

利用主成分分析建構蝦貝類的免疫總合指標

許晉榮¹、黃文彬²¹水產試驗所海水繁養殖研究中心、²國立東華大學自然資源與環境學系

前言

近幾年，由於水產養殖生物一直遭遇疾病問題，因此免疫學相關研究特別受到重視。目前生物學家已經發現多項魚介類的細胞性與體液性免疫指標的測定方法，也證實這些指標與水產動物的免疫力及日後對於病原物的抵抗力有關。但截至目前為止，還沒有一個適當的免疫指標，能夠統括又正確地顯示這些個體真正的免疫力。事實上，這種多免疫指標整合法是很重要的，其分析結果可用以判斷一些免疫調節物質或營養添加物是否具有促進魚介類免疫力的效果，也有助於免疫防病治病的發展。

Ma et al. (2010) 提出的免疫總和指標 (composite immune indicator, CII) 的計算概念，即是嘗試解決這個問題。該研究係利用層級分析 (Analytical hierarchy process, AHP) 及主成分分析 (principle component analysis, PCA) 等兩種多變量分析 (multivariate analysis) 的方法來建構蝦類的免疫總和指標。層級分析法牽扯到對於不同免疫指標主觀的評分及加權，可是在目前無脊椎動物各種免疫指標所代表的意義及其重要性還不是十分清楚的情況下，要將各種免疫指標主觀

地排序，再加以不同分數的評分、加權 (如絕對重要、極重要、稍重要、同等重要等分級) (鄧及曾，1989)，並不容易也不適當。因此筆者等在計算免疫總和指標方面，係以實際觀測值重組後獲得客觀加權方式的主成分分析法來進行分析。以下介紹 Ma et al. (2010) 利用主成分分析法建構蝦類免疫總和指標的方法，以及筆者等實際應用於九孔 (*Haliotis diversicolor*) 的結果。

方法

主成分分析法最早由 Karl Pearson 在 1901 年提出，後由 Harold Hotelling 在 1933 年將之擴展。該法是將觀測資料中原來具有相關性的 p 個變數，經過線性組合後，成為彼此間相關係數為零的 k 個新變數 (即彼此間互相獨立)，同時為了達到資料簡化的目的，通常 k 比 p 小很多，而這 k 個新變數就是 k 個主成分 (張，1993)。至於如何選取 k ，則依這 k 個新變數對原有變數的共變數結構有多少解釋能力 (變異量所佔比例) 而定。在線性組合關係的轉換中，總變異量是不變的。將新變數代表的變異量大小排序後，新的第一變數即擁有最大的變異量，稱之為第

1 主成分；下一個新的變數（第 2 主成分）具有第二大變異量，與第 1 主成分無任何關係。Ma et al. (2010) 利用此種方式，將甲殼類的多種免疫係數進行簡化，設定免疫總和指標，可較清楚地比較不同處理對甲殼類的免疫促進效果。Ma et al. (2010) 將免疫總和指標設為 ϵ_{im} 。

$\epsilon_{im} = F(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n)$ 每個 X_i 就是一個免疫指標（變量）

$$\text{實際計算式 } \epsilon_{im} = \sum_{i=1}^n \omega_i \frac{\text{Im}_{fi} - \text{Im}_{oi}}{\text{Im}_{oi}}$$

Im_{fi} 是該免疫指標經過處理後的數值，而 Im_{oi} 則是該指標未經處理的原始起始值（data of blank control group）。 ω_i 則是經由主成分分析法計算求得加權指數。而此加權是來自於第一主成分上的特徵向量，並且將其各元素值平方而得。亦即當每個免疫指標被計算時，是以此指標經處理後增加的比例乘上主成分分析所得的加權指數，總和即為免疫總和指標。

甲殼類的例子

Ma et al. (2010) 選用一個以不同蚯蚓含量的飼料投餵白蝦後，其免疫力變動的例子來進行分析、說明（表 1）。他們先將把各處理組的各免疫指標之觀測值數據輸入如下：

0.27	77.59	47.44	9.40	1290.00
0.36	72.65	54.40	18.40	1479.80
1.07	107.75	77.23	27.26	1700.30
0.61	122.73	99.43	32.68	1924.10
0.93	157.13	92.82	32.17	1905.00

