

# 第二十屆旺宏科學獎

## 成果報告書

參賽編號：SA20-241

作品名稱：魚的抑鬱：使用機器學習方法  
研究斑馬魚與空氣污染的交互作用行為

姓名：吳懿恩

關鍵字：焦慮行為、抑鬱行為、機器學習



## 壹、研究題目

無論你是多樂觀的人，身處在都市的高壓環境難免會感覺沮喪、抑鬱、焦慮，若無法轉換心情，長期下來會影響大腦活動，轉成抑鬱症、焦慮症等棘手的問題。不只人類會抑鬱，動物也會，甚至看起來在水中悠遊自在的魚，也會抑鬱。那麼面對日益增加的空氣汙染，是否會對魚造成抑鬱呢？

對此問題，我使用 AIoTs 物聯網技術結合 3D 列印，設計一款物聯網超音波起震器激發氣態二氧化矽微粒之 PM<sub>2.5</sub> 空污模擬室，並連結一物聯網抽氣閥門系統，以精準控制每分鐘抽取次微克(sub-microgram)二氧化矽微粒之氣體，導入斑馬魚之行動水箱；藉由大數據儲存自製三維攝影系統，並以機器學習法追蹤斑馬魚的行為，通過測量與標記生物體的三維空間活動，定量的分析二氧化矽微粒濃度對斑馬魚行為的影響，成功以二氧化矽微粒誘導成年斑馬魚在高濃度實驗中表現出抑鬱行為。

此研究方法可在未來對研究”空氣汙染對人體誘導式抑鬱/焦慮症”提供一新的行為檢測模型。

## 貳、研究動機

焦慮症(Anxiety)和抑鬱症(Depression)為中樞神經系統(CNS)疾病，它們與大腦的運作有密切的關係[1-6]。但使用人體作為研究這類中樞神經系統疾病卻有許多的侷限性：第一個侷限即是人類大腦非常複雜，約有 860 億個神經細胞。而人類的相關行為、反應、與感受都是透過大腦中的這些神經細胞來執行、管理、與運作。因此能夠導致焦慮和抑鬱行為的因素非常多，很難明確的將人類的焦慮和抑鬱行為指標量化。第二個侷限是人體實驗倫理問題。焦慮症和抑鬱症的相關藥物開發與發病機制研究需要進行實驗，這些的實驗必須要確保受試者的生命安全，並且不能讓受試者承受痛苦或暴露於未知的風險中。這些限制會造成實驗可控性低的問題。第三個侷限則是研究成本的問題，導致焦慮和抑鬱的因素有很多，其中包含環境與基因等因素。因此需要大量的測試才夠證明研究的有效性，同時也會帶來很高的研究成本，使研究難以維持下去。為了解決以上的問題，科學家們開始使用動物作為研究對象，用它們模擬人類的焦慮和抑鬱行為，進行焦慮症和抑鬱症的研究，此作法被稱為模式生物研究。

雖然模式生物已廣泛作為中樞神經系統疾病的研究模型，但是它們仍存在一些普遍性上的侷限。這些侷限主要可以分為兩類：第一類的侷限是動物始終與人類是不同的物種，因此一定不可能完全的模擬人類的焦慮和抑鬱行為。第二類的侷限則是動物大腦不足以展現焦慮和抑鬱這樣複雜的情緒與心理狀態。儘管如此，越來越多的研究表明，動物中具有類似於人類焦慮和抑鬱的行為，並且這些行為具有可靠性且穩定，並非是偶然的反應。雖然人們無法透過語言了解動物的想法，但是可以透過觀察動物的行為和特定的生理表徵了解動物們的狀態。這些與動物行為的相關研究，稱為動物行為學。動物行為學的發展同時也促進了神經科學的發展。神經科學家能透過實驗，分析動物行為並且了解大腦與行為之間的相互關

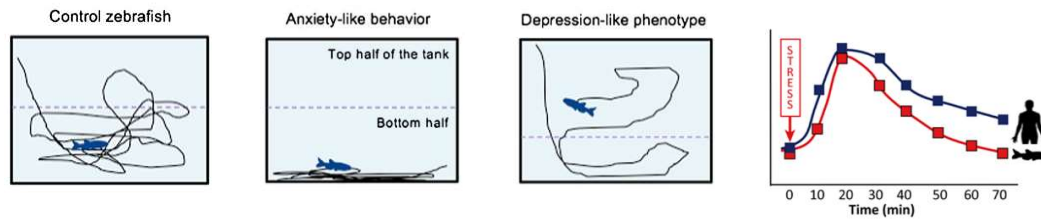
係，包括焦慮和抑鬱的行為。

值得注意的是，焦慮症和抑鬱症為複雜的中樞神經系統疾病，因此大腦太過簡單的模式生物無法展現焦慮和抑鬱行為，而大腦太過複雜的模式生物不好做研究。因為齧齒動物和斑馬魚的大腦複雜度介於狗和果蠅之間，不像非人靈長類動物和狗過於複雜，也不像果蠅和線蟲過於簡單，並且齧齒動物和斑馬魚的基因與人類的基因相似度算高，比起無脊椎動物模型物種(如果蠅、線蟲)具有更強的人類可比性。因此齧齒動物和斑馬魚比其他模式生物更適合進行焦慮症和抑鬱症的研究。

特別是斑馬魚具有以下優勢使它們非常適合用於焦慮症和焦慮症譜系相關的研究。首先，斑馬魚和齧齒動物一樣在面對壓力時會觸發它們的焦慮反應行為。第二類優勢為，斑馬魚的神經內分泌系統(下丘腦-垂體-腎間質，HPI)與人類的神經內分泌系統(下丘腦-垂體-腎上腺，HPA)非常相似，並且斑馬魚與人類的應激內分泌物都為皮質醇。第三類優勢為，斑馬魚面對壓力的刺激時會產生對應的應激行為，這些行為的發生取決於不同方式的刺激，而產生不同種的行為反應，並且這些行為反應相當穩健並非偶然的反應，因此它們具有被量化分析的可能性。

那魚會不會抑鬱呢？曾經養過魚的人或許有這樣的經驗，不知道為什麼，心愛的魚有段時間總是死氣沉沉地待在水族箱底部一動也不動。牠？們是在沉思嗎？還是在休息？還是抑鬱了？但是魚會不會抑鬱，這可能是很少人想過的問題，直覺告訴我會！好奇心驅使我探索這個問題，進而去了解魚的心情和行為。於是我上網找了些資料，沒想到這個直覺是對的，甚至許多抗抑鬱藥物，都來自魚的實驗。但問題是魚在底部就是抑鬱嗎？我們不是魚，怎知道牠在想什麼？

其實這個問題在學術研究社群爭論已久，他們爭議的是焦慮(Anxiety)或抑鬱(Depression)是否可用來形容魚類。科學家觀察斑馬魚對所有事情都失去興趣，包括食物、玩具、探索等，就像抑鬱症病人一樣，因此他們認定魚的行為就是抑鬱表現。其研究與歸類的方法為觀察斑馬魚在水箱的運動軌跡與行為特徵。如圖一(a)可以明確的看見未受刺激的斑馬魚，其運動軌跡呈現隨機分佈會在水位中間偏下的高度活動，而受刺激的斑馬魚會潛伏在水箱底部活動，其魚體維持水平運動，展現出焦慮樣的行為，如圖一(b)所示。而圖一(d)則是呈現在水箱的上、下運動軌跡，其特徵為魚尾呈下垂式運動，被歸納為一種憂鬱的行為。另外，研究表明正常的斑馬魚在受到急性壓力刺激後大約 15 分鐘皮質醇的濃度會上升到最大，之後皮質醇的濃度會逐漸的下降到正常水平。並且斑馬魚受到急性壓力刺激後皮質醇濃度隨時間的變化與人類相似，如圖一(d)所示，顯示以乙醇或空氣微粒刺激斑馬魚可獲得與人類類似的行為反應。



圖一：由左至右：(a)為一正常的斑馬魚運動軌跡；(b)則是呈現在水箱底部的密集運動軌跡，為一種焦慮的行為表現；(c)則是在運動中魚尾呈下垂式運動，為一種類憂鬱的行為特徵；(d) 斑馬魚和人類受到急性刺激時，皮質醇濃度隨時間的變化圖。

我也思考到，利用行為的觀察來描述並解釋實驗的結果是否恰當？這類解釋較接近於定性說明，直到 2017 年底諾貝爾生物學與醫學獎的揭曉，揭示獲獎的工作為成功解釋基因與生理時鐘的關聯性，此有趣的果蠅的睡眠問題，也促使我去尋找如何定量分析魚的抑鬱行為與改變的實驗變因的交互作用！

實驗變因我考慮到了空汙汙染是否會引起魚的抑鬱(或人的抑鬱症)？而有了這個實驗主題：

### 魚的抑鬱：使用機器學習方法研究斑馬魚與空氣汙染的交互作用行為

為了能夠更直觀的研究懸浮微粒與焦慮和抑鬱行為的關係，所以這個研究法必須達成兩個主要的目標，分別是定量控制空氣汙染物之濃度與定量分析焦慮和抑鬱行為的方法。

第一個目標：開發物聯網式空氣汙染箱，用來定量的產生可控的空氣汙染物，其產生的二氧化碳濃度介於 $\sim 10^{-5} \sim 10^{-4} \mu\text{m/ml}$  之間，此目標需要開發相關物聯網的技術以克服此問題。

第二個目標： 量化分析焦慮和抑鬱行為所遇到四個研究挑戰，分別是 1.如何模擬人類的焦慮和抑鬱行為；2.斑馬魚的三維行為錄影成像問題；3.斑馬魚的三維行為影像分析問題；4.斑馬魚的三維軌跡分析問題。這四個挑戰的解決方式則分別是，使用斑馬魚作為研究對象、開發物聯網式三維錄影系統、使用機器學習與深度學習影像辨識系統和開發量化斑馬魚三維軌跡的方法來完成此研究。

## 參、研究目的

抑鬱症是最常見的心理健康問題之一，其形成可能是因為與神經系統部份重要化學物質失調所致，或因與家族遺傳有關，並會嚴重干擾了日常生活和生活品質，給國家健保系統帶來了重大的經濟負擔 [1]。抑鬱症同時也是自殺的重要危險因素，許多因素促成了抑鬱症的病因學，包括外在的生活環境影響與非精神病疾病，如中風，糖尿病，和癌症，和心理因素[2]。最近的研究表明空氣汙染與人類抑鬱症狀之間存在關聯[3-5]。

之前研究已經暗示環境風險因素對疾病的影響[6]，這項研究綜合評估了

1991年1月1日至2008年12月31日期間台北市自殺與空氣污染、天氣、和失業變量之間的時間關係。其結果預示了一個典型的季節性模式，即初期增加的空氣微粒和大氣壓力下降導致自殺增加，隱含著台北市抑鬱症人口的增加，其中後者與相應時間內的溫度升高相一致。氣體空氣污染物，如微粒、二氧化硫、和臭氧，被發現長時間的空污暴露範圍內，相對的增加了自殺的風險。日照時間減少和太陽黑子活動也同時也與自殺率的增減有相關性。

空氣污染物中的懸浮微粒會透過嘴巴和鼻子進入到人體中，對人體健康產生巨大的危害，當懸浮微粒大於 $10\mu\text{m}$ 時，微粒會被分泌液、黏膜等物理和化學性防禦機制留在鼻咽中，並對鼻咽造成影響。而當粒徑介於 $2.5 \sim 10 \mu\text{m}$ 時，微粒會越過分泌液、黏膜等屏障進入到肺部中，其中大部分會停留在上部鼻腔和深部呼吸道中，並對鼻腔和呼吸道造成影響。粒徑小於 $2.5 \mu\text{m}$ 時，微粒會繼續深入肺部中。它們大部分會停留在支氣管和肺泡中，並且對肺部造成影響，也會有少部分的微粒能夠進入血液，並且會對心血管系統和中樞神經系統造成影響。與其它尺寸的微粒相比，當粒徑小於 $0.1\mu\text{m}$ 的微粒會對人體造成的危害更大。主要的原因在於，粒徑小於 $0.1\mu\text{m}$ 的微粒除了可以透過血液進入到各個器官之外，它們還有機會越過血腦屏障進入到腦中。這說明粒徑小於 $0.1\mu\text{m}$ 的微粒幾乎能夠到達人體所有的部位，並且對這些部位造成影響。可以從行政院環境保護署網站輕易的檢索到空污的歷年資料[7]，而環境保護署從1993年7月至2008年12月就提供了空氣污染數據和空氣懸浮微粒直徑小於 $10 \mu\text{m}$ 的顆粒物質（ $\text{PM}_{10}$ ，F701型，Verewa，德國）。懸浮微粒直徑小於 $2.5\mu\text{m}$ 的顆粒物質的測量僅在2005年以後實施，如表一可見2017年的數據，台灣整年的平均 $\text{PM}_{10}$ 最大值約為 $57.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ，而平均 $\text{PM}_{2.5}$ 最大值約為 $25.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ，顯示過去一年我們一直暴露在高粉塵的懸浮微粒空氣中。

表一： 106年各空品區主要污染物年平均濃度統計表。

空品區	站數	$\text{PM}_{10}(\mu\text{g}/\text{m}^3)$	$\text{PM}_{2.5}(\mu\text{g}/\text{m}^3)$	$\text{SO}_2(\text{ppb})$	$\text{NO}(\text{ppb})$	$\text{CO}(\text{ppb})$	$\text{CO}_3(\text{ppb})$
北部空品區	19			2.92	15.79	0.41	30.22
竹苗空品區	5	36.8	18.1	2.33	10.61	0.31	31.15
中部空品區	9	44.3	22.2	2.73	13.45	0.36	28.96
雲嘉南空品區	9	57.4	25.2	2.87	11.61	0.33	30.45
高屏空品區	11	56.5	25.4	3.70	13.34	0.35	31.05
宜蘭空品區	2	33.1	12.3	1.91	7.58	0.27	30.40
花東空品區	2	26.9	10.2	1.45	5.76	0.28	26.15

