2020 年

實驗動物科學（技術篇）





中華實驗動物學會 主編

行政院農業委員會 補助

實驗動物主管機關　序言

我國於民國 87 年 11 月 4 日發布施行「動物保護法」，立法要旨為尊重動物生命及保護動物，並訂定實驗動物專章，規範動物科學應用機構應設置實驗動物照護及使用委員會或小組，督導該機構進行的動物科學應用，農委會做為動物科學應用機構監督及管理之主管機關，每年邀集教育部、經濟部、衛生福利部、科技部、實驗動物專家、學者及立案之動物保護團體代表參與監督查核，透過三階段之書面審查、實地查核及重點查核，強化機構自主管理，促使各機構提升實驗動物之人道管理。

我國實驗動物人道管理制度分為法規制度、監督查核及教育訓練等三大構面，法規制度如「動物保護法」、「實驗動物照護及使用委員會或小組設置及管理辦法」及「動物科學應用機構監督及管理執行要點」配合執行；監督查核則根據「實驗動物照護及使用指引」中所定指導原則，督導機構進行實驗動物科學應用；另藉由教育訓練強化機構自主管理及內部作業程序，提升機構動物照護管理專業度；此次編撰實驗動物科學教科書，係提供實驗動物從業人員現場實務操作之作業程序及技術規範，並強化實驗動物福祉概念與知識管道，足可成為大專院校、研究單位授課教師開設一門學習科目的教材，為實驗動物學研界持續培養專業人才。

謹代表農委會致上最真誠的敬意，感謝實驗動物科學(基礎篇)編審委員與許多曾參與撰文學者專家，以 2 年的時間，召開多次會議，逐字用心的討論書寫本書到付梓，付出諸多心力；同時感謝中華實驗動物學會的鼎力協助，使實驗動物人道管理工作得以順利推展，更祈望實驗動物照護與操作者能透由獲得動物福利觀念及動物實驗專業知識，落實應用 3R 原則於動物之飼養照護及實驗過程，儘可能減少動物遭受不必要的痛苦。

行政院農業委員會畜牧處 處長　張經瑋

張經瑋 謹撰

中華民國 109 年 4 月

編審小組主席 序言

在美國求學與工作過程中皆已應用實驗動物於研究，並實際撰寫研究計畫及其實驗動物計畫書，從美國回到台灣加入國家衛生研究院的新藥研發團隊(1999 年)，就負責新研發的藥物之動物藥理活性評估、藥物動力學研究與疾病動物模式應用等工作，幸運地使用了當時全台灣唯一有國際實驗動物管理評鑑認證(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International, AAALAC)協會認證的生物技術開發中心的實驗動物設施，洪昭竹常務理事為當時的實驗動物中心主任。2002 年起開始擔任國家衛生研究院動物實驗管理委員會的召集人迄今(2020 年)，並於 2003 年開始與建築師共同規劃與設計現在國家衛生研究院在竹南院區的實驗動物中心的藍圖，2004 年開始加入中華實驗動物學會，並由梁善居前理事長推薦成為理事參與理事會，開始學習更多與實驗動物相關的專業知識與管理。2005 年起擔任國家衛生研究院實驗動物中心主任 4 年多，國衛院的實驗動物設施與管理也於 2015 年通過 AAALAC 國際認證迄今，接觸實驗動物領域後的學習很快地歷經十幾年了。

這麼多年來，也曾經尋找幾個有可能開設實驗動物科學課程的學校，當時有的學校並沒有設此課程，有設此課程學校的教材也不是完整的教科書，一直覺得這部分是有欠缺的。直到這兩本實驗動物科學教科書付梓，也沒有其他實驗動物科學課程的完整中文教科書在台灣。擔任中華實驗動物學會的理事長期間，數次拜訪時任農委會畜牧處動保科的江文全科長，江科長一直是很積極地努力在實驗動物相關的動物保護與專業管理等法規之健全、執行面的落實、以及國際接軌，有一次拜訪時，他提起希望請中華實驗動物學會撰寫實驗動物相關的中文教科書，我當然非常心有同感地接受了，國內參與撰寫各章節的專家學者們也都盡心盡力地一起完成，在此一併表達對農委會長官與專家學者們的感謝。

這兩本實驗動物科學書籍分別為[基礎篇]與[技術篇]，為國內第一次發行的中文實驗動物科學教科書，期望國內學校能多利用於大學部與研究所的教學，研究機構能使用於研究人員與設施管理人員之教育訓練。也期待有專家與學校教師能參考這兩本書籍設計出很棒的教學教案，更有利於這些實驗動物之基礎知識與技術的推廣，不論在學校或在職場，持續學習與持續教育訓練都是很重要的，也期望中華實驗動物學會能週期性地持續再精進兩本書籍的內容，並藉由教育訓練機制推廣。希望這兩本教科書可以成為提升國內實驗動物於科學應用水準的重要墊腳基石之一，為台灣生技醫藥相關之科學研究與實驗動物福祉的共同發展而繼續努力。

中華實驗動物學會 常務理事
國家衛生研究院動物實驗管理委員會 召集人
國家衛生研究院生技與藥物研究所 所長

陳炯東 謹撰

中華民國 109 年 4 月

總編召集人 序言

技術篇是繼基礎篇後，考慮研究人員對正確操作實驗動物存有疑慮，由主管機關農委會繼續支持中華實驗動物學會專家群分組討論撰寫完成的技術書籍。由於實驗動物操作技術不勝枚舉，所以本技術篇僅能介紹較常使用的各種實驗動物技術，諸位讀者除了參考技術操作方法外，亦須配合基礎篇之實驗動物操作要求（3R 原則）或者參考國際動物操作規範執行之。

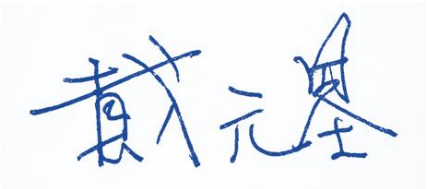
技術篇主要的內容乃針對國內使用性或應用性較高之技術、動物模式，以系統化分類的方式編撰，主要分為嚙齒類動物、中大型動物、水生及兩棲動物，並在內容的最後加入讀者在臺灣若欲進行相關實驗或研究，該如何從國內外獲得需要的資源等。各動物模式內容主要包括模式建立、特性介紹、應用領域、特殊照護及福祉，並簡要說明該模式成功建立的標準。內容深淺以「學生看得懂，能對此技術或觀念有收獲」為重點原則。在進行動物實驗的基礎技術主要是保定、採血、導尿、麻醉、投藥或醫材植入等操作技術，並介紹上述基礎技術的準備材料、操作程序及方法、說明注意事項，希望學員能熟練這些基礎技術，以確保人員安全及動物福祉。

目前全世界有超過一千個研究單位、生技公司或藥廠擁有高品質實驗動物平台進行生技競爭，在泛太平洋區域則在近十五年間由十餘家通過國際認證增加至超過兩百個單位通過擁有高品質實驗動物平台。這個通過認證單位數目的暴增代表著亞洲各國家在生技產業競爭努力與激烈程度，本實驗動物科學（技術篇）於此時刻編撰之目的就是希望藉著各位專家的無私貢獻集結成冊，能夠幫助國內對生技產業有興趣的學生、從業人員快速學習各種職場所需之實驗動物技術，並結合良好實驗動物飼養操作及科研工作，共同為提升台灣生技產業研究而努力。

中華實驗動物學會理事長

國際實驗動物評鑑認證協會認證委員

花蓮慈濟醫學中心麻醉部教授部主任



戴元基 謹撰

中華民國 109 年 4 月

目錄

第一章 緒論.....P.4

第一節 實驗動物教科書之編撰精神 P.4

1.1.1 基礎篇

1.1.2 技術篇

第二節 尊重生命的動物實驗計畫 P.10

第三節 精緻化的技術操作 P.15

1.3.1 術前規劃

1.3.2 人員訓練

1.3.3 術前準備

1.3.4 無菌手術操作

1.3.5 手術監控

1.3.6 術後照護與紀錄

1.3.7 人道安樂死

第二章 動物模式.....P.23

第一節 嚙齒類動物 P.27

2.1.1 發炎性腸道疾病動物模式

2.1.2 皮膚炎動物模式

2.1.3 呼吸道發炎動物模式

2.1.4 腫瘤動物模式

2.1.5 神經行為相關疾病模式

2.1.6 糖尿病動物模式

2.1.7 非酒精性脂肪肝動物模式

2.1.8 疼痛疾病動物模式

2.1.9 心血管疾病模型

2.1.10 高血壓動物模式

2.1.11 骨關節疾病動物模式

第二節 中大動物（含反芻類） P.114

2.2.1 熱原試驗兔模式

2.2.2 刺激性試驗兔模式

2.2.3 多株抗體兔模式

2.2.4 動脈硬化兔模式

2.2.5 乾眼症兔模式

2.2.6 牙科植入物實驗犬模式

2.2.7 關節軟骨受損修復實驗犬模式

2.2.8 自發性癌症實驗犬模式

2.2.9 小型豬模式-骨質疏鬆症模式
2.2.10 小型豬模式-心血管疾病研究模式
2.2.11 小型豬模式-糖尿病的動物模式
第三節 水生、兩棲動物 P.154
2.3.1 魚類及斑馬魚胚生物急毒性試驗模式
2.3.2 利用基因轉殖斑馬魚來偵測內分泌之干擾物質
2.3.3 斑馬魚之行為試驗
2.3.4 斑馬魚胚篩藥模式
2.3.5 兩棲類常用之研究模式
第三章 基礎技術.....P.171
第一節 實驗動物基本注射方式 P.175
3.1.1 實驗動物之皮下注射方法
3.1.2 實驗動物之肌肉注射方法
3.1.3 實驗動物之靜脈注射方法
第二節 大、小鼠 P.181
3.2.1 大小鼠之口服投藥方法
3.2.2 大小鼠之腹腔注射方法
3.2.3 大小鼠之犧牲前大量採血方法
3.2.4 大鼠尾靜脈採血方式
3.2.5 小鼠顎下採血方式
第三節 兔 P.192
3.3.1 實驗兔之皮內注射方法
3.3.2 實驗兔的採血方法
第四節 犬 P.197
3.4.1 實驗犬的口服投藥方法
3.4.2 實驗犬的採血方法
第五節 豬 P.203
3.5.1 保定
3.5.2 採血
3.5.3 麻醉
3.5.4 氣管內導管置入術
3.5.5 導尿管置入術
3.5.6 豬隻口服、注射、皮膚塗抹給藥技術
第六節 水生、兩棲動物 P.217
3.6.1 魚類與兩棲類之保定
3.6.2 魚類與兩棲類之麻醉
3.6.3 斑馬魚基因檢測實驗-剪尾鰭
3.6.4 斑馬魚腹腔注射試驗

3.6.5 斑馬魚抽血技術
3.6.6 斑馬魚強制餵食技術
3.6.7 斑馬魚眼窩注射技術

第四章　手術技術與操作準備.....P.231

第一節 存活手術程序：（囓齒類及中大動物）.....P.234

4.1.1 手術前準備
4.1.2 術中程序及術後管理
4.1.4 麻醉

第二節 常用手術技術概述：囓齒類動物.....P.253

4.2.1 動脈和靜脈導管插入術
4.2.2 膽管結紮與插管操作
4.2.3 肝部分切除、肝急性缺血及肝臟活體組織檢查
4.2.4 5/6 腎切除手術
4.2.5 卵巢切除術
4.2.6 氣管切開術與氣管插管術
4.2.7 腦部手術及立體定位注射
4.2.8 腸道插管手術
4.2.9 輸精管切除術

第三節 常用手術技術：水生、兩棲動物.....P.276

4.3.1 切除小部分肝臟手術-以斑馬魚為例
4.3.2 魚類的活組織檢查-以斑馬魚的魚鰓為例
4.3.3 兩棲類常用手術

附件一 實驗動物國內外資源.....P.283

附件二 各物種麻醉、止痛、鎮靜劑量表.....P.287

附件三 中英名詞對照表.....P.298

實驗動物科學（技術篇）編審小組.....P.315

第一章 緒論

本章課程安排時數：2 小時

本章學習目標：

1. 使讀者了解實驗動物教科書之編撰精神、基礎篇、技術篇二本書的章節大綱及核心內容。
2. 再次提醒讀者在進行動物實驗前，須以尊重生命的態度，以 3R 原則慎重考量其動物實驗計畫的內容。若無法避免使用動物來進行測試，最後就要做好各項準備工作，以實施精緻化的手術操作與動物照護。

第一節 實驗動物教科書之編撰精神

2018 年我國動物科學應用主管機關行政院農業委員會邀請國內專家學者編撰實驗動物學科之教科書，以實驗動物軟硬體基礎篇為主；技術篇則於 2019 年度計畫持續進行。定位為 2 學分（現行基本標準）之大學課程及講義，提供實驗動物新進從業人員、實驗動物照護及使用委員會或小組（IACUC）成員及動物保護檢查員在現場實務操作遇到問題時能從本教科書獲得基礎的概念及解決問題的邏輯思考，之後引導至更深入的資料搜尋，強化相關從業人員之專業知識及教育訓練。

我國「動物保護法」配合國際潮流持續修訂，為最上層之管理規範。中間層為落實 2018 年修訂之「實驗動物照護及使用指引」，而最底層為本實驗動物教科書基礎教育之紮根。希望未來新進的從業人員由觀念的改變審視其實驗動物的基本理論，進而影響管理面的質變。

1.1.1 基礎篇

實驗動物科學（基礎篇），主要章節大綱分為：

第一章緒論：（1）.實驗動物發展的歷史。（2）.實驗動物與生醫發展相關性及價值。（3）.實驗動物發展現況。（4）.實驗動物未來的發展。

全球生技產業涵蓋醫療保健、農業生技、食品生技等領域，其中包含藥品、醫療器材及再生醫學在內的醫療保健領域，是現階段驅動生技產業成長的主力。

另外，隨著飼料添加劑市場的規模持續擴張，以及基因轉殖作物種植面積屢創新高，動物用疫苗與生物性農藥及肥料等銷售增加，進一步擴大農業生技的市場規模，加大全球生技產業成長力道。當代實驗動物更進一步廣泛用於疾病研究、疫苗開發、藥物毒理安全性測試、抗癌研究、與基礎生物醫學研究、診斷、實驗技術及教育等範疇，這些皆是實驗動物對人類福祉的重大貢獻。由此可知，在現代生命科學研究的領域中，實驗動物是不可缺少的一環，且扮演著極重要的角色；尤其對於醫學研究、生命科學及生物科技等的水準提升，擔任一個重要的指標。

第二章動物福祉：(1).動物福祉的歷史演進。(2).3 Rs 的內涵。(3).結語。

在實驗動物領域中，開宗明義即闡述「所有照顧、使用或生產動物以進行研究、測試、或教學的人員，都必須對動物福祉承擔應負的責任」。在所有文化和歷史時期，關注動物應該如何被對待的問題非常普遍。在過去因為資訊傳播較慢，所以在世界各的"動物福祉"運動也有時間上的差別，但隨著通訊技術的發展，活動日益活躍，動物福祉的討論也在全球廣泛的進行。人道對待與照護動物的標準相當複雜，涉及的層面包括法律，以及哲學、倫理和科學的專業守則。本章首先介紹促進動物福祉的一些重大事件的簡要歷史，以及 3 Rs 概念的提出及其內涵，並針對現今公認實驗動物福祉的指導原則 3 Rs 的內容及施行方式進行詳細的闡述，以期使研究人員了解 3 Rs 的內容及重要性，促進實驗動物的福祉。

