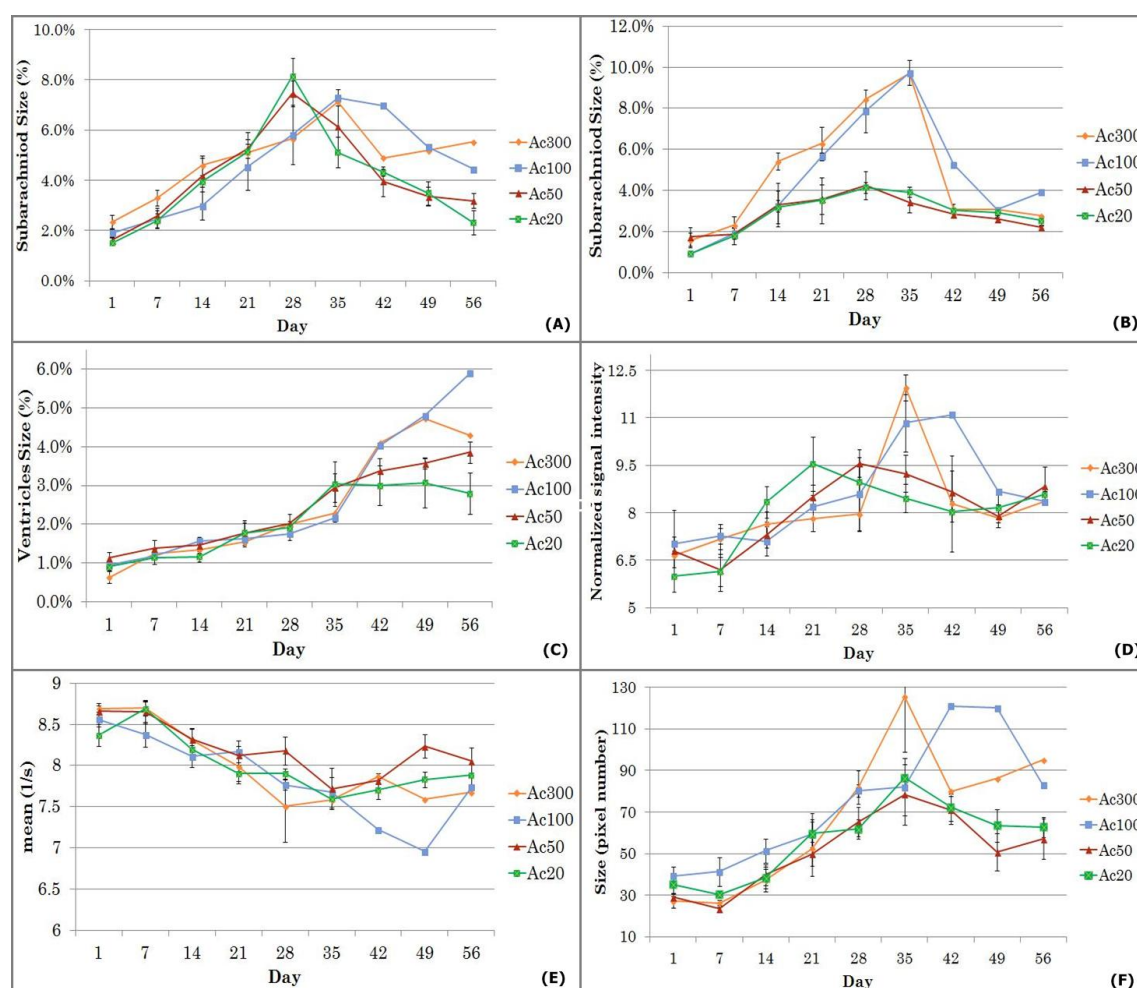


Fig.5 不同影像分析對應四種感染程度之平均折線圖

(A) Subarachnoid Size in T1WI (B) Subarachnoid Size in T2WI (C) Ventricles Size in T2WI (D) Subarachnoid Signal Intensity in FLAIR (E) R2 Mapping Mean (F) R2 Mapping Pixel Number (Subarachnoid& Ventricles)