這幾年的粉塵空污漸漸的被重視，主要是來自於大陸的工業粉塵污染在冬季往台灣方向下移，如2017年11月29日，從環境保護署的沙塵監測站中，可見到冬季中，整個中國大陸幾乎都籠罩在沙塵的生活環境中。所以在沙塵暴影響台灣時，

其懸浮微粒濃度會有較顯著的升高情形，且其沙塵移動速度有減緩的趨勢，產生在台灣上空滯留的現象，再加上本地空氣污染情形嚴重，造成空氣污染指標經常達到不良等級，對敏感性族群造成有害的影響。

關於空氣污染和抑鬱症之間的關係的研究報告數量有限，大多數研究都是在一個樣本量較小的城市進行的。這可能是因為抑鬱症並非與空氣污染有生物學聯繫的傳統疾病，且越來越多的文獻將抑鬱症與暴露於空氣污染之間聯繫起來。在加拿大埃德蒙頓進行的一項研究表明，急診室（ED）對抑鬱症的訪問與暴露於環境空氣污染有關 [6, 8]。這個研究使用分層群集設計，分析了 1992 年至 2002 年之間，因抑鬱症而至急診室的 15556 病患，及 6 個加拿大城市抑鬱症的 27047 位急診室病人。結果顯示，抑鬱症患者與環境空氣污染之間存在相關性，其中大部分是由化石燃料（如機動車輛或工業二氧化矽微粒）燃燒引起的。這些結果增加了越來越多的文獻，表明環境空氣污染與情緒症狀之間存在關聯。且由於抑鬱症導致的自殺企圖也與空氣污染暴露有關，台北市的一項研究檢測了 4,857 人因自殺而死亡，也表明自殺與空氣污染之間存在時間關係[6]。同樣的，韓國首爾的 537 名參加者的研究報告指出，環境空氣污染，PM<sub>2.5</sub>，NO<sub>2</sub> 和 O<sub>3</sub> 的增加可能會增加老年人的抑鬱症狀。這些結果支持了環境空氣污染與情緒症狀相關的假設。為了進一步支持這一假設，使用死後取樣的研究已證實人類大腦中的顆粒物質與環境的顆粒物質有關[9]，且可能對在大腦中多巴胺神經元產生毒性作用。這種神經毒性可能是微粒氧化的結果，並已被假設影響抑鬱情緒。另有研究顯示，暴露在空氣污染下，會危害人體的每個器官和每個細胞，而憂鬱症與小於 2.5 微米的空氣污染微粒有直接的關係。成年人暴露於每立方公尺 10 微克（ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）PM<sub>2.5</sub> 一年或以上的人，其發生患憂鬱症的風險增加 10 %，研究人員估計，若是能將 PM<sub>2.5</sub> 降低到 WHO 所建議的標準 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  以下，將可使城市居民的憂鬱症減少約 2.5% [10-11]。

本次的這項研究目的是想定量了解環境空氣懸浮微粒與抑鬱症所表現的交互作用行為觀測，斑馬魚是現存已知在生物醫學研究的一個理想實驗模型，尤其是在發育、遺傳研究、和藥物測試方面的應用，且已在藥物研究和毒理學領域得到廣泛應用。此外斑馬魚也是一個很好的行為研究模型，因為它們對新環境的精神和物理變化的理性反應很敏銳，以及與脊椎動物具有高度相似的神經迴路系統，因此，斑馬魚作為對焦慮研究與環境空氣懸浮微粒的交互作用行為觀測很適合的。對於評估斑馬魚行為的各種特徵需要準確，可靠和可重複地檢測受試者的時空位置，為此，我於高一專題研究課程中成立一個研讀社群，共同研讀了近幾年發表於 Nature Method 期刊有關動物行為分析的三篇重要論文[12-14]，並尋找相關可用的新技術來研究此問題，其相關內容簡述如下：

第一篇為布蘭森實驗室(Branson Lab. HHMI at Janelia farm) 於 2013 所發表的曠世巨著[12]，他們開發出利用機器學習的機器視覺和學習技術，可以從動物的行為影像(如蒼蠅)中，自動標示行為分類與標示，以進一步了解行為及其對應的神經元現象。此系統簡稱 JAABA (Janelia Automatic Animal Behavior Annotator)，

可安裝於深度伺服器中，並於 Matlab 2014b 軟體中運行，為一開放軟體，詳細內容建構於 <http://jaaba.sourceforge.net/>。

第二篇重要文章為 Polavieja 實驗室(Instituto Cajal, Spain) 於 2014 所發表的重大影響巨著[13]，他們我們提出了 idTracker 這種概念，一種多軌搜索算法，可從群組中的每個運動動物中提取特徵指紋，並使用這些指紋識別整個視頻中的每個動物。通過識別進行跟蹤可防止錯誤傳播，並且可以無限期保持正確的身份。例如大小匹配的群組，idTracker 系統可在動物暫時從視頻中消失或跨越不同視頻後重新識別它們。並可用來測試斑馬魚(Danio Rerio 和 *Oryzias latipes*)，蒼蠅(黑腹果蠅)，螞蟻(Messor 結構蛋白)和小鼠(Mus musculus)。此系統可安裝於 Win 與 Linux 作業系統中，並於 Matlab 2014a 中運行，詳細內容建構於 <http://www.idtracker.es/>。

第三篇則是德國科學家 Gil G. Westmeyer 教授所發表於 2017 年 11 月的動物行為追蹤與神經元取像顯微鏡技術，稱為 NeuBTracker 技術(簡稱 NeuB)，NeuB 追蹤器是一款開放源代碼的追蹤顯微鏡，可以在自由行為的斑馬魚幼蟲中同時進行神經和行為成像。並使用現成的組件來實現基於鏡子的追蹤系統，避免移動階段，目標或照明光束，對行為產生混淆效應。詳細藍圖已在 *Nature Methods* [14]中發表，並介紹了硬件組件的，數據採集和處理代碼以及 NeuB 追蹤器應用示例，詳細內容建構於 <http://neubtracker.org/>。

綜合上面的技術優點，我選擇以 idTracker 開源技術，並架設學習實驗軟體模擬，成功完成技術分析，即開始設計實驗課題。

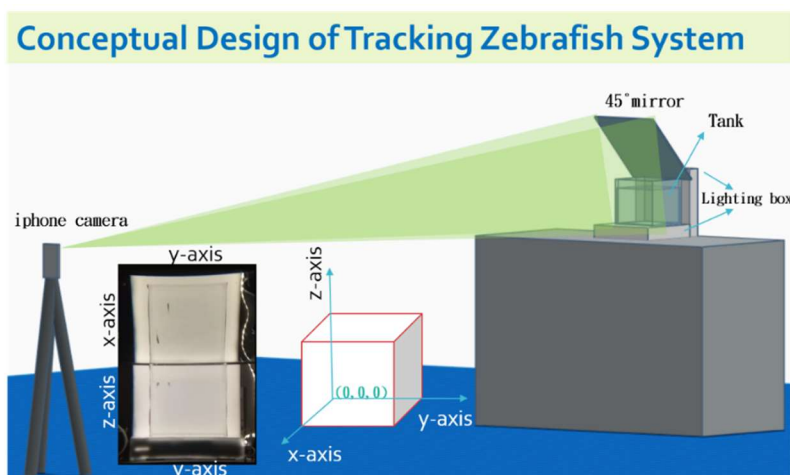
## 肆、研究過程

### 4.1 實驗設備設計與製作

(1) 研究所需解決的第一個課題，則是構思如何解決拍攝斑馬魚的生活：我利用由 Polavieja 實驗室所發表的文獻中[13]了解到若要精準拍攝三維空間的斑馬魚至少需要兩台攝影機，一個上面(Top view)，一個側面(Side view)，然後再各自做影像分析，並做相對距離校正，算出其隨時間變化的三維空間(x, y, z)位置，此方法有點複雜與對時間的不準確，卻乏一次性的實驗作法。因此，我又參考 2018 年 2 月於 *Inventions (MDPI)* [15] 期刊中找到一個新方法，利用一片 45 度角的鏡子來成像 Top view，即可完成此一想法；其架設與示意圖說明如下圖二(相關說



明放置於附錄一： 說明書協作平台)：



圖二： 斑馬魚三維空間解析概念圖。

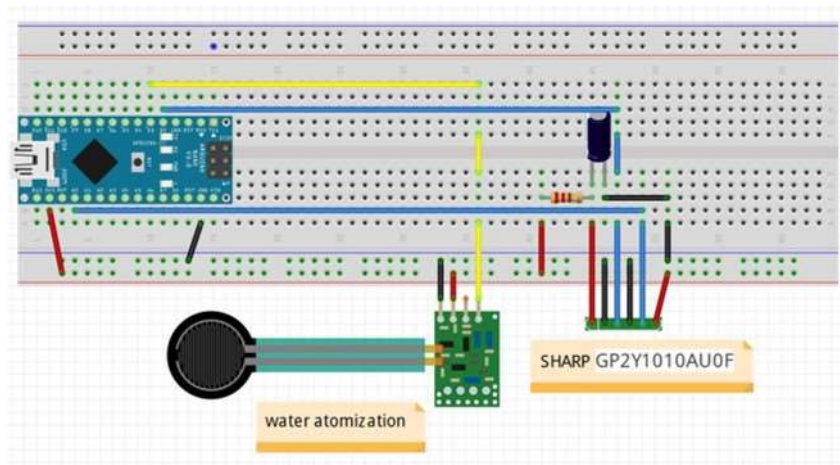
其整體裝置包含：

1. 使用野生型 AB 株的六個月大的斑馬魚進行測試。
2. 影片拍攝採用一般手機相機並外加手機變焦鏡頭。
3. 新穎潛水測試水箱(Novel diving test tank)採用標準壓克力板，其厚度為 0.5 cm，自行裁切製作內徑 20(寬)x20(長)x20(高) cm 之水箱，並用壓克力膠黏著靜置 48 小時，經漏水測試完成，實驗中為防止斑馬魚跳出水面，實驗中水位  $z=15$  cm(高)為標準，水箱載水體積約為  $20 \times 20 \times 15$  cm<sup>3</sup>=6000 ml。
4. 自製燈箱，使用霧面壓克力板手工製作之燈箱，供底部與背部光源用，其內徑長寬高尺寸為 20x20x10cm，板厚為 0.3 cm；並於底部貼上錫箔紙加強反光，並於四圍貼上 12V LED 燈貼條長 80 cm。
5. 攝影採用 iphone 8 plus 與 canon 三腳架，置於觀測水箱前方 5 米處，以減少水箱邊緣的間隙邊界干擾。視頻分辨率為 1280×720 像素，並且在黑白模式下幀頻為 60 fps（幀/秒）模式，每次影片紀錄 5 分鐘。
6. 利用一面反射鏡將水箱 xy 平面映射，並可同時同步錄下 xy 平面與 yz 平面的斑馬魚運動。

**(2) 研究所需解決的第二個課題，則是構思架設一個人工模擬的污染空氣之腔體：**

我藉由觀察無印良品的暢銷商品「超音波芬香噴霧器」操作原理，將資訊課學到的簡易物聯網技術拿來應用設計此空污室；超音波噴霧器(water atomization)具有將水溶液霧化後噴射出的特性，而這些霧化物是由一群直徑微小的水溶液所組成，為一種氣溶膠的產物。我依此特性去設計一個顆粒污染物的產生器，使用了購自 Alfa Aesar 公司生產的 Silicon (IV) Oxide amorphous fumed 次微米( $<0.1 \mu\text{m}$ )微粒，並以 1：100 的二氧化矽微粒等重量比例與去離子水調出混合水溶液，並藉由超

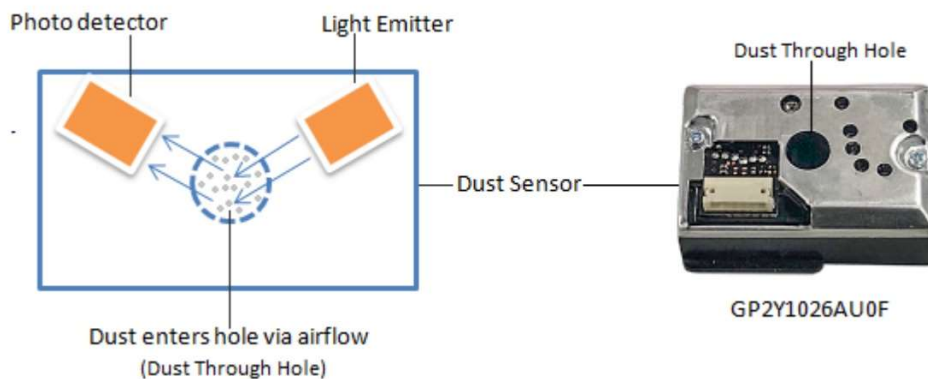
音波模組震盪至空氣，以作為模擬空氣污染的基礎。



圖三： 空污室整體電路設計圖。

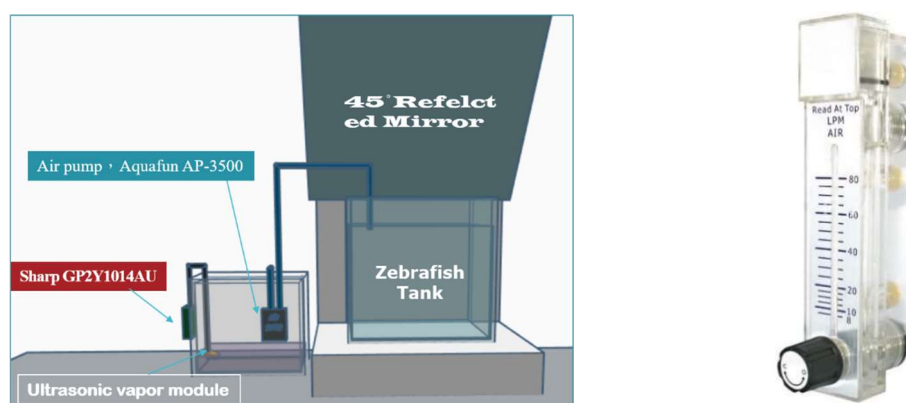
超音波噴霧器的運作原理為，利用高頻電子震盪訊號(約 1.7 MHz) 使陶瓷霧化片產生高頻諧振，而陶瓷霧化片表面上均勻分布的小孔將會把液態水分子結構打散，進而產生直徑微小的水霧。我可以藉由改變陶瓷霧化片上的小孔直徑來控制產生水霧的直徑大小。我使用了 Grove 公司開發的超聲波霧化模塊作為高頻電子震盪訊號產生器，搭配孔洞直徑為 5  $\mu\text{m}$  的陶瓷霧化片作為顆粒污染物的產生器。使用 Arduino Nano 的主控制面板來控制震動時間和功率，並用 3D 列印件將超聲波振盪器頭以 45 度角放置在溶液中，以最大功率 2 瓦，將水溶液中的顆粒蒸發到空氣中，其物聯網電路設計，如圖三所示。

