

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱： 前瞻式擴散磁共振造影長期追蹤廣東住血線蟲感染之兔腦變化 *
* ***** *

執行計畫學生： 吳孟穎
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-043-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 徐玲玉

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： 中山醫學大學醫學系

中華民國 103年03月10日

摘要

台灣常見的寄生蟲感染為廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*, *A. Canlonensis*)，廣東住血線蟲是一種寄生性圓蟲，最終宿主為老鼠，中間宿主為水生或陸生蝸牛及蛞蝓，其中以非洲大蝸牛影響人類較為顯著。線蟲會在蝸牛體內脫皮兩次變成具有感染性的第三期幼蟲，若此時人類誤食，線蟲會在人體內再經過兩次脫皮形成第五期幼蟲，之後移行寄宿於腦部，且因為人類並非適當宿主的關係，所以線蟲無法在人體完成發育並產卵，當蟲體長到一定程度而死亡時，會在腦部產生炎症反應，使得腦脊髓液和末梢血管的嗜酸性白血球增加，引起嗜酸性白血球腦膜炎及腦炎。廣東住血線蟲的確認診斷，臨床上多半採用腰椎穿刺取得腦脊髓液來檢測蟲體，但廣東住血線蟲其臨床症狀不具特異性，且腰椎穿刺侵入性有一定的危險性。或是利用血清抗體檢測嗜酸性白血球是否上升，但兩者皆需要有免疫反應。而在過去我們的研究中發展出使用擴散張量造影(diffusion tensor imaging, DTI)來檢測因廣東住血線蟲所引起的腦部病變，但DTI在偵測腦部複雜的神經結構上仍有不足，所以為了要更準確的得知複雜的腦部神經，本實驗使用通用擴散波數取樣造影(generalized q-sampling imaging, GQI)來檢測蟲體並分析腦部感染程度的變化。

關鍵字：廣東住血線蟲、磁振造影、通用擴散波數取樣造影

目錄

摘要	1
目錄	2
第一章、導論	3
(一)研究動機.....	3
(二)文獻回顧與討論.....	3
第二章、材料與方法	7
(一)材料.....	7
(二)研究方法.....	8
第三章、結果與討論	9
(一)GQI 分析結果	9
(二)GQI 與 DTI 的相關性分析.....	11
第四章、結論	13
參考文獻	14

第一章、導論

(一) 研究動機：

臨床上的傳統診斷偏重腰椎穿刺吸取腦脊髓液，觀察嗜酸性白血球是否有上升，但腰椎穿刺除了有風險外，腦脊髓液嗜酸性白血球增多並非廣東住血線蟲特異的免疫病理反應，且常見的併發症有頭痛或穿刺部位疼痛，潛在的症狀又有頭顱內壓病變、腦脊髓液洩漏、出血、細菌感染、損壞脊椎神經及產生植入性皮囊瘤等。所以目前又結合利用單株抗體純化青年期蟲體抗原成份，但因蟲體成分複雜導致與其他感染產生交叉反應而造成偽陽性的問題，也可能會因為抗體的空窗期而偵測不到，使得免疫診斷效果不彰。因此本實驗以廣東住血線蟲所引起的腦部病變為基礎，使用非侵入性的磁振造影檢查(diffusion magnetic resonance imaging, dMRI)來觀察腦部因感染蟲體所引起的中樞神經病變，並更進一步以 GQI 來分析蟲體所造成的腦部病變，來補足 DTI 在腦部結構分析上的缺陷。

在這個研究中主要是以紐西蘭大白兔腦部組織受廣東住血線蟲感染後的傷害作為探討，其典型的臨床症狀為急性嗜酸性白血球腦膜炎，並伴隨中樞神經的障礙，因此我們使用非侵入性且為非游離輻射的磁振造影技術來觀察紐西蘭大白兔腦部的變化，在不同的感染期，對兔腦進行 GQI 分析，期許未來能將此種非侵入性的臨床檢驗方法應用在蟲體的檢測上，能達到早期診斷及治療的依據。