除了影像中的腦部變化外，我們也可以由統計分析觀察到重度感染組與中輕度感染組的存活天數有差距，感染隻數從 300、100、50、20 隻的大鼠依序平均存活天數為 23、32、76、119 天，使用 T-test 分析後我們得到感染 300 隻幼蟲與感染 50 隻幼蟲之平均存活天數 $p = 0.02927$ ；與 20 隻幼蟲之平均存活天數 $p = 0.02974$ ，感染 100 隻與 20 隻幼蟲之平均存活天數 $p = 0.004406$ ，具有顯著的差異性，從存活曲線上亦可觀察到，當感染隻數越少時存活天數就越長(Fig.6)，故重度感染組較中輕度感染組的平均存活天數短，使得中輕度感染組可以觀察到較長期的病程變化與趨勢。

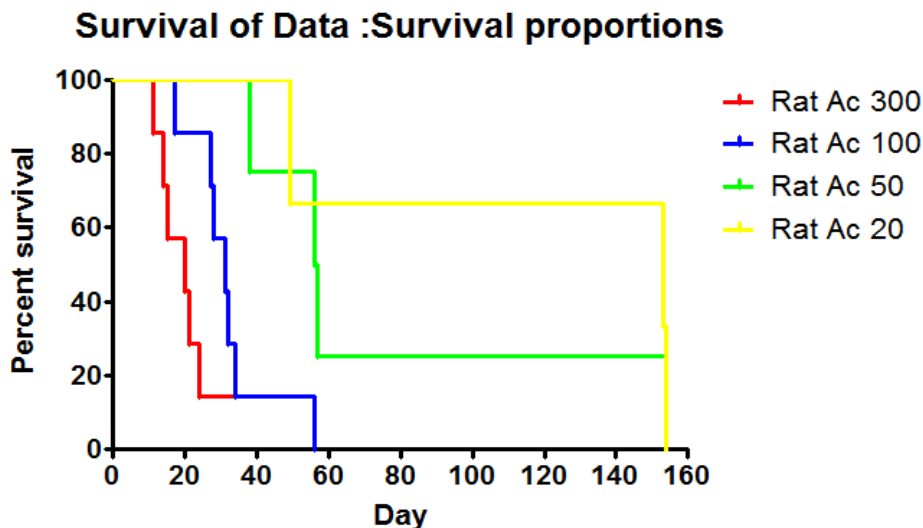


Fig.6 不同感染程度下大鼠的存活曲線

待大鼠死亡後，我們將大鼠取出腦部組織後做切片，並且使用H&E染色法，觀察腦部病理變化可觀察到，無論何種感染程度下，蟲體皆在腦膜處造成破壞，使腦膜通透性增厚並且有剝離的現象，出血以及不正常空泡也可以在細胞中被發現。感染程度下差異點在於感染隻數較多的大鼠可以在腦部組織中發現蟲體的機率較感染隻數少的大 (Fig.7)。