**(3) 研究所需解決的第三個課題，則是構思架設一個即時檢測 PM<sub>2.5</sub> 數值之物聯網感測器：**能定量測量空氣中的微粒重量，我採用的是夏普 GP2Y1014AU PM<sub>2.5</sub> 粉塵感測器，為一款紅外線 LED 光學式的空氣品質感測器，我將其物聯網電路整合至圖四，其光學運作量測方式如圖四所示：



圖四： 夏普 GP2Y1014AU PM<sub>2.5</sub> 粉塵感測器設計圖(圖截自 <https://www.mouser.com/>)。

此設計可用來感測空氣中的塵埃粒子，其內部對角安裝紅外線發光二極體和光電晶體，使其能夠探測空氣中塵埃反射光，可測量 0.8 微米以上的微小粒子，即使非常細小的如煙草煙霧顆粒也能夠被檢測到。最後，使用一個密閉箱子將上述之物聯網設備整合成一物聯網空污箱 (物聯網空污箱 Arduino 程式碼詳見附錄二)，如圖五所示：

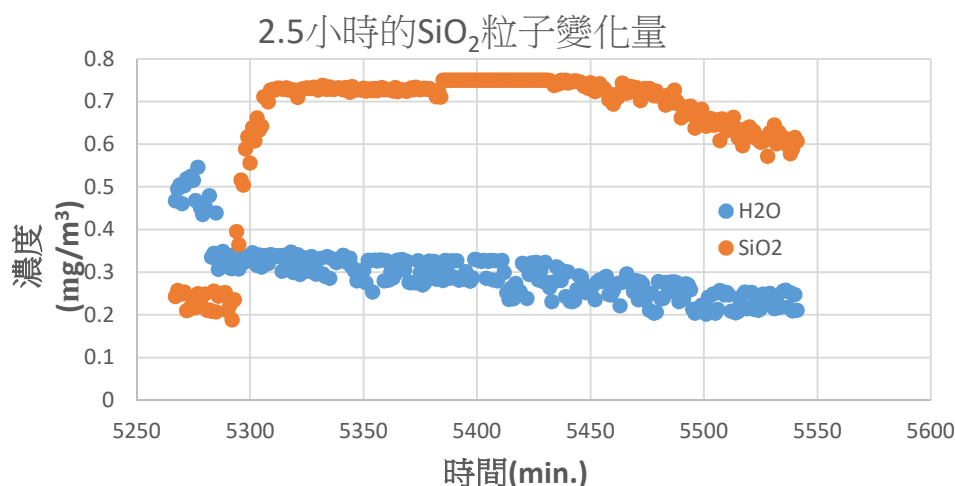


圖五： (a)物聯網空污箱；(b) 面積式氣體流量計閥門(H401B：抽氣範圍 0.1~1 LPM)。

(4)研究所需解決的第四個課題，則是構思架設一個定量的抽氣系統：我在空污箱出口加入面積式氣體流量計閥門(H401B：抽氣範圍 0.1~1 LPM)，蒸發的混合空氣使用空氣抽氣馬達(Air pump，Aquafun AP-3500)，將空氣抽進水箱，抽氣量為 1 L/min.，可以通過 Arduino Uno 加上繼電器，以設計一個控制抽氣馬達的抽氣定時器，進而控制二氧化矽微粒進入水箱的量。因此需要重新計算出真實斑馬魚所在水箱二氧化矽微粒濃度，其隨時間的積分表示如下：

$$PM_{FT} = \int \frac{PM_S \cdot F}{V_{FT}} ds$$

其中， $PM_S$  為 PM2.5 sensor 的數值( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )， $F$  為每分鐘馬達抽氣量(L/min)， $V_{FT}$  為水箱中的含水量 (mL)， $PM_{FT}$  為水箱中二氧化矽微粒的濃度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。考慮到空氣水分子會在 GP2Y1014AU 中產生散射，造成空污室中 PM<sub>2.5</sub> 量測的誤差，感測器會同時量到 SiO<sub>2</sub> 和水分子，從而導致空氣污染室內 PM2.5 測量的誤差。因此我通過一個簡單的過濾校正方法，讓純水分子的微粒被過濾掉，只剩下 SiO<sub>2</sub> 的微粒被釋放到空氣中。同時測量去離子水蒸氣和混合水溶液以校正實驗值。如圖七所示，為面積式氣體流量計閥門(H401B)，設定抽氣通量為 1 LPM，我們實驗結果中可見，並在啟動超音波噴霧器 4 分鐘後空污箱的二氧化矽微粒濃度穩定落在  $720 \mu\text{g}/\text{m}^3 = 0.72 \text{ mg}/\text{m}^3$  左右。此時抽氣馬達會以每分鐘 1 L 的速度將二氧化矽微粒抽入水箱中，經過計算後可得知抽氣馬達每分鐘抽  $0.72 \mu\text{g}$  的二氧化矽微粒(以每分鐘抽氣一公升的氣體計算約為  $0.72 \mu\text{g}/\text{L}$ )進入 6 公升的水箱，產生濃度為  $0.12 \mu\text{g}/\text{L}$  的水溶液。



圖六：為超音波震盪與空污室中分別量測水蒸氣與二氧化矽微粒的校正結果。參考表二之微粒的數值與空氣品質對照，可以知道此數值約  $720 \mu\text{g}/\text{m}^3$  此對照空氣品質約在「一般」，接近「差」的階段；由此，可以相信此裝置可以成功的模擬出空污室，並克服傳統化學製造水溶液法，以磅秤或稀釋法對於微粒的重量精準量測。

表二： 微粒的數值與空氣品質對照表。

空氣品質	很差	差	一般	好	很好	非常好
單位( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	>3000	1050-3000	300-1050	150-300	75-150	0-75

綜合而論，在此實驗構想中，我創新用此抽氣法已有效的控制二氧化矽微粒的重量，往後可以藉由調整參數：

- (1) 手動設定面積式氣體流量計閥門，由 0.1~1 LPM，或更精準之流量計 0.01 LPM。
- (2) 抽氣時間，如幾微秒(ms)至幾分鐘，來控制抽氣量，以 Arduino 微控板，可精準至 1 微秒，當考慮繼電器電路反應，應在 100 毫秒範圍具有準確性。

克服上述之困難後，不僅可以利用超音波震盪法有效控制到次微克之精準度的微粒重量，還可以藉由控制抽氣馬達抽氣時間控制倒入水箱的微粒總量，藉此精準量測微粒水含量與觀測其與斑馬魚的交互作用行為。我亦對實驗設備做一簡單的成本評估，總體實驗設計所需花費如附錄三：表 S1所列。

我將整體研究方法說明分成實驗變因、實驗分析工具、與實驗分析流程三大項簡述如下：

**4.2 實驗控制變因：** 首先，我針對導致抑鬱與焦慮症的常見誘因以及考慮現有的實驗的環境，將變因規劃成兩類，並於第三點說明傳統藥理反向推論斑馬魚抑鬱

與焦慮症行為之分類方法：

(1) 第一類變因屬於空污實驗之前期測驗，我們先考慮乙醇(Ethanol)對斑馬魚的試驗：實驗中我使用乙醇，是因為它是最流行的消遣藥物之一，並且與許多大腦疾病和危險行為有關。早期結果顯示適量的酒精會使魚更活躍，而更高的劑量會減慢它們的速度；儘管魚與人類的相似度僅略有不同，但對要研究酒精或空氣汙染影響魚的議題來說，斑馬魚可以成為方便的研究對象。那是因為要讓魚喝醉、更活躍、或減慢他們的速度，並不必強迫它們喝任何東西，你只需要在它的水箱中加入少量酒精即可觀察實驗。紐約大學理工學院工程學院 Maurizio Porfiri 教授在最近對斑馬魚的研究實驗中[16]，顯示改變三種不同水箱的酒精濃度(0.25%、0.5% 和 1%)下：低濃度(0.25 %)的斑馬魚具有無拘無束的慢速運動、微醺狀、與社會互動性(social interaction assay)、且有魚群 Leadership 的特性；而較高的酒精劑量(0.5%)具有“鎮靜作用”，則會喪失魚群 Leadership 的特性。對此研究結果[16]，我認為非常有趣與重要，但應該先嘗試更低濃度(0~0.2%)乙醇實驗觀察斑馬魚的運動行為作為對照參考實驗，檢驗是否具有在(0~0.2%濃度範圍內會有焦慮與抑鬱的行為相變，並建立解釋模型，來描述空氣汙染中二氧化矽微粒對斑馬魚的誘發抑鬱行為。

以前的研究文獻也表明[15]，急性給予乙醇對魚類幼體的運動有刺激作用，而通過引入大量分子和細胞機制影響中樞神經系統[17]，會改變魚類的複雜行為模式並導致乙醇成癮。因此，乙醇會增加斑馬魚的焦慮行為，這使得魚停留在水箱底部較長的時間，一般而言[14]水箱中乙醇含量約在 2% 即會引起。這一數值是有待懷疑與商榷的，其原因為參考維基百科關於血液酒精濃度(BAC)[18]的說明，如表三為用於度量酒精中毒的指標。通常的度量單位為：單位體積血液中的酒精質量或體積的百分比。例如，北美的 BAC 0.10%意味著每 100 毫升血液中含 0.10 克酒精。

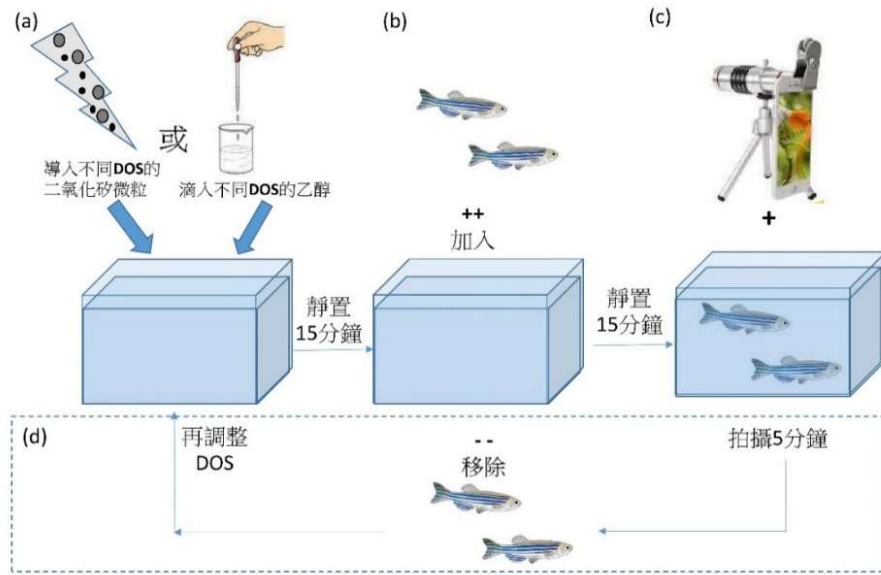
表三：度量人體酒精中毒的指標 [19]。

BAC (%/體積)	行為	損害
0.010–0.029	<ul style="list-style-type: none"><li>個體平均感覺正常</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>特殊試驗可探測到些微效應</li></ul>
0.030–0.059	<ul style="list-style-type: none"><li>溫和快感</li><li>鬆弛</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>專注力</li></ul>
0.06–0.09	<ul style="list-style-type: none"><li>感覺變得麻木</li><li>去抑制</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>周邊視覺</li><li>眩光視覺恢復</li></ul>

0.10-0.19	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 情緒波動</li> <li>• 憤怒或悲傷</li> <li>• 喧鬧</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 條件反射</li> <li>• 反應時間</li> <li>• 粗略運動控制</li> </ul>
0.20-0.29	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 目光呆滯；恍惚</li> <li>• 感知受損</li> <li>• 可能陷入昏迷</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 嚴重的運動能力受損</li> <li>• 失去意識</li> <li>• 記憶空白</li> </ul>
0.30-0.39	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 嚴重的中樞神經系統抑制</li> <li>• 不省人事</li> <li>• 可能致死</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 肺換氣不足</li> <li>• 平衡失調</li> <li>• 心動過緩</li> </ul>
0.40-0.50	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 失去行為能力</li> <li>• 昏迷</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 呼吸</li> <li>• 心率</li> </ul>

根據表三，對應人類行為於斑馬魚，酒精含量若大於 0.1%，有可能導致斑馬魚精神亢奮，而大於 2%則會過量陷入昏迷？因此，為避免乙醇過量，造成斑馬魚傷害，此次實驗，我並不跟隨文獻數據，我將實驗變因調成各為 0, 0.05, 0.10, 0.2% 酒精含量等五種參數來從事實驗。