第三章管理篇：(1).實驗動物物種。(2).實驗動物的照護：標準訂定的理論基礎。(3).實驗動物的遺傳控制與育種。(4).實驗動物設施的功能及管理。(5).動物實驗設計。(6).計畫申請、審查與監督管理。(7).醫療照護管理。

實驗動物管理的目的在於以維護動物福祉為準則，從而進行生醫研究、測試、教學與其它活動，確保動物福祉並提升生醫研究的水準。動物實驗品質的良窳取決於多項因素與條件，而實驗動物管理良好與否為關鍵的條件之一。一個良好的實驗動物飼養管理，需建構在符合動物天性的基本需求之上，依據動物本身的生理條件與需要，並在符合政府相關法規的規範下，來興建合宜的動物設施與架構符合動物實驗需求的管理辦法，以達成維護動物福祉與提升實驗品質之雙重目的。本章節管理篇主要的設計是國內實驗動物設施運作時的基本情境，希望現場實務操作遇到問題時，能從本教科書獲得基礎的概念及解決問題的邏輯思考，之後引導至更深入的資料搜尋。在內容的編排上及未來的教學使用上，建議先以簡單的情境介紹引導思考，再說明解決方案，較細節的內容則可引述「實驗動物照護及

使用指引」、國內外相關的指南及文獻等參考資料。七大章節內容及後續引導的方向如下：

（1）.「實驗動物物種」：內容為常見的實驗動物、國內特有的實驗動物物種介紹，品系特性可連結到 Jackson website，概述引用所需要的資料，未來應用的層面等。

（2）.「實驗動物的照護：標準訂定的理論基礎」：內容為飼養與管理人員之編制與責任、基本飼養環境條件、營養需求等，以效能標準（performance standards）為主，在第四節則以技術規範（engineering standards）為主。

（3）.「實驗動物的遺傳控制與育種」：內容為育種／保種、常見囓齒類實驗動物遺傳模型、遺傳控制、紀錄等，後續思考國內引進國外基因剔除（Gene knockout）的動物而想留種造成基因控制的問題，以及寶貴的品系如蘭嶼豬，避免發生傳染病時的異地保種規劃等。

（4）.「實驗動物設施的功能及管理」：內容為飼養設施管理、基礎飼養環境、動物飼養管理、物料管理、設施安全衛生、動物購買及健康檢疫、設施與物件潔淨、職業安全衛生、教育訓練等，在現場實務操作可能遇到的問題、注意事項，亦思考緊急應變計畫之人員及動物的處置狀況。

（5）.「動物實驗設計」：內容針對沒有統計背景或經驗的從業人員，希望應用統計數據來幫助他們得出有效可靠的結論-最小化所需的動物數量。一個實驗研究的成功與否，除了有完備的科學邏輯設計以及該實驗是否具有意義的基本條件外，便是該實驗設計及資料分析是否符合統計學方法。動物實驗以邏輯和統計分析的方式進行，確保其可靠性和可重複性。倘若能最大化一個實驗所得的資訊，預期需使用的動物總量便可降至最低。

（6）.「計畫申請、審查與監督管理」：內容是讓讀者了解國內實驗動物使用與管理之法源及概況，認識實驗動物照護及使用委員會或小組，以及提交動物實驗計畫書之目的、應注意之重點、審查的程序及動物實驗計畫書通過後之監督管理。

（7）.「醫療照護管理」：內容為對實驗動物過敏以及人畜共通疾病的防範、醫療處置與照護、動物福祉的評量基礎以及苦痛的減緩、防範與終結、實驗動物的健康與疾病監測、手術前中後的照護計畫等，引導學生發想為什麼疼痛分級沒有類別 A（category A）？例如疼痛分級中，行為學研究的電擊屬於第幾級？是否須投藥控制疼痛？記憶與制約反應？不同案例要參考什麼？大魚、小魚的疼痛評估等，實例探討引發問題進而學習答案。

實驗動物科學（基礎篇）共三大章，包含二篇序言「我的實驗動物之路-宋永義名譽教授」、「貢獻所學，為我國開創實驗動物學以支援生技產業發展-洪昭竹博士」，共計 325 頁。除介紹常見的實驗動物（嚙齒類、兔子、水生動物、經濟動物等），亦介紹國內特有的實驗動物物種（台灣獼猴、蘭嶼豬、李宋豬）。另外在計畫申請、審查與監督管理亦納入農委會現行三階段外部查核機制及 2018 年最新公告的「實驗動物照護及使用委員會或小組設置及管理辦法」、「實驗動物照護及使用指引」內容，以利讀者快速融入國內現況。各章節學習目標請參閱附件 1-1。

1.1.2 技術篇

實驗動物科學（技術篇）主要的內容乃針對國內使用性或應用性較高之技術、動物模式，以系統化分類的方式編撰，並在內容的最後加入讀者在臺灣若欲進行相關實驗或研究，該如何從國內外獲得需要的資源等。除成為大學、研究所授課教師開設一門學習科目的教材外，亦可成為實驗動物從業人員的實務操作教科書，為實驗動物產學研界持續培養專業人才。若以學生的需求角度去思考，可能會先考量未來要做哪一方面的研究，所以會先去了解該研究主題有哪一些的動物模式可應用，接下來會需要了解該物種的保定、採血等基本技術，然後思考手術操作準備及注意事項，最後再了解侵入性手術的內容及技術。因此，規劃章節順序如下：

第一章 緒論：（1）.實驗動物教科書之編撰精神。（2）.尊重生命的動物實驗計畫。（3）.精緻化的技術操作。

動物實驗的目的是在動物身上模擬或複製人的生理與疾病狀況，以便進行後續分析及治療相關的研究。為表達人類對實驗動物的尊重，在進行動物試驗之前

須再三考量最基本的動物實驗倫理 3R 原則--替代(Replacement)、減量(Reduction)及精緻化(Refinement)。若無法避免使用動物來進行測試，最後就要做好各項準備工作，以實施精緻化的手術操作與動物照護。

第二章 動物模式：(1).嚙齒類動物。(2).中大動物（含反芻類)。(3).水生、兩棲動物。

近年來生物科技發展快速，各種動物模式與應用日新月異，本章節僅介紹較常見的動物模式。編撰小組在思考本章的重點時，以接軌產業界，讓學生未來可以直接上手，或是具有啟發性質，未來可能會發展或應用的動物模式為主。例如人類用 3C 的時間越來越長，眼科兔模式在乾眼症的研究就可能很有實用性；另外也有癌症研究的醫生表示嚙齒類的癌症模式太簡單,研究結果通常無法適用於人類臨床，所以發想介紹癌症犬模式，或許能讓學生有些啟發性。

各動物模式內容主要包括模式建立、特性介紹、應用領域、特殊照護及福祉，並簡要說明該模式成功建立的標準。在介紹各動物模式時可能會將有系列性或相關性的疾病模式整併在一起，內容深淺以「學生看得懂，能對此技術或觀念有收獲」為重點原則。

第三章 基礎技術：(1).實驗動物基本注射方法。(2).大、小鼠。(3).兔。(4).犬。(5).豬。(6).水生、兩棲動物。

在進行動物實驗的基礎技術主要是保定、採血、導尿、麻醉、投藥或醫材植入等操作技術，在藥物動力學的經口投藥方法部份，需要防止動物嚼碎藥物，亦說明該如何操作或執行的注意事項。本章節介紹上述基礎技術的準備材料、操作程序及方法，並說明注意事項，希望學員能熟練這些基礎技術，以確保人員安全及動物福祉。

第四章 手術技術與操作準備：(1).存活手術程序(嚙齒類及中大動物)。(2).常用手術技術概述：嚙齒類動物。(3).常用手術技術：水生、兩棲動物。

手術可分為兩種，存活手術（survival surgery）與非存活手術（non-survival surgery)。除了以動物存活與否分類外，以手術的性質可分為重大手術（major surgery）與次要手術或小手術（minor surgery)。本章節介紹在手術前的器械、動物與人員準備、術中程序及術後管理的注意事項，學習止痛藥的應用及麻醉狀態的判讀。並介紹嚙齒類、水生、兩棲等實驗動物常用之手術及其應用，如動脈和靜脈導管插入術、膽管結紮與插管操作、肝部分切除、5/6 腎切除手術、卵巢切

除術等，讓讀者了解整個概念，再去找該技術的標準作業程序（SOP）進行操作。

在消毒滅菌的部份可參考 WHO 泛太平洋感染控制學會（Asia Pacific Society of Infection Control，APSIC）每年出版的指引（Guideline）為標準。另外亦介紹疼痛來源及分類，並可參考「指引」附件二附錄 1-2 疼痛程度評估及止痛計畫表。

最後，在附件亦檢附各種動物的麻醉、止痛、鎮靜劑量表，以及國內外實驗動物供應資源體系、委託研究機構、相關的專業協會或團體，以利讀者快速找到所需之資源。

第二節 尊重生命的動物實驗計畫

動物實驗主要應用於醫學、生物學、獸醫學、動物科學和農業領域。就實驗中使用的動物數量而言，大多數動物用於醫學領域，包括教學和培訓、醫學研究、以及藥物，生物製品和食品的功能檢測和安全檢查。

動物實驗的目的，是在動物身上模擬或複製人的生理與疾病狀況，以便進行後續分析及治療相關的研究。實驗動物對人類醫學的進步有著密不可分的關係，而為了保障病人的權益，我們很難完全避免使用動物來進行測試。因此，1959 年羅素和伯齊（Russell and Burch）發表 3R 原則概念--替代（Replacement）、減量（Reduction）及精緻化（Refinement），將遵守動物實驗倫理成為保障動物福祉的最重要原則。隨著科技的進步及動物保護觀念的提升，歐美各國相繼投入動物替代方法具體技術化，尤其近年來強調精準醫療的同時，亦反思各項動物試驗的必要性，要求其相關部會積極發展動物測試替代方案。

在國內使用動物進行教學訓練、科學試驗、製造生物製劑、試驗商品、藥物、毒物及移植器官等之科學應用，應依循「動物保護法」及其子法「實驗動物照護及使用委員會或小組設置及管理辦法」之規定。進行動物科學應用之機構，應依動物保護法第 16 條之規定成立「實驗動物照護及使用委員會或小組（IACUC）」，以督導機構內實驗動物之使用符合動物保護法之規定：包括第 5 條、第 6 條及第 11 條（動物之一般保護）、第 15 條（使用實驗動物時之替代考量、數目減量與精緻化）及第 17 條（人道終止點、安樂死及動物再利用之考量與執行）。」因此，無論是研究人員或實驗動物照護及使用委員會或小組，在進行實驗動物手術操作前須進行下面基本原則的考量，以符合「動物保護法」第 15 條第 1 項「使用動物進行科學應用，應儘量避免使用活體動物，有使用之必要時，應以最少數目為之，並以使動物產生最少痛苦及傷害之方式為之。」

（1）. 考慮使用替代方案（體外系統、電腦模擬、及/或數學模型），以減少或取代動物的使用。（替代、減量）

（2）. 應基於人類及動物健康、增進知識、或對社會有所貢獻的目的，去設計與執行動物操作程序。（損害、利益評估）

（3）. 選用合適的動物物種、動物品質及動物數量。（實驗設計與統計）

（4）. 避免或減輕動物不安、不適和疼痛的感受。（精緻化）

（5）. 使用適當的鎮靜劑、止痛劑及麻醉藥。（精緻化）

（6）. 建立人道終止時機。（安樂死）

（7）. 提供充分的獸醫照護。（臨床照護）

（8）. 由合格的人員指導與執行動物運送及飼養管理業務。（教育訓練）

（9）. 活體動物實驗只能由具資格及有經驗的人員負責操作或在其監督下執行。（教育訓練）

表 1-2-1 實驗動物手術操作前考量項目

考量點	思考內容
替代、減量	1. 採用無感知的物質取代以往使用有意識的活脊椎動物的科學方法。 2. 利用物理化學特性來預測生物效應，以篩選或評估測試材料。包括使用酸鹼值和緩衝能力來預測潛在眼睛刺激性或腐蝕性的嚴重程度；電腦模型的使用，需先有可靠的活體實驗數據為依據，可進行分子結構與特定生物活性關聯性的探討。 3. 使用無疼痛知覺之物種，其不會感覺疼痛或痛苦；例如，以魚的幼體評估水的毒性。 4. 使用動物或人來源的離體和體外系統，如器官、組織切片，細胞培養/懸浮液或胞器等。如果是以不需要使用胎牛血清維持的細胞培養材料，則可做到完全替代。 5. 應用分層實驗方法，早期排除不適合繼續發展的材料或假說，從而避免了不必要的動物研究。初期的研究或測試也可使用替代方案，有顯著正面的結果再進行動物試驗；另外，在小規模研究如果不能證明預期結果，則可以避免大規模研究的失敗。研究初期也可考慮先用體外試驗進行，進而減少動物使用量。初期的細胞毒性試驗可以用來計算毒性試驗時的劑量，以減少因測試劑量造成動物使用量增加。
損害、利益評估	損害及效益分析（Assessing harms and benefits）研究人員及實驗動物照護及使用委員會或小組必須權衡動物可能的傷害，考慮 3R 最佳的實行，以及試驗可能獲得的效益，如此方能確保危害降至最低和效益最大化。

表 1-2-1 實驗動物手術操作前考量項目（續）

考量點	思考內容
實驗設計與統計	1. 實驗設計的統計要素，如樣本大小、功效程度、異性精確度、以及適當統計方法的正確應用，是確定所需動物數量和解釋所產生數據的重要方法。 2. 達到科學目標所需的動物數量反映了所需的精確度和確定性。認真審核實驗的目的及預期成果，並事先搜尋相關文獻，如果實驗的目的不明確，或是參考文獻後發現預期成果可能無法達成時，應該考慮停止實驗，或重新設計實驗。 3.先期實驗（Pilot Study）是一項小規模的初步研究，旨在研擬最終研究的可行性；一般情況下，其結果用於實驗設計改進及修正。改進及修正可包括以下方向：可能的個體差異和獲得完整科學結果所需的動物數量；最合適的劑量和取樣方式；了解可能產生的生理或行為變化和不良反應的性質、發生率、嚴重程度和時間點，以及如何避免及處理。重要的是，執行先期實驗的結果與修正，可以避免大規模研究時的非預期結果的產生及處理。
精緻化	1. 動物可能會感到疼痛和痛苦，所以在進行科學應用時，應先評估涉及動物疼痛的分級。所有參與動物實驗之相關人員皆應有理解的道德和義務，只要這些評估疼痛的行為不干擾研究目標，就可以減少或消除研究動物的疼痛和痛苦。 2. 實驗程序的精緻化可以減少動物可能承受的痛苦。近年來有許多專用於實驗動物的儀器被開發出來，尤其是影像設備，這些設備大多是非侵入性的或是小程度侵入性的檢查；有些設備如遙測系統，雖然需要先以侵入式手術植入偵測器或晶片，但植入後，動物在手術恢復後不受干擾，而研究人員即可透過遙測設備，收集想要的各種生理資訊。這些發展對於動物福祉的推展有很大的助益。 3. 全身麻醉劑會影響許多生理參數，必須注意確保其不會損害實驗數據或動物福祉。在整個手術過程中，應採取適當措施，監測和維持麻醉受試者的循環，呼吸功能和體溫在正常生理範圍內；而且從全身麻醉中恢復可能是危險的，應有專人看管，防止動物在意識不清時受到傷害，直至被麻醉的動物完全清醒；必要時應給予對症或支持性治療，以確保其安全。在麻醉恢復前應考慮給予第一劑鎮痛藥，因為當初始劑量的鎮痛劑的開始生效時間點先於動物感到疼痛的能力時，整個的手術後鎮痛處理的要求會降低。手術後鎮痛應該是常態，應該根據需要給予疼痛控制，以加速其恢復正常行為，如食物和水的攝入，從而縮短手術後的分解代謝階段。執行動物全身麻醉需要適當的觀察時間表及紀錄，並且諮詢獸醫師，基於個體動物的情況和需要，有必要時給予適當的治療。

