

Investigation of light stimulated mouse brain activation in high magnetic field fMRI using image segmentation methods

Wook Kim*, Sang-Keun Woo**, Joo Hyun Kang***, Sang Moo Lim****

Abstract

Magnetic resonance image (MRI) is widely used in brain research field and medical image. Especially, non-invasive brain activation acquired image technique, which is functional magnetic resonance image (fMRI) is used in brain study. In this study, we investigate brain activation occurred by LED light stimulation. For investigate of brain activation in experimental small animal, we used high magnetic field 9.4T MRI. Experimental small animal is Balb/c mouse, method of fMRI is using echo planar image (EPI). EPI method spend more less time than any other MRI method. For this reason, however, EPI data has low contrast. Due to the low contrast, image pre-processing is very hard and inaccuracy. In this study, we planned the study protocol, which is called block design in fMRI research field. The block designed has 8 LED light stimulation session and 8 rest session. All block is consist of 6 EPI images and acquired 1 slice of EPI image is 16 second. During the light session, we occurred LED light stimulation for 1 minutes 36 seconds. During the rest session, we do not occurred light stimulation and remain the light off state for 1 minutes 36 seconds. This session repeat the all over the EPI scan time, so the total spend time of EPI scan has almost 26 minutes. After acquired EPI data, we performed the analysis of this image data. In this study, we analysis of EPI data using statistical parametric map (SPM) software and performed image pre-processing such as realignment, co-registration, normalization, smoothing of EPI data. The pre-processing of fMRI data have to segmented using this software. However this method has 3 different method which is Gaussian nonparametric, warped modulate, and tissue probability map. In this study we performed the this 3 different method and compared how they can change the result of fMRI analysis results. The result of this study show that LED light stimulation was activate superior colliculus region in mouse brain. And the most higher activated value of segmentation method was using tissue probability map. this study may help to improve brain activation study using EPI and SPM analysis.

▶ Keyword : fMRI, Image segmentation, SPM, mouse brain activation

• First Author: Wook Kim, Corresponding Author: Sang-Keun Woo

*Wook Kim (decom0405@kirams.re.kr), Korea Institute of Radiological and Medical Sciences

**Sang-Keun Woo (skwoo@kirams.re.kr), Korea Institute of Radiological and Medical Sciences

***Joo Hyun Kang (kang2325@kirams.re.kr), Korea Institute of Radiological and Medical Sciences

****Sang Moo Lim (smlim328@kirams.re.kr), Korea Institute of Radiological and Medical Sciences

• Received: 2016. 08. 26, Revised: 2016. 10. 06, Accepted: 2016. 12. 02.

• This research was supported by a Basic Science Research Program (NRF-2011-0012830) and Nuclear Research & Development Program (NRF-2012M2A2A7013480) through the NRF of Korea funded by the MEST and by the National R&D Program through the KIRAMS (No. 1711021908).

I. Introduction

자기공명영상(magnetic resonance image, MRI)은 의료영상 분야에서 이용되고 있는 영상 획득방법 중 하나이다. 방사선의 발견에 따른 X-ray와 computed tomography (CT) 영상의 발명 이후, 의료 영상은 최근까지 비약적인 발전을 해왔다. 이중 가장 최신 기술이자 최근 가장 널리 연구되고 있는 MRI는 비침습적이며 방사선피폭이 없다는 장점으로 매우 주목 받는 의료영상 기법이다. MRI로 얻어진 의료영상은 여러 가지 방법으로 분석 되고 질병을 진단할 수 있다. MRI는 체내에 존재하는 수소 원자의 성질을 이용하여 영상을 획득하는 기법이다. 체내에 존재하는 물 분자는 수소 원자를 갖고 있으며 이러한 수소 원자는 인체를 구성하는 세포의 특성에 따라 구성 비율이 각각 다르다. 이러한 차이점을 이용하기 위하여 MRI는 먼저 각 수소 원자핵을 일정한 방향으로 정렬하기 위하여 자장을 걸어준다. 세차운동은 주변에 형성된 자장 때문에 수소 원자가 일정한 방향으로 회전하는 것을 의미한다. 이러한 세차운동 이후에는 특정 주파수의 전자파를 생성해주고 특정 시간 이후 전자파를 제거해주면 수소 원자는 원래의 상태로 돌아오게 되는데 이때 원래 상태로 돌아가는 시간을 relaxation time이라 한다. 인체를 구성하는 각 조직 및 세포는 보유하고 있는 수소 원자에 차이가 있다. 수소 원자의 비율 차이는 외부 주파수에 의한 수소 원자 회복시간의 차이를 일으키게 된다. 결국, 세포를 구성하고 있는 수소 원자의 차이는 relaxation time의 차이로 이어지고 이는 MRI 영상을 획득할 수 있는 근본적인 원리로 작용하게 된다[1].