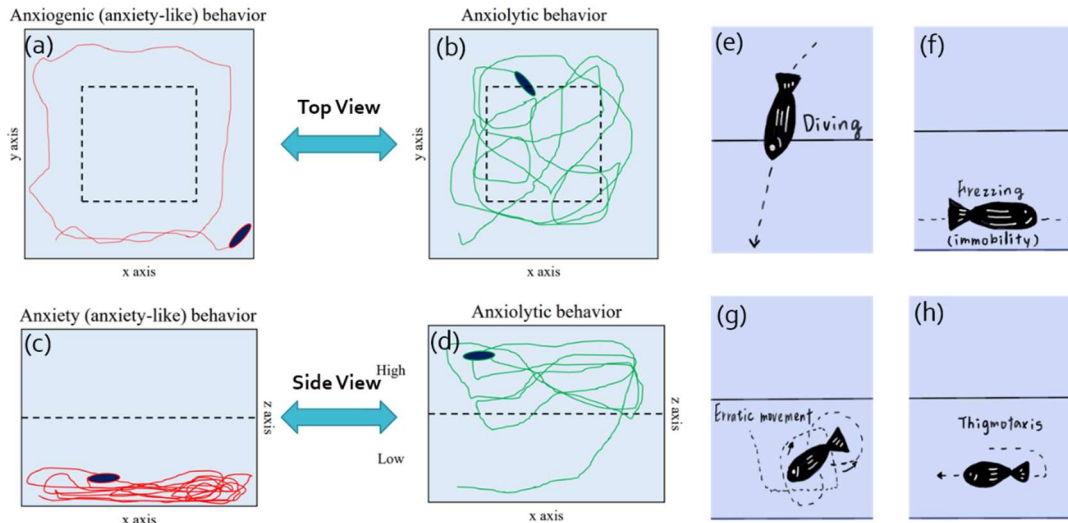
**(2)第二類變因則是以抽氣馬達的抽氣時間為變因，來控制導入的二氧化矽微粒重量；**根據先前文獻了解[20-21]，會引起斑馬魚導致抑鬱或帕金斯現象的奈米二氧化矽微粒(15 與 50 奈米)濃度約為  $DOS=300\sim 1000\mu\text{g/ml}$ ，以~30 秒為單位，每次於水箱中(6000 ml 水)導入 0.36  $\mu\text{g}$  的二氧化矽微粒，其對應的濃度  $DOS=6\times 10^{-5}\mu\text{g/ml}$ 。因此，總體實驗 DOS 為 0  $\mu\text{g/ml}$ , 0.6 $\times 10^{-4}\mu\text{g/ml}$ , 1.2 $\times 10^{-4}\mu\text{g/ml}$ , 1.8 $\times 10^{-4}\mu\text{g/ml}$ , 和 2.4 $\times 10^{-4}\mu\text{g/ml}$  共五組實驗。其整體流程如圖八所示，每一次實驗，手動加入不同濃度的酒精或由空污室導入不同濃度之二氧化矽微粒，並再靜置 15 分鐘(如圖七(a))，再將斑馬魚兩隻放入水箱，讓其適應環境 15 分鐘(如圖七(b))，再用手機遠端拍攝 5 分鐘(如圖七(c))，再將斑馬魚移置乾淨水箱休息(如圖七(c))，再重複實驗，至完成所有實驗變因。



圖七：實驗準備與操作流程。

**(3) 傳統藥理反向推論斑馬魚抑鬱與焦慮症行為之分類方法：** 因為斑馬魚具有很強的藥理操作具有很強的敏感性。我可將斑馬魚急性或是慢性的暴露於這些藥物中，以觀察其在測試水箱的藥物環境中展現出的行為反應。如圖八(a)所示，例如將斑馬魚暴露在致焦慮的藥物中，它們會在行為測試展現出焦慮樣的行為，在水箱俯視圖中，其會沿著水箱四個角落呈現瞬時旋轉 30~50 度的軌跡，且次數異常增多與方形迴旋，反之亦然，如圖八(b)所示，為暴露抗焦慮藥氟西汀 (0.1 毫克/升) 2 週的斑馬魚軌跡圖 [22]，其行為則得以改善，呈現平面隨機運動。圖八(c)圖可以看到未治療的斑馬魚沉在水箱的底部活動，顯示高度的焦慮水平，圖八(d)水箱側視圖可以看到暴露經典抗抑鬱藥 2 週的斑馬魚跑到水箱的上方活動，顯示低度的抑鬱/焦慮水平。這表明了抗抑鬱藥能夠反轉斑馬魚焦慮狀態。如圖八(e)-(h)所示，斑馬魚暴露於精神藥物中展現的幾種特定行為，像是潛水(Diving)、停滯(Freezing)、不穩定移動 (Erratic movement)、趨觸性 (Thigmotaxis)等。這些行為可以被量化作為焦慮或抑鬱行為的指標，用於檢測應激物是否有致焦慮或是抗焦慮的因素。值得注意的是，斑馬魚具有雙向藥理操作的特性，像是抗焦慮的藥物能夠反轉斑馬魚的焦慮行為。這些藥理操作特性還可以進一步與行為測試和內分泌生理反應結合。使斑馬魚可以做為焦慮症藥物的開發，以及檢測藥物或是某些物質是否有潛在的致焦慮因子。

因此，在本實驗中我亦能結合乙醇與二氧化矽微粒誘導斑馬魚行為，以分析 3D 影像，計算其瞬時旋轉角  $A_T$ 、停留於水箱上方  $T_t$ 、下方之時間  $T_b$ 、停滯時間  $T_f$ 、平均速率  $S$ 、與運動總距離  $D$ ，作為斑馬魚行為之觀察指標。



圖八：傳統藥理反向推論斑馬魚抑鬱與焦慮症行為之分類方法。

### 4.3 實驗分析工具：

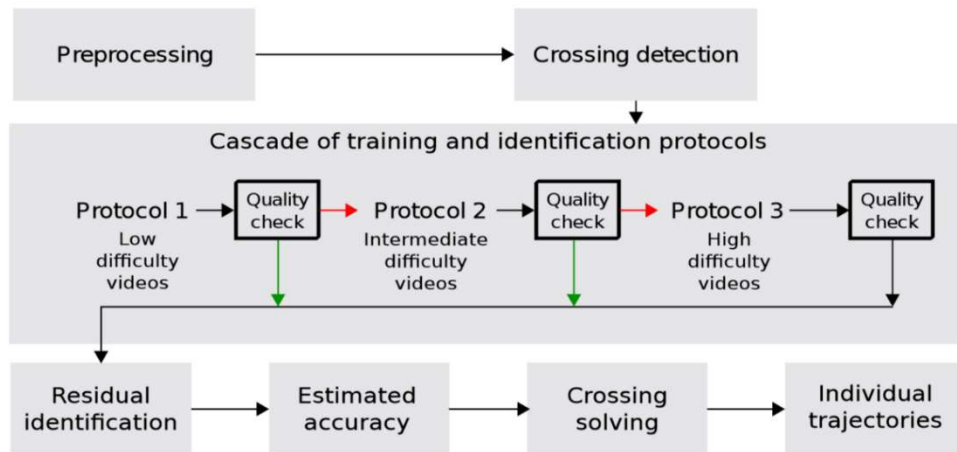
因為此實驗分析，涉及多項軟體、韌體、及高階分析套件，所以我盡量選擇開放式、免費的方式進行，並請教多位資訊老師之幫忙，完成整個系統架構，這邊我以 TAG 方式來表達，如圖九所示：



圖九：專題所用核心技術說明。

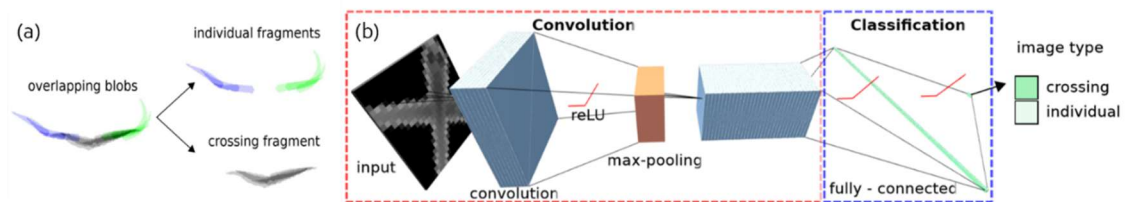
此次專題主要分析軟體為 idTracker 2014 版本(<http://www.idtracker.es/>)，並加裝 Matlab 2014b runtime 外掛版於 Windows 10; 但過程中，一直執行不順利，程式錯誤不斷，也無法用現有學校電腦跑出影像分析，我猜測應該是此釋出版有些程式碼上的錯誤；我也一直嘗試於網路論壇(idTracker Forum)中訊問，看如何解決次問題，最後我終於得到網友的回應，一個他們修改過的 idTracker 2017 beat 版本，且支援 Matlab 2017b 的平行運算版，我也立即投入實驗與分析，才完成此實驗分析工具。其機器學習分析特色如圖十所示，第一階段為影片訓練：分類選區影片的畫質分析難度，由低困難至高困難度分類；第二階段為殘餘分辨 (Residual identification)，(1)：判別與估算精準度(Estimated accuracy)；(2)判別是否有時間差的交錯影像(crossing video)；(3) 分析獨立軌跡(Individual trajectories)。





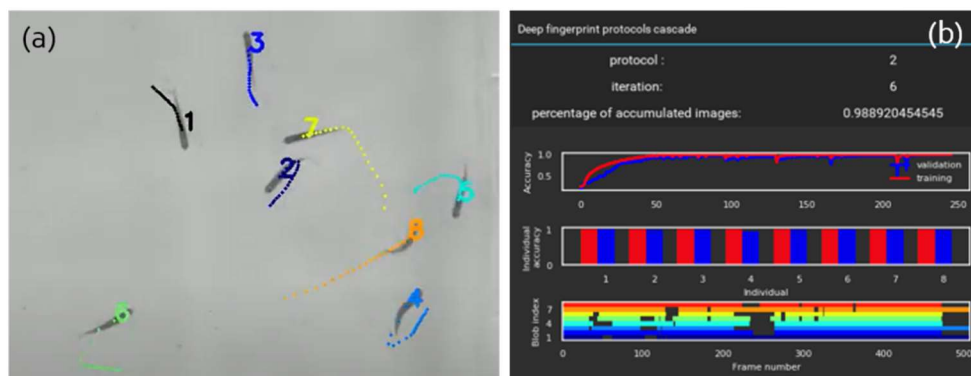
圖十： idTracker 機器學習分析流程。

其中判別是否有時間差的交錯影像(crossing video)，此系統採用一個影像卷積方式，分類如圖十一(a)當有兩條斑馬魚(分別為藍色與綠色)影像，隨時間游動之中點時，發生影像交錯，此時交錯過後，如何精準追蹤原來的兩條斑馬魚，則是一困難，利用深度學習交錯探測訓練器，可以經由多次影像卷積方式，來分類其軌跡，進一步說明詳述於附錄四： idTracker.AI 的演算法。



圖十一：深度學習交錯探測訓練器，具有經過預處理的單一和多動物圖像交錯分析功能。

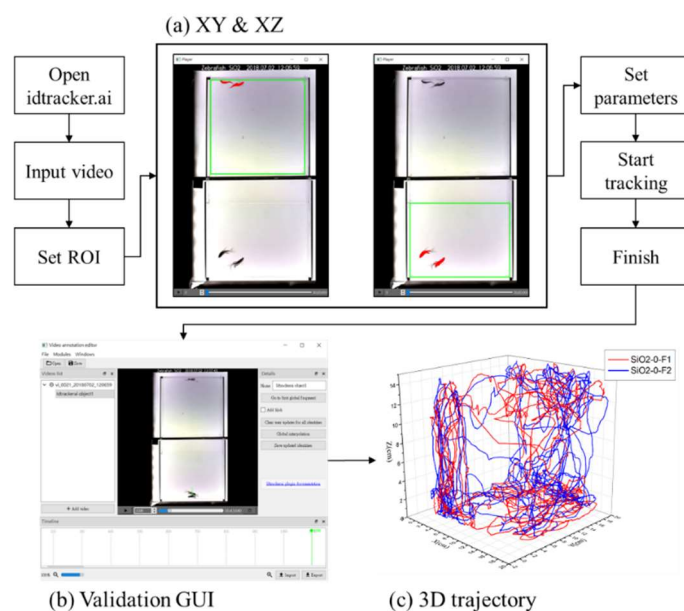
而圖十二為利用 idTracker 範例分析八隻斑馬魚的機器學習分析結果，我發現其分析精準度有 98.89%，可以用手動進一步修正與機器學習，以採改進精準度，約經過 3-9 次的影像訓練，即可完成。



圖十二：利用 idTracker 範例分析八隻斑馬魚的機器學習分析結果。

#### 4.4 實驗分析流程：

我參考了 Polavieja 教授的文章[13]與網頁教材，歸納出自己的分析方法與影片分析流程，雖無法將全部實驗參數算出，但我也將 Excel 所能用到的計算函數發揮到底，找出一些基本變數與其隨不同實驗變因的關係。開啟 idtracker.ai 後，將實驗影片輸入，並且選擇要分析影片的區塊(ROI)。因為我是對 XY 和 XZ 同時錄影，所以我們要分別對 XY 和 XZ 進行分析，並設定去背景、魚的數量，以及相關的參數將斑馬魚圖像提取。這個部分需要反覆的測試參數值，直到每個畫面中的斑馬魚皆被選取，以及沒有多餘的畫面被選進去。確認好參數後，開始執行影片機器學習，完成斑馬魚座標追蹤與分析，亦可啟用手動驗證功能，以查看實際影片的正確性，並依據準確率，決定是否再次分析。如圖十三(a)-(b)所示，我重複了上述的步驟，將實驗影片的 XY 和 XZ 畫面分析完成，並且將提取出來的 XYZ 空間座標組合成 3D 軌跡圖，如圖十三(c)之斑馬魚運動軌跡圖。