表 1-2-1 實驗動物手術操作前考量項目（續）

考量點	思考內容
安樂死	1. 實驗動物在科學應用中，無論是進行生產或用於科學實驗，最終通常需要人道安樂死。人道安樂死的方法，如果使用得當，通常可確保動物的意識迅速喪失而不會產生疼痛或痛苦的跡象，並導致動物死亡，使其身體和精神感受最少的痛苦。人道安樂死的執行需要專業知識與技術，這些專業知識與技術只能通過適當的教育訓練，以及提供和維護適當的設備才能執行。在執行人道安樂死後，應先確認動物已死亡，才能進行後續工作，如全採血、收集組織或屍體處理。 2. 人道終點必須在實驗申請時提出評估，實驗人員應透過文獻閱讀，設想實驗可能對動物福祉造成的影響。評估人道終點時需有多方面的考量，包括法律、道德、動物福祉和科學方面，包括：即使沒有直接的福祉問題，但已經達到實驗目標，或已知實驗目標無法實現時；實驗對象經歷痛苦或持久傷害超出必要的範圍，這些終點通常在較低痛苦時即被介入引用。例如，體重減少通常可以被認為是明顯毒性的早期指標；當有併發問題時，例如次臨床背景感染，即使它們可能沒有損害動物的健康狀況，但會影響數據或產品的品質，例如，實驗小鼠遭受小鼠肝炎病毒的感染，小鼠可能沒有明顯的福祉問題，但它會產生非典型的免疫反應而影響實驗結果，這批動物再繼續實驗也是沒有意義的。
臨床照護	1. 定期評估動物福祉的指標，建立動物福祉減損的評估系統。評估動物福祉首先要了解和認識什麼是“對動物有意義的”與“適合動物的”。對動物異常狀態的鑑別，取決於對觀察中的實驗動物物種及其個體正常性的認識和熟悉。在沒有相反證據的情況下，可以假設任何在人類中產生疼痛和不適的刺激、經驗或病理，也可以在有感知的動物中觀察到或反映出來。 2. 手術為侵入性的操作，若未妥當規畫可能會造成動物的疼痛與不適。研究人員或手術者必須與獸醫師討論，依據動物福利選擇並適當的使用止痛藥或抗生素，以減少動物的疼痛與感染的發生。
教育訓練	1. 可以在教育與訓練中使用各種替代方式來表現生物現象，過程和相互作用；培訓參與者的技能並培養解決問題的能力。這些包括模型、操作程序的影片、互動式模擬軟體與課程，以及虛擬實境的操作系統。

表 1-2-1 實驗動物手術操作前考量項目（續）

考量點	思考內容
教育訓練 （續）	2. 所有參與實驗動物科學應用過程的人員都應具備適當的專業能力，實驗動物飼育人員、獸醫師以及研究人員，這些人員對於實驗動物飼養照護及操作的專業能力，有賴於有系統的教育訓練課程；而人員的態度和技能是實現高動物福祉標準和開展健全科學的最重要因素。人工飼養的動物完全依賴於人的照護，以維持健康及正常的生理行為。除了技術能力之外，所有員工都必須發展並展現適當的“關心動物福祉的文化”。 3. 在科學應用中，最佳和最精確的精緻化需要多學科的團隊合作；實驗動物獸醫師，實驗室動物科學家以及動物照護人員必須同時發揮積極和專業的作用。工作人員必須接受訓練，以識別正常行為與疼痛和痛苦的跡象，既可以改善動物照護的面向，也可以促進對實驗結果的認識。

第三節 精緻化的技術操作

依實驗動物照護及使用指南第八版敘述，「精緻化是指修改飼養或實驗的程序，以強化動物福祉，並減少或消除疼痛和緊迫狀態。」因此，在科學應用技術操作的過程中儘量減少動物所遭受的痛苦或持續性的傷害，一直到動物受到人道安樂死處理，每一個環節都需要仔細考慮。

手術種類可區分為存活性手術（survival surgery）非存活性手術（non-survival or terminal surgery）。存活性手術再分為 1.重大手術（major surgical procedure）：手術過程穿透並暴露出體腔，造成身體或生理學上永久的傷害，如截肢、開腹、開胸或開顱手術；2.小手術（minor surgical procedure），未穿透體腔或使體腔暴露，並未造成動物身體或生理上永久的傷害，如皮下滲透式幫浦植入或皮膚活體組織檢查。

成功的手術結果是需要適切留意下列因素，包括術前規劃、人員訓練、麻醉、無菌和手術操作技術、動物福祉的評估、正確使用止痛劑、於手術期間及術後照顧階段全程留意動物的生理狀態。這些個別因素所產生的影響程度，會因手術程序的複雜度及使用動物的種類而有所不同。

1.3.1 術前規劃：

為了降低手術的副作用，參與手術的所有人員皆須了解手術過程，並考慮各層面。事先準備好確認清單，對於周圍的工作人員及手術者是很實用的。手術進行前應有完整的術前規劃，評估項目建議包含動物生理狀態的評估，執行手術人員數量及是否具有完整的知識與經驗，對操作技術的熟悉度，麻醉藥、止痛藥、抗生素等藥物的選用與劑量，預計需要的手術時間。所有的存活性手術都應遵守無菌手術操作的原則。助理們通常會參與中大動物的手術，但其對於嚙齒類動物手術的協助通常會被低估。例如可有人專門負責無菌手術過程中較易污染的工作，如術前動物的準備及其他支援的部分。另外必須考慮的，包含執行手術的時間點，若安排為一天最後的工作或週五，會讓術後照護延續到夜晚或週末，若人員不足的話可能導致人員不便或術後動物的照護不夠充分。典型的確認清單如下：

1. 選擇合適的動物：種類、品系、性別、年齡及需要的動物數量。
2. 適應、習慣手術前的訓練。
3. 術前評估動物的健康狀態：外觀、體重、活動力等。
4. 確認手術及術前、術後的設備。
5. 手術器材、設備的選擇、供應及滅菌。
6. 需要支援的人數。
7. 動物術前的準備：鎮靜、麻醉，剃毛、手術部位刷洗。
8. 動物術後的管理、緊急情況及後續長期的觀察與照護。
9. 麻醉及手術操作的流程。
10. 手術者的經驗，包含手術過程中器具使用及組織拿取的練習。
11. 紀錄保存：手術紀錄及術後醫療紀錄。

1.3.2 人員訓練：

執行手術操作的研究人員必須接受適當的訓練，以確保好的手術技術有被執行，包括無菌操作、輕柔的組織處理、最少的組織切割範圍、適切的使用器械、妥善止血、和正確使用縫合材料和縫合方式。

1.3.3 術前準備：

（1）. 手術設施與硬體設備：

嚙齒類動物應在指定的區域執行手術操作；應與其他區域區隔。存活性手術多在一個大空間內完成。空間中的一小區域可用來做為動物和人員準備與麻醉使用。另外的區域可做為術後甦醒的監控與復原。

中大動物的無菌手術設施至少需要三個要件，手術室、動物準備室及人員準備室。三個區塊必須分開並有動線的管制。其他支援區域應包含儲存空間、動物恢復室及器材準備區；動物準備室及人員準備室也可兼具上述功能。地板、牆面和天花板需為不可滲透的材質且容易清潔消毒。手術室的燈光應採取天花板懸掛式，管線如能供應氧氣與抽吸或排氣用的真空更為理想。同時須提供氣體麻醉用的儀器、電燒機、體溫監測與心電監控。其他重要的儀器包含輸液設備、脈搏血氧機、血壓計、血氧儀、二氧化碳監控儀等。特殊操作情況下須要加護監控設備及心肺急救包。

（2）.手術用器具：

嚙齒類動物使用的器械，因尺寸相近故多來自於兒科、眼科或神經外科使用的類別。縫合傷口的器具應包含不同持針器、縫針、不同尺寸及材質的縫線。縫合皮膚可採用自動縫合器與釘針。手術者使用的器具使用前皆須無菌。可使用蒸氣、加熱、放射線或環氧乙烷（Ethylene oxide，EO）等方式滅菌，依器具材質、方便性及安全性選擇滅菌方式。某些器具與配件，如縫針、縫線、手術用手套、覆蓋巾、刀片等，從供應商取得時已是無菌狀態。所有器具應事先包裝並滅菌好，並於外包裝標示滅菌後有效期限。

中大動物手術需要的儀器設備相當廣泛，一般來說，手術用器具套組應包含不同尺寸、直與彎等。器械每次使用完畢都應徹底清洗，去除沾黏的血液與組織；以布或其他能承受高溫高壓滅菌的材質包裹，再放置於金屬容器或滅菌袋中。以正確的方式滅菌，存放於乾淨乾燥的環境。若外包裝破損，應再執行一次滅菌作業。

非存活性的手術（如器官移植或忠實呈現實驗數據等）仍須遵守無菌手術原則，同樣建議在術前計畫時與獸醫師詳細的討論，可允許的情況下使用乾淨但未完全滅菌的器械、超過保存期限的手術材料（縫線、手套、導管、繃帶、輸液、非急救用藥物如利尿劑、抗生素等）；但絕對不可在動物身上使用過期的麻醉藥、止痛藥、安樂死藥物或急救用藥物。清楚明確的標示過期的材料，建議統一放置或放置於特殊區域，與其他材料或藥品區隔開。

（3）.手術操作人員：

刷手前應將非滅菌的物品穿戴好，如口罩、鞋套、頭套等。用手術刷，優碘或抗菌劑刷洗，刷洗時間至少需要五分鐘，從指尖、手腕、手肘，在時間內可重複刷洗同一區域。刷洗完畢之後使用無菌毛巾擦乾雙手再穿戴手術裝備。為了確保無菌手術操作完整性，若無菌物品的包裝破損或過期，應立即更換。

（4）.動物準備：

為顧及動物感受及避免其他動物的恐懼，不建議在其他動物的面前執行，並提早給予止痛藥物。手術前剃毛，剃毛範圍應包含手術及周圍區域，至少為手術區域的 2-3 倍大，後續進行適當的消毒及刷洗。手術開始前採用無菌的布巾或是不織布覆蓋動物，顯露出手術操作區域。

藉由動物對刺激的反應（捏腳趾或眼瞼反射）、體態（豬的下顎）、生理數值（心跳、呼吸速率等），判斷動物是否到達合適的麻醉深度。可同時採用多項指標來評估動物的麻醉深度。

可依據臨床需求（麻醉所需要的時間與深度）或過往使用的經驗，對研究影響最少及對動物造成最少的緊迫與不適，術後甦醒及復原良好等的考量，來選擇麻醉藥物，如設備允許的情況下採用氣體麻醉，可有效增加手術操作人員控制麻醉深度與時間，提高動物存活率。挑選動物可輕易代謝、轉化或排出的藥物，減少實驗數據的誤差值。

1.3.4 無菌手術操作

無菌器械應放置於無菌布巾上，任何疑似被污染的物品都應立即更換。操作過程中確保布巾的乾燥與乾淨，並有足夠空間擺放洞巾鉗、縫線等工具。請將雙手保持在布巾的無菌區域中，若雙手不小心觸摸到無菌區域以外或手術手套破損，請立即更換。為了避免組織傷口的感染、癒合時間延長及切創處傷口裂開，請儘量減少手觸摸臟器的次數，小心並輕柔地拿取，或使用器具拿取，並記得定時濕潤暴露的腹腔臟器。

選擇適當的縫線種類與尺寸及縫合方式，可避免傷口裂開與癒合時間延長。建議手術前可先與獸醫師討論相關細節。

1.3.5 手術監控

動物於麻醉的清況，應進行持續監控，包含呼吸、體溫、血壓、心跳等基本生理數值，藉由生理數值的表現來判斷動物麻醉的深度與對手術操作的反應。由於嚙齒類動物容易迅速的散失熱量導致體溫下降，應特別注意體溫的維持，如使用電熱毯、熱水袋、保溫燈（避免動物燙傷）等設備來進行保溫作業。尾部、耳朵和腳趾處也容易散失熱量，若動物體溫降低的話，會延長麻醉恢復期，並增加併發症產生之風險。

動物在手術過程中也有喪失大量體液的可能性，多發生在體腔暴露導致體液外流或蒸發，血液流失。嚙齒類動物體型較小，體液含量較少，更容易發生體液流失的現象；為了避免體液流失，可皮下給予加溫的無菌等張輸液如生理食鹽水，給予量約為體重的 3-5%。手術過程中藉由使用電燒或血管結紮來控制血液的流失。動物手術後應持續監控飼料與飲水的攝取量及動物復原情況。

1.3.6 術後照護與紀錄

術後照顧程序中的一項重要內容是在麻醉及手術恢復期間對於動物的觀察與適時的協助。監控的頻率會依照動物種類及手術類別而有所不同，在麻醉恢復期間可能需要較高的監控頻率。在此期間，動物應該被安置在乾淨、乾燥及舒適的場所，並由受過培訓的人員經常的給予觀察。

若動物於手術麻醉過程中，採用氣管內管及呼吸器，手術後應持續觀察動物呼吸的情況，直到動物能自主呼吸為止才能移出呼吸輔助器具。應持續進行手術後的監控與醫療照護紀錄：紀錄項目可包含基本生理數值。特別要注意動物是否有持續流血或脫水的現象，判斷是否應給予輸液補充，傷口的清理、給藥與包紮，體溫的維持（保溫燈或加熱墊）及疼痛管理；紀錄應持續到動物完全甦醒，可自由行動並能飲食飲水為止；故手術後的觀察應維持至少三天，若為重大手術或動物發生術後的併發症時，應延長觀察的天數。

手術後疼痛與發炎現象會依手術的種類而持續不同的時間，未適時舒緩疼痛會讓動物減少活動力，可能導致動物攝食及飲水的慾望，阻礙手術部位的復原，故手術後止痛藥、抗生素、抗發炎藥及其他藥物需持續給予，直到動物能恢復正常活動為止。手術後 7-14 天應移除動物皮膚上的縫線或釘針，中大動物可在手術後 10 天再評估是否可移除了。應在動物病歷上記錄移除縫線的日期，此時可視為動物從手術中完全復原了。

1.3.7 人道安樂死

安樂死是一種人道處死動物的動作，此方式可以在無痛苦或焦慮的狀態下迅速將動物導入無知覺及死亡的狀態。任何安樂死措施都應該符合美國獸醫師協會（American Veterinary Medical Association，AVMA）安樂死的指導原則或農委會「實驗動物照護使用指引」附件二實驗動物疼痛評估、人道終點及安樂死方法指導原則。

安樂死可以被規劃在實驗計畫終止時執行且為必要的措施，或者是當止痛劑、鎮靜劑、或其他治療都無法減輕疼痛或緊迫時所採用的方法。採行安樂死的判斷標準，包括與計畫有關的特定終止時機（例如某些身體或行為功能喪失的程度，或腫瘤大小）。這類標準可以讓獸醫師和研究人員快速作出判斷，同時確認終止時機是人道的。

1.4 參考文獻

1. 林聰賢等人，(2018)，「實驗動物照護及使用指引」，行政院農業委員會，台北。
2. 張維正譯，(2015)，「實驗動物照護及使用指南第八版」，中華實驗動物學會，台北。
3. 陳炯東等人，(2018)，「實驗動物個體福祉評估指標分析技術報告」，中華實驗動物學會，台北。
4. 陳炯東等人，(2018)，「實驗動物科學(基礎篇)」，中華實驗動物學會，台北。
5. ASR [Academy of Surgical Research]. 2009. Guidelines for training in surgical research with animals. J Invest Surg 22:218-225.
6. AVMA [American Veterinary Medical Association]. 2002. A Report from the American Veterinary Medical Association Animal Air Transportation Study Group. Schaumburg, IL: AVMA.
7. AVMA. 2007. AVMA Guidelines on Euthanasia. Schaumburg, IL: AVMA.
8. Home Office （2007） Statistics of Scientific Procedures on Living Animals, Great Britain 2006. The Stationery Office, London.
9. Home Office. Consultation on options for transposition of European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Summary report and Government response. May 2012.