利用統計軟體進行相關係數矩陣（correlation matrix）分析，再進行主成分分析法正交轉換（orthogonal transformation）後，可得到下列經大小排序後之特徵值：

$$\lambda = [4.3803 \quad 0.4177 \quad 0.1809 \quad 0.0212 \quad 0.0000]$$

根據上述每一個特徵值可得到所對應的特徵向量（表 2）。上述主成分 1 之可解釋變異量達 87.61%，再加上主成分 2 後可達 95.96% 的解釋能力。Ma et al. (2010) 認為上述主成分 1 可解釋的變異量已經夠高，所以決定只用主成分 1 所得之各特徵向量值再取平方後作為加權指數，來求各處理組的免疫總和指標（CII）。以攝食 1/8 蚯蚓添加物組的 ϵ_{im} 為例說明：

$$\sum_{i=1}^n \omega_i \frac{\text{Im}_{fi} - \text{Im}_{oi}}{\text{Im}_{oi}} = 0.1508 \quad (= 0.3883 \times 0.3883) \times (0.36 - 0.27) / 0.27 + 0.1964 \times (72.65 - 77.59) / 77.59 + 0.2145 \times (54.4 - 47.44) / 47.44 + 0.2187 \times (18.4 - 9.4) / 9.4 + 0.2197 \times (1479.8 - 1290) / 1290 = 0.311$$

依此計算，其他三組（2/8、3/8 及 4/8 蚯蚓添加物）免疫總和指標分別為 1.1433、1.1889 及 1.0885。由此總和指標比較，顯示白蝦飼料以添加 3/8 蚯蚓飼料含量對免疫力的促進效果最佳。

九孔的例子

事實上，Travers et al. (2008) 在 Ma et al. (2010) 之前就曾運用主成分分析來統合、簡

表 1 餵食不同比例(1/8-4/8)蚯蚓添加物對白蝦免疫力的影響

餵食物品 (處理)	CAT 活性 (U/mg prot)	ACP 活性 (U/mg prot)	AKP 活性 (U/mg prot)	溶菌力 (U/mg prot)	總血球數 ($10^4/\text{mL}$)
人工飼料(對照組)	0.27	77.59	47.44	9.40	1290.0
1/8 添加物	0.36	72.65	54.4	18.40	1479.8
2/8 添加物	1.07	107.75	77.23	27.26	1700.3
3/8 添加物	0.61	122.73	99.43	32.68	1924.1
4/8 添加物	0.93	157.13	92.82	32.17	1905.0

表 2 主成分分析法分析表 1 白蝦免疫力所得之各主成分特徵向量表

變量/主成分	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
CAT 活性	0.3883	0.8969	0.1346	0.1414	0.0815
ACP 活性	0.4432	-0.0257	-0.8753	-0.1621	-0.1021
AKP 活性	0.4631	-0.3273	0.1175	0.7956	-0.1778
溶菌力	0.4677	-0.1291	0.4036	-0.5147	-0.5804
總血球數	0.4687	-0.2665	0.1975	0.2364	0.7839

化歐洲鮑 (*H. tuberculata*) 的免疫指標。Travers 等人選用總血球數、超氧歧化酶活性等十項血淋巴指標進行主成分分析，將主成分因子 1 所得的各特徵向量值作為加權係數，乘上原免疫指標，是為該採樣點的血淋巴扼要指標 (haemolymph profile, HP)。分析結果顯示，歐洲鮑的扼要指標在產卵後明顯地降低，而較低的扼要指標在對抗哈維弧菌 (*Vibrio harveyi*) 時的活存率也較低。利用此類的統合性免疫指標，可清楚地解釋歐洲鮑在產卵後，遇到細菌大量孳生時，何以會出現大量的死亡潮。

筆者等嘗試將 Ma et al. (2010) 計算甲殼類免疫總和指標的方式應用在九孔上。以許 (2010) 「分析九孔種貝血淋巴免疫相關指標

季節性之變化」為例，其實驗期間為 15 個月，所計算之免疫指標分別為蛋白質濃度、總血球數、血青素含量、酸性磷酸酶、鹼性磷酸酶及酚氧化酶活性。因為沒有所謂未處理之起始對照組，所以取用前 1 年內的各指標數據平均值做為對照基準之起始值 (Im_{oi})。由主成分分析法計算許 (2010) 之各項指標結果顯示，主成分 1 之解釋變異量高達 73.5%，再加上主成分 2 後可達 89.2% 的解釋能力。仿照 Ma et al. (2010) 以主成分 1 特徵值所對應之各特徵向量平方值作為加權指數，求得 12 個月的免疫總和指標。所得圖形 (圖 1) 與許 (2010) 中所得的多項免疫指標圖形 (例如鹼性磷酸酶活性) 相似。但整合的指標可更清楚、簡潔地顯示九孔的「總免