圖十三：影像分析流程圖。

研究發現，將斑馬魚暴露在新環境中同樣會引起強烈的焦慮反應，利用此壓力響應，可以比較實驗組和對照組的焦慮誘發行為。當斑馬魚暴露於新的環境中時，他們會潛入水底並限制探索，直到他們感到可以安全時，才會慢慢的在水箱的上部游泳。而根據不同壓力源引起的不同焦慮水平，會使斑馬魚產生不同的動力行為與運動行為 (例如，上下行駛的距離、速度、曲折和角速度，等等)，可以用影像分析程序中分析獲得這些行為與相關參數，根據文獻所示，Allan V. Kalueff 定義的行為參數[23]，描述新型水箱測試中斑馬魚抑鬱症和焦慮症的行為參數。具體參數定義與未來實驗分析標達式如下所列：

1. 總行駛距離(Total Distance) D：定義為新型水箱的總行駛距離。
2. 平均速度 (Average speed) S：定義為新型水箱中斑馬魚速度的方向和大小。

3. 旋轉角 (Turning angle)  $A$ ： 定義為新型水箱中斑馬魚的總轉角。
4. 瞬時旋轉角 (Instantaneous Turning angle)  $A_T$ ： 定義為新型水箱中斑馬魚的總轉角。
5. 上方總時間(Total time /Top) $T_t$ ： 定義為新型水箱中斑馬魚的停留於水箱上方總時間。
6. 下方總時間(Total time /Bottom) $T_b$ ： 定義為新型水箱中斑馬魚的停留於水箱下方總時間。
7. 停滯時間 (Freezing time)  $T_f$ ： 定義為新型水箱中斑馬魚的停滯於水箱總時間。

#### 4.5 研究結果與分析：

一般而言，除了外在實驗環境因素對斑馬魚影響的變數降至最低外，我尚得需要去考慮一些與可能影響追蹤數據有關的重要因素，例如（1）魚的性別（在某些溫度下，雄魚比雌魚游得更快[24]），（2）魚的密度[25]（在一般情況下，斑馬魚的年齡（耐力，衝刺表現和轉折頻率可能隨著年齡的增加而降低[26]）。還有，捕捉視頻前，魚類還必須適應新環境至少 15 分鐘，以減少焦慮並提高魚的恆常性。我反反覆覆的量測無數遍的實驗，發現要在每秒 60 張照片中清楚分析出斑馬魚的空間軌跡，確實是一大挑戰，相關原始實驗數據我放置於**附錄一之中協作平台**。

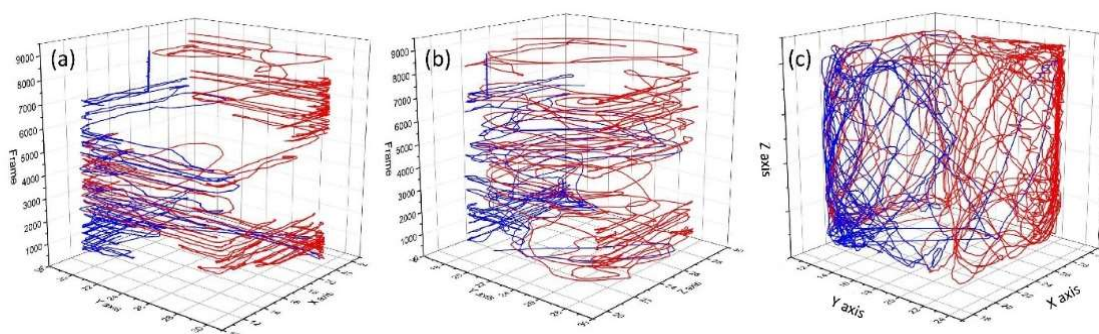
經過整理，一系列實驗總共有八組，分別為添加不同濃度 DOS 的乙醇與二氧化矽微粒，其實驗控制參數詳列於**表四**。

**表四：不同濃度 DOS 的乙醇與二氧化矽微粒之實驗控制參數。**

DOS		比例		比例		
		水(ml)	乙醇(ml)	水(ml)	二氧化矽微粒 ( $\mu\text{g}$ )	通氣時間(s)
乙醇	0	6000	0			
	0.05 %	5970	30			
	0.1 %	5940	60			
	0.2 %	5880	120			
SiO <sub>2</sub> NPs	$0.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$			6000	0.36	30
	$1.2 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$			6000	0.72	60
	$1.8 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$			6000	1.08	90
	$2.4 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$			6000	1.44	120

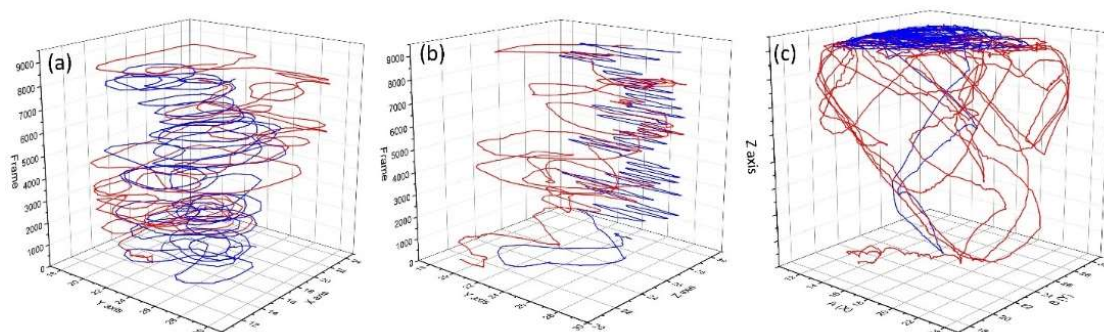
為了評估模型，我利用了無添加處理的水(標示 DOS=0)做為前期測試對照組。拍攝視頻前，將兩隻魚放在水中 15 分鐘以適應並避免焦慮，為了實驗比較與追蹤，我標示體型大一點的斑馬魚為紅色，而較小為藍色。我們可以定性的觀察斑馬魚在 YX-平面與 YZ-平面上隨每一幀(frame)的變化、與 XYZ 三維運動

軌跡表現，我觀察到，大多數時候，對照組在水箱四周無序的游泳（圖十四(a)-(c)）。這表明馴化後的魚焦慮程度較低且很健康，這與以前的研究中發表的正常平均速度和運動時間比是一致的[27]。



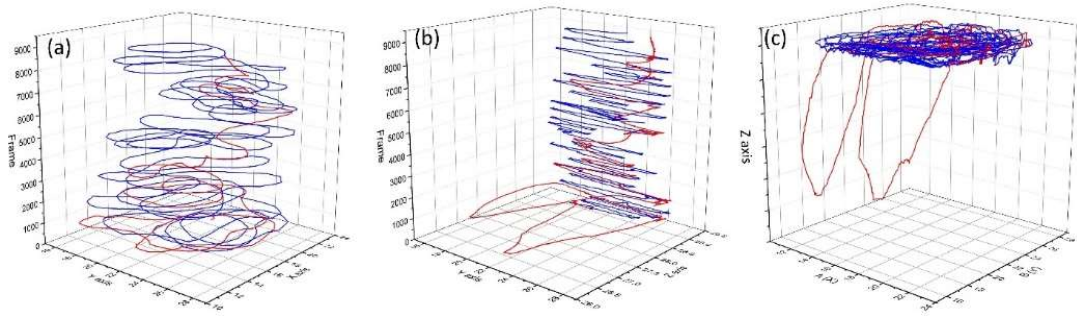
圖十四：斑馬魚在 DOS=0 無任何添加的水箱中(a)YX-平面, (b)YZ-平面, 與 (c)XYZ 三維運動軌跡。

而當我將乙醇濃度增至 0.05 %時，觀察到運動行為輕微的改變，通過水引入少量乙醇分子和影響中樞神經系統之細胞，漸漸改變了斑馬魚之行為模式，如表三所列，當 BAC (%/體積)接近 0.03~0.059 時，可導致行為的輕微快感與鬆弛，如圖十五所示：



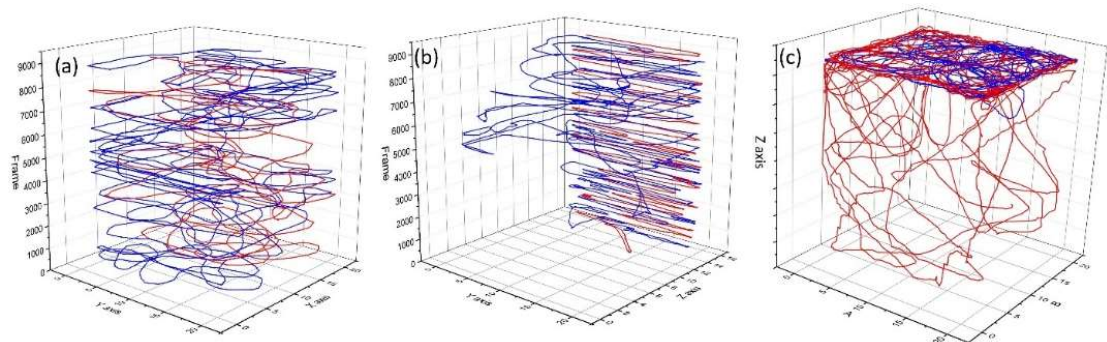
圖十五：斑馬魚在 DOS=0.05%乙醇的水箱中(a)YX-平面, (b)YZ-平面, 與 (c)XYZ 三維運動軌跡。

我在圖十五(c)中可觀察到，藍色線條所標示的斑馬魚，大部分時間皆在水箱的中線上(高大於 7 公分)，且紅色標示之斑馬魚也有相同的趨勢；當乙醇增至 0.1 %時，則變得更明顯的精神麻木狀態，如圖十六(a)-(c)所示：



圖十六：斑馬魚在 DOS=0.1%乙醇的水箱中(a)YX-平面, (b)YZ-平面, 與 (c)XYZ 三維運動軌跡。

若是持續的增加乙醇含量，則會漸漸導致斑馬魚乙醇成癮，如 0.2 %的實驗(圖十七)，紅色標示的斑馬魚有漸漸地朝水箱底部運動現象，此結果如先前文獻所述，斑馬魚的運動軌跡中，其愈接近水箱底部，兩條斑馬魚幾乎處在情緒波動的狀態，處在憤怒與悲傷同時發生的狀態，可能是由於乙醇的濃度增加導致刺激作用開始發酵[26]，呈現斑馬魚焦慮症狀;如圖十七(b)顯示藍色標記之斑馬魚尚處於焦慮狀態，並程往復運動。



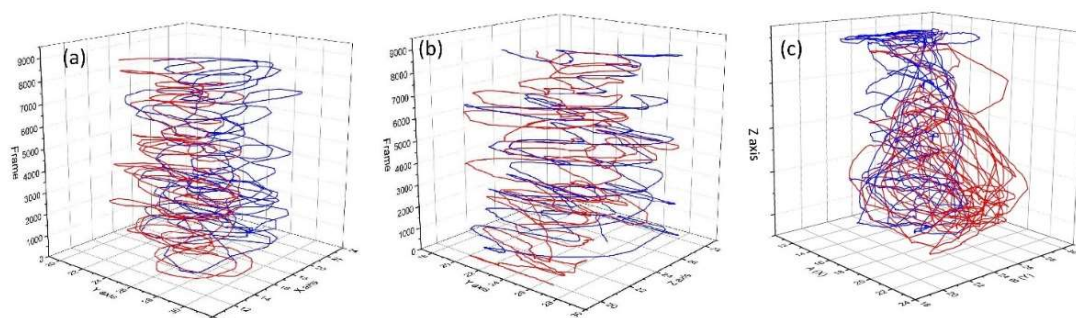
圖十七：斑馬魚在 DOS=0.2%乙醇的水箱中(a)YX-平面, (b)YZ-平面, 與 (c)XYZ 三維運動軌跡。

本次乙醇變因實驗，在定性上可觀察到，斑馬魚由健康的無序運動(DOS=0)到輕微快感與鬆弛運動(DOS=0.05%)，並因乙醇濃度的增加而精神麻木狀態(DOS=0.1%)，至最後的悲傷焦慮導致運動量增加而焦慮(DOS=0.2%)的過程，這類的動物行為狀態並未被文獻所報導，主要是一般的研究皆在乙醇濃度為>0.2~2%中實驗，很容易忽略這一乙醇初始誘發階段；以前的研究表明[17, 27-29]，當斑馬魚暴露於高劑量乙醇時(如 2%)，幼蟲和成魚都表現出劑量依賴性的運動反應。中間劑量導致機能亢進，和高劑量而引起的活動減退和鎮靜。

因此，如本次實驗動機所說明，大家爭議的焦慮(Anxiety)或抑鬱(Depression)是否可用來形容魚類，或是如何形容；由此次實驗，我認為焦慮(Anxiety)的狀態，約在 0.1 -0.2%乙醇含量中可被觀察到，其定量的數值計算與模型建立，我也將於