附件 1-1

實驗動物科學（基礎篇）各章節學習目標

大綱	章節學習目標
第一章 緒論	1. 使讀者了解實驗動物對醫學發展的貢獻：過去、當今與未來。 2. 讓讀者對於我國接軌國際發展實驗動物的歷史有概念，進而引發其對實驗動物照護及使用的品質要求。
第二章 動物福祉	1. 使讀者了解何謂動物福祉？介紹各國動物保護法的演進及做法。 2. 介紹國際最新 3R 觀念、技術發展等相關資料。 3. 最後讓讀者思考動物福祉要做到什麼程度？動物福祉該如何評估。
第三章 管理篇 第一節 實驗動物物種	1. 使讀者了解常見的實驗動物有那些？也對品種、品系有初步的概念。 2. 讓讀者對於平常聽到臺灣彌猴、蘭嶼豬，亦是臺灣特有的實驗動物物種，感到新奇，進而引發學生對實驗動物的定義、遺傳及飼育條件產生好奇。
第二節 實驗動物的照護：標準訂定的理論基礎	1. 引導讀者從動物保護及動物福祉的概念，延伸至飼養與管理人員之編制與責任。 2. 實驗動物需要在所處的設施中對其環境進行控管，以避免會造成實驗偏差的變因，因此需要思考哪些基本的飼養環境條件、營養需求項目是必須被了解與管理？
第三節 實驗動物的遺傳控制與育種	1. 使讀者了解藉由控制和改變原物種或品系的遺傳物質、發育歷程和必要的環境條件，以成為實驗動物之育種/保種的概念。 2. 說明國內引進國外基因剔除（Gene knockout）的動物而想留種造成基因控制的問題。

實驗動物科學（基礎篇）各章節學習目標（續）

大綱	章節學習目標
第四節 設施管理	1. 使讀者了解一個實驗動物設施的基本設計、日常營運機制，如飼養設施管理、基礎飼養環境、 動物飼養管理、物料管理、設施安全衛生、動物購買及健康檢疫、設施與物件潔淨、職業安全衛生、教育訓練等。 2. 希望讀者以「同理心」為出發點去感受動物的需求、喜好、不安，致力改善而營造出契合動物習性及行為的情境，並兼顧人員安全等環境，為「人道」及「友善」作最佳註解。 3. 在實務中常會遇到空間不足、機器故障、人為疏失而產生很多突發的緊急事件，因此希望能引導學生五流（動物流、人流、物流、空氣流、廢棄物流）的防疫概念，學習應變處理能力，達到避免交叉污染的狀況。
第五節 動物實驗設計	1. 針對沒有統計學背景或經驗的從業人員，希望應用統計數據來幫助他們得出有效可靠的結論最小化所需的動物數量。如果讀者希望更理解實驗設計和統計背後的數學分析，可閱讀更高級的教科書。 2. 一個實驗研究的成功與否，除了有完備的科學邏輯設計外，是否具有意義的基本條件，便是該實驗設計及資料分析是否符合統計學方法。 3. 利用這些技術將會確保實驗以有邏輯的方式進行，應該導致可靠和可重複的結果。倘若能最大化一個實驗所得的資訊，預期需使用的動物總量便可降至最低。
第六節 計畫（protocol）申請之審查與監督管理	1. 了解國內實驗動物使用與管理之法源及概況。 2. 認識實驗動物照護及使用委員會或小組（Institutional Animal Care and Use Committee，IACUC）。 3. 解釋提交動物實驗計畫書之目的、應注意之重點、審查的程序及動物實驗計畫書通過後之監督管理。
第七節 醫療照護管理	1. 讓讀者了解實驗動物獸醫師的職責，包括動物防疫與調適、醫療處置與照護、動物福祉的評量基礎以及苦痛的減緩、防範與終結、實驗動物的健康與疾病監測、手術前中後的照護計畫等。 2. 引導學生感受疼痛等級及分類，例如行為學研究的電擊屬於第幾級？是否須投藥控制疼痛？記憶與制約反應？不同案例要參考什麼？大魚、小魚的疼痛評估等，實例探討引發問題進而學習答案。

第二章 動物模式

人類疾病動物模式對疾病的病理生理學探索和開發新型治療藥品扮演關鍵作用。隨著科學的進步，人類不斷尋求各種可能的方式達到使疾病減少並減輕其所帶來的痛苦，從低等生物如細菌、黴菌、寄生蟲等，到動物器官、組織、細胞與胚胎等之體外（*in vitro*）實驗，再到所謂的體內（*in vivo*）實驗等。體內實驗則分為非哺乳類與哺乳類動物，由於哺乳類與人類在生物學上的相近性，以哺乳類為主的體內實驗便漸漸成為主流，並且對於20 世紀人類健康產生極大的貢獻。然而由於人類疾病的多樣性，並非在所有動物身上都可產生與人類相似的疾病，或者同一種人類疾病可能在不同動物品種產生類似的疾病，在這當中如何選擇最合適的動物模式，以什麼標準去篩選，皆成為專門的學問。

實驗動物模式指在動物身上進行生物、行為之研究成果，及在動物產生的先天或誘發性病理變化，在人類或另種動物有類似現象，以作為參考，此稱為動物模式。一般而言，動物模式主要針對人類疾病而言，稱為人類疾病動物模式，此種動物模式主要利用某些動物產生與人類特定疾病類似之反應，作為研究模型，促進人類對疾病的了解，同時可以避免以人作為實驗對象而造成人的傷害。近年來因轉譯醫學備受重視，更是需要藉助許多人類疾病模式動物，來進行新藥開發與醫療研究，以利將基礎研究的成果與人類疾病的臨床治療發展做有效的連結。實驗動物模式一般分成四類，且前兩類較為常用，如表 2-1-1，

表 2-1-1 實驗動物模式之種類

類型	模式	說明
1	實驗或誘發模式（Induced or experimental models）	嘗試將所研究之疾病以實驗誘導方式在動物身上表現。例如以肝臟部份切除術觀察其肝臟再生或以四氧嘧啶（alloxane）誘導糖尿病之發生。基因轉殖及基因剔除動物已越來越普遍，因以人為方式引入或剔除基因，故屬誘發模式；通常誘發模式的變異大於自發模式。
2	自發模式（Spontaneous or natural models）	又稱自然實驗，疾病自然發生，非由研究者所誘導。例如裸鼠、裸大鼠或貓之神經節苷脂沉積症（gangliosidosis），通常此類模式之再現性較高。

表 2-1-1 實驗動物模式之種類（續）

類型	模式	說明
3	負模式（Negative or non-reactive models）	此模式與前兩模式相反，指某特定人類疾病不會發生在此動物上，例如淋球菌感染不會發生在兔子上。負模式通常可表示動物對某特殊刺激不具反應能力，常用於對疾病抵抗機制之研究。
4	孤兒模式（Orphan models）	某種疾病自然存在於某動物，但卻在人類身上找不出可對照、類似的疾病，之後才在人類身上找出類似的疾病。例如禽類馬立克病（Marek's disease），牛海綿樣腦病（BSE）－俗稱狂牛病。

所謂演化上與人接近的品種（如猿猴），在人類疾病動物模式之選擇上不一定比所謂較低等之動物（如貓、老鼠等）更具絕對優勢。有兩類廣義的動物模式因素需要考慮，一類指根據類似結構及相似功能（analogy）而來，另一類指根據同質性（homology），即結構上來自於演化上同一祖先且有類似功能者。主要的決定要素，乃根據受測試品種的病理與疾病之表現與人的相似性而定。（Svendsen, P. & Hau, J. ,1994）要選擇最適當的動物模式並不容易，需要從多重因素去考量，然後再做整體的評估，才能作成較佳的選擇。動物模式的選擇原則，一般而言要考慮以下幾項因素，如表 2-1-2。

表 2-1-2 動物模式的選擇考量

步驟	選擇考量
1.確定主要問題	要先確定此動物模式針對的主要問題為何，以人類疾病動物模式而言，其主要問題乃針對人類的疾病，而人類疾病種類繁多，需確定所要針對的疾病。比如說，癌症、高血壓及肝炎，其所需的動物模式可能完全不同。
2.針對動物因素	選擇適合的動物品種需考慮以下幾項因素： ● 來源：來源是否容易取得。 ● 壽命：如壽命過長，研究所需時間亦會加長。 ● 飼養需求及條件。 ● 人員操作之方便性：如容易抓取。 ● 環境之適應力。 ● 微生物之了解與控制。 ● 遺傳資訊之了解。 ● 品系之多元化：有近親品系、雜交系、遠親交配種等。 ● 繁殖性狀：是否容易繁殖，胎兒仔數如何。 ● 價格。 ● 生物學特徵之了解：如生理、生化、解剖及組織等之資訊。 ● 人道及道德考量。

表 2-1-2 動物模式的選擇考量（續）

步驟	選擇考量
3.針對疾病因素	要考量動物之疾病與人類疾病是否有極高的忠實性（fidelity），譬如臨床症狀、遺傳、病因、病程、病理等之相似性。

大鼠及小鼠在全世界的動物實驗中佔了 80%以上，主要因為：來源易、壽命短、體積小、操作易、易飼養與繁殖、環境適應快、微生物、遺傳及生物學資訊皆清楚、價格便宜、能培育出多種近親品系等。

以人類高血壓之動物模式為例，高血壓鼠（spontaneous hypertension rat，SHR）為極佳的動物模式，原因如下：

- 臨床症狀：皆產生高血壓，且雄性高於雌性。
- 遺傳：皆為多基因（polygene）之控制。
- 病因：皆非心臟血輸出量增加，而是心血管之阻力增加。
- 病程：皆為生下時無病症，而隨年齡之增加而明顯。
- 病理：皆會出現左心室肥大之併發症。

以此同理，在其他人類疾病方面也可選擇出較佳的動物模式，如犬之心臟及腎臟、貓之腦、青蛙之肌肉、大鼠之腸道、果蠅之基因、小鼠之腫瘤、天竺鼠之過敏、兔子的循環抗體、烏賊的巨軸突等。

雖然小鼠具有生殖週期短、品系純、遺傳資料詳盡、DNA 序列完整並具性腺遺傳等特性的胚幹細胞可供研究。然而，小鼠作為人類疾病動物模式時，和人類生理狀況相較則會有心跳太快、代謝太快、生命週期太短、基因演化變異大等缺點。而豬隻具有可畜養性，在基因、演化及內臟器官大小和人類接近，遺傳與疾病研究資料豐富等優勢，亦可開發良好之動物模式。

常見人類疾病之一般動物模式彙整如表 2-1-3。

表 2-1-3 常見人類疾病之動物模式

疾病種類	說明
1.高血壓	誘導性高血壓大鼠、自發性高血壓大鼠。
2.癌症	（1）非腫瘤接種癌症動物模式：指先天或經由誘發可形成癌症者。如化學物致癌、病毒致癌、自發腫瘤、致癌基因。 （2）腫瘤接種癌症動物模式：一般指免疫不全動物，可以接種人類癌症細胞而成為癌症動物模式。如誘發式免疫不全、自發免疫不全。

表 2-1-3 常見人類疾病之動物模式（續）

疾病種類	說明
3.腎臟炎	最具代表性的腎炎為紅斑性狼瘡腎炎，如小鼠及狗。另外有以天竺鼠為動物模式之抗腎小管基底膜抗體腎小管間質性腎炎、以狗為動物模式之遺傳性腎炎、以 ddY 小鼠為動物模式之自發性腎病變。
4.關節炎	誘發性關節炎模式、自發性類關節炎模式。
5.糖尿病	（1） 第一型糖尿病：在動物方面有不少的模式，如自發模式、用藥物或手術誘發模式。 （2） 第二型糖尿病：通常為肥胖之小鼠或大鼠。
6. 病毒性肝炎	常使用土撥鼠、非人類靈長類及鴨作為動物模式。
7. 心肌病	心肌病指原發於心肌之疾病，而非其它解剖部位。如原發性心肌病、擴張性心肌病、限制性心肌病、倉鼠心肌病、火雞心肌病。
8. 心肌缺血	豬優於狗。冠狀動脈之側枝循環：人和豬僅在少數側枝血管發生冠狀阻塞是極相似的。而狗和大鼠具豐富的側枝。
9. 動脈粥樣硬化	在不同動物模式之間，變異很大。而不同實驗動物模式都有其價值存在，由研究人員自行判斷及選擇。如兔子、豬隻、狗、大鼠、鳥類、非人類靈長類。
10. 毒性試驗	主要為急性毒性試驗、眼刺激、皮膚刺激、過敏性接觸皮膚炎、亞慢性及慢性毒性試驗、致癌毒性試驗、繁殖毒性試驗、遺傳毒性試驗。

雖然人類疾病動物模式對人類生物醫學發展有非常大的助益，但有些對於實驗動物模式的「錯誤觀念」也要在此說明：

- 動物是人類的迷你種。
- 動物模式是人類疾病的精確複製品。
- 在演化上居較高等級之動物，越能預測人類疾病。
- 嚙齒類太小，不適合於大多數研究。
- 不需要特別花費人力及訓練，學習有關人類疾病動物模式之生物醫學。
- 發現一個人類疾病動物模式相等於對人類疾病的了解有重大進展。