(二) 文獻回顧與討論：

2.1 廣東住血線蟲症的發生

廣東住血線蟲為一白色蟲體，外皮光滑，其成蟲主要寄生在老鼠的肺動脈內，並在此交配後產卵。雌蟲每天可產1500個卵，蟲卵停留在肺微血管中並孵化成第一期幼蟲，幼蟲穿破微血管進入肺泡，移行至氣管，下嚥入胃腸，在由糞便排出。第一期幼蟲穿入螺體(中間宿主)的體表或被掠食者食入而移行至肌肉組織等處(Fig. 1)。在臺灣地區，這些中間宿主至少包括六種以上的水生或陸生蝸牛和蛞蝓。食入七到九天後形成第二期幼蟲，十二到十六天後變成第三期幼蟲，具有感染性但仍保有外鞘。此時若被適當宿主鼠類吃下感染的中間宿主螺類，即被感染第三期幼蟲，具感染性的第三期幼蟲會穿過老鼠的胃腸壁進入靜脈或腹腔淋巴管內，返回右心，經肺循環入左心，經體循環至內臟各器官，感染一到兩天後會集中到老鼠的中樞神經，感染三到六天後會進行第三次脫皮，形成第四期幼蟲(無外鞘)，感染第七到九天移行到蜘蛛膜下腔時進

行第四次脫皮，形成第五期幼蟲，之後會穿入擴張的大腦靜脈內在進入肺動脈中，蟲體會在此長成成蟲，完成線蟲的自然生活史[1] (Fig. 2)。老鼠對此線蟲來說是終宿主，不致於造成老鼠的死亡，但如果被感染的螺體是為人類所食用。因為人類並非廣東住血線蟲的適當宿主，因此蟲體無法在人體完成發育，蟲體會移行至腦部、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，使腦脊髓液和末梢血液的嗜酸性紅血球增加。臨床上的表徵依蟲體的數目和所在的部位不同而異，若移行至腦部會產生嗜酸性腦膜炎或腦膜腦炎，而失明是主要的後遺症之一[2]。