疫力」在秋、冬生殖季（10 月到 1 月）時與非生殖季時的差異。

結論

由於九孔和甲殼類都是無脊椎動物，並不像脊椎動物具有後天免疫系統（adaptive immune system），當外來病原（病毒、細菌、

寄生蟲）入侵時，不是以產生抗體的方式，而是透過先天免疫系統（innate immune system）產生抗病力去對抗（Bachère et al., 1995；Hooper et al., 2007）。可是，由於各種免疫指標測量方法及單位不盡相同，所以即使以相同的藥物或病原處理，其反應結果仍不易比較，因此利用主成分分析取得簡化的免疫總和指標，或許是一個值得考量的方向。

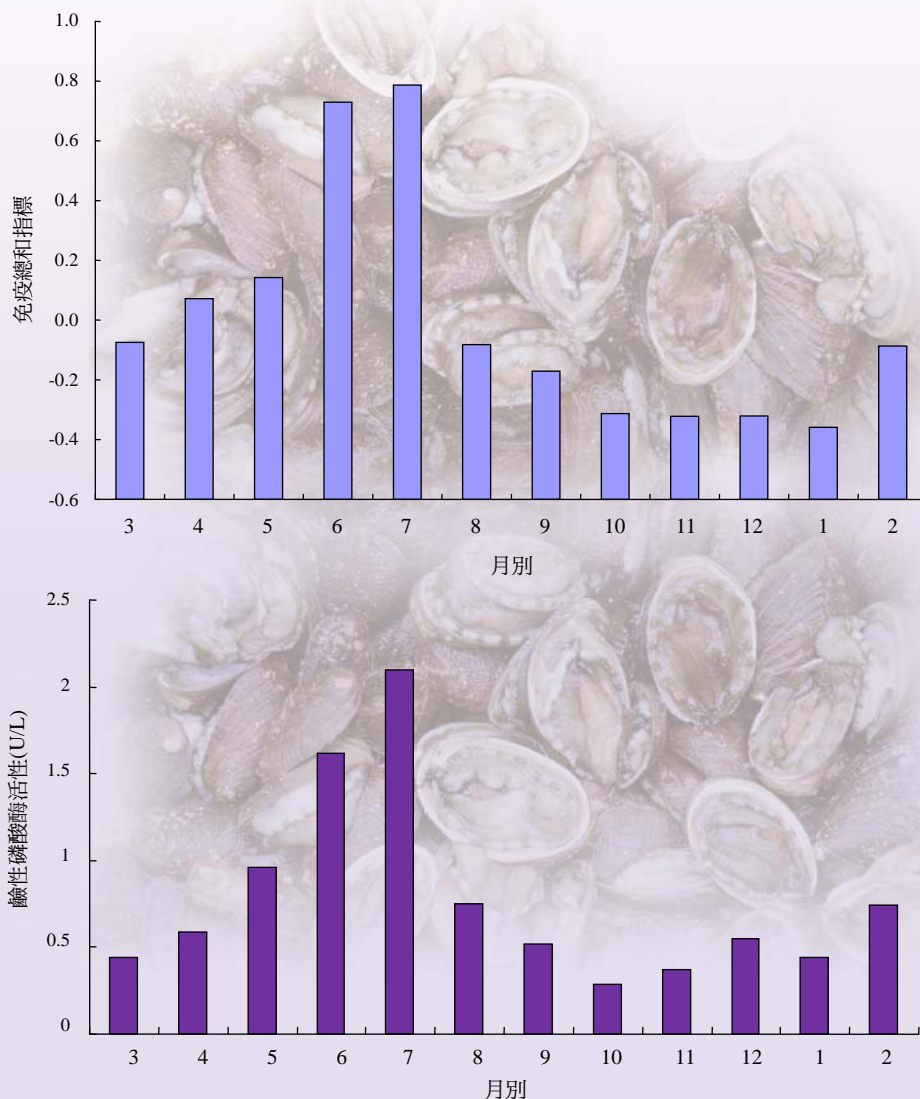


圖 1 九孔種貝血淋巴免疫總和指標(CII)與鹼性磷酸酶活性周年變化情形