因此動物模式雖然在人類比較醫學研究方面有很大的發展潛力，但仍無法提供最終解答，而僅能提供最接近之結果，後續仍需整合產業價值鏈，將此基礎研發能量由臨床前試驗團隊承接，如此方可加速將研究結果轉換成臨床應用，進而申請上市，為人類生物科技發展及健康福祉提供最大的貢獻。

第一節 嚙齒類動物

本章課程安排時數：10 小時

本章學習目標：

1. 嚙齒類具有繁殖能力強、遺傳多樣性、照護成本低等優勢，是使用量最大的實驗動物，約佔 80-90%左右的動物使用數量。
2. 介紹目前較常應用的動物模式如發炎性腸道疾病、皮膚炎、呼吸道發炎、腫瘤、神經行為相關、糖尿病、非酒精性脂肪肝、疼痛疾病、心血管疾病、高血壓、骨關節、肌肉疾病等。
3. 不同的嚙齒類品系可能會比較適合某些的動物模式，在不同的模式中也會說明。
4. 各動物模式主要內容包括模式建立、特性介紹、應用領域、特殊照護及福祉，並簡要說明該模式成功建立的標準，以利讀者學習及應用。

常做為實驗動物之嚙齒類動物（Rodentia）品種包括大鼠、小鼠、倉鼠、沙鼠和天竺鼠，是目前科學應用上使用量最大的脊椎動物。小鼠（*Mus musculus*）因體型小、繁殖能力強、壽命短、擁有遺傳的多樣性等特性且近年來基因改造小鼠大量被開發出來，可應用的研究範圍很廣泛，包括遺傳、癌症、藥物、傳染性疾病及特殊疾病模式等。另外購買及照顧的成本也較低，因此是嚙齒類動物中使用量最大的實驗動物。

大鼠(*Rattus norvegicus*)與小鼠雖然在外觀上類似，大鼠如同「放大的小鼠」，但在解剖構造上不盡相同，最明顯的差異為大鼠沒有膽囊。從演化的角度來看，大鼠與小鼠的差異，有如人類與舊世紀猴之間的差異性，其在實驗中所代表的意義也大不相同。20 世紀以來，許多生理學研究發現多得自大鼠模式，大鼠是除了小鼠以外，最常被用於各種醫學、藥品開發等生物科技研究上之實驗動物。

2.1.1 發炎性腸道疾病動物模式（Inflammatory Bowel Disease Models）

2.1.1.1 前言

發炎性腸道疾病（Inflammatory bowel disease，IBD）是 21 世紀重要的全球性疾病，調查自 1990-2016 年的相關公共衛生學報導指出 IBD 的盛行率在北美以及西歐已經達到 500/100,000 以上，而原本認為盛行率不高的亞洲、非洲及南美洲，也隨著工業化的程度在近 30 年來有明顯的增加。IBD 主要分為兩型：潰瘍性結腸炎（ulcerative colitis，UC）及克隆氏症（Crohn's disease，CD），在近年來的調查中 UC 與 CD 兩型約各佔一半。在病理上，UC 的特徵在黏膜上皮的破壞與發炎，CD 的特徵在腸道上皮增生與黏膜下形成的肉芽腫病灶。一般而言，IBD 被認為是一種慢性、進行性的腸道發炎反應，但由於 IBD 的病因複雜，可能來自於腸道微生物環境或病患遺傳因子調節的免疫反應不平衡，因此選擇適當的 IBD 疾病動物模式，對於釐清新藥對於 IBD 的藥效相當重要。

2.1.1.2 常見 IBD 模式

一般而言，IBD 疾病動物模式多在小鼠上建立，常分為三大類型：

（1）. 基因改造小鼠的自發性 IBD 模式

小鼠經基因改造後常造成免疫反應的不均衡，走向容易發炎的體質。因此不論是傳統的基因剔除（genetic knock-out，KO）、基因轉殖（gene transgenic）或致病基因嵌入（gene knock-in），都可以成為製作 IBD 疾病動物模式的手段。在基因剔除小鼠的 IBD 疾病動物模式，常見的有 IL-10、IL-2 及其受體、TGF-β 等細胞激素缺陷的小鼠，或是涉及免疫細胞活化的基因如 Runx3、JAK3、SHIP1、STAT3、Blimp 等基因缺陷小鼠。另一方面藉由促進發炎反應如 CD40L、soluble B7.2、LIGHT、TNFSF15 基因轉殖小鼠也都是可以造成 IBD 的基因改造小鼠。利用這類的基因改造小鼠作為 IBD 疾病動物模式的優勢在於發病率穩定，且機制清楚，然而由於這類動物多在與環境因子的交互化作用下，才會發病，因此發病的病程常常變異度較大，病程也拖延的較長，發病狀況也較為不穩定。舉例而言, IL-2 KO 小鼠在無特定病原（specific pathogen free，SPF）與無菌（germ-free，GF）環境中都會發生 IBD 的症狀，但 IL-10 KO 小鼠，在沒有螺旋桿菌（Helicobactor

spp.）的環境中則不會有 IBD 狀況。此外，這類模式適用於已清楚知道藥物機轉時，再選擇適當的基因改造模式是最重要的考量。

（2）.利用免疫細胞移植造成不均衡的腸道發炎反應

增加自體反應 T 細胞（auto-reactive T cells）的比例或減少抑制發炎反應的調節型 T 細胞（regulatory T cells）也可以造成 IBD 疾病動物模式。目前最常見的 IBD 疾病動物模式是利用移植初始型 CD4 T 細胞(CD45RbhiCD25-CD4+ naïve T cells，也就是去除調節型 T 細胞的 CD4 T 細胞群）到缺乏 B、T 細胞的免疫缺陷小鼠誘發自體免疫性的結腸炎。另一方面，移植初始型 CD8 T 細胞（CD62hiCD44loCD8+ naïve T cells）也同樣會誘發 IBD 疾病動物模式，其主要的原因是自體免疫 CD8 T 細胞會活化成為表現大量 IL-17 的發炎性 CD8 T 細胞。這類模式的優點在於病程容易控制，通常在移植後 2-3 週會有明確的發炎反應發生，且在 4-6 週間可以達到試驗終點，對於療程的安排也方便明確的規畫。另一方面，這樣的 IBD 疾病動物模式在組織病理學上的觀察也符合 CD 的疾病動物模式，因此若是以治療 CD 為主要訴求的新藥，強烈建議利用此一類疾病動物模式。正如前述，這類疾病動物模式是去除調節型 T 細胞，破壞發炎與抗發炎反應的平衡為主的致病機轉，因此模式建立時移植的純真型 T 細胞純度（purity）成為最重要的關鍵因子，模式的成功與否將建立在是否能大量純化出高純度（純度 >90%）初始型 T 細胞技術上。

（3）.化學藥物造成腸道上皮細胞發炎的 UC 疾病動物模式

利用飲水給予 1-5% 葡聚糖硫酸（Dextran sulfate sodium，DSS）是目前最常見的化學藥物誘發 IBD 的疾病動物模式，其主要的機制是對腸道的上皮造成傷害如潰瘍般的病灶，當上皮細胞的物理性障壁被破壞，腸道內的微生物進一步刺激黏膜下的細胞造成腸炎，這樣的疾病動物模式在組織病理學上的病灶正如同 UC，因此是絕佳的 UC 疾病動物模式。DSS 誘發 IBD 疾病動物模式的優勢在可以讓病程短到一週內達試驗終點，誘發效果佳，也可以利用投予 DSS 的排程，模擬 IBD 病人反覆長期的發病過程,因此是目前常用的 IBD 疾病動物模式之一。值得注意的是，前述的基因改造動物，可能會依其致病機轉，對於 DSS 誘發 IBD 疾病的敏感性大不相同，如 IL-10 KO 小鼠屬於 DSS 敏感性高的品系，但 CD40L KO 小鼠則對於 DSS 誘發 IBD 疾病的敏感性不高；餵食或是由肛門注入三硝基

苯磺酸（Trinitrobenzene sulfone acid，TNBS）或是噁唑酮（Oxazolone）也是常見的 IBD 疾病動物模式，這類化學品主要誘發腸道細胞的發炎反應，但不同品系小鼠誘發狀況各有不同，TNBS 模式適用於 SJL/J、C3H/eJ 及 BALC/c 小鼠，不適用於 C57BL/6 及 DBA/2 小鼠；但 C57BL/6 小鼠則非常適用於 Oxazolone 模式。

2.1.1.3 參考文獻

1. Loftus, C. G., E. V. Loftus, Jr., W. S. Harmsen, A. R. Zinsmeister, W. J. Tremaine, L. J. Melton, 3rd, and W. J. Sandborn. 2007. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. Inflamm Bowel Dis 13: 254-261.
2. Sanders, D. S. 1998. The differential diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Baillieres Clin Gastroenterol 12: 19-33.
3. Mizoguchi, A., and E. Mizoguchi. 2010. Animal models of IBD: linkage to human disease. Curr Opin Pharmacol 10: 578-587.
4. Monteleone, G., D. Fina, R. Caruso, and F. Pallone. 2006. New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. Curr Opin Gastroenterol 22: 361-364.
5. Mizoguchi A. 2012. Animal models of inflammatory bowel disease. Prog Mol Biol Transl Sci. 105:263-320.
6. Contractor NV, Bassiri H, Reya T, Park AY, Baumgart DC, Wasik MA, Emerson SG, Carding SR. 1998. Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. J Immunol. 160:385-94.
7. Kullberg MC, Rothfuchs AG, Jankovic D, Caspar P, Wynn TA, Gorelick PL, Cheever AW, Sher A. 2001. Helicobacter hepaticus-induced colitis in interleukin-10-deficient mice: cytokine requirements for the induction and maintenance of intestinal inflammation. Infect Immun. 69:4232-41.
8. Read S, Powrie F. 2001. Induction of inflammatory bowel disease in immunodeficient mice by depletion of regulatory T cells. Curr Protoc Immunol. Unit 15.13.
9. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. 2014. Dextran sulfate sodium （DSS）-induced colitis in mice. Curr Protoc Immunol. Unit 15.25.
10. Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, Cong Y, Black CA, Ridwan BW, McGhee JR. 1996. Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. J Immunol. 157:2174-85.

2.1.2 皮膚炎動物模式 （Animal Models of Dermatitis）

2.1.2.1 前言

皮膚炎（Dermatitis）是一群導致皮膚發炎的疾病，這些疾病的臨床症狀包含搔癢、乾燥的皮膚或紅腫皮膚上的皮疹（Rash），也可能會導致皮膚起水泡、滲出液，結痂或剝落。皮膚炎實例包括異位性皮膚炎（atopic dermatitis）、接觸性皮膚炎（contact dermatitis）和脂漏性皮膚炎（seborrheic dermatitis）等。皮膚炎的確實病因仍不清楚，通常與外來的刺激、過敏和不良靜脈回流有相關。

2.1.2.2 常見的皮膚炎動物模式

（1）. 異位性皮膚炎

異位性皮膚炎的特徵為慢性高度搔癢症及復發性炎症皮膚病變。文獻指出，2,4-二硝基氯苯（Dinitrochlorobenzene，DNCB），一種親電和細胞毒性苯衍生物質，可以在 NC/Nga 小鼠中誘導穩定的類異位性皮膚炎（atopic-like dermatitis）。NC/Nga 小鼠會有抓癢的行為，隨後是皮膚紅斑（erythema）的快速發展，皮膚的苔蘚化（lichenification）和出血；組織學檢查亦顯示皮膚病變中的嗜酸性粒細胞和肥大細胞增生和聚集。除了皮膚變化之外，NC/Nga 小鼠有總血清 IgE 增加的情形。此外，亦有報告指出可利用由粉塵蟎過敏原（dermatophagoides farinae）來誘導類異位性皮膚炎病變。這類異位性皮膚炎動物模式可用於評估止癢和抗發炎藥物藥效。

A. 2,4-二硝基氯苯誘導類異位性皮膚炎

動物：8-10 週齡 NC/Nga 雌性小鼠 每組建議隻數：10-12
方法：

1. 在第 0 天時，隨機將雌性 NC/Nga 小鼠分成控制組與處理組，同時將這些小鼠背部及頸部毛髮剃除乾淨。
2. 在第 4 天時，於每隻小鼠背部、頸部及耳朵皮膚施以 200 μL 1%DNCB 進行致敏，之後每隔 3 天（第 7、10 及 13 天）使用 150 μL 0.2%DNCB 促進過敏反應。
3. 待測物質通常以口服方式（或其他方式）從第 1 天給至第 14 天。
4. 通常每 3 天（第 2、5、8、11 及 14 天）以肉眼進行抓癢行為觀察，小鼠會以後肢抓耳朵、頸部或背部皮膚，連續性抓癢行為視為一次抓癢。

5. 皮膚肉眼病變在第 15 天進行評分，評估面部、耳朵、頸部和背部皮膚病變嚴重程度，評分標準如下：
   0：沒病變
   1：輕微程度病變
   2：中等程度病變
   3：嚴重程度病變
6. 於第 15 天測量耳厚度。
7. 第 15 天犧牲小鼠，採集皮膚進行組織病理學分數評量及細胞素分析。
8. 收集血清進行 IgE 分析。
9. 如果處理組這些評估指標與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止癢或抗發炎效果。

B. 2,4-塵蟎過敏原誘導類異位性皮膚炎

動物：8-10 週齡 NC/Nga 雌性小鼠 每組建議隻數：10-12
方法：

1. 在第 0 天時，隨機將雌性 NC/Nga 小鼠分成控制組與處理組，同時將這些小鼠背部及頸部毛髮剃除乾淨。
2. 於每隻小鼠背部、頸部及耳朵皮膚塗抹 100 mg Biostir®-AD 塵蟎過敏原（dermatophagoides farinae）進行致敏，每週施行兩次，持續三週（第 1、4、8、11、15 和 18 天）。
3. 待測物質通常以口服方式（或其他方式）從第 1 天給至第 21 天。
4. 通常每 7 天（第 0、7、14 及 21 天）以肉眼進行抓癢行為觀察，小鼠會以後肢抓耳朵、頸部或背部皮膚，連續性抓癢行為視為一次抓癢。
5. 皮膚肉眼病變每 7 天（第 0、7、14 及 21 天）進行一次評分，評估面部、耳朵、頸部和背部皮膚病變嚴重程度，評分標準如下：
   0：沒病變
   1：輕微程度病變
   2：中等程度病變
   3：嚴重程度病變
6. 於第 0、7、14 及 21 天測量耳厚度。
7. 第 22 天犧牲小鼠，採集皮膚進行組織病理學分數評量及細胞素分析。
8. 收集血清進行 IgE 分析。
9. 如果處理組這些評估指標與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止癢或抗發炎效果。

（2）.接觸性皮膚炎

接觸性皮膚炎是由皮膚直接接觸某種物質而且對該物質產生過敏反應引起的紅色且會發癢的皮疹。皮疹不具有傳染性，但可能讓個體非常不舒服。許多物質皆會引起這種反應，包括肥皂、化妝品、香水、珠寶和植物等。常用的小鼠模式如下：