MRI 장비를 이용하여 영상을 획득하는 방법에는 spin-lattice relaxation time을 이용한 T1 강조영상(T1 weighted image) 이외에도 T2 강조영상(T2 weighted image), 확산강조영상(diffusion MRI), 기능적 자기공명 영상(functional MRI, fMRI) 기법 등이 존재한다[2]. 특히, 기능적 자기공명 영상(functional magnetic resonance image, fMRI)은 양전자방출단층촬영(positron emission tomography, PET)이나 단일광자 단층촬영(single photon emission computed tomography, SPECT) 영상화 기법과 달리 방사선 피폭에 노출되지 않고 영상을 획득할 수 있다는 장점이 있어 뇌 활성화 연구 및 임상 분야에서 널리 이용되고 있다[3,4].

fMRI 영상은 외부의 자극이나 영향에 의해 뇌의 옥시헤모글로빈(oxyhemoglobin)과 데옥시헤모글로빈(deoxyhemoglobin) 비율 변화를 측정하는 원리로 영상을 획득한다. 자극이 없을 때 뇌 영역에는 헤모글로빈이 산소를 포함한 형태인 옥시헤모글로빈과 산소를 포함하지 않은 데옥시헤모글로빈이 일정 비율로 존재한다. 만약 외부에서 자극이 가해지면 뇌 영역은 활성화되며 이때 활성화된 신경세포는 산소를 소모하게 되며 이를 영상화하는 기법이다[5]. 즉, 외부 자극에 의한 뇌 활성을 위해서는 산소 소모를 동반하게 되고

이러한 산소의 소모는 옥시헤모글로빈과 데옥시헤모글로빈의 비율변화를 일으키게 된다. 산소를 포함한 옥시헤모글로빈은 일반적으로 데옥시헤모글로빈 보다 낮은 자화율을 갖게 되기 때문에 MRI 영상 장비를 이용하여 뇌 활성을 관찰할 수 있게 된다[6].

EPI (echo planar image) 영상 획득 방법은 무선주파수 (radio frequency, RF)를 경사 에코(gradient echoes)와 서로 다른 공간부호화(spatial encoding)방법을 통해 영상을 획득하는 고속영상화 기법이다[7,8]. EPI 영상 획득 방법은 T1 강조 영상이나 T2 강조 영상과 다르게 빠른 시간 동안 뇌 영상을 획득하는 방법으로 영상의 대비(contrast)가 낮다. 이러한 한계점 때문에 영상 분석 시 영상 전처리 과정이 부정확하고 불완전하게 수행된다.

영상 분석을 위한 statistical parametric mapping (SPM)은 PET, SPECT, MRI와 같은 의료 영상 장비로 얻어진 뇌 영상 데이터를 통계적인 방법을 이용하여 분석하는 소프트웨어이다. SPM 외에도 뇌 영상 분석에는 AFNI, FSL 등과 같은 소프트웨어가 연구 및 임상에서 널리 이용되고 있다. SPM을 이용한 영상 분석 방법은 영상의 전처리 과정인 재배열 (realignment), 상관 정렬(co-registration), 분할 (segmentation), 정상화(normalization), 평활화(smoothing) 과정을 거친 다음 최종적으로 model estimation 과정을 거쳐 해당 연구의 통계적 분석 방법을 설정하여 복셀 기반의 형태 계측(voxel based morphometry, VBM)을 통하여 영상 간 복셀 차이를 통계적으로 검증한다. 본 연구에서는 초고자장 내 광자극 소동물 EPI 영상에 대한 마우스 시각 영역 활성화 분석 방법을 제시하고자 하였습니다.

II. Materials and Methods

1. LED stimulation tool produce

광자극용 LED 장치를 소동물 뇌 영역의 활성을 평가하기 위하여 초고자장 MRI 영상 획득 중에 작동 가능한 LED (light emitting diode) 장치를 제작 하였다. MRI는 영상 획득 시 고자장을 발생시키기 때문에 LED 광자극이 제대로 발생하지 않을 수 있다. 이러한 문제점을 피하기 위하여 본 연구팀은 전선 내부에 편조체(braid shield)가 포함된 전선을 사용하고 LED를 이용하여 광자극을 줄 수 있는 장치를 제작하였다. 해당 장치를 Fig. 1과 같이 소동물이 위치하는 곳에 부착해주었고, 뇌 영상을 획득하기 위하여 장착된 코일 내에 위치시켜주었다. LED 광자극은 외부에 설치된 스위치를 이용하여 주기적으로 진행해 주었다.



Fig. 1. Manufactured LED for light stimulation, and access on 9.4T MRI system

2. MRI data acquisition

실험용 소동물 뇌 MRI 영상은 소동물 전용 초고자장 MRI (9.4T MRI, Agilent, Santa Clara, CA)를 사용하여 영상을 획득하였다. 소동물 뇌의 구조적 정보를 얻기 위하여 T1 강조 영상(spin-lattice relaxation or T1 weighted image)과 뇌 영역의 활성 변화에 대한 영상을 획득하기 위한 EPI 영상을 각각 획득하였다. T1 강조 영상의 경우 영상 matrix 크기는 256 x 256으로 설정하였으며, Field of view (FOV)는 20 x 20mm², 영상 각각의 slice 두께는 1mm로 설정해 주었으며 하나의 프레임 내에 총 18개의 slice가 포함 되도록 설정하였다. EPI 영상의 경우 matrix 크기는 64 x 64로 설정해 주었으며, field of view는 20 x 20 mm², 영상의 slice 두께는 1 mm로 영상을 획득하였고, 영상 하나의 프레임당 총 18개의 slice가 포함 되도록 설정하여 영상을 획득 하였다. MRI 영상 획득 파라미터는 T1 weighted 영상의 경우 repetition time 은 500ms, echo time은 14.28ms로 설정해 주었으며, fMRI 영상은 repetition time 2000ms, echo time 30.00ms로 설정하여 영상을 획득하였다.

영상획득 과정에서 실험용 소동물의 움직임을 방지하기 위하여 소동물을 아이소플루레인을 이용하여 약하게 마취를 유도하여 주었으며, 이후에 medetomidine 을 이용하여 마취시켜주었다[9]. Medetomidine은 NMDA 수용체 길항제 (N-Methyl-D-aspartic acid receptor antagonist)로서 소동물을 이용한 fMRI 연구에서 가장 널리 이용되고 있는 마취제이다. Medetomidine이 투여된 동물은 눈을 뜬 채로 시각적인 자극을 수용할 수 있게 된다.