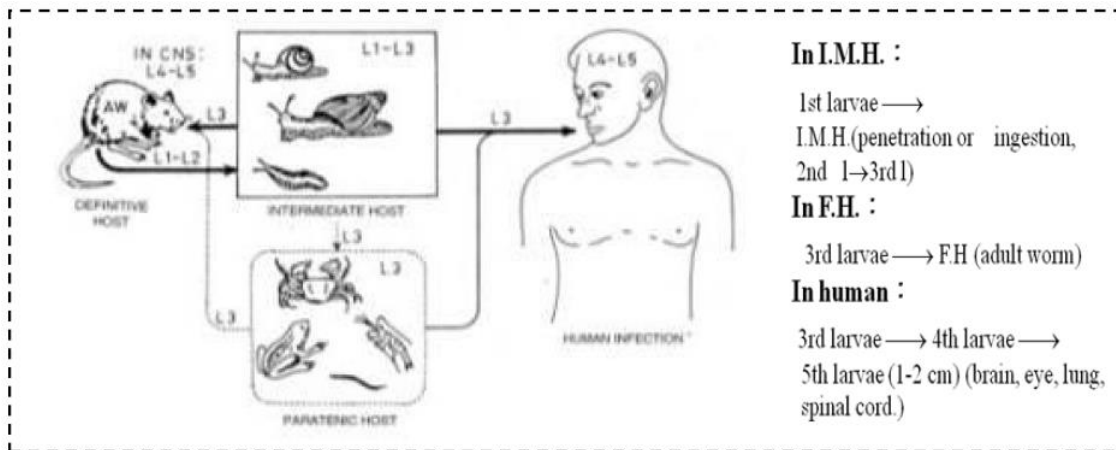


Fig. 1 廣東住血線蟲感染途徑

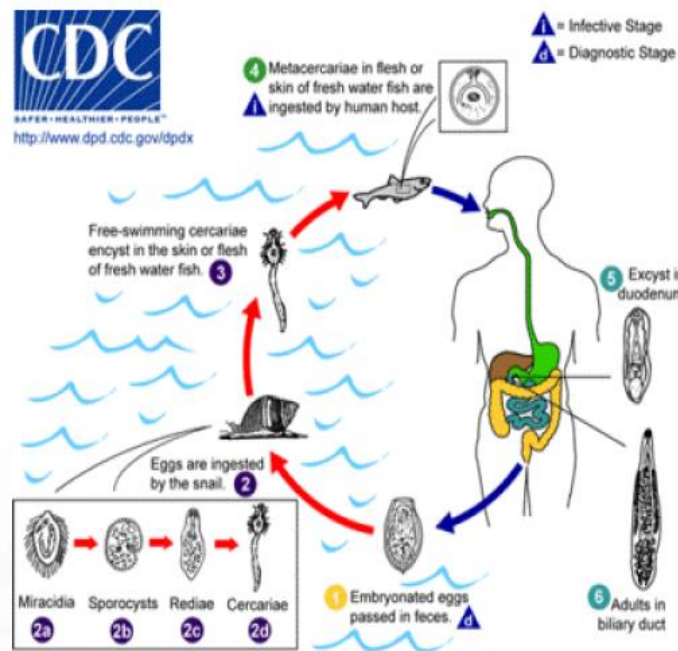


Fig. 2 廣東住血線蟲生活史

2.2 廣東住血線蟲在顯微鏡觀察下的腦部病變

攝入感染性幼蟲後，蟲體液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，幼蟲存在八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形成，在蛛網膜下腔一些區域可指出蟲體但周圍並無炎症反應發生，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因為(1)蟲體遷移直接對腦部的機械性破壞(2)蟲體釋放對寄主有害的抗原或代謝產物(3)蟲體在腦部形成肉芽組織，破壞腦部結構(4)引發腦部血管周邊組織的炎症反應，使嗜酸性白血球及淋巴球大量浸潤腦部，造成傷害(5)嗜酸性白血球會釋放蛋白攻擊蟲體，同時也會造成腦部損傷(6)血腦障壁破壞(7)神經細胞脫髓鞘及小腦浦金氏細胞損傷、出現空泡等[3]。

2.3 磁振造影與擴散張量磁振造影在寄生蟲診斷的應用

從過去的研究中使用磁振造影的 T2 加權影像或 FLAIR 加權影像能更快速的偵測出體內的寄生蟲。Chang 及其研究團隊的報告指出有一嗜伊紅性腦膜炎的病患於住院前四星期有生吃蝸牛病史，腦部電腦斷層檢查正常，但是磁振造影以質子及 T2 權重影像檢測之後可見點狀或管狀的高訊號強度病灶，且此現象並不是一般所常見的細菌性及病毒性腦膜炎或腦膜腦炎，最後以血清學輔助證實了患者感染了廣東住血線蟲 [5]。另外在最終宿主大鼠的研究上也得到良好的結果，在董光中教授發表的文章顯示，將每隻大白鼠口服 300 隻具感染性的第三期幼蟲，使用磁振造影技術檢測，於第一天即可看見腦膜面、蜘蛛膜下腔及脈絡叢有病變，而口服 100 隻第三期幼蟲的大白鼠可於第 12 天觀察到腦部血管的病變，對照肉眼病變及組織病理發現其結果與磁振造影的影像相吻合。因此，將磁振造影應用在診斷因廣東住血線蟲引起的嗜酸性腦膜炎及腦膜腦炎是可行的，且因磁振造影為非侵入性且不具輻射線，預期能在臨床的診斷上能提供更準確的早期治療[6]。

除了磁振造影在寄生蟲上的應用之外，還有研究利用擴散張量磁振造影的技術檢測寄生蟲，我們在 2012 年的研究中指出胼胝體的平均擴散指標(mean diffusivity, MD)、徑向擴散指標(radial diffusivity, RD)以及海馬迴的擴散非等張性(fractional anisotropy, FA)，皆會隨著感染時間增加而有改變。這些影像上的變化和因廣東住血線蟲感染兔腦而造成的胼胝體水腫、海馬迴發炎、血管栓塞、水腦及腦室發炎出血的病

理變化相符合，因此，預期這些變化可以做為早期診斷廣東住血線蟲感染腦部的指標 [7]。

2.4 通用擴散波數取樣造影

雖然現在 DTI 已經廣泛的運用在臨床診斷上，但 DTI 沒有辦法解決交叉或有分支的這種較複雜的神經纖維，所以 Yeh 等人提出了一項新的分析技術通用擴散波數取樣造影 (generalized q-sampling imaging, GQI)，是利用 MR 訊號和擴散位移量做傅立葉轉換所得的 spin distribution function (SDF)，可用來描述複雜的的纖維及辨別其方向，GQI 的原理為結合傅立葉轉換和 ODF 計算進而推導出擴散訊號和 SDF 之間的關係，且 GQI 也提供了一個明確的控制參數 diffusion sampling length (ΔL) 來減少假影。所以比起 DTI，GQI 將會得到更準確的再現性。而 GQI 主要的優勢在於不需做反捲積 (de-convolution) 的運算，只需用捲積 (convolution) 運算分析，所以方法也比 DTI 簡單，且可適用於不同的取樣方法。但 GQI 在某些方面上也有限制，例如取樣方法須建立在平衡情況之下，所以易受取樣方法影響。總的來說，GQI 可以適用於不同的取樣方法，且能提供交叉纖維的方向和尺寸，如此一來便可觀察較複雜的神經纖維 [8]。