A. 花生四烯酸（arachidonic acid）誘導的接觸性皮膚炎

動物：ICR 雄性小鼠（20-24 g） 每組建議隻數：6-8

方法：

1. 將花生四烯酸（2 mg，溶在 20 μL 丙酮中）局部塗在 ICR 小鼠右耳的前表面和後表面。
2. 在花生四烯酸（2 mg/耳）給予前 30 分鐘和 15 分鐘後局部給予待測物質（20 μL/耳）。
3. 在花生四烯酸給予後 60 分鐘使用厚度計測量耳腫厚度。
4. 通過從右耳（經處理的耳朵）減去左耳（正常對照）的厚度作為炎症的指標，用來評估耳水腫程度。
5. 根據下式計算抑制百分比：（Ic-It）/ Ic×100，其中 Ic 和 It 指對照和處理動物中耳厚度（mm）的增加。
6. 如果處理組耳水腫程度有下降且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在抗發炎效果。

B. 辣椒素（capsaicin）誘導的接觸性皮膚炎

動物：ICR 雄性小鼠（20-24 g） 每組建議隻數：6-8

方法：

1. 將辣椒素（1 mg，溶在 20 μL 丙酮中）局部塗在 ICR 小鼠右耳的前表面和後表面。
2. 在辣椒素給予前 30 分鐘局部給予待測物質（20 μL/耳）。
3. 在辣椒素給予後 30 分鐘使用厚度計測量耳腫厚度。
4. 通過從右耳（經處理的耳朵）減去左耳（正常對照）的厚度作為炎症的指標，用來評估耳水腫程度。
5. 根據下式計算抑制百分比：（Ic-It）/ Ic×100，其中 Ic 和 It 指對照和處理動物中耳厚度（mm）的增加。
6. 如果處理組耳水腫程度有下降且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在抗發炎效果。

C. 巴豆油（croton oil）誘導的接觸性皮膚炎

動物：ICR 雄性小鼠 （20-24 g）每組建議隻數：6-8

方法：

1. 將巴豆油（4%，溶在 20μL 丙酮中）局部塗在 ICR 小鼠右耳的前表面和後表面。
2. 在巴豆油給予前 30 分鐘和 15 分鐘後局部給予待測物質（20 μL/耳）。
3. 在巴豆油給予後 6 小時使用厚度計測量耳腫厚度。
4. 通過從右耳（經處理的耳朵）減去左耳（正常對照）的厚度作為炎症的指標，用來評估耳水腫程度。
5. 根據下式計算抑制百分比：（Ic-It）/ Ic×100，其中 Ic 和 It 指對照和處理動物中耳厚度（mm）的增加。
6. 如果處理組耳水腫程度有下降且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在抗發炎效果。

D. 噁唑酮（oxazolone）誘導的接觸性皮膚炎

動物：BALB/c 雄性小鼠（20-24 g）每組建議隻數：6-8
方法：

1. 先將腹部皮膚剃除乾淨。
2. 將噁唑酮（1.5%，溶在 100 μL 丙酮中）局部塗在 BALB/c 小鼠腹部皮膚進行致敏。7 天後，將噁唑酮（1%，溶在 20 μL 丙酮中）局部塗在小鼠右耳的前表面和後表面。於噁唑酮給予前 30 分鐘和 15 分鐘於右耳的前表面和後表面局部給予待測物質（20 μL/耳）。
3. 在噁唑酮給予後 24 小時使用厚度計測量耳腫厚度。
4. 通過從右耳（經處理的耳朵）減去左耳（正常對照）的厚度作為炎症的指標，用來評估耳水腫程度。
5. 根據下式計算抑制百分比：（Ic-It）/ Ic×100，其中 Ic 和 It 指對照和處理動物中耳厚度（mm）的增加。
6. 如果處理組耳水腫程度有下降且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在抗發炎效果。

E. 佛波醇 12-肉荳蔻酸酯 13-乙酸酯（Phorbol 12-myristate 13-acetate）誘導的接觸性皮膚炎

動物：ICR 雄性小鼠 （20-24 g） 每組建議隻數：6-8
方法：

1. 將佛波醇 12-肉荳蔻酸酯 13-乙酸酯（5 μg，溶在 20μL 丙酮中）局部塗在 ICR 小鼠右耳的前表面和後表面。
2. 在佛波醇 12-肉荳蔻酸酯 13-乙酸酯給予前 30 分鐘和 15 分鐘後局部給予待測物質（20 μL/耳）。
3. 在佛波醇 12-肉荳蔻酸酯 13-乙酸酯給予後 6 小時使用厚度計測量耳腫厚度。
4. 通過從右耳（經處理的耳朵）減去左耳（正常對照）的厚度作為炎症的指標，用來評估耳水腫程度。
5. 根據下式計算抑制百分比：（Ic-It）/ Ic×100，其中 Ic 和 It 指對照和處理動物中耳厚度（mm）的增加。
6. 如果處理組耳水腫程度有下降且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在抗發炎效果。

（3）. 牛皮癬

牛皮癬是一種慢性炎症性皮膚病，其病徵在於斑塊狀牛皮癬、紅斑、皮膚增厚、表皮改變以及 T 細胞和樹突細胞浸潤。局部應用咪喹莫特（Imiquimod）在小鼠耳朵上誘導的皮膚炎症非常類似於人的斑塊型牛皮癬。咪喹莫特誘導的牛皮癬通常用於研究皮膚炎症的機制並評估治療功效。

A. 咪喹莫特（Imiquimod）誘導的牛皮癬

動物：BALB/c 雄性小鼠 （20-24 g） 每組建議隻數：6-8

方法：

1. 從第 1 天起在右耳上連續 9 天塗抹市售 5%咪喹莫特乳膏 15 mg。
2. 待測物質於塗抹咪喹莫特前一小時給予，連續給予 9 天，每天一次。
3. 在第 0、2、4、6、8 天用使用厚度計測量耳腫厚度。
4. 在第 10 天最後一次給藥後 24 小時測量耳腫脹。
5. 犧牲動物，進行耳朵採樣並稱重。
6. 根據下式計算抑制百分比：（Ic-It）/ Ic×100，其中 Ic 和 It 分別指對照和處理小鼠中耳厚度（mm）的增加。
7. 如果處理組耳水腫程度有下降且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在抗發炎效果。

2.1.2.3 參考文獻

1. Jung BG, Cho SJ, Ko JH, Lee BJ. Inhibitory effects of interleukin-10 plasmid DNA on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. J Vet Sci. 2010; 11:213-20.
2. Yamamoto M, Haruna T, Yasui K, Takahashi H, Iduhara M, Takaki S, Deguchi M, Arimura A. A novel atopic dermatitis model induced by topical application with dermatophagoides farinae extract in NC/Nga mice. Allergol Int. 2007; 56:139-48.
3. Gober MD, Gaspari AA. Allergic contact dermatitis. Curr Dir Autoimmun. 2008;10:1-26.
4. van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. J Immunol. 2009; 182:5836-45.

2.1.3 呼吸道發炎動物模式（Animal Models of Respiratory Inflammation Diseases）

2.1.3.1 前言

呼吸道的發炎一般分為上呼吸道的發炎（口、鼻、氣管）與下呼吸道（肺部）發炎，不論哪一種發炎都會造成呼吸困難，造成發炎的原因包含了過敏原造成的氣喘反應（Asthma）、感染造成的發炎反應（如感冒病毒感染或細菌性感染肺炎）與長期發炎造成的呼吸道阻塞性疾病（如慢性阻塞性肺病 chronic obstructive pulmonary disease）。本節主要介紹非感染性所造成的氣喘及呼吸道阻塞性疾病造成的呼吸道發炎動物模式。

2.1.3.2 常見之呼吸道發炎相關人類疾病動物模式

（1）. 氣喘動物模式：

氣喘是一種呼吸道慢性發炎性疾病，常合併呼吸道的重塑（remodeling），由於造成氣喘的原因不一，但多數與長期對於特定過敏原的專一性免疫反應有關，因此目前常見的疾病動物模式均以特定抗原誘發專一性後天免疫反應（體液性的抗體反應或 T 細胞反應）後，再造成呼吸道的致敏，達到呼吸道發炎的目的。常用於誘發小鼠氣喘反應的抗原包括卵蛋白素（Ovalbumin）與塵蟎蛋白（DerP）。

A. **卵蛋白素誘發氣喘動物模式 （Ovalbumin-induced allergic asthma）**

本模式是最常用的氣喘動物模式，與人類的氣喘具有高度相似性，包含嗜伊紅性球浸潤、細胞激素等發炎介質分泌與呼吸道上皮細胞的過敏反應。因此包含支氣管肺泡沖洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）細胞學檢查及發炎介質測定、病理學上肺部支氣管的發炎細胞判讀與上皮杯狀細胞增生都是重要的指標，呼吸道阻力測試則可直接印證人類氣喘臨床症狀嚴重程度的重要指標。值得一提的是，利用卵蛋白素誘發氣喘模式在天竺鼠也是相當好的模式，天竺鼠在呼吸道過敏、嗜伊紅性球與嗜中性球浸潤性過敏表現及對於甲膽鹼（methacholine）及組織胺（histamine）的反應上也與人類病患反應相似。

本模式的誘發包含兩個階段，第一階段為全身性免疫反應的誘發，主要在利用 Ovalbumin（50-100 g/mouse）添加鉀鋁礬佐劑（主成分 aluminium

hydroxide，2 mg/mouse），腹腔注射或皮下注射後誘發全身性反應。第二階段在誘發全身免疫反應後（自第一次誘發後至少兩週），利用汽化Ovalbumin溶液（0.5-1％）的方法，每隔兩天進行致敏（每次至少 20 分鐘），至少致敏 3 次。

評估方法：最後一次致敏日的隔天則為試驗終點，可以進行 BALF 細胞學檢查、發炎介質測定及組織病理學判讀。

評估標準：建議以組織病理學判讀作為標準方法，評斷的項目包括肺部發炎細胞的嚴重度、分佈範圍、炎症細胞種類、上皮杯狀細胞的數量與上皮增生狀況做為評估嚴重度的標準。部分學者建議以 BALF 細胞學檢查作為快速評估標準，以嗜伊紅性球佔全部 BALF 細胞的 30-40％以上作為模式成功的依據。

B. **塵蟎萃取物誘發氣喘動物模式（House dust mite extract-induced allergic asthma）**

利用卵蛋白素誘發氣喘模式雖然可以誘發相似於過敏病患的臨床、細胞學與病理學上的擬真反應，但由於 Ovalbumin 不是病患呼吸道常見過敏原，因此利用塵蟎萃取物成為近年來的熱門方式。塵蟎萃取物內含多種塵蟎蛋白致敏原也包含如脂多醣（lipopolysaccharide，LPS），因此可以同時提供複合式的免疫刺激，在誘發氣喘的過程也可以完全以鼻腔投予或是霧化吸入方式致敏，模擬病患致敏的過程。塵蟎萃取物誘發氣喘動物模式在嗜伊紅性球的浸潤及細胞激素等發炎介質分泌過敏反應上也較 Ovalbumin 以相同投予方式時反應更佳。塵蟎萃取物誘發氣喘動物模式的誘發方式簡單，但需要較長的誘發時間；誘發的方式為每週 5 次，連續 7 週鼻腔投予（25 μg 塵蟎萃取物蛋白在 10 μg 生理實驗水）。

評估方法：最後一次致敏日的隔天則為試驗終點，可以進行 BALF 細胞學檢查、發炎介質測定及組織病理學判讀。

評估標準：建議以組織病理學判讀作為標準方法，評斷的項目包括肺部發炎細胞的嚴重度、分佈範圍、炎症細胞種類、上皮杯狀細胞粘液分泌增加與肺泡細胞皮下膠原蛋白層增生狀況做為評估嚴重度的標準。

（2）.慢性阻塞性肺病 （chronic obstructive pulmonary disease，COPD）

慢性阻塞性肺病是一種造成呼吸困難的慢性、進行性疾病，在病理上呈現慢性發炎、呼吸道纖維化及肺氣腫等現象。目前誘發 COPD 的方式主要有香菸呼吸誘導、誘發發炎反應、蛋白酵素誘發組織傷害及基因改造方式，其中誘發發炎反應與蛋白酵素誘發組織傷害是較容易量化與執行的方式，因此越來越多文獻採用這些方式或合併使用。

A. 嗜中性球增多模式 （Neutrophilia Model）

本模式利用呼吸道單次投與脂多醣（LPS） 誘發急性嗜中性球浸潤，造成急性肺損傷，因此常用於研究如 COPD 及急性呼吸窘迫症（acute respiratory distress syndrome，ARDS）等嗜中性球浸潤疾病的機制及部分因為發炎造成呼吸道狹窄的現象，但由於 LPS 刺激所造成的發炎反應是短期的，因此無法呈現長期肺呼吸道變形或肺氣腫等現象。本模式建立簡單，僅需鼻腔投與 0.05-0.3 mg/kg 的 LPS 即可在 3-24 小時內誘發大量的嗜中性球浸潤在肺部與氣管。

評估方法：LPS 刺激後 3 及 24 小時後，可以進行 BALF 細胞學檢查、發炎介質測定及組織病理學判讀。

評估標準：建議以 BALF 細胞學檢查判讀為標準方法，此一模式誘發 BALF 細胞中嗜中性球增加可達 10 倍以上，作為模式成功標準。

B. 合併 LPS 誘發發炎反應與蛋白酵素誘發組織傷害模式

由於前述利用 LPS 所造成的嗜中性球增多模式主要造成急性的反應，因此合併 LPS 刺激與彈性蛋白酶（elastase）造成的組織傷害，將更有效在細胞浸潤與呼吸道變形上更貼近於 COPD 的病患。誘發模式的方法是每週的第一天鼻腔投予 1.2 unit 豬胰臟彈性蛋白酶（porcine pancreatic elastase，PPE），接著於每週第四天鼻腔投予 70 μg 的 LPS，連續四週重複這樣的刺激後即可建立此一模式。

評估方法：模式建立後，可以進行 BALF 細胞學檢查、發炎介質測定及組織病理學判讀。

評估標準：建議合併 BALF 細胞學檢查及組織病理學判讀作為標準方法。 BALF 細胞學檢查以細胞總數及單核球、嗜中性球比例做為主要判斷標準。組織病理學判讀評斷的項目包括肺部發炎細胞的嚴重度、分佈範圍、

炎症細胞種類及肺泡纖維化作為標準。

2.1.3.3 參考文獻

1. Pichavant M, Goya S, Hamelmann E, Gelfand EW, Umetsu DT. （2007） Animal models of airway sensitization. Curr Protoc Immunol. Chapter 15:Unit 15.18.
2. Kianmeher M, Ghorani V, Boskabady MH. （2016） Animal Model of Asthma, Various Methods and Measured Parameters: A Methodological Review. Iran J Allergy Asthma Immunol. 15:445-465.
3. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ,
4. Gutierrez-Ramos JC, Ellis R, Inman MD, Jordana M. （2004） Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. Am J Respir Crit Care Med. 169:378-85.
5. Ghorani V, Boskabady MH, Khazdair MR, Kianmeher M. （2017） Experimental animal models for COPD: a methodological review. Tob Induc Dis. 15:25.
6. Corteling R, Wyss D, Trifilieff A. （2002） In vivo models of lung neutrophil
7. activation. Comparison of mice and hamsters. BMC Pharmacol. 2:1.
8. Sohn SH, Jang H, Kim Y, Jang YP, Cho SH, Jung H, Jung S, Bae H. （2013） The effects of Gamijinhae-tang on elastase/lipopolysaccharide-induced lung inflammation in an animal model of acute lung injury. BMC Complement Altern Med. 13:176.