영상의 획득 순서는 해부학적 정보를 얻기 위해서 먼저 T1 영상을 획득하였으며, 해당 영상은 대략 10분에 걸쳐 영상을 획득하였다. 뇌 활성 EPI 영상은 하나의 영상을 획득할 때 16 초의 시간이 소모되었으며, 광자극은 영상획득 후 16초 이후부터 자극의 유무를 1분 36초 간격(16 sec * 6 EPI image)으로 광자극을 주기적으로 반복하였다[10,11]. EPI 영상은 총 96개의 영상을 획득하였으며, 한 번의 광자극 세션에서는 6번의 EPI 영상을 획득하였다. 주기적인 광자극에 의한 뇌 활성 변화를 EPI 영상을 토대로 관찰하기 위해서 본 연구에서는 Block design이라는 실험 방법을 도입하였다. 본 실험 방법은 기능적 자기공명 영상 획득 실험에서 널리 이용되고 있는 방

법으로, 동일 대상 내에서 자극의 유무에 대한 실험을 한 번의 영상 획득을 통해서 관찰할 수 있는 실험 방법이다.

Table 1. Information of T1 and EPI

	T1	EPI
Matrix size	256 x 256	64 x 64
FOV	20 x 20 mm ²	20 x 20 mm ²
Slice Thickness	1 mm	1 mm
Number of slice	18	18

3. Statistical Parametric Mapping analysis

획득된 초고자장 소동물 MRI 영상 분석은 statistical parametric map (SPM)을 이용하여 분석하였다. SPM 소프트웨어를 구동시키기 위해서는 Matlab이라는 프로그램이 필요하다. 본 연구에서는 Matlab 2016a (Mathworks Inc., USA)를 이용하여 해당 환경에서 SPM12 버전을 구동하여 영상 분석을 진행하였다.

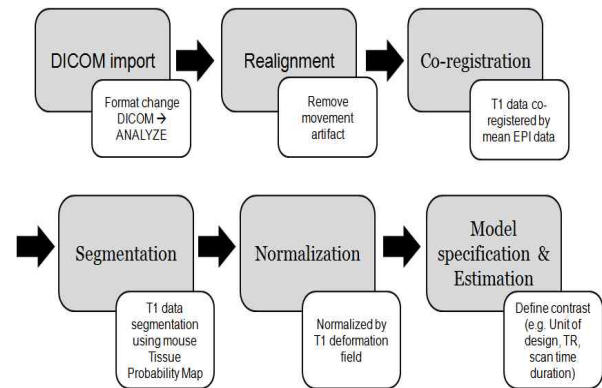


Fig. 2. Scheme of SPM analysis using fMRI data.

영상을 분석하기 위해서는 영상 전처리 과정이 있어야 하는데 본 연구에서는 먼저 초고자장 EPI 영상 획득 중 소동물의 움직임 보정을 위한 과정인 realignment 과정을 진행하였다 [12]. 이러한 realignment 과정은 소동물의 움직임에 관한 뇌 영상의 오차를 줄여주기 위한 움직임 보정 과정이다. Realignment는 영상 분석 전에 가장 먼저 수행해야 하는 영상 전처리 과정 중 하나이며, 본 연구에서는 전체 획득된 EPI 영상의 평균 영상을 구하고, 평균 영상을 바탕으로 realignment 과정을 진행해 주었다. Realignment를 해주기 위해서 SPM 상에서 설정값을 지정해줘야 하는데, 먼저 모든 EPI 데이터를 input 데이터로 넣어준 다음 Num passes 설정값은 Register to mean으로 설정하여 준다. 이는 모든 영상의 평균 영상을 생성하고 이를 바탕으로 registration을 진행한다는 것을 의미한다. Resliced image 설정값은 mean image only로 설정하여 준다. 이 설정값의 의미는 입력된 모든 영상에 대해서 reslice를 진행 하는 것이 아니라 EPI 평균 영상에 대해서만 reslice 과정을 진행한다는 의미다. 즉, 영상을 크기를 변화시키는 과정을 모든 영상에 적용하는 것이 아닌 평균

영상만을 reslice 시킨다는 의미이다.

Co-registration 과정은 realignment 과정 이후 생성된 평균 영상을 바탕으로 서로 다른 공간 정보상에 위치한 T1 강조 영상을 하나의 공간상에 위치시켜주는 영상 전처리 과정이다. Co-registration 과정은 SPM 상에서 co-registration을 실행한 다음, reference image는 reslice 된 mean EPI image를 입력해주고, Source image에는 T1 영상을 설정값으로 입력해준다. 이렇게 설정하는 이유는 이후에 진행되는 segmentation 과정을 T1 강조 영상을 이용하여 진행한 다음 생성된 deformation field를 이용하여 EPI 영상을 normalization 해줘야 하기 때문이다. 이후 영상 분석에 필요한 뇌 영역만을 추출해 주는 segmentation 과정과 이후 추출된 뇌 영상을 표준화 영상으로 만들어 주는 normalization 과정을 각각 진행 하였다[13].

Segmentation 과정은 volume data에 co-registration 된 T1 영상을 입력해 주고, segmentation의 기준이 되는 tissue probability map은 표준 template로 제공되는 mouse brain template를 사용하였다. 해당 과정에서는 설정값에 따른 서로 다른 3가지 영상 분할 방법이 존재한다. 분할하고자 하는 영역의 영상의 강도(Intensity)를 반영해 주는 Gaussian nonparametric 방법과, 영상의 세포 영역에 대해서 공간 표준화(Spatial normalization)을 수행하는 Warped modulated 방법, 그리고 해당 소동물의 표준 template를 제공해주고 제공된 template를 기반으로 분할 과정을 수행하는 Tissue probability map 방법이 존재한다. 본 연구에서는 각각의 분할 과정을 통한 결과를 바탕으로 뇌 활성화에 대한 영상 분석 연구를 수행하였다.