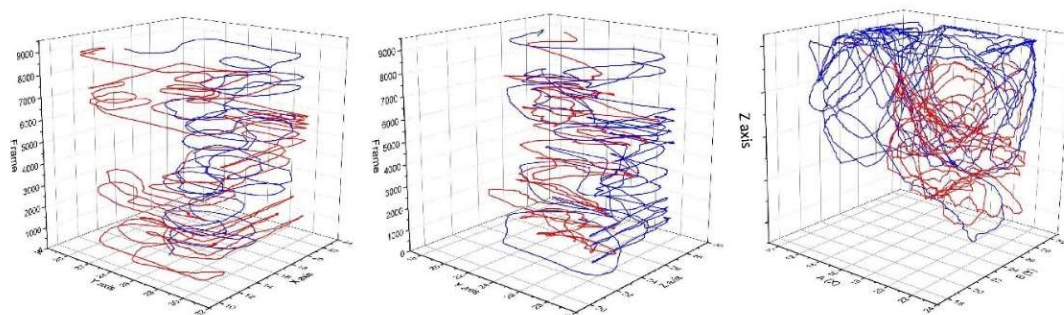
討論部分時加以說明。

如對照乙醇實驗，我也進一步分析不同濃度二氧化矽微粒之誘發實驗，觀察其在不同濃度下之行為，如圖十八所示，為摻雜濃度為  $0.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  的實驗，可以見到斑馬魚中許多運動反應與劑量有依賴性的影響，其運動更集中與隨浸泡時間愈長，愈往水箱的底部運動，呈現行為漸緩的趨勢。

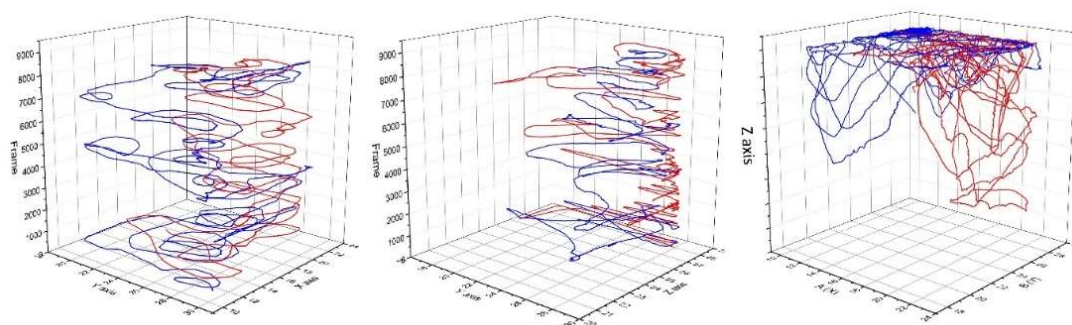


圖十八：斑馬魚在  $\text{DOS}=0.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  二氧化矽微粒的水箱中(a)YX-平面，(b)YZ-平面，與(c)XYZ 三維運動軌跡。

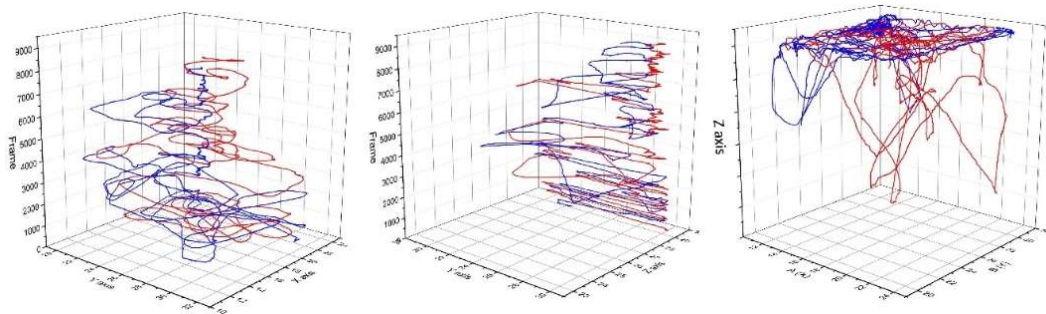
我持續增加二氧化矽微粒濃度至  $1.2 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$ ，我發現到斑馬魚呈現焦慮感，有漸漸往水箱上半部移動的趨勢(如圖十九)，且二氧化矽微粒濃度愈增加至  $1.8 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  (如圖二十) 與  $2.4 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  (如圖二十一)，愈有往上移動的現象。



圖十九：斑馬魚在  $\text{DOS}=1.2 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  二氧化矽微粒的水箱中(a)YX-平面，(b)YZ-平面，與(c)XYZ 三維運動軌跡。



圖二十：斑馬魚在  $\text{DOS}=1.8 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  二氧化矽微粒的水箱中(a)YX-平面, (b)YZ-平面, 與(c)XYZ 三維運動軌跡。



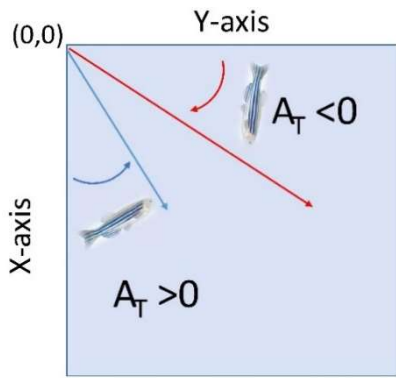
圖二十一：斑馬魚在  $\text{DOS}=2.4 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  二氧化矽微粒的水箱中(a)YX-平面, (b)YZ-平面, 與(c)XYZ 三維運動軌跡。

但是，我也由此定性三維運動軌跡觀察中，見到明顯的行動遲緩，但是漸往水箱上部移動，此結果與一般的新穎潛水測試水箱(Novel diving test tank)預測不同，愈往底部運動愈呈現憂鬱的現象；總合而言，我由實驗觀察發現，在二氧化矽微粒濃度為  $\text{DOS}=0.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  的實驗中出現短暫抑鬱(brief depression)，而當二氧化矽微粒濃度增加至  $1.2\text{-}2.4 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$ ，三組實驗皆出現焦慮(Anxiety)的狀態，此現象皆接近於乙醇 0.1~0.2 % 實驗。

## 伍、結論

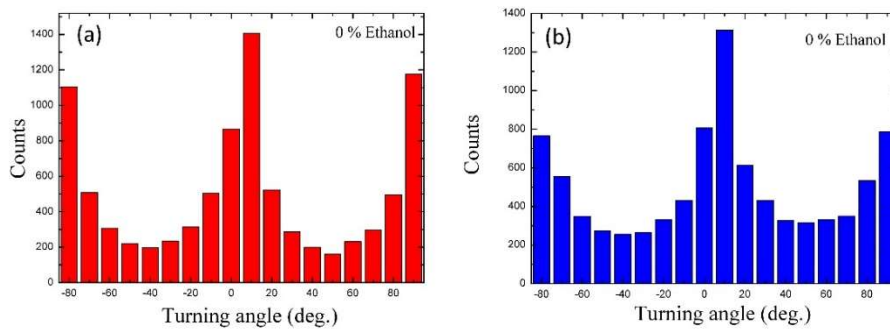
由三維運動軌跡定性的觀察，可以解釋不同環境對於斑馬魚精神上的影響，但要定量的計算，則要借用統計的方式來進行；提出一套定量分析模型，藉由實驗中得知每一組影片約有 9302 個(x, y, z)空間座標與時間(t)座標，且每一秒鐘有 30 幀(fps)照片等量測數據，可以使用這些數據與 Excel 工具來換算與計算斑馬魚的瞬時旋轉角(Instantaneous turning angle)，並以此數值來定量表達其焦慮或抑鬱感的程度；首先，旋轉角的計算為採其投影面(Top View)中其單位時間中兩點間的移動位置之斜率，所推算出的夾角定義為瞬時旋轉角  $A_T(\text{deg.})$ 可表示為：

$$A_T(\text{deg.}) = \tan^{-1}(\Delta y / \Delta x)$$



我定義水箱的左上角定為原點，在投影面(Top View)中，斑馬魚若為逆時針運動，則定義為正值瞬時旋轉角  $A_T > 0$ ，若斑馬魚的順時針運動定義為負值瞬時旋轉角  $A_T < 0$ ，如圖二十二所示：水箱中的空間位置定義，順時針旋轉為負值瞬時旋轉角，而逆時針旋轉為正值瞬時旋轉角。

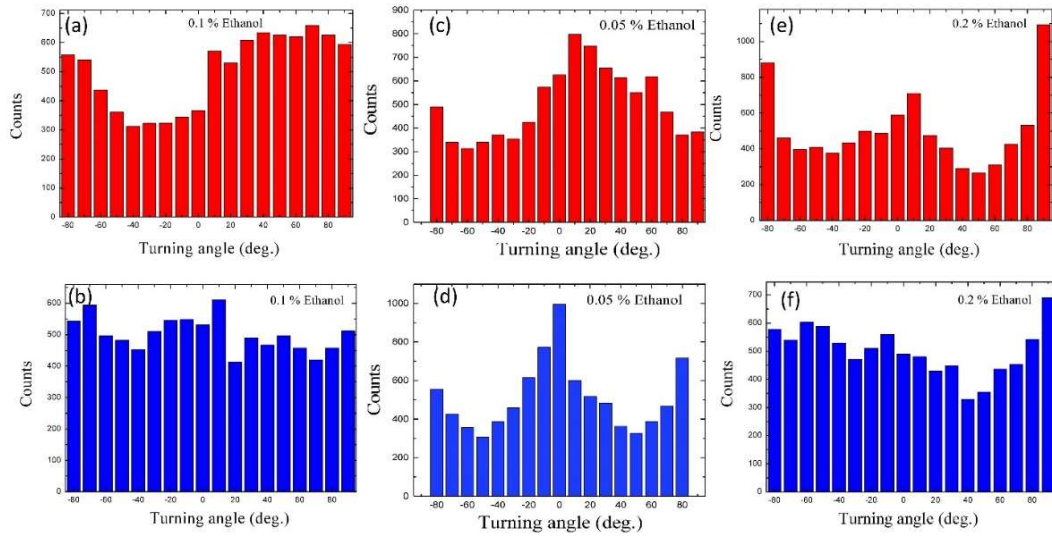
藉由 Excel 工具之統計，我將瞬時旋轉角設定以每 10 度為間隔範圍，進行統計瞬時旋轉角在  $-90 \sim 90$  度的範圍出現次數，並累加其出現次數。如圖二十三為對照組的斑馬魚瞬時旋轉角分佈，可以清楚見到健康的兩隻斑馬魚幾乎是呈現雙馬鞍型的分佈，正負 45 度的瞬時旋轉角次數最少，在小角度 ( $-10 \sim 10$  度) 的瞬時旋轉角的次數較多，呈現輕鬆運動的現象，而兩端 ( $80 \sim 90$  度) 的瞬時旋轉角次數較多的原因，是因為水箱呈正方形的空間所造成的 90 度迴轉。



圖二十三：為對照組的兩隻斑馬魚瞬時旋轉角之次數統計分佈。

藉由圖二十三的統計結果，我提出一個推論：當瞬時旋轉角在正負 ( $30 \sim 50$ ) 度範圍時，斑馬魚呈現焦慮行為，而瞬時旋轉角在正負 ( $-10 \sim 10$ ) 度時，呈現鬆弛行為；如圖二十四為不同乙醇濃度與斑馬魚瞬時旋轉角次數分佈結果，可以清楚見到在正負 ( $30 \sim 50$ ) 度附近之瞬時旋轉角次數隨濃度增加而增加，且在 ( $-10 \sim 10$ ) 度旋轉角附近之次數有遞減的趨勢。

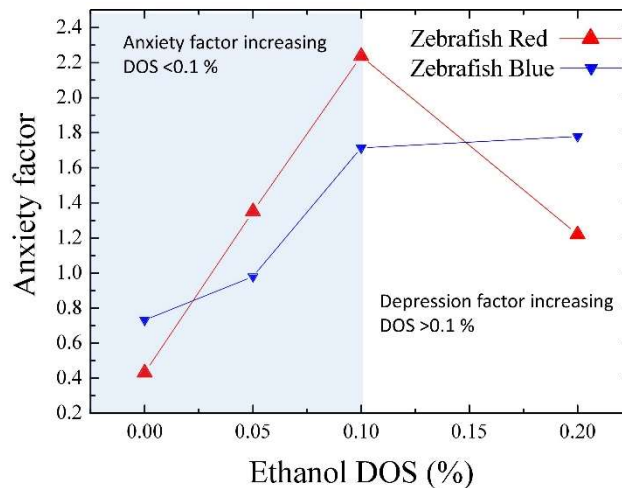




圖二十四：為不同乙醇濃度的兩隻斑馬魚瞬時旋轉角之次數統計分佈。

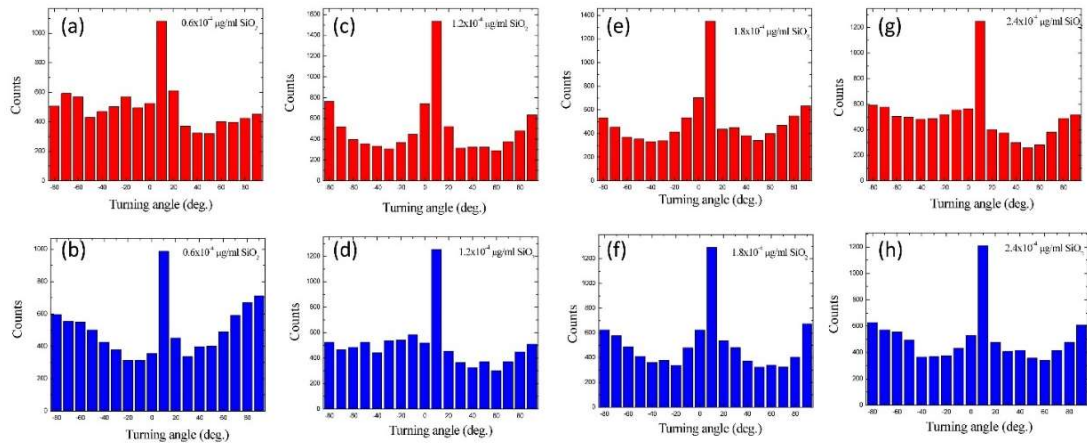
若以旋轉角在(正負(30~50)度範圍的次數)與(正負(-10~10)度範圍的次數)為比值，提出一個合理的焦慮指數 AF (Anxiety Factor)，其值愈大表示焦慮程度愈大，以此來判斷斑馬魚焦慮程度，我將其定義為：

$$AF = \frac{\text{Total numbers between } \mp (30\sim 50) \text{ degree of of } A_T}{\text{Total numbers between } (-10\sim 10) \text{ degree of of } A_T}$$