第二章、材料與方法

(一) 材料

3.1 第三期幼蟲的採集

實施蟲體感染前要先採集具有感染性的第三期廣東住血線蟲幼蟲。從台中太平收集野外非洲巨螺(*Achatina fulica*)，將非洲巨螺外殼打碎後，去殼取其組織，之後均質搗碎，再以1:30比例加入人工胃蛋白酵素消化液(0.6% Pepsin)，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，以滴管吸取下層之沉澱物，置於玻璃皿中，在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，觀察並吸收取第三期幼蟲[4]。

3.2 實驗設備

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

線圈：double loop array (Fig. 3G)

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、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，可隨時調整吸入麻醉濃度，維持所需麻醉深度(Fig. 3D, E)。
 - (2) 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)。
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，在該水箱上裝置有連接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基控制電路版控制其加熱、水泵工作，此裝置手術中及術後恢復失溫加熱保暖(Fig. 3C)。

3. 監測裝置：血氧濃度計(Fig. 3I)、呼吸監測器(Fig. 3J)
4. 其他裝置：表面線圈固定座、兔子標準面罩(內徑 40mm，外徑 93mm)

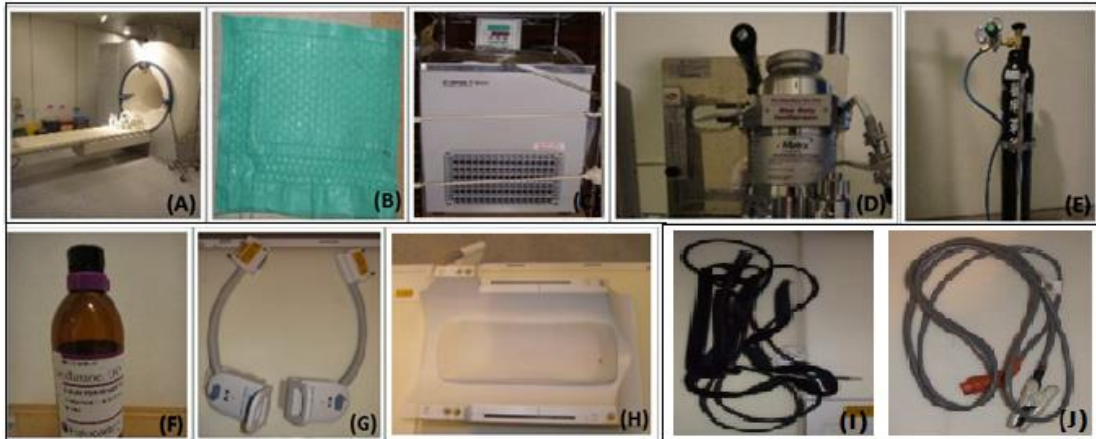


Fig.3 實驗設備

(二) 研究方法

2.1 實驗方法

將五隻紐西蘭大白兔分別感染700隻第三期幼蟲的廣東住血線蟲，並於感染前12小時均禁水、禁食。每隻兔子每週都進行一次磁共振造影，共持續六週，目的是為了觀察不同時期感染程度的變化，並將未感染前的資料當作對照組，互相比較，看其腦部組織的病變。實驗開始前會先為兔子戴上標準面罩，同時以3.5%氣體麻醉劑Isoflurane混合每分鐘300ml的氧氣流量灌流，靜待一陣子，按壓兔子後腳並觀察兔子眼瞼反射，假使兔子無反射動作，即可進行實驗。將兔子放在磁共振造影的檢查床上，並在實驗全程以2~3%氣體麻醉劑Isoflurane混合每分鐘300ml的樣氣流量灌流，使兔子維持在麻醉狀態。此外，實驗全程需以37°C水溫的水循環保溫墊維持兔子體溫，避免因失溫而死亡。掃描時將兔子的後腳接上血氧濃度計(oximeter)，肚子綁呼吸監測器，監測兔子的生命狀態。造影時使用的線圈是double loop array (DLA)線圈，並貼近兔子頭部增強訊號的強度。

2.2 實驗的取像與分析

本實驗用磁共振造影擷取影像，並用GQI來分析影像資料。GQI是以DSI studio分析四種擴散參數，包括generalized fractional anisotropy, isotropic value of the ODF, normalized quantitative anisotropy，之後使用ImageJ圈選大白兔的大腦皮質、海馬迴、胼胝體、嗅球，然後再除上紋狀體當校正。

第三章、結果與討論

本研究以和人類一樣同為非適當宿主的紐西蘭大白兔作為實驗對象，由於為非適當宿主，所以一旦被具有感染性的第三期幼蟲感染，廣東住血線蟲只會在腦部中移行，並對中樞神經產生破壞。並不會像適當終宿主大鼠，感染後其幼蟲會自腸胃道移行到腦中，發育成第四或第五期幼蟲，然後再移行至心臟與肺動脈發育成成蟲。