Normalization은 분할된 영상을 표준화해주는 방법으로 입력되는 deformation field는 segmentation 과정이 끝난 후 얻어지는 결과를 바탕으로 진행된다. 이러한 deformation field를 기반으로 입력 영상은 모든 EPI 영상을 normalization 과정을 진행하면 EPI 영상의 표준화 과정은 끝나게 된다. 본 연구에서는 normalization의 결과 영상의 voxel size를 0.2mm로 설정해주고 영상의 normalization을 진행하였다.

이후 분석을 위한 영상을 smoothing을 해주면 분석을 위한 영상 처리 과정은 마무리가 된다. 본격적인 영상의 복셀 간 분석을 위한 평활화 과정은 가우시안필터를 이용하여 평활화를 수행한다. 이러한 평활화 과정은 복셀 간 분석을 하기 위해서 반드시 선행되어야 하는데, 그 이유는 정합필터(matched filter) 이론에 의하여 예상되는 기능 단위의 범위에 맞는 필터를 사용하면 최적의 검출 성능을 보여주기 때문이며, 둘째는 중심극한정리(central limit theorem)에 의해서 여러 복셀이 겹쳐지면서 일반선형모델의 오차 항을 정규 분포화 시키게 하고 결과적으로 모수적 통계기법 적용을 더 유리하게 하기 때문이다. 마지막으로 공간 정규화 시 발생한 정합 에러를 보정해 주기 때문에 이러한 평활화 과정은 반드시 필요하다[14].

평활화 과정 이후에는 전처리가 완료된 영상을 이용하여 영

상 분석을 진행하게 되는데, 이러한 과정을 model specification & estimation 과정이라 한다. 분석 과정은 SPM을 이용하여 수행된다. SPM의 model estimation의 설정값은 영상의 Interscan interval 값 및 평활화가 완료된 모든 EPI 영상을 입력해주고, duration 설정값은 하나의 block 당 구성 되는 영상의 개수를 나타내며 본 연구에서는 6개가 하나의 블록으로 구성 되어 있다. 마지막으로 onset 설정값은 6:12:84로 입력을 해주어 분석을 진행하였다. 전처리가 완료된 뇌 영상을 바탕으로 통계적인 분포 지도를 작성해 주면 활성화된 뇌 영역만이 표시된 영상인 voxel based morphometry 분석 영상을 획득하게 된다[15,16]. VBM 영상 획득 후, 각각의 영상 분할 방법에 따른 뇌 활성화 정도를 확인하기 위하여 Fig. 3.과 같이 관심 영역을 정의하여 활성화 정도를 비교하였다.

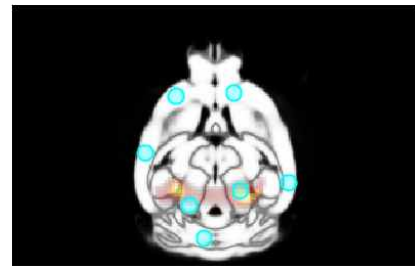


Fig. 3. Defined region of interest (RoI) in mouse brain. Blue circle was define the specific regions.

본 연구에서 총 96개의 초고자장 EPI 영상을 획득하였지만 영상의 분석에는 84개의 영상만을 이용하였다. MRI 영상 획득 시 먼저 T1을 얻은 다음 EPI를 얻게 되면 자기포화효과(magnetic saturation effect)의 영향을 받게 되어 정확한 영상 분석이 어렵기 때문이다[17].

III. Result

1. MRI acquisition

일반적으로 소동물을 이용한 초고자장 fMRI 영상 획득 시, 소동물 마취를 위하여 α -클로라로스 또는 medetomidine를 마취제로 사용한다. 본 연구에서는 광자극에 의한 뇌 활성을 관찰하기 위해 NMDA 수용체 길항제(N-Methyl-D-aspartic acid receptor antagonist)인 medetomidine 을 이용하여 fMRI 영상을 획득하였다. 마취약에 대한 소동물의 뇌 활성화에 대한 영향은 기존의 선행 연구를 통해서 입증되었다. 해당 연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 광자극에 의한 소동물의 뇌 활성화에 대한 연구를 수행하기에 가장 적합한 약물로 medetomidine을 선택하여 연구를 진행하였다. Medetomidine은 0.3 mg/kg 용량으로 피하 주입(subcutaneous injection)해주었다.

초고자장 MRI 영상은 해부학적 정보를 얻을 수 있는 T1

강조 영상과 EPI 영상을 각각 영상화하여 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3(A)의 영상이 T1 영상을 의미하며 보이는 방향에 따라 수평면(transverse), 관상면(coronal), 시상면(sagittal)으로 보여주었다. T1 강조 영상에는 뇌의 두개골 영역 이외에도 soft tissue와 같은 기존의 영상 장비로는 영상 획득이 어려웠던 부분까지 모두 영상화할 수 있다. 이와 같이 T1 강조 영상에서는 뇌 영역의 해부학적 경계를 명확히 파악할 수 있어 뇌 영상 분석 및 전처리 과정에서 해부학적 정보를 제공하는데 사용하였다. Fig. 4(B)은 EPI 영상 획득 방법을 이용한 초고자장 소동물 뇌 영상이다. Fig. 4(A)의 T1 영상과는 다르게 각 영역간의 대비(contrast)가 좋지 않아 상대적으로 영상의 질이 떨어져 보이고 짧은 시간 동안에 획득하는 영상화 기법 때문에 영상 기기로 전송되는 신호가 약해 잡음이 많다. 하지만 구조적인 정보만을 제공하는 T1과는 다르게 EPI는 외부 자극에 의한 뇌 영역의 활성화를 관찰할 수 있는 장점이 있다.