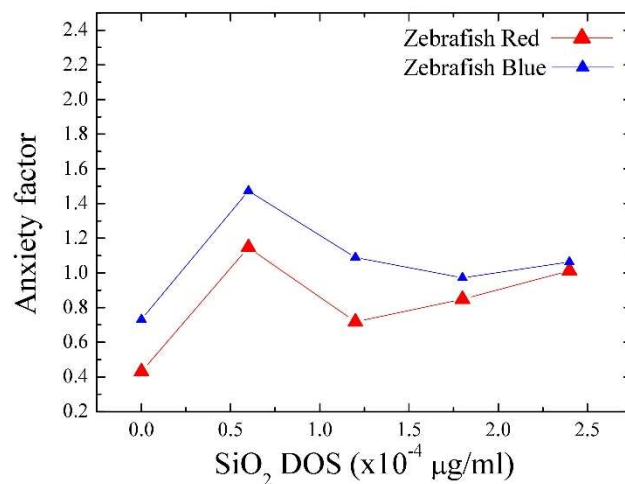
圖二十五：為不同乙醇濃度與焦慮指數的關係。

而圖二十五即是其計算出之焦慮指數隨乙醇濃度變化的關係圖，可以定量的在乙醇濃度為 0.1 % 範圍為區分點，當乙醇濃度小於 0.1 % 範圍，焦慮指數隨濃度增加而增加，而當乙醇濃度大於 0.1 % 時(如表三統計所示，即 BAC 已達 0.10 %)，意味著斑馬魚的行為將在悲傷狀態與抑鬱行為中反轉。



圖二十六：不同二氧化矽微粒濃度與斑馬魚瞬時旋轉角次數分佈。

我接著去分析不同二氧化矽微粒濃度與斑馬魚瞬時旋轉角次數統計的關係，如圖二十六所示，可以清楚地見到在正負(30~50)度附近之瞬時旋轉角次數隨二氧化矽微粒濃度增加並呈現非線性變化，且在(-10-10)度旋轉角附近之次數亦無明顯變化的趨勢。我們也進一步分析其焦慮指數與二氧化矽微粒濃度的關係(如圖二十七所示)，並將此結果與圖二十五使用同焦慮指數範圍作圖，可發現二氧化矽微粒濃度對斑馬魚較無明顯焦慮的精神狀態改變，其指數值相對的小，其中二氧化矽微粒濃度  $DOS=0.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  之最大指數值 (Red,  $AF=1.147$ ) 約為酒精  $DOS 0.1\%$  之一半 (Red,  $AF=2.24$ )，此問題或許需藉由計算運動距離與平均速率來進一步解釋。



圖二十七：為不同二氧化矽微粒濃度與焦慮指數的關係。

為進一步定量分析每隻斑馬魚的運動狀態，我藉由分析三維運動軌跡的座標與時間的關係，計算其在五分鐘實驗中的運動總距離、平均速率、與最大速率。每個座標間的距離，在將其疊加所得的總距離可以表示如下：

$$\text{總距離 (Total distance) } D \text{ (cm)} = \sum \sqrt{(x_i^2 - x_{i+1}^2) + (y_i^2 - y_{i+1}^2) + (z_i^2 - z_{i+1}^2)}$$

而平均速率(average speed) S(cm/s)則是：

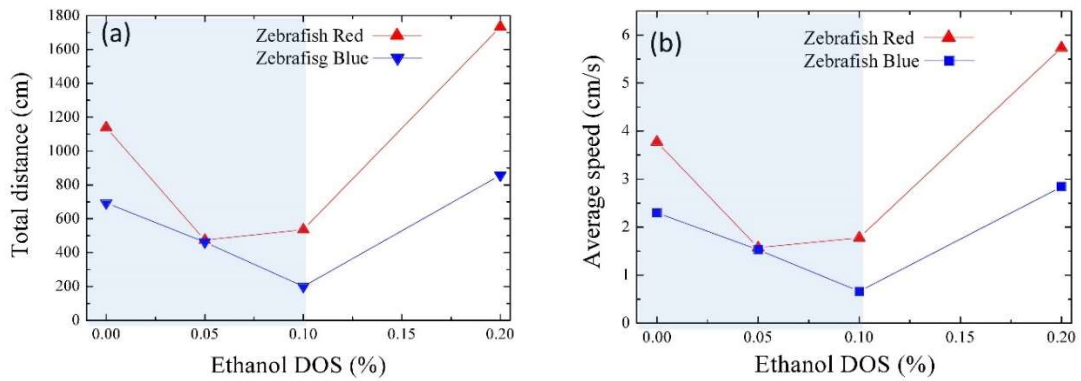
$$S = \text{總距離} / \text{總時間} = \frac{\text{total distance}}{\text{total time}} = \frac{D}{\Delta t}$$

其計算結果詳列於表五。

表五：斑馬魚的運動總距離、平均速率、與最大速率。

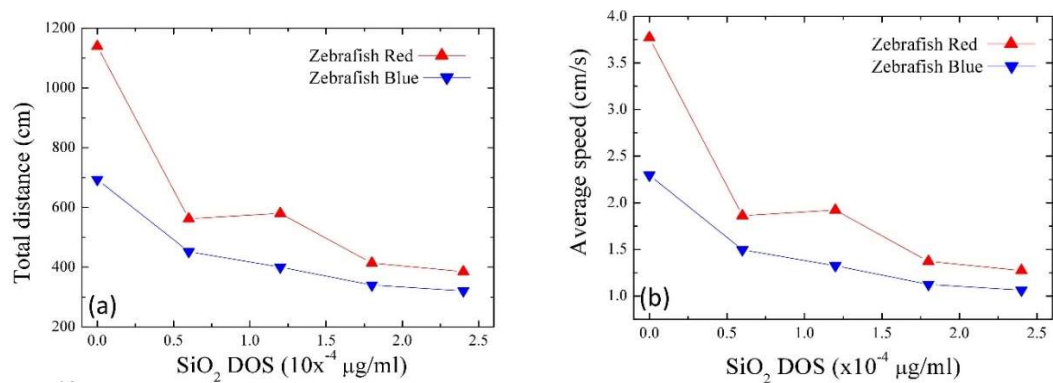
摻雜		濃度	斑馬魚顏色標示	總距離 D(cm)	平均速率 S (cm/s)	最大速率 (cm/s)
對照組		0	紅色	1139	3.772	51.565
			藍色	693	2.296	237.416
乙醇 DOS(%)		0.05%	紅色	474	1.571	11.879
			藍色	462	1.529	23.944
		0.10%	紅色	536	1.776	97.747
			藍色	200	0.662	9.992
		0.2%	紅色	1734	5.743	68.323
			藍色	857	2.839	25.473
二氧化矽 微粒 DOS(10 <sup>-4</sup> μg/ml)		0.6	紅色	562	1.861	14.318
			藍色	452	1.496	16.506
		1.2	紅色	580	1.921	17.777
			藍色	400	1.325	11.869
		1.8	紅色	414	1.372	29.352
			藍色	340	1.125	12.264
		2.4	紅色	385	1.274	13.909
			藍色	321	1.063	10.974

我也進一步對計算結果作圖，由圖二十八所示，我發現了乙醇濃度與斑馬魚運動總距離、平均速率皆有一致的趨勢，在濃度小於 0.1 % 處，其濃度增加會造成總距離與平均速率的減少(同時如圖二十五所示造成焦慮指數的增加)，而當濃度大於 0.1 % 時，運動總距離與平均速率均開始增加。此現象與表三之度量人體酒精中毒的指標相近，且為被實驗證實過，本次實驗首次利用焦慮指數來描述低乙醇濃度斑馬魚現象，將有助未來人類因酒精過癮所引起焦慮症的研究。



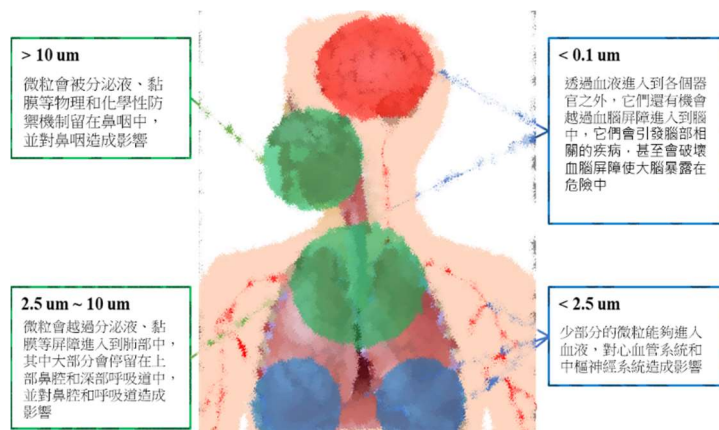
圖二十八：乙醇濃度與斑馬魚運動總距離、平均速率的關係圖。

另一方面，我也對二氧化矽微粒濃度與斑馬魚運動之總距離、平均速率作圖，如圖二十九所示，觀察到隨著濃度的增加，整體的運動距離與平均速率皆呈遞減的關係，我的推算為二氧化矽微粒濃度會直接影響斑馬魚，誘發氧化反應，影響其中樞神經系統 (CNS)，引起運動遲緩與不可逆的行為，其抑鬱程度則與此兩項運動指標(運動之總距離與平均速度)有關，其值愈大，則運動距離變短，平均速率變小，可以做為斑馬魚之抑鬱指數(Depressive factor)，而焦慮行為之指數變化不明顯，與相關文獻結果不同[20]，可能與使用的微粒之粒徑大小有關。



圖二十九： 二氧化矽微粒濃度與斑馬魚運動總距離、平均速率的關係圖。

## 陸、討論及應用



圖三十：空氣微粒之粒徑與器官影響之關係。

長久以來，人們認為懸浮微粒(2.5 ~ 10 μm)主要的危害為呼吸道、肺和心血管相關的疾病，如圖三十所示，歸因於這些部位為懸浮微粒進入首要接觸的目標。因此懸浮微粒對呼吸道和心血管的影響獲得了廣泛的研究。而科學家們很少關注空氣污染對於大腦影響，這是因為他們認為血腦屏障(BBB)能夠安全地保護大腦。血腦屏障為大腦的重要的保護機制，它們可以將大腦與循環系統分開，阻擋有害化學物質進入到中樞神經系統。還可以調節運輸大腦所需的分子，使大腦維持在穩定的環境。但是當空氣污染之粒徑小於 0.1 μm 時，微粒即可透過血液進入到各個器官之外，還有機會越過血腦屏障進入腦中。這說明粒徑小於 0.1 μm 的微粒幾乎能夠到達人體所有的部位，並且對這些部位造成影響。

而高劑量實驗酒精[19]或二氧化矽微粒[20]一直是普遍的研究方式，但是因為使用劑量太大，導致魚中樞神經功能喪失，誤判為抑鬱症的表現；因此，如何在運動中觀察斑馬魚的行為一直是很值得挑戰的，尤其是粒徑小於 0.1 μm 的微粒與低劑量( $\sim 10^{-4}$  μg/ml)濃度的實驗設計，一直是個困難的挑戰。本次實驗中，我成功設計與製造次微克(sub-microgram)計數之低價成本空污室，精準製造出超低濃度環境( $10^{-4}$  μg/ml)之實驗水箱，並以不同濃度之乙醇為對照組，研究其不同濃度對斑馬魚的抑鬱或焦慮的誘發行為，在此批低劑量實驗中，直接觀察到抑鬱與焦慮的定量實驗分野，成功提出焦慮與抑鬱指數模型，來研究斑馬魚的抑鬱、焦慮特徵、與實驗濃度定量的相關性。總結實驗特點如下列：

- (1) 自行利用 3D 軟體設計此次實驗架設。
- (2) 自行利用物聯網技術設計一新穎次微克(sub-microgram)計數的空污室。
- (3) 成功設計一次拍攝出三維空間影片。
- (4) 成功學習機器學習開放軟體 idTracker 並應用於實驗。
- (5) 成功分析出斑馬魚的三維空間運動軌跡圖。
- (6) 利用瞬時旋轉角統計法，重新定義健康、抑鬱、焦慮特徵指數。
- (7) 利用計算動運總距離與平均速率標示斑馬魚行為之抑鬱特徵指標。

- (8) 低濃度乙醇實驗，證明在濃度小於 0.1 % 下會引起斑馬魚焦慮症狀，大於此濃度 0.1 % 會引起情緒上悲傷狀態與抑鬱行為中反轉，但無明顯抑鬱現象。
- (9) 成功配置超低濃度的二氧化矽微粒與模擬出空污現象，並成功觀察到斑馬魚抑鬱症與二氧化矽微粒濃度呈正相關。

未來的實驗，我將進一步使用機器學習技術來量測斑馬魚的心跳 ECG 特徵、神經元放電、與實驗變因(如環境干擾、抗憂鬱藥、高血壓藥、乙醇、與空氣污染)的關係，並與此次實驗成果連結，以進一步觀測動物行為與動物身體機制上的變化，相信是一具有前瞻與有趣的實驗方法。

### 柒、參考資料

- [1] Simon GE, Social and economic burden of mood disorders. *Biol. Psychiatry*. 2003; 54 : 208.
- [2] Murray ED, Buttner N, Price BH. Depression and psychosis in neurological practice. In : Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J, eds. *Neurology in Clinical Practice*. 6th ed. Butterworth Heinemann; 2012. Philadelphia, PA.
- [3] Szyszkowicz M, Willey JB, Grafstein E, Rowe BH, Colman I. Air pollution and emergency department visits for suicide attempts in Vancouver, Canada. *Environ Health Insights*. 2010; 4 : 79–86.
- [4] Raub JA, Benignus VA. Carbon monoxide and the nervous system. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002; 26 : 925–40.
- [5] Mangone CA, Genovese O, Abel C. Behavioural-cognitive disorders due to chronic exposure to industrial and environmental toxic substances. *Vertex*. 2006; 17 : 16–22.
- [6] Yang AC, Tsai SJ, Huang NE. Decomposing the association of completed suicide with air pollution, weather, and unemployment data at different time scales. *J Affect Disord*. 2010; 129 : 275–81.
- [7] 行政院環境保護署網站 <https://taqm.epa.gov.tw>
- [8] Szyszkowicz M. Air pollution and emergency department visits for depression in Edmonton, Canada. *Int J Occup Med Environ Health*. 2007; 20(3) : 241–5.
- [9] Calderón-Garcidueñas L, Solt AC, Henríquez-Roldán C, et al. Long-term air pollution exposure is associated with neuro inflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol Pathol*. 2008; 36 : 289–310.
- [10] Block ML, Wu X, Pei Z, et al. Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons : the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB J*. 2004; 18 : 1618–20.
- [11] Veronesi B, Makwana O, Pooler M, Chen LC. Effects of subchronic exposures to

concentrated ambient particles. VII. Degeneration of dopaminergic neurons in Apo E<sup>-/-</sup> mice. *Inhal Toxicol.* 2005; 17 : 235–41.