將感染後的兔子每週都進行一次磁振造影，共持續六週，觀察不同時期感染程度的變化，並將感染前的資料當作對照組，互相比較腦部病變的特徵，再經過後處理分析，把影像輸出成GQI參數，圈選代表性的解剖位置來看腦部組織的病變。

另外把GQI和過去我們曾使用的DTI做相關性的分析，來探討兩者分析技術在偵測廣東住血線蟲所造成的腦部病變的差別。

(一)GQI 分析結果

經實驗及分析研究之後，(Fig.4)為將感染前的兔腦輸出GQI參數GFA、ISO及NQA的單一切面影像圖一直到感染寄生蟲後六週的影像。從圖中，我們並無法以肉眼直接觀察感染廣東住血線蟲的兔腦所產生的腦部病變，所以我們將GQI參數影像經過分析軟體Image J圈選ROI定量化後來看感染後兔腦的變化。

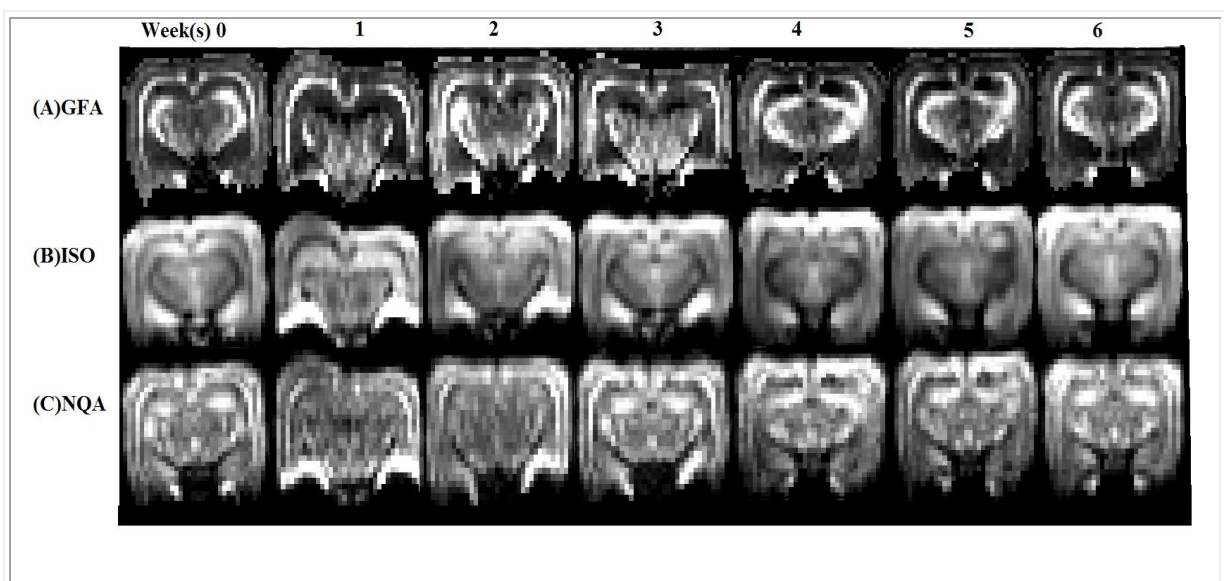


Fig.4 感染了 700 隻廣東住血線蟲的兔腦，未感染前及感染後 42 天所造成的腦部變化其 GQI 參數影像(A)GFA，(B)ISO，(C)NQA。

將GQI參數影像定量分析後，結果發現兔腦的紋狀體(CPu) (Fig.5C)並沒有因為感染寄生蟲而有變化，所以用於當作基準值，標準化其他部位的GQI指標。