2.1.4 腫瘤動物模式（Tumor Murine Models）

2.1.4.1 前言

癌症（惡性腫瘤）的發生與轉移是一個複雜且需要持續探討的病程，為了確實了解癌症如何在身體內產生和轉移，進而開發更有效的診斷方法和預防/治療方式，目前仍需要使用實驗動物模擬病患不同階段的腫瘤進行機制研究和藥物測試。腫瘤模式大致可從建立方法分成『植入型』與『自發型』（或稱為非植入型模式） 兩大類。植入型又依照腫瘤與宿主的種類異同歸納為『同種移植』和『異種移植』；或者依照移植部位區分成『異位移植』、『原位移植』和『轉移部位移植』。自發性腫瘤模式則因為誘發的方式不同而有不同名稱，常見的包括『品系自發模式』、『致癌物誘發模式』和『基因改造模式』等。每種模式各有應用上的優點和限制，可依照實驗目的選擇適當的模式使用。

雖然動物實驗對癌症研究和藥物開發仍是必要的，但執行過程必須兼顧動物福祉與 3R 精神。所以本章將介紹常見的大小鼠腫瘤模式以及建立模式或使用模式進行實驗須注意的事項。

2.1.4.2 常見腫瘤模式

（1）. 同種移植腫瘤模式（syngeneic tumor models）

同種移植腫瘤模式就是將大、小鼠的腫瘤團塊或腫瘤細胞移植到同種類、同品系的動物身上。因為不會有免疫排斥現象，可以使用一般免疫健全的大、小鼠，動物照護和操作相對方便、腫瘤生長快速易轉移，可應用於腫瘤轉移機制的研究和免疫治療的初期測試。不過，同種移植腫瘤模式的腫瘤和宿主都不是人類的基因/組織背景，比較無法真實反應人類腫瘤的情況。例如：小鼠乳癌細胞株 4T1 細胞移植到 BALB/c 小鼠，細胞移植後約 25-28 天對照組動物達人道實驗終點，且可在動物肺部觀察到腫瘤轉移。

（2）. 異種移植腫瘤模式（xenograft tumor models）

異種移植腫瘤模式則是將腫瘤細胞株或者人類的腫瘤細胞株和團塊移植到免疫缺陷鼠，避免腫瘤被宿主的免疫系統排斥而無法生長。相較於同種移植模式，異種移植使用人類腫瘤更貼近腫瘤病患的基因和特性，對藥物的測試結果較接近

病患的真實反應。然而腫瘤生長速度和轉移能力都會因宿主免疫缺陷程度不同而有所差異。例如：人類三陰性乳癌 MDA-MB-231 細胞移植到 T 細胞不全小鼠（裸小鼠），細胞移植 60 天後，約四成小鼠肺部可觀察到腫瘤轉移；若移植到高度免疫不全小鼠，細胞移植 60 天後，約九成小鼠肺部可觀察到腫瘤轉移（Puchalapalli *et al.*, 2016）。由於腫瘤移植到免疫缺陷鼠缺乏人類免疫細胞和體細胞，所以異種移植腫瘤模式通常應用於針對腫瘤本身的治療藥物，但無法應用於透過免疫調節的藥物測試，亦無法應用於腫瘤和周邊細胞交互反應的研究。

A. 細胞株異種移植模式（cell line-derived xenograft，CDX）

因為免疫缺陷鼠的應用加上細胞株培養容易又可大量繁殖，讓異種移植腫瘤模式成為近 30 年來最普遍的藥物篩選動物模式。美國癌症研究所甚至從 1990 年代開始使用 60 種不同癌症的人類細胞株建立新穎藥物篩選平台，透過離體和 CDX 模式逐步篩選具有抗癌潛力的化合物。通常腫瘤細胞株會被移植到實驗鼠皮下，稱為異位移植模式，方便移植也容易量測，但是相對地缺乏腫瘤原生位置的微環境。所以腫瘤細胞株也可能被移植到原生位置建立原位移植模式，或者移植到腫瘤最容易轉移的臟器建立轉移性移植模式，以符合實驗目的。

B. 病患腫瘤異種移植模式（patient-derived xenograft，PDX）

隨著高度免疫缺陷鼠的開發，實驗鼠對病患腫瘤的接受度愈來愈高，進而提升病患腫瘤移植成功率。另一方面，相較於長期離體培養的人類腫瘤細胞株，病患腫瘤保留更多原來的腫瘤突變負荷量（tumor mutation burden，TMB）、細胞組成架構（architecture）和異質性（heterogeneity），所以近幾年 PDX 使用更普遍。PDX 模式對化療藥物等以腫瘤為標的的抗癌藥物具有高度預測性，其對此類藥物的測試結果與病患對藥物的反應相似度高達九成。

C. 腫瘤移植免疫擬人鼠模式（CDX/PDX + humanized immune system mice）

因為高度免疫缺陷鼠的開發和基因改造技術的進展，各類型免疫擬人鼠陸續問世，包括初階和次世代免疫擬人鼠。初階免疫擬人鼠就是移植人類周邊單核球、CD34+造血幹細胞或合併移植 CD34+造血幹細胞、胎兒肝臟和胸腺於高度免疫缺陷鼠；進階免疫擬人鼠則是移植 CD34+ 造血幹細胞到細胞激素、幹細胞生長因子基因或是人類白血球抗原基因表現高度免疫缺陷鼠，讓 CD34+ 造血幹細胞在實驗鼠體內分化出不同的人類免疫細胞。搭配人類

腫瘤細胞/團塊和免疫擬人鼠，除了更精準地呈現病患腫瘤對藥物的反應，也更適合用來測試免疫調節相關機制的抗癌藥物，應用層面更廣。

（3）.自發性腫瘤模式

較常使用的自發性腫瘤模式大致分成三類：品系自發、致癌物誘發以及基因改造模式。

A. 品系自發腫瘤模式（spontaneous tumor models）

早期一些近親或遠交品系大小鼠自發性腫瘤被應用於腫瘤發生機制的研究。例如：T138 或 C3H 雌鼠好發乳癌、NOD-SCID 小鼠易生胸腺淋巴瘤、約 50%的棉鼠（cotton rats，Sigmodon hispidus）會產生自發性 ECL 細胞衍生腫瘤。然而此類模式的腫瘤種類受限且難以掌控腫瘤發生時間，導致實驗時間不易規劃。

B. 致癌物誘發腫瘤模式（carcinogen-induced tumor models）

早期普遍使用的自發性腫瘤模式還包括化學物質、輻射線、病毒等致癌物誘發的模式。例如：1,2-Dimethylhydrazine（DMH）大約可誘發七成 Wistar 大鼠產生胃癌、UVB 單獨或合併 UVA 照射 B6 或 FVB 仔鼠可誘發黑色素瘤發生。與品系自發腫瘤模式相同，致癌物誘發腫瘤模式可應用於腫瘤發生到晚期的全程研究，但也同樣具有發生率低且個體差異性大的困難。

C. 基因改造腫瘤模式（genetically engineered mouse models，GEMMs）

隨著基因改造技術的進步，基因改造技術應用於多方面的腫瘤模式建立階段。包括致癌基因轉殖（transgenic）、抑癌基因剔除（knock-out）、生長因子轉殖加速致癌物自發腫瘤生成速度等。這些 GEMMs 讓基因與癌症發展的研究更精準也促進分子標靶藥物的開發，尤其是多基因控制性改造提升自發性腫瘤生成率和轉移比例。例如：大腸瘜肉症（adenomatous polyposis coli，Apc）剔除鼠在小腸處產生許多息肉、K-rasG12D 突變配合 Trp53R172H 突變誘發小鼠肺癌。

2.1.4.3 腫瘤模式常用的評估標準

腫瘤動物模式成功與否的判定包括觀察腫瘤是否生長、轉移與病理判讀等，腫瘤是否生長則主要依據腫瘤大小，病理的判讀則協助了解長出的腫瘤塊是否具

有腫瘤的細胞特徵。

在實驗結果的判讀上常需要好的對照基準點，例如比較未經任何治療的對照組動物，比較治療前後的腫瘤生長速度、存活時間是否延長、腫瘤組織病理學判讀的血管新生程度或腫瘤壞死狀況等等，均可用為判讀的標準，依照各種藥物抑制腫瘤的機制，可以著重於不同面向的評估標準。

2.1.4.4 腫瘤模式常用的評估方法

（1）. 腫瘤大小

針對移植於皮下的腫瘤動物，傳統利用游標尺測量腫瘤最長邊（L）與其垂直短邊（S），並利用 L×S×S/2 公式計算腫瘤體積，近年來則有多款的 3D 腫瘤體積量測設備的上市，使得體表腫瘤量測更加客觀。至於體腔內的腫瘤則可分為具有可辨識之報導基因（如螢光或冷光表現）或傳統腫瘤量測兩種。如果具有冷光或螢光等報導基因的腫瘤，可以利用活體螢光或冷光系統加以定量；如果為傳統的腫瘤則可利用試驗終點的動物犧牲與腫瘤採集秤重；或利用如超音波、微米級電腦斷層掃描造影系統等影像系統協助判讀與定量腫瘤的體積。

（2）. 腫瘤轉移

對於報導基因表現之腫瘤動物，可使用光學影像分析結果評估腫瘤的轉移和多發性生長情況，評估腫瘤轉移的頻率、大小與分佈狀況。此外，傳統可利用組織病理學的篩檢判讀做為轉移與否的篩檢。

（3）. 動物臨床症狀、存活率與存活時間

若實驗單位在腫瘤動物模式與可利用的量測設備上無法配合，例如白血病腫瘤動物模式無法量測腫瘤大小，也無法利用表現報導基因腫瘤株，則利用臨床症狀的觀察、同一時間點動物存活率或腫瘤動物存活時間（達人道犧牲時間）也可以作為觀察的方法。

（4）. 組織病理學檢查

腫瘤的體積固然是腫瘤動物試驗最重要的觀察指標，但根據經驗整個腫瘤在經過治療後並非都是可能組成腫瘤塊的成分細胞不同，壞死的比例也不同。因此，利用組織病理學的判讀，腫瘤細胞的存活、腫瘤細胞分裂的活性、腫瘤內發炎細胞的活躍程度或是腫瘤內血管新生狀況，都可以是判讀治療方法是否有效的方法。

2.1.4.5 參考文獻

1. M Puchalapalli, X Zeng, L Mu, et al. NSG Mice Provide a Better Spontaneous Model of Breast Cancer Metastasis than Athymic（Nude）Mice. PLoS One（2016）11（9）, e0163521.

2. P Workman, EO Aboagye, F Balkwill, et al. An ad hoc committee of the National Cancer Research Institute19, Observers: V Navaratnam17 and S Ryder17 Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. British Journal of Cancer （2010） 102, 1555–1577.

3. TC. Martinsen, S Kawase, R HaÊkanson, et al. Spontaneous ECL cell carcinomas in cotton rats: natural course and prevention by a gastrin receptor antagonist. Carcinogenesis （2003） 24（12）, 1887–1896.

2.1.5 神經行為相關疾病模式

2.1.5.1 前言

神經退化性疾病一般泛指中樞神經系統緩慢而持續的退化，不同疾病之間依據受到影響區域的不同而會產生不同的臨床症狀。雖然疾病的表現型多是伴隨著神經細胞的損傷與減少，但在疾病病程中會受到影響的細胞並不僅止於神經元細胞（neuron），神經膠細胞（glial cell）以及微膠細胞（microglia cells）目前也被認為在神經退化性疾病中受到損傷或是扮演著致病機轉中重要的角色。

神經退化性疾病既然涵蓋各種不同種類，其成因亦是相當多元。部分神經退化性疾病目前認定為是屬於遺傳性的疾病，如脊髓小腦萎縮症及杭丁頓舞蹈症等。這些疾病臨床表現相當複雜且診斷上也很難依據病癥進行分類。現今利用分子診斷技術，特定出數個不同的致病基因，後來也依此作為疾病分類的依據。然而許多神經退化性疾病的成因目前仍不清楚，以在高齡化社會中備受矚目的阿茲海默症與帕金森氏症為例，明確可界定為遺傳性的患者佔所有病患的比例不到 10％，因此在界定疾病成因與建立適當動物模式上目前仍然是受到挑戰的一環。目前在模式建立上除了利用基因改造動物以外，也有利用毒素去殺死特定區域特定種類神經細胞的方法，以下將針對這類模式建立做一簡述。

2.1.5.2 阿茲海默症常見動物模式

（1）. 基因改造模式

阿茲海默症的主要症狀是由漸進式的記憶衰退開始，接下來是執行職能的能力逐漸喪失，並伴隨其他行為上的改變，如易躁動、偏執妄想等。在病理上有三個重要的特徵：類澱粉蛋白斑塊（amyloid plaque）、神經纖維糾結（neurofibrillary tangle）、以及海馬迴與皮質神經細胞退化。類澱粉蛋白斑塊是阿茲海默症特有的病理現象，其主要成分是前類澱粉蛋白質（amyloid precursor protein，APP）蛋白的代謝產物 Aβ42；過去分析家族性（早發型）阿茲海默氏症患者的基因，發現前類澱粉蛋白質（APP）、早老蛋白 1（presenilin 1，PSEN1）和早老蛋白 2（presenilin 2，PSEN2）等三個基因是目前有較明確證據會導致阿茲海默症的基因，這三個基因的突變主要都是會影響 APP 蛋白的代謝，導致類澱粉蛋白質斑塊的主要成分 Aβ42 在細胞中的相對或絕對量升高。

目前從不同的國家區域及家族中已分離出數個不同的突變，也藉此建立了數

種不同的基因改造疾病模式。神經纖維糾結的主要成分是過度磷酸化的 Tau 蛋白質纖維構型，除了在阿茲海默症的患者中有被觀察到，在其他神經退化性疾病，如額顳葉型失智症（frontal temporal dementia）中也會出現。

分析阿茲海默症患者的 Tau 蛋白也發現在 P301 的位點有突變，帶有此人類突變基因的小鼠也成功複製了神經纖維糾結的症狀。雖然透過分析早發型家族性阿茲海默症病患辨識出了數個相關的突變基因，但目前世界上超過百分之九十的阿茲海默症患者為晚發（散發）型，沒有帶有上述的基因突變。在迄今的研究中，研究人員也找到一些可能與阿茲海默症發病有關的危險因子基因，其中最著名的例子是 ApoE 基因的 ε4 等位基因。帶有一個 ε4 等位基因的人若罹患阿茲海默症，其發病年齡會較帶有其他等位基因人提早 10-15 年。