[12] Kabra M, Robie AA, Rivera-Alba M, Branson S, Branson K, JAABA : interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior. *Nature Methods.* 2012 ; 10 : 64-7

[13] Pérez-Escudero A, Vicente-Page J, Hinz RC, Arganda S, de Polavieja GG, idTracker : Tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nature Methods.* 2014; 11 : 743-748.

[14] Symvoulidis P, Lauri A, Stefanoiu A, Cappetta M, Schneider S, Jia H, Stelzl A, Koch M, Perez CC, Myklatun A, Renninger S, Chmyrov A, Lasser T, Wurst W, Ntziachristos V, Westmeyer GG, NeuBTracker—imaging neurobehavioral dynamics in freely behaving fish. *Nature Methods.* 2017; 14 : 1079.

[15] Audira G, Sampurna BP, Juniardi S, Liang S-T, Yu-Heng Lai Y-H, and Hsiao C-D, A Simple Setup to Perform 3D Locomotion Tracking in Zebrafish by Using a Single Camera. *Inventions* 2018; 3 : 11.

[16] Ladu F, Butail S, Macrí S, & Porfiri M (2014). Sociality Modulates the Effects of Ethanol in Zebra Fish. *Alcoholism, clinical and experimental research* PMID : 24819037

[17] Tran, S.; Chatterjee, D.; Gerlai, R. An integrative analysis of ethanol tolerance and withdrawal in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 2015, 276, 161–170.

[18] [http : //emedicine.medscape.com/article/2090019-overview](http://emedicine.medscape.com/article/2090019-overview)

[19] A hybridizing of effects as described at Alcohol's Effects from Virginia Tech and Federal Aviation Regulation (CFR) 91.17 : Alcohol and Flying (hosted on FlightPhysical.com)

[20] Li X, Liu X, Li T, Li X, Feng D, Kuang X, Xu J, Zhao X, Sun M, Chen D, Zhang Z, Feng X, SiO<sub>2</sub> nanoparticles cause depression and anxiety-like behavior in adult zebrafish. *RSC Adv.* 2017; 7 : 2953-2963.

[21] Li X, Liu B, Li X-L, Li Y-X, Sun M-Z, Chen D-Y, Zhao X, Feng X-Z, SiO<sub>2</sub> nanoparticles change colour preference and cause Parkinson's-like behaviour in zebrafish. *Scientific Reports* 2014; 4 : 3810.

[22] Shuraiqi A Al, Al-Habsi A, Barry M J, Time-, dose- and transgenerational effects of fluoxetine on the behavioural responses of zebrafish to a conspecific alarm substance. *Environmental Pollution*, 2021, 270, 116164.

[23] Stewart A, Gaikwad S, Kyzar E, Green J, Roth A, Kalueff A V, Modeling anxiety using adult zebrafish : a conceptual review. *Neuropharmacology.* 2012;62(1) : 135-43

[24] Leris I, Sfakianakis D, Kentouri M, Are zebrafish danio rerio males better swimmers than females ? J. Fish Biol. 2013, 83, 1381–1386.

[25] Pavlidis M, Digka N, Theodoridi A, Campo A, Barsakis K, Skouradakis G, Samaras A, Tsalafouta A, Husbandry of zebrafish, Danio rerio, and the cortisol stress response. Zebrafish 2013, 10, 524–531.

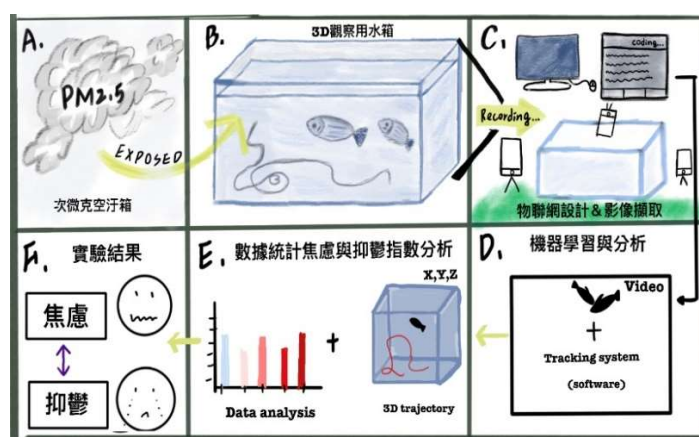
[26] Gilbert MJ, Zerulla TC, Tierney KB, Zebrafish (Danio rerio) as a model for the study of aging and exercise : Physical ability and trainability decrease with age. Exp. Gerontol. 2014, 50, 106–113.

[27] Maes J, Verlooy L, Buenafe OE, De Witte PA, Esguerra CV, Crawford AD, Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. PLoS ONE 2012; 7 : e43850.

[28] Tran S, Gerlai R, Time-course of behavioural changes induced by ethanol in zebrafish (Danio rerio). Behav. Brain Res. 2013; 252 : 204–213.

[29] De Esch C, van der Linde H, Slieker R, Willemsen R, Wolterbeek A, Woutersen R, de Groot D, Locomotor activity assay in zebrafish larvae : Influence of age, strain and ethanol. Neurotoxicol. Teratol. 2012; 34 : 425–433.

### 捌、說明書摘要圖(Graphic for Manuscript)



**研究概念圖：** (A)不同濃度的二氧化矽微粒為實驗的輸入源。(B)斑馬魚和微粒放入測試水箱進行藥理操作實驗。(C)影片攝影系統記錄斑馬魚暴露於空污微粒的行為。(D)影片追蹤與機器學習。(E)數據彙整，繪出三維軌跡圖和相關參數。(F)依判斷不同濃度之空污微粒與乙醇與斑馬魚焦慮或抑鬱行為分類。



附錄一：說明書協作平台



實驗影像與研究相關數據之協作平台

<https://sites.google.com/view/SA20-241>

## 附錄二：物聯網空污箱 Arduino 程式碼

```
int measurePin = 0; //Connect dust sensor to Arduino A0 pin
int ledPower = 2; //Connect 3 led driver pins of dust sensor to Arduino D2
int samplingTime = 280;
int deltaTime = 40;
int sleepTime = 9680;
float voMeasured = 0;
float calcVoltage = 0;
float dustDensity = 0;
void setup(){
  Serial.begin(9600);
  pinMode(ledPower,OUTPUT);
}
void loop(){
  digitalWrite(ledPower,LOW); // power on the LED
  delayMicroseconds(samplingTime);
  voMeasured = analogRead(measurePin); // read the dust value
  delayMicroseconds(deltaTime);
  digitalWrite(ledPower,HIGH); // turn the LED off
  delayMicroseconds(sleepTime);
  calcVoltage = voMeasured * (5.0 / 1024.0); // 0 - 5V mapped to 0 - 1023 integer values // recover
  voltage
  // linear equation taken from http : //www.howmuchsnow.com/arduino/airquality/ // Chris Nafis
  (c) 2012
  dustDensity = 0.17 * calcVoltage - 0.1;
  Serial.print("Raw Signal Value (0-1023) : ");
  Serial.print(voMeasured);
  Serial.print(" - Voltage : ");
  Serial.print(calcVoltage);
  Serial.print(" - Dust Density : ");
  Serial.print(dustDensity * 1000);
  Serial.println(" ug/m3 ");
  delay(1000);
}
```

### 附錄三：實驗設備成本評估

我也對實驗設備做一簡單的成本評估，總體實驗設計所需花費如表 S1 所列：

表 S1：實驗設備成本評估表。

	品項	價格 (NTD)	網址
1.	Arduino Nano+麵包板	100	<a href="https://www.icshop.com.tw/product_info.php/products_id/25092">https : //www.icshop.com.tw/product_info.php/products_id/25092</a>
2.	超音波水霧化模組 Grove – Water Atomization V1.0	357	<a href="https://www.taiwaniot.com.tw/product/grove-water-atomization-超音波水霧化模組/">https : //www.taiwaniot.com.tw/product/grove-water-atomization-超音波水霧化模組/</a>
3.	夏普空氣品質感測器	229	<a href="https://www.taiwaniot.com.tw/product/sharp-原裝夏普-gp2y1014au-pm2-5灰塵粉塵空氣品質感測器(提供arduino/">https : //www.taiwaniot.com.tw/product/sharp-原裝 夏普-gp2y1014au-pm2-5 灰塵粉塵空氣品質感測器(提供 arduino /</a>
4.	面積式氣體流量計 閥門	200	<a href="https://www.fullwins.com.tw/mbc.html">https : //www.fullwins.com.tw/mbc.html</a>
4.	水箱	500	壓克力 20x20x20 cm 五片
5.	燈箱+LED 燈條	520	壓克力 30x30x2 cm 共兩組
7.	空氣抽氣馬達	170	199 賣場
8.	鏡子	250	199 賣場
9.	空污箱	150	199 賣場
10.	手機變焦鏡頭	190	199 賣場
11.	美工器材與軟管一 批	210	199 賣場
12.	六月大斑馬魚 10 條	100	花蓮長虹水族店
	<b>總體花費</b>	<b>~3000 元</b>	

#### 附錄四： idTracker.AI 的演算法

關於在 idTracker.AI 的演算法中之「Preprocessing」與「Crossing detection」，「Preprocessing」其目的為將影片中每一幀斑馬魚影像提取出來。而「Crossing detection」為交錯偵測(Crossing detection)卷積神經網路分類器，如圖 S1(a)-(b)分別為有交錯與無交錯斑馬魚影像之 Top View 與 Side View，藉由交錯偵測(Crossing detection)卷積神經網路分類器，把有交叉和無交叉的斑馬魚影像做分類，然後將無交叉的斑馬魚影像經過另一個獨立偵測(Individual detection)卷積神經網路進行身份辨識。最後，將卷積神經網路訓練好的結果，對影片中每一幀所有的斑馬魚影像身份進行預測(包含有交叉和無交叉的斑馬魚影像)，並輸出斑馬魚 xyz 的時空軌跡。

(a) Top view crossing & non-crossing (b) Side view crossing & non-crossing



圖 S1：(a)-(b)分別為有交錯與無交錯斑馬魚影像之 Top View 與 Side View。

如圖 S2 所示，為濃度為零之對照組影片(DOS\_0\_SV, Side View)之 Crossing detection 卷積神經網路分類器運行的結果，圖 S2(a)-(c)分別為計算的誤差率(Loss)、計算的準確率(Accuracy)、與有交叉和無交叉兩類別的準確率(Per class accuracy)之結果，其中 Y 軸的數值為 0~100%對應成 0~1 之歸一化數值，X 軸 Epochs 則為其神經網路重複執行訓練的次數。每一次影像分析，我皆預設為 10 epochs，並視精準度收斂程度作調整，並以誤差率的數值越小越好，準確率的數值越大越好為評斷。

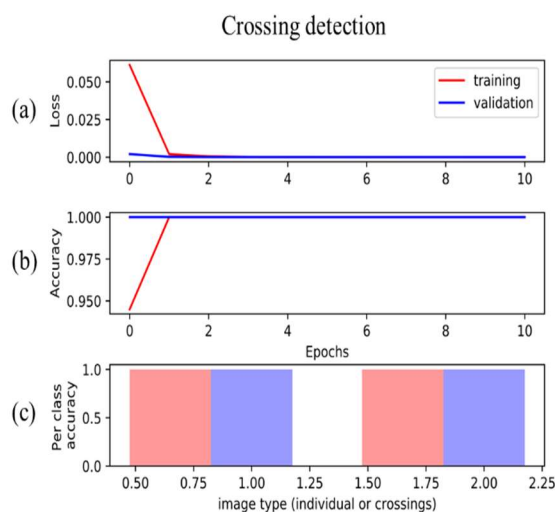


圖 S2：為濃度為零之對照組影片之卷積神經網路分類器運行的結果。

由於神經網路的訓練方式為，先利用資料集進行訓練(training)，再用訓練好的結果對驗證(validation)的資料集進行預測，所以可以看到圖 S2(a)-(b)中紅色為 training，藍色為 validation。再來 Per class accuracy 為有交叉和無交叉兩類別的準確率，Y 軸一樣是準確率歸一化的結果，而 X 軸則是交叉和無交叉的兩個類別，圖 S2(c)為紅色和藍色的長條圖分別表示 training 和 validation 的結果。

綜上所述，從交錯偵測的數據結果中，我看見都能在 Epochs= 10 的時候達到接近 1 的準確度，表明交錯偵測卷積神經網路分類器能夠確實有效的進行斑馬魚影像交叉分類。