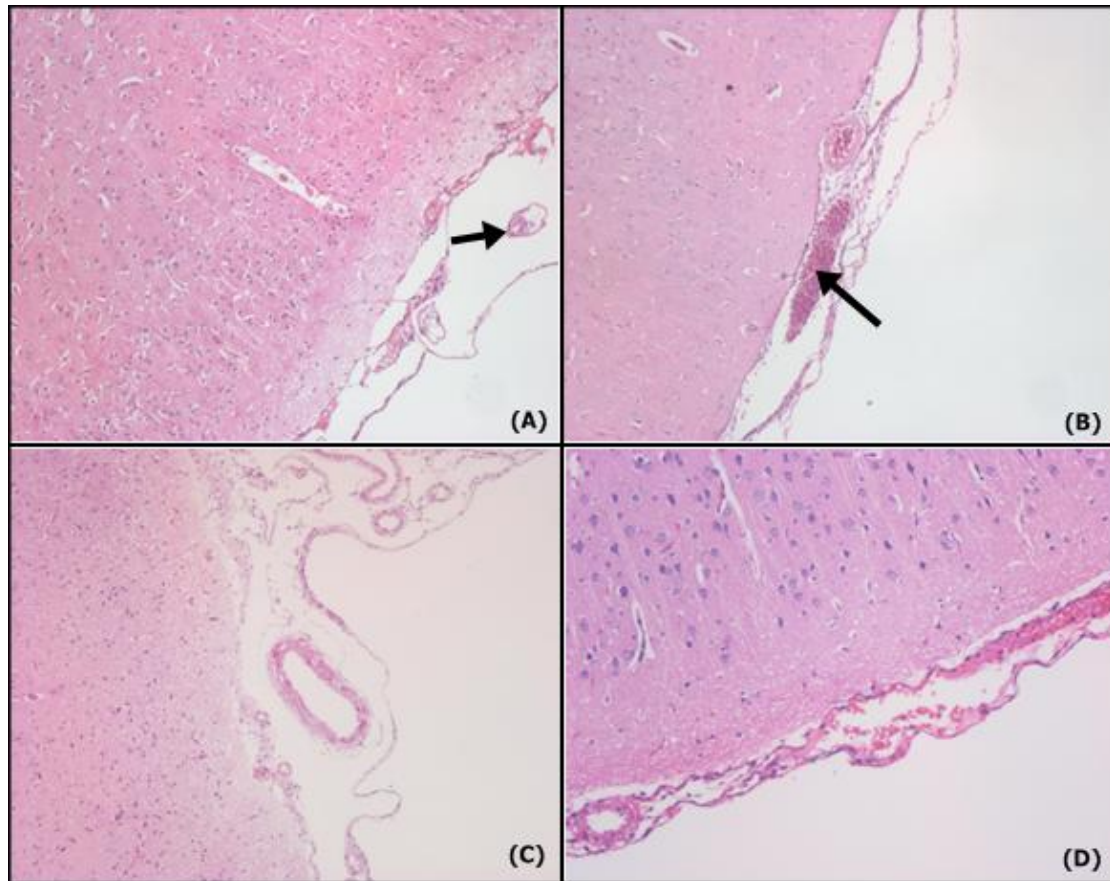


Fig.7 不同感染程度下大鼠腦部組織切片

(A)感染幼蟲隻數為 300 隻，箭頭所指為第五期幼蟲 (B) 感染幼蟲隻數為 100 隻，箭頭所指為出血處 (C) 感染幼蟲隻數為 50 隻 (D) 感染幼蟲隻數為 20 隻

第四章、結論

磁振造影影像以及病理組織切片的結果皆能夠顯示出大鼠腦部的病理變化，由於感染程度對應之變化有所不同所以我們傾向將感染 300 隻與 100 隻廣東住血線蟲的大鼠分類為重度感染組；感染 50 隻與 20 隻分類為中輕度感染組。接著從影像數值分析看，重度感染組較中輕度感染組腦膜發炎現象持續較長時間，造成的傷害也較嚴重，並且存活天數亦較中輕度感染組短，但是無論何種感染程度下腦膜發炎的範圍以及嚴重程度是可回復的，腦室受蟲體侵害是為不可回復性傷害，所以我們可以說，不同感染程度的病程演進具有差異性。

參 考 文 獻

- [1] Alicata JE. **Advances in Parasitology**. 1965 ; 3: 223-248.
- [2] Chen ER. **Angiostrongyliasis eosinophilic meningitis on Taiwan review**. 1979 ; In Cross JH , ed , studies on angiostrongyliasis in eastern Asia and Australia Taipie , R . O . C . , U . S . Navy Medical Research Unit No . 2, pp . 57 - 73
- [3] D. T. John, A. J. Martinez. **Animal model of human disease**. 1975 August; 80(2): 345–348.
- [4] 劉志忠. **Behavior of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents under Magic-Angle-Spinning**. 2007
- [5] L-Y. Shyu, et al. **In Vivo Pathological Mapping of the Rat Brain Infected with Angiostrongylus Cantonensis using MRI**. 2011; Proc 19th ISMRM Ann Meeting, Montreal, Quebec, Canada, No. 2281.
- [6] Tsai H-C., et al., Am. J. Trop. Med. Hyg. **Eosinophilic Meningitis Caused by Angiostrongylus Cantonensis Associated with Eating Raw Snails: Correlation of Brain Magnetic Resonance Imaging Scans with Clinical Findings**, 2003; 68