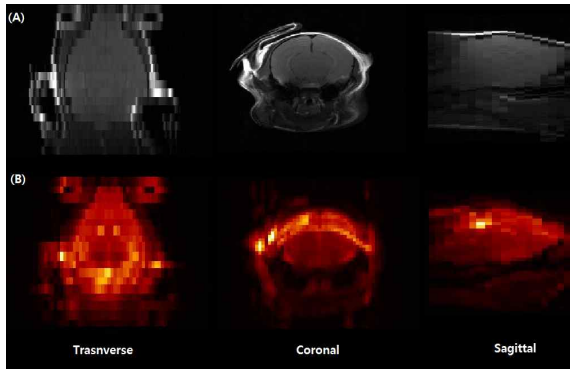


Fig. 4. fMRI EPI data (A), T1 weighted image (B) in vivo Balb/c mouse brain EPI data.

2. SPM analysis

본 연구에서는 획득된 EPI 영상을 바탕으로 광자극이 소동물 뇌의 어떤 영역을 자극하고 영상으로 표현되는지 SPM 소프트웨어를 이용하여 voxel-based morphometry (VBM) 분석을 수행하여 관찰하였다.

Realignment 과정에서 96개의 fMRI 영상 모두 translation과 rotation의 결과를 Fig. 5를 통해 확인하였다. 본 연구에서는 medetomidine 이라는 상용되고 있는 동물용 마취제를 실험용 소동물에 투여하고, 영상기기인 MRI와 LED 광자극을 이용하여 뇌 활성화 관찰 연구를 진행하였다. 해당 마취제는 소동물을 완전히 움직이지 못하게 보정하는 것이 아니므로 영상 획득 후에 realignment 과정이 반드시 필요하며, Fig. 5의 결과를 얻기 위하여 realignment 과정을 수행을 하면 각각의 공간상의 위치를 EPI 평균 영상에 맞춰 일치시켜준다. translation에서 가로축은 각각의 EPI 영상을 나타내며 세로축의 mm은 영상의 평균으로부터 얼마나 이동했는지를 보여준다. translation에서는 영상의 x, y, z 방향으로 이동을 해주며 rotation에서는 영상에서 보여주는 물체를 기준에 맞춰서 pitch, roll, yaw 회전축으로 각도를 변경해준다.

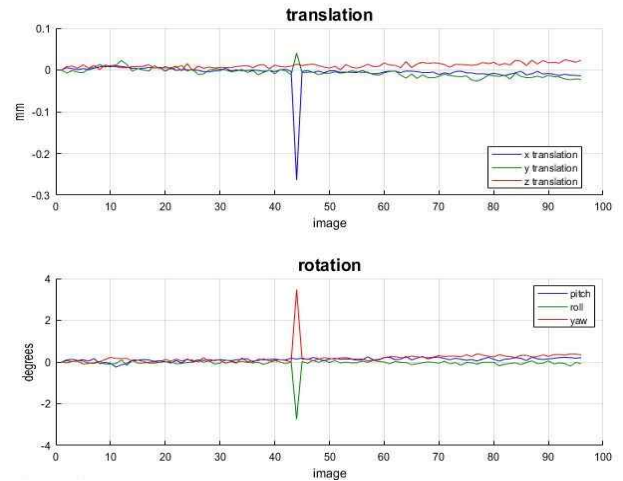


Fig. 5. Translation (x, y, z) and rotation (pitch, roll, yaw) in realignment processing of fMRI data.

Realignment 과정 이후에 진행된 EPI 평균 영상과 T1 영상 간의 co-registration 과정을 통하여 Fig. 6를 얻을 수 있었다. Fig. 6에서 좌측에 나타난 영상이 reference image인 reslice EPI 평균 영상이고, 오른쪽의 영상이 T1 영상이다. Co-registration 과정 이후에 결과 창에서 커서를 이용하여 EPI 영상과 T1 강조 영상이 서로 같은 위치를 나타내고 있는지 확인하는 작업을 진행한 후 segmentation 과정을 진행하였다.

Normalised Mutual Information Coregistration

$$\begin{aligned} X1 &= 0.250^{\circ}X + 0.007^{\circ}Y + 0.006^{\circ}Z - 1.607 \\ Y1 &= -0.007^{\circ}X + 0.250^{\circ}Y - 0.004^{\circ}Z + 1.479 \\ Z1 &= -0.006^{\circ}X + 0.004^{\circ}Y + 0.250^{\circ}Z + 0.170 \end{aligned}$$

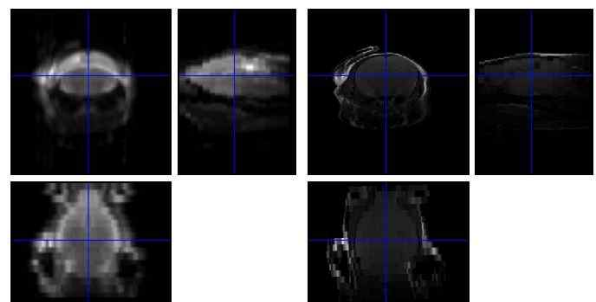
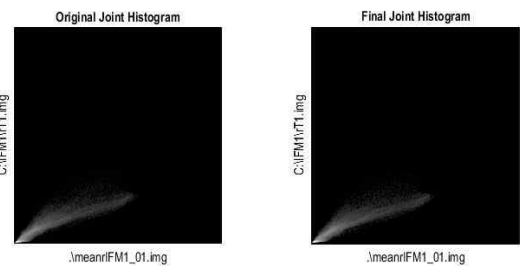


Fig. 6. Result of in vivo Balb/c mouse fMRI and T1 weighted data co-registration.