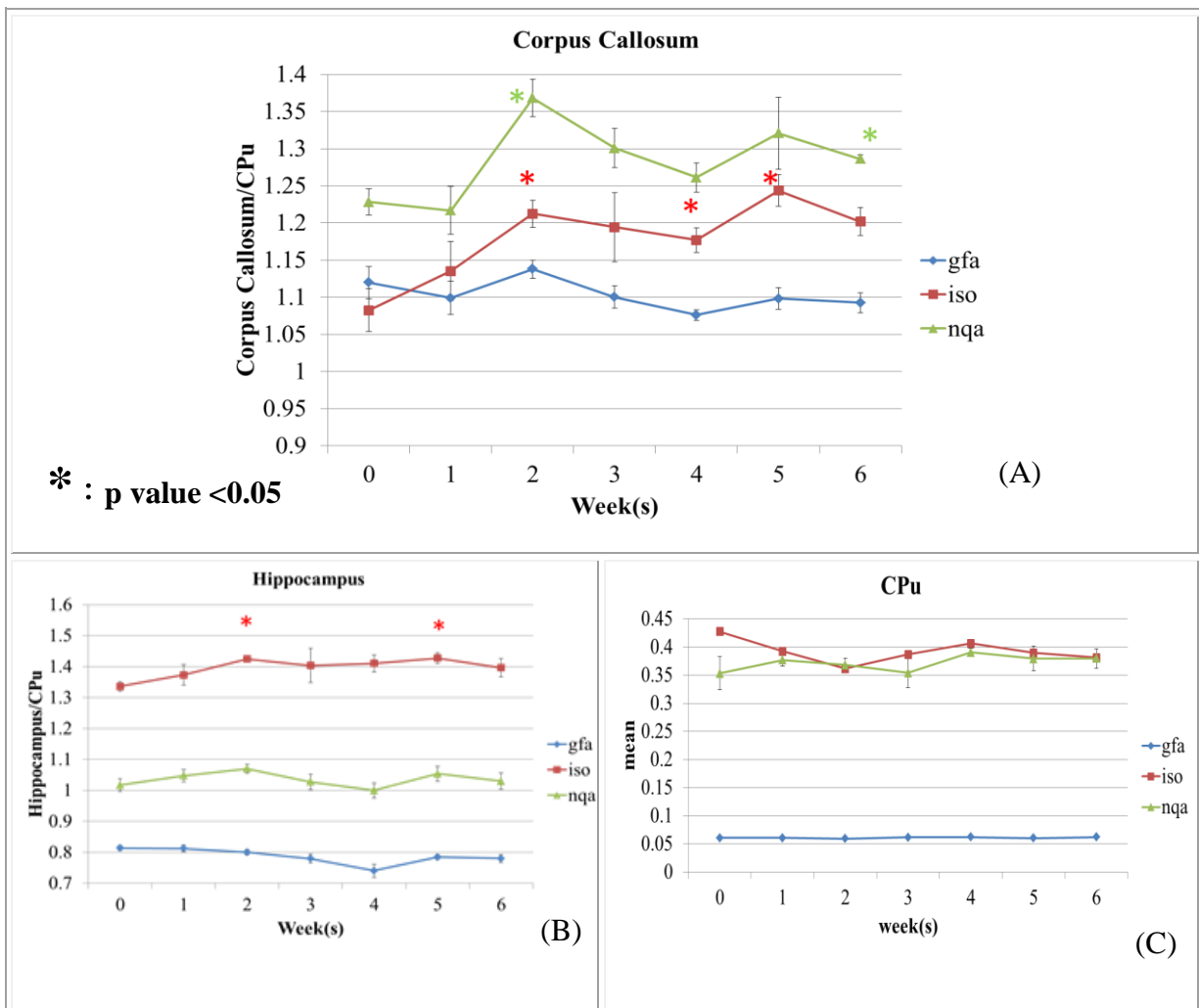
由(Fig.5A)可以看到感染廣東住血線蟲後的胼胝體(corpus callosum)在第二週的時候ISO有上升的趨勢，p值為0.0423，雖然在第三週有下降的情形，但第四週後又開始

回升，p值為0.0476，上升的情形一直持續到第五週。而NQA過了第二週之後曲線有稍稍下降的趨勢，GFA則沒有明顯的變化。我們推論ISO上升的原因為感染寄生蟲後的兔腦的腦室變大，導致過多的腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)往腦室周邊的組織移動滲入，使得胼胝體內產生水腫，細胞間隙也因為水分增加而變大。NQA下降可能是胼胝體被感染後，寄生蟲破壞其神經髓鞘及軸突，造成結構上的改變，使細胞間隙因而增加，而GFA參數則對胼胝體的偵測較不敏感。

另外海馬迴(hippocampus)(Fig5.B)在被感染後的第二週，GFA及NQA沒有明顯的變化，但ISO有上升的趨勢，其病理原因為由於寄生蟲的感染，使海馬迴產生病變、血管四周有空洞化的現象，且在血管上皮發現有白血球的浸潤，血管內也充滿血球及有較廣的細胞間隙，代表海馬迴有發炎的現象，造成ISO數值的上升。