Segmentation 과정에서는 Fig. 7과 같이 3가지 방법에 대

하여 각각의 분할 방법에 따른 영상 분석을 진행하였다. 뇌 활성화 분석 결과에서 Tissue probability map을 이용한 분할 방법이 가장 높은 값을 나타냈으며, Gaussian nonparametric 방법에서는 분할이 정확히 이뤄지지 않아 소동물 회백질(Gray matter)과 백질(White matter) 영역을 분할해내지 못하는 결과를 확인하였다. 따라서 최종적으로 뇌 활성화에 대한 결과는 Warped modulate 방법과 Tissue probability map을 이용한 방법을 각각 비교 분석하였다.

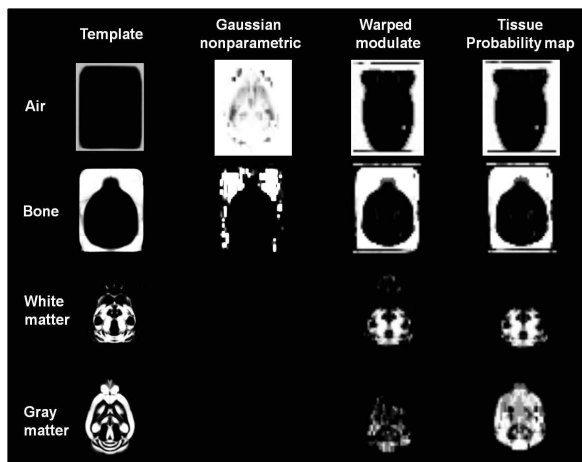
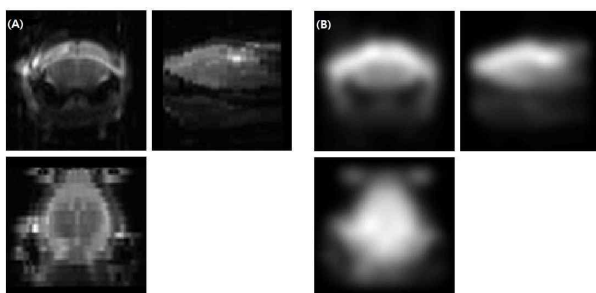


Fig. 7. Result of each difference of segmentation method. Gaussian nonparametric, Warped modulated, and Tissue probability map.

Normalization은 segmentation 과정 이후 생성된 deformation field를 이용하여 모든 EPI 영상에 적용 해주면 Fig. 8(A) 결과를 얻을 수 있다. 영상은 첫 번째부터 시계방향으로 관상면, 시상면, 수평면으로 배치하였다.

Smoothing 과정은 Gaussian smoothing kernel 방법을 이용하여 2mm의 설정값으로 진행해주면 Fig. 8(B) 결과를 얻게 된다.



영상의 전처리 과정이 끝나면 model specification & estimation 과정으로 넘어간다. 이 과정은 모든 EPI 영상의 voxel을 각각 비교하여 활성화된 뇌 영상을 표현을 해주게 되는데 이러한 방법을 VBM이라고 한다. 결론적으로 VBM은 활성화된 뇌 영역에서만 표현이 되게 된다. 활성화 정도가 강하면 노란색을 띠게 되며 반면에 활성화 정도가 약해지면 붉은빛을

띠며 활성화 정도가 전혀 존재하지 않으면 아무런 영상도 나타나지 않게 된다. 이러한 VBM 영상 데이터를 같은 개체의 T1 강조 영상과 정합(fusion)시켜주면 뇌의 어느 영역이 활성화했는지 관찰할 수 있다. 결과적으로 Fig. 9의 결과를 얻을 수 있었으며, 광자극에 의해 소동물 중뇌의 상부에 있는 돌출부 영역(superior colliculus)이 활성화됨을 확인할 수 있었다.

분할 방법에 따른 VBM 결과 값을 비교해 보면 분할 영상 결과와 유사하게 Tissue probability map을 이용한 방법이 전반적으로 더 높은 값을 나타냄을 확인할 수 있었다(Table 2).

Table 2. Evaluated image value between segmented method.

	Warped modulated	Tissue probability map
Left Frontal cortex	-0.1851	-0.1794
Right Frontal cortex	-0.3998	-0.3875
Left Temporal cortex	-0.8379	-0.8218
Right Temporal cortex	-0.1801	-0.1782
Left Midbrain	2.7070	2.7233
Right Midbrain	3.8994	3.9369
Cerebellum	0.5210	0.5491

Tissue probability map을 이용한 방법에서 VBM 뇌 활성화 결과는 오른쪽 중뇌(Midbrain) 영역에서 가장 높은 값을 나타냈으며, 오른쪽 측두피질(Temporal cortex) 영역에서 가장 낮은 결과를 나타냈다. 이와 유사하게 Warped modulate를 이용한 방법의 경우 오른쪽 중뇌(Midbrain) 영역에서 가장 높은 값을 나타냈으며, 오른쪽 측두피질(Temporal cortex) 영역에서 가장 낮은 결과를 나타냈다(Table 2).

초고자장 영상 분할 방법에 대한 뇌 활성화 정도를 나타내는 결과를 비교해보면 전체적으로 Tissue probability map을 이용한 영상 분할 방법에서 전반적으로 높은 값을 나타냈으며, 각 영역에 대한 값의 차이는 왼쪽 전두엽(Left Frontal cortex)의 경우 0.0057 가량 높은 값을 나타냈으며, 오른쪽 전두엽(Right Frontal cortex)은 0.0123, 왼쪽 측두엽(Left Temporal cortex)은 0.0161, 오른쪽 측두피질(Right Temporal cortex)은 0.0019, 왼쪽 측두엽(Left Temporal cortex)은 0.0163, 오른쪽 측두피질(Right Temporal cortex)은 0.0375, 소뇌(Cerebellum)는 0.0281 높은 값을 나타냈다. 결과적으로 광자극에 의한 대뇌 활성을 가장 민감하게 나타내는 영상 분할 방법은 Tissue probability map을 이용한 방법임을 본 연구 결과를 통해 확인할 수 있었다.

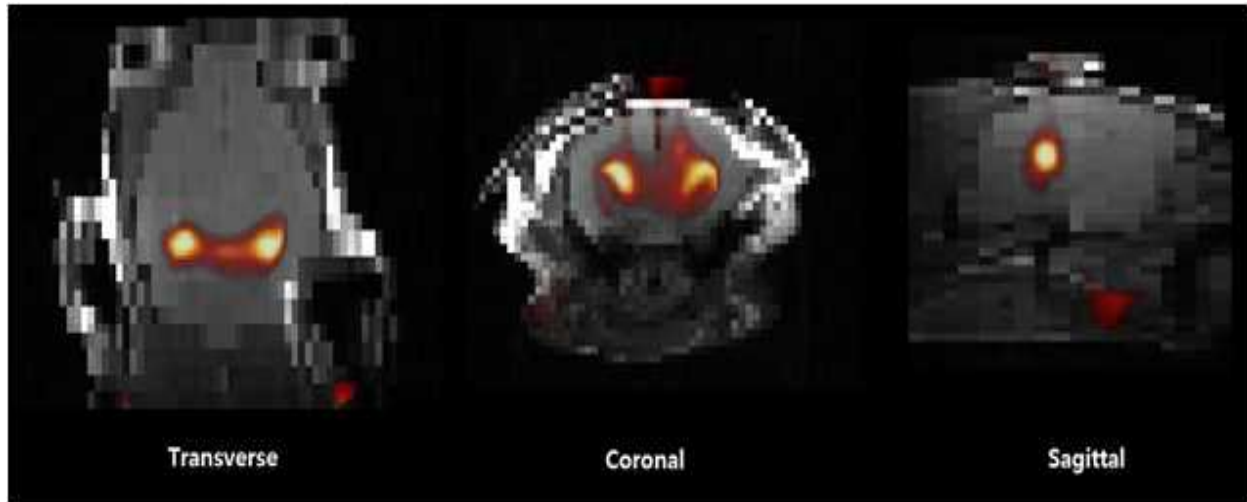


Fig. 9. Overlay the activated area of brain region voxel based morphometry image on Balb/c T1 weighted image

IV. Conclusions

기존의 소동물 MRI 연구는 MRI 장비를 활용하여 특정 질환에 의한 구조 변화를 관찰하는 연구를 진행하거나 fMRI 연구의 경우 EPI 연구는 영상의 대비(contrast)가 매우 낮아 영상의 전처리 과정이 원활하게 진행되지 않아 관련 연구가 매우 희소하게 진행되었다. 하지만 본 연구에서는 이러한 어려움을 극복하고자 초고자장 소동물 fMRI 영상 전처리 과정에서 영상 분할에 관한 3가지 방법에 대하여 각각 진행하였으며, 분할된 영상을 바탕으로 뇌 영상 분석 소프트웨어인 SPM을 이용하여 LED 광자극에 대한 소동물의 뇌 활성화 영역을 관찰할 수 있었다. 분석 결과 Tissue probability map을 이용한 영상 분할 방법이 초고자장 소동물 fMRI 영상분석에서 뇌 활성을 가장 잘 반영하는 영상 전처리 방법임을 확인하였다. 따라서 이러한 연구결과는 이후 수행될 외부 자극에 대한 초고자장 fMRI 영상 분석방법 정립에 큰 기여를 할 것이라 기대된다.

더 나아가 이러한 내용을 바탕으로 본 연구 이외에도 다른 종류의 외부 자극을 이용한 연구 및 전임상 단계에서 정신질환 및 난치성 뇌 질환의 신약개발을 위한 약효평가 및 약물 투여에 의한 체내 변화에 관한 연구를 EPI와 MRI 기법을 활용하여 소동물에서 수행할 수 있을 거라 기대된다. 또한 이러한 영상분석 방법의 정립은 이후에 진행될 의료영상을 기반으로 하는 약물의 분포 및 외부자극에 관한 분석연구의 효율성 및 정확도를 향상해줄 것이라 기대된다.

REFERENCES

[1] Sung Dae Yoon, Hyun Wook Park. "Current Status of Measurement and Analysis of the fMRI" Journal of KIISE, JOK. Vol. 27, pp. 25-32. Apr 2009.

[2] Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TE, Johansen-Berg H, Bannister PR, De Luca M, Drobnjak I, Flitney DE, Niazy RK. "Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL." Neuroimage. Vol. 31, pp. S208-219. Dec. 2004.

[3] Chung JY, Yoon HW, Kim YB, Park HW, Cho ZH. "Susceptibility compensated fMRI study using a tailored RF echo planar imaging sequence." Journal of Magnetic Resonance Imaging. Vol. 1, pp. 221-228. Jan. 2009.