從大腦皮質(Fig5.D)來看，ISO在第二週之後有上升的情形，但數值未達統計上的意義，而其他GQI的參數在大腦皮質的分析中沒有明顯的趨勢呈現。

另外我們可以在(Fig5.E)看出GQI參數在偵測嗅球上較不敏感，曲線沒有明顯趨勢。



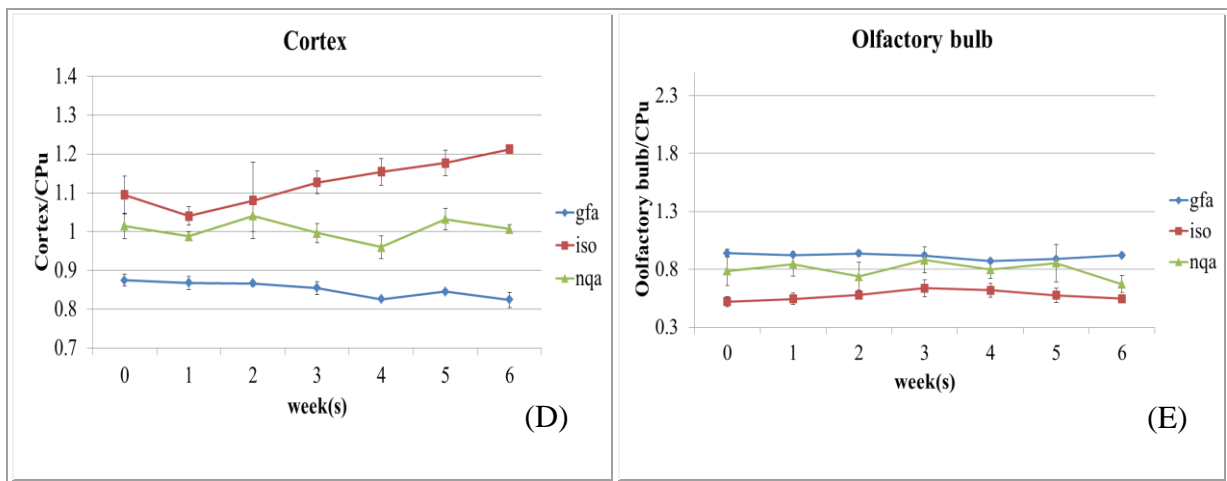


Fig.5 感染 700 隻廣東住血線蟲的兔腦(A)胼胝體及(B)海馬迴(C)紋狀核(D)嗅球(E)大腦皮質的變化。

(二)GQI 與 DTI 的相關性分析

過去我們使用 DTI 來研究廣東住血線蟲所造成的病症，但由於 DTI 對於偵測結構較複雜的神經纖維仍有不足，於是本研究使用 GQI 來分析，並計算兩個分析技術的相關性，且假設兩者的相關性為線性關係，計算出相關係數 R 並判斷兩者的關係。

首先我們將 FA(fractional anisotropy)和 NQA 兩者做比較，DTI 的參數 FA 可以用來觀察水分子的走向，常用於評估物質的非等張性，其數值介於 0-1 之間。由(Fig.6A)可以看出 FA 和 NQA 呈現正相關性，原因為 FA 是評估物質非等張性(anisotropy)的指標，當 FA 數值越大代表物質越趨向非等張性；數值越小則趨向等張性(isotropy)，可以用來計算微小物質的結構變化。而 NQA 主要看的是結構中方向性最大的神經纖維，也就是主要的神經分佈走向，他可以去除訊號低或是趨於等張性的神經纖維，具有降雜訊的功能，所以 FA 和 NQA 兩者的意義大致相同，故呈現為正相關性。

接下來我們從(Fig.6B)來看 MD 和 ISO 之間的相關性，MD (mean diffusivity)和 ISO 之間並無太大的關聯，由 R 的數值更可明確得知兩項分析參數呈現無相關性，其原因解釋為 MD 是用來評估物質在空間中的擴散能力，也就是說看的是物質擴散的快慢，其單位為 mm^2/s ，不能用來查看物質擴散的方向性，而 ISO 是看物質結構中其等張性的比例含量有多少，可以觀察神經纖維中分布最小的結構。所以雖然 MD 及 ISO 在定義上都是看物質的等張性，但本質上的意義卻不相同，這代表 ISO 可以帶給我們關於神經結構上更多的資訊，能提供比 MD 更多的診斷訊息。