[4] Pautler RG. "Mouse MRI: concepts and applications in physiology." Physiology. Vol. 19, pp. 168-175. Aug. 2004.

[5] Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. "Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation." Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 1, pp. 9868-9872. Dec. 1990.

[6] Nair G, Duong TQ. "Echo-planar BOLD fMRI of mice on a narrow-bore 9.4 T magnet." Magnetic resonance in medicine. Vol. 52, pp. 430-434. Aug. 2004.

[7] Stephen J. Sawiak, Nigel I. Wood, Guy B. Williams, A. Jennifer Morton, and T. Adrian Carpenter "Voxel-based morphometry with templates and validation in a mouse model of Huntington's disease," Magnetic Resonance Imaging, Vol. 31, pp. 1522-1531, March 2013.

[8] Christopher J. Bailey, Basavaraju G. Sanganahalli, Peter Herman, Hal Blumenfeld, Albert Gjedde and Fahmeed Hyder "Analysis of Time and Space Invariance of BOLD responses in the Rat Visual System", Cerebral Cortex, Vol. 1, pp. 210-222, Jan. 2013.

[9] Williams, K. A., Magnuson, M., Majeed, W., LaConte, S. M., Peltier, S. J., Hu, X., & Keilholz, S. D. (2010).

“Comparison of α -chloralose, medetomidine and isoflurane anesthesia for functional connectivity mapping in the rat.” *Magnetic resonance imaging*. Vol. 28, pp.995–1003. Sep. 2010.

- [10] Takata N, Yoshida K, Komaki Y, Xu M, Sakai Y, Hikishima K, Mimura M, Okano H, Tanaka KF. “Optogenetic activation of CA1 pyramidal neurons at the dorsal and ventral hippocampus evokes distinct brain-wide responses revealed by mouse fMRI.” *PLoS one*. Vol. 10, pp. e0121417. Mar. 2015.
- [11] Le Bihan D, Karni A. “Applications of magnetic resonance imaging to the study of human brain function.” *Current Opinion in Neurobiology*. Vol. 5, pp. 231–237, Apr. 1995.
- [12] Bookstein FL. “Voxel-based morphometry should not be used with imperfectly registered images.” *Neuroimage*. Vol. 31, pp. 1454–1462. Dec 2001.
- [13] Ashburner J, Neelin P, Collins DL, Evans A, Friston K. “Incorporating prior knowledge into image registration.” *Neuroimage*. Vol. 30, pp. 344–352. Nov. 1997.
- [14] Hae-Jeong Park. “Methodological Review on Functional Neuroimaging Using Positron Emission Tomography.” *Nuclear Medicine Molecular Imaging*. Vol. 41, pp. 71–77. Apr. 2007.
- [15] Stephen J. Sawiak, Jean-Luc Picq and Marc Dhenain “Voxel-based morphometry analyses of *in vivo* MRI in the aging mouse lemur primate”, *Frontiers in Aging Neuroscience*, Vol. 6, pp. 82–91, May. 2014.
- [16] Sawiak SJ, Wood NI, Williams GB, Morton AJ, Carpenter TA. “Voxel-based morphometry with templates and validation in a mouse model of Huntington’s disease.” *Magnetic resonance imaging*. Vol. 31, pp. 1522–1531. Nov. 2013.
- [17] Büchel, Christian, and K. J. Friston. “Modulation of connectivity in visual pathways by attention: cortical interactions evaluated with structural equation modelling and fMRI.” *Cerebral cortex*. Vol. 7, pp.768–778. Dec. 1997.

Authors



Wook Kim received the B.S degree in department of Biotechnology from Chonbuk National University and M.S. degree in department of Biomedical Radiation Science from Seoul National University, Korea, in 2013, and 2016, respectively. Mr. Kim was joined the research associate in Division of RI-convergence Research from KIRAMS. He is interested in High magnetic field MRI and functional MRI related of brain function.



Sang-Keun Woo received the M.S. and Ph.D. degrees in Computer Engineering from Konkuk University, Korea, in 2003. He worked a research assistant in OSAKA National Cerebral and Cardiovascular Center from 2001 to 2003, and worked a research fellow in University of California, San Francisco from 2014 to 2015. Dr. Woo joined the Division of RI-convergence Research at KIRAMS, Seoul, in 2006. He is currently a senior researcher in the Division of RI-convergence Research. His current research interests include motion compensation, precision medicine, medical image standardization and medical image bigdata analysis.



Joo Hyun Kang received the Pharm. B. degree in department of pharmacy from Seoul National University and M.S. and Ph.D. degrees in Molecular Biology from KAIST, Korea, in 1985, 1987 and 1991. She worked as a postdoctoral fellow in KRIBB and associate professor in department of nuclear medicine in Seoul National University. She is currently a principal researcher from 2006 in KIRAMS. Her current research interests include development of new radiopharmaceuticals and molecular imaging methods in small animal disease models with nuclear medicine, optical and MR images.



Sang Moo Lim received the M.D & Ph.D. degrees in Nuclear medicine from Seoul National University in 1988. He worked a research fellow in USA National Institutes of Health from 1990 to 1991, and University of California, Davis from 1995 to 1996. Dr. Lim joined the Department of Nuclear medicine at KIRAMS, Seoul in 1987. He is currently director of Department of Nuclear medicine in KIRAMS. He is interested in radionuclide therapy with ^{131}I and ^{166}Ho , ^{18}F FDG PET clinical oncology studies, and multi-functional image research with PET/CT and MRI.