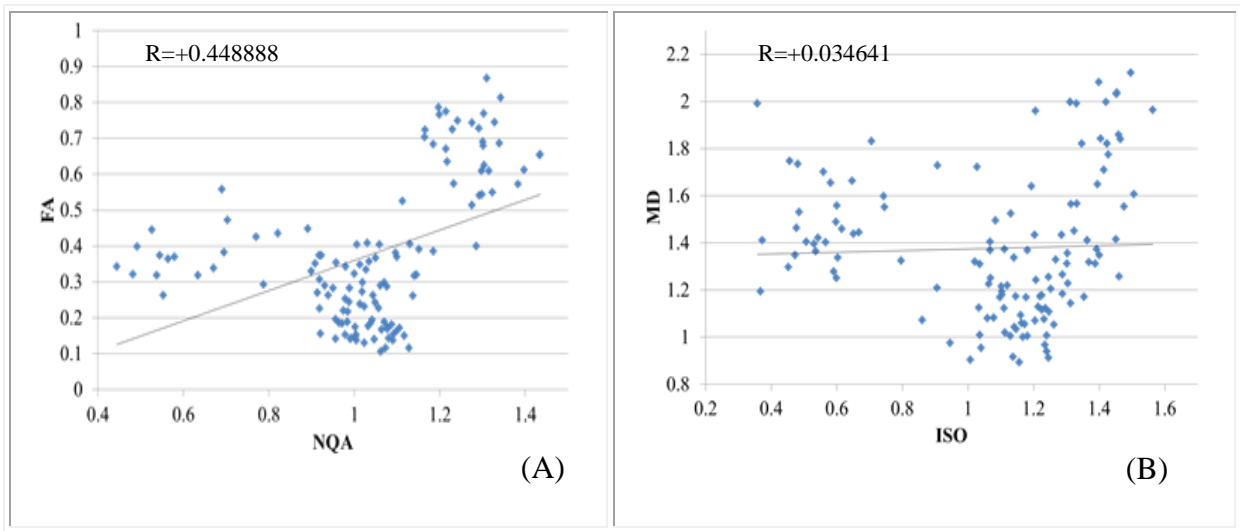


Fig.6 分別為 DTI 及 GQI 兩種分析技術的相關性比較圖。(A)FA 及 NQA 呈現正相關性，(B)MD 及 ISO 呈現無相關性。

第四章、 結論

綜合以上結果我們可以得知，在被廣東住血線蟲感染的兔腦中，隨著感染週數的增加，對於兔腦產生神經結構上的病變，尤其是在胼胝體以及海馬迴中 GQI 參數的結果更可以顯著的看出腦部的病變。感染寄生蟲後的胼胝體 ISO 有上升的趨勢，而 NQA 有下降的情形，在海馬迴中 ISO 也有上升的現象，這些都可以代表 GQI 在偵測交錯的神經纖維能有較好的診斷能力，且對於灰白質組織皆具有更佳的診斷潛力。雖然 DTI 已經廣泛的應用在臨床的診斷上，但是當造影的部位遇到較複雜的神經纖維時，DTI 的準確度較不足，而 GQI 的優勢在於可適用不同的取樣方法，還可以分析水分子在非高斯分佈下的擴散，且對交錯的神經纖維有較好的偵測。期許未來 GQI 這項無輻射且非侵入性的診斷技術能輔助 DTI 在臨床上診斷廣東住血線蟲所引起的腦部病變及病症。

參考文獻

- [1] Alicata JE, **Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurologic disorders of man and animals.** *Advances in Parasitology*. 1965; 3: pp.223-248.
- [2] Chen ER, **Angiostrongyliasis eosinophilic meningitis on Taiwan : a review.** In: Cross JH, ed. *Studies on angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia*. Taipei: NAMRU-2 Special Publication.1979; pp.57-73.
- [3] D.T. John, A. J. Martinez, **Animal model: eosinophilic meningoencephalitis in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis* Animal model of human disease.** 1975 August; 80(2): pp.345-348.
- [4] Ling-Yuh Shyu, et al., **In vivo Pathological Mapping of the Rat Brain Infected with *Angiostrongylus Cantonensis* using MRI.** Proc 19th ISMRM Ann Meeting, Montreal, Quebec, Canada. 2011; No. 2281.
- [5] Hsin-Yuan Chang, et al., **Eosinophilic Meningitis Caused by *Angiostrongylus Cantonensis*-one Case Report.** *中華放射線醫學雜誌*. 1992; pp.165-169.
- [6] 董光中, et al., **廣東住血線蟲腦髓症之磁振造影.** *中華民國獸醫學會雜誌* 1998; p.29.
- [7] Hao-Hung Tsai, et al., **In Vivo Characterization of Rabbit Eosinophilic Meningitis Caused by *Angiostrongylus Cantonensis*,** Proc 20th ISMRM Ann Meeting, Melbourne, Australia. 2012; No. 913.
- [8] Fang-Cheng Yeh, et al., **Generalized Q-Sampling Imaging.** *IEEE Trans Med Imaging*. 2010; 27: pp.1415-1424.