近年來透過全基因組關聯分析（genome-wide association study，GWAS）以及次世代定序(next generation sequencing，NGS)等方法的應用，研究人員持續發現其他可能與致病有關的相關因子，但這些基因對疾病的貢獻度仍有待更多的實驗證實。其中目前較受矚目的為 Trem2 基因，此基因在腦部表現於微膠細胞，目前被認為其基因突變與 Aβ 的清除或是神經發炎相關。由於目前利用既有的模式動物進行的阿茲海默症藥物開發幾無正面的成果，除了有人檢討以嚙齒類動物作為人類神經退化性模式的適當性外，也有人檢討過去模式的不足，例如說有的轉殖基因的表現量事實上是原來基因表現量的多倍，模式動物發病時間是否符合人類疾病進程等等。Alzheimer’s Disease Genetics Consortium，International Genomics of Alzheimer’s Project 等團體與計畫致力於解開基因與阿茲海默症之間的關聯，而如 MODEL-AD（Model Organism Development and Evaluation for Late-Onset Alzheimer's Disease Consortium）則透過新模式的建立，希望能夠找到更好的疾病模式。

（2）.誘發模式

在阿茲海默症的研究上可利用立體定位儀注射的方式直接打入 Aβ42 的寡聚物（oligomer）或單體到海馬迴或是側腦室的部位來誘發。此一模式根據的是 Aβ42 毒性的理論，由外部直接將 Aβ42 送入腦內達到誘發疾病的效果。

2.1.5.3 帕金森氏症常見動物模式

（1）.基因改造模式

帕金森氏症的特徵在於黑質緻密部（substantia nigra pars compacta，SNpc）的多巴胺神經元的持續喪失，以及蛋白質構型摺疊錯誤的 alpha synuclein 堆積在路易氏體（Lewy-Bodies）以及神經突中。目前認為其致病因子包括有遺傳與環境兩大類。遺傳性的帕金森氏症，目前已知 α -synuclein 與 leucine repeat kinase 2（LRRK2）兩個基因的突變會造成體染色體顯性遺傳性的帕金森氏症；其他基因如 parkin、PTEN-induced putative kinase 1（PINK1），以及 DJ-1 則具有隱性遺傳性。除了以上的致病基因外，也有找到一些可能會造成類似帕金森氏症症狀或是遺傳穿透性能力不確定的罕見帕金森氏症型式。目前至少有四十幾個基因被認為與帕金森氏症有所相關。目前已有各種不同的 α-synuclein、LRRK2、parkiin、PINK1 等基因的改造鼠可供選擇。

（2）.藥物誘發型的帕金森氏症模式

在藥物誘發的帕金森症模式上過去最常用的便是 MPTP（1-methyl-4- phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine）。在 1980 年代，由於化學合成海洛因毒品煉製過程中產生的雜質導致吸毒者陸續出現類帕金森氏症的症狀，當時的一位主治醫師由此進一步發現 MPTP 可以在動物體內複製帕金森氏症的症狀；由於此化合物已知會在人體內造成帕金森氏症的病變，因此其模式的確效程度相當高。MPTP 本身並不具有神經毒性，但因其化學特性為脂溶性的有機化合物，因此可以通過血腦屏障進入大腦，透過神經膠細胞所產生的 MAO-B（單胺氧化酶 B）會被代謝成有毒的陽離子 MPP+。MPP+能夠藉由多巴胺神經元上的多巴胺轉運體（dopamIne transporter）被帶入神經細胞內。在細胞內 MPP+會抑制粒線體的呼吸鏈作用，造成 ATP 耗盡並加速自由基的堆積，最終導致細胞死亡。此外 MPP+也會抑制合成多巴胺路徑上重要酵素 tyrosine hydroxylase 的活性，降低多巴胺的產量。不同品系的小鼠對 MPTP 的敏感度並不相同，目前認為採用 C57BL/6 品系動物效果較佳，但仍可能受到年齡、體重、來源、飼育環境等因素的影響而有不同的誘發效果。

有關 MPTP 模式的建立，在 Jackson-Lewis and Przedbor 2007 有相當詳盡的介紹，可依不同試驗需求採取不同方式的投與。利用皮下或腹腔注射方式投予的

模式雖然較常採用，但這類模式多是用來觀察急性的多巴胺神經元損傷；若要觀察到 alpha synuclein 蛋白的異常堆積，需要採用植入微量幫浦連續注射 MPTP 的方式來進行。在 MPTP 模式建立上必須特別留意的是，由於 MPTP 已知會在人體造成帕金森氏症的傷害，因此在操作上必須特別留意，包括人員訓練、廢棄物的處理、動物換籠等方面都需十分小心。除了 MPTP 外，與其結構相似的數種藥物也可以誘發帕金森氏症的模式。包括農藥巴拉刈、魚藤酮等皆屬此類。

此外，另一常用的是 6-hydroxyl dopamine（6-OHDA）模式。6-OHDA 的作用由於無法通過血腦屏蔽，因此需要利用立體定位儀定位注射部位後直接進行顱內注射。利用立體定位儀的注射方式可以建立在黑質緻密體、前腦內側神經束（medial forebrain bundle）或是紋狀體單側損傷的動物模式，可以利用動物左右兩側做為控制組與實驗組，進行相關試驗。

2.1.5.4 神經退化動物模式常用的評估標準

（1）.阿茲海默症動物模式

慣用評估方法包括行為測試與腦部病理判讀等，此外目前也積極開發疾病相關生物標記已提升模式分析上的可信賴性。在行為測試上以工作記憶（working memory）的空間記憶分析最常應用，評估模式動物學習記憶空間關係的能力。由於行為測試的混擾因子（confounding factor） 相對較多，因此在試驗設計與執行上皆須特別留意；而如何確保所採用的行為測試方法是能夠與人類臨床診斷方法與症狀連結則是未來轉譯能否順利的關鍵之一。在病理分析上，常以類澱粉蛋白斑塊與神經纖維糾結堆積情形與神經細胞退化情形做為評估的標準，最近也有以神經發炎程度作為其他判斷指標的研究。

（2）.帕金森氏症動物模式

評估方法包括行為測試與病理判讀等。傳統上帕金森疾病模式的行為分析多著重在運動能力的分析上，目前則建議兼顧運動行為與其他在患者上可能看到的行為表徵；同時也建議利用給予 L-DOPA 來確認症狀是否緩解作為一個實驗對照組。在病理學上常以 Lewy bodies 形成與否、多巴胺神經元退化等作為判讀的標準。

2.1.5.5 神經退化動物模式常用的評估方法

（1）.阿茲海默症動物模式

工作記憶測試常以各種”迷宮”測試空間記憶的方式來執行,如最簡單的Y/T-maze 測試利用大小鼠喜愛探索的天性，讓他們在三個外觀相同的相連 Y 或 T 字型通道中分辨未曾進入或曾經進入過的空間；八爪迷宮（radial arms maze）則利用食物等獎賞讓模式鼠在由中心點向外延伸的八個通道間學習辨別找出有獎賞的通道。而傳統上最常使用的是水迷宮（morris water maze），利用這些動物不喜歡被迫游泳想要找到脫逃處的特性,讓他們在圓形泳池中透過空間提示記住隱藏式平台的位置。這些測試也可以透過調整測試流程來進行參照記憶（reference memory）的測試。除了空間記憶之外，工作記憶也可以利用操作制約測試的方法來進行（Dudchenko, 2004; Buccafusco et al., 2008）。除了工作記憶外、也可針對職能執行、注意力、事件記憶（episodic memory）等功能利用其他行為分析方法進行分析。

在病理上常利用 H&E、銀染、congo-red 或 thioflavin-S 染色或免疫組織化學染色等方法進行類澱粉蛋白斑塊與神經纖維糾結與神經細胞退化評估。此外，也可利用 MRI 掃描與[18F]-florbetaben PET Imaging 等與人醫相同的方法，進行評估。

（2）.帕金森氏症動物模式

常用的運動行為分析包括利用開放空間、步態分析、滾輪測試議（rotarod）、平衡桿行走測試、pole test 等方法。若是利用單邊受損的 6-OHDA 模式，可觀察其在進入新環境時所產生的自主性旋轉或是利用安非他命或 apomorphine 誘發的旋轉來評估單邊受損的情形。在其他表徵上會依據使用模式特性與實驗目的，加入有關嗅覺、睡眠（晝夜活動情形）、腸胃道（糞便狀態），焦慮或憂慮症狀、認知功能退化等相關的分析。

在病理上常利用 H&E、或利用 tyrosine hydroxylase、α-synuclein 免疫組織化學染色等方法進行紋狀體、SNpc、amyglada 等部位神經細胞退化與 Lewy body 評估。此外，也可利用 MRI 掃描與 18F-9-Fluoropropyl-（+）-dihydrotetrabenazine PET Imaging 等與人醫相同的方法，進行評估。

2.1.5.5 參考文獻

1. Bagga, V., Dunnett, S. B., & Fricker, R. A. （2015）. The 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease - Terminal striatal lesions provide a superior measure of neuronal loss and replacement than median forebrain bundle lesions. Behav Brain Res, 288, 107-117. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.058
2. Decressac, M., Mattsson, B., & Bjorklund, A. （2012）. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and alpha-synuclein rat models of Parkinson's disease. Exp Neurol, 235（1）, 306-315. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.02.012
3. Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S.（2007）. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Nat Protoc, 2（1）, 141-151. doi: 10.1038/nprot.2006.342
4. Jagmag, S. A., Tripathi, N., Shukla, S. D., Maiti, S., & Khurana, S. （2015）. Evaluation of Models of Parkinson's Disease. Front Neurosci, 9, 503. doi: 10.3389/fnins.2015.00503
5. Jankowsky, J. L., & Zheng, H. （2017）. Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener, 12（1）, 89. doi: 10.1186/s13024-017-0231-7
6. Jean, Y. Y., Baleriola, J., Fa, M., Hengst, U., & Troy, C. M. （2015）. Stereotaxic Infusion of Oligomeric Amyloid-beta into the Mouse Hippocampus. J Vis Exp（100）, e52805. doi: 10.3791/52805
7. Kamat, P. K. （2015）. Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. Embo j, 10（7）, 1050-1052. doi: 10.15252/embj.201797397
8. 10.4103/1673-5374.160076
9. Rajamohamedsait, H. B., & Sigurdsson, E. M. （2012）. Histological staining of amyloid and pre-amyloid peptides and proteins in mouse tissue. Methods Mol Biol, 849, 411-424. doi: 10.1007/978-1-61779-551-0_28
10. Salkovic-Petrisic, M., & Hoyer, S. （2007）. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. J Neural Transm Suppl（72）, 217-233. doi: 10.1007/978-3-211-73574-9_28
11. Sasaguri, H., & Nilsson, P. （2017）. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. 36（17）, 2473-2487. doi: 10.15252/embj.201797397
12. Taylor, T. N., Greene, J. G., & Miller, G. W. （2010）. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. Behav Brain Res, 211（1）, 1-10. doi: 10.1016/j.bbr.2010.03.004
13. Tieu, K. （2011）. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med, 1(1), a009316. doi: 10.1101/cshperspect.a009316
14. Wolfe, C. M., Fitz, N. F., Nam, K. N., Lefterov, I., & Koldamova, R. （2018）. The Role of APOE and TREM2 in Alzheimer's Disease-Current Understanding and Perspectives. Int J Mol Sci, 20（1）. doi: 10.3390/ijms20010081

2.1.6 糖尿病動物模式

糖尿病（Diabetes Mellitus，DM）是因相對性或絕對性胰島素缺乏而導致高血糖症狀的疾病，慢性高血糖可導致神經病變、腎病和視網膜病變等併發症，並增加罹患心血管疾病的風險。世界衛生組織統計，2014 年全球約有 4 億 2200 萬糖尿病患，成年人口（>18 歲）盛行率約為 8.5%。國內根據食藥署的統計，糖尿病一直位居國人十大死因的第四或第五位，可見糖尿病不管在國內外都有日益增加之趨勢。糖尿病主要分為兩個類型：分別為第一型糖尿病和第二型糖尿病。第一型糖尿病是由於自身免疫破壞胰臟 β 細胞導致胰島素分泌不足所引起；而第二型糖尿病是由胰島素抗性（insulin resistance）引起，台灣地區主要以第二型糖尿病（type 2 DM）為主，約佔糖尿病罹患率的 95%左右。

人類疾病動物模式對疾病的病生理學探索和開發新型治療藥品扮演關鍵作用。糖尿病是人類常見之慢性代謝性疾病，為了減少糖尿病的併發症和相關醫療費用，早期預防和治療是必要的；但因為目前的治療效果有限，所以需要開發新的治療策略，藉由糖尿病動物模式，將有助於發現治療糖尿病的新藥物，進而轉化用於人類糖尿病的治療。

2.1.6.1 模式建立

（1）. 第一型糖尿病：

第一型糖尿病的主要特徵是自身免疫破壞胰腺 β 細胞，導致胰島素的製造缺乏。第一型糖尿病的動物模式包括具有自發性的免疫性疾病或化學物質破壞胰臟 β 細胞所導致。常用的第一型糖尿病動物模式簡述如表 2.1.6-1。

表 2.1.6-1 第一型糖尿病動物模式概述

誘導機制	模式	主要特徵
化學物質誘導	高劑量 STZ	高血糖
	Alloxan	
	重複低劑量 STZ	胰島炎
自發性自體免疫疾病	NOD 小鼠	自體免疫過程破壞胰臟 β 細胞
	BB 大鼠	

A. 化學物質誘導

化學誘導的第一型糖尿病模型，因大多數的 β 細胞被破壞，因此，內源性胰島素產生很少，導致動物高血糖和體重減輕。兩種主要用於誘導第一型

糖尿病的化合物為 streptozotocin（STZ）或 alloxan。由於它們的結構與葡萄糖類似，alloxan 和 STZ 可以與葡萄糖競爭，因此禁食的動物易感性較佳。Alloxan 和 STZ 相對不穩定，故建議注射前才配置注射溶液。

a. STZ：腹腔或靜脈注射 STZ 後，透過 Glut-2 transporter 進到胰臟 β 細胞, 經一連串反應導致細胞內 ATP 下降並隨後降低胰島素的生產，STZ 誘發第一型糖尿病動物模式，可分成單一高劑量給予或低劑量重複給予，給予方式分述如下:

單一 STZ 高劑量:視小鼠品種,劑量 100-200 mg/kg; 大鼠: 35-65 mg/kg。

重複低劑量 STZ：可以多次給予低劑量 STZ 超過 5 天誘導小鼠或大鼠胰島炎。依種別不同，劑量範圍為每天 20-40 mg/kg。

b. Alloxan：Alloxan 快速被 β 細胞攝取並形成游離自由基，因 β 細胞對自由基的防禦機制較差，導致 β 細胞 DNA 碎裂。給藥途徑主要為腹腔注射，視品種不同，小鼠的劑量範圍從 50-200 mg/kg，大鼠 40-200 mg/kg，若皮下給藥需要高達腹腔注射的三倍劑量。

B. 自發性自體免疫疾病誘導

最常用自體免疫疾病誘發的第一型糖尿病動物模型是非肥胖糖尿病（non-obese diabetic，NOD）小鼠和 Biobreeding（BB）大鼠。

a. NOD 小鼠：NOD 小鼠是 1974 年由日本大阪 Shionogi 的研究實驗室所開發出的。NOD 小鼠在 3-4 週齡左右開始出現胰島炎。胰島炎導致 β 細胞破壞，但明顯發病通常直到 10-14 週齡左右，大約減少 90％以上的胰島素。糖尿病好發率雌性 NOD 小鼠（60-90%）高於雄性 NOD 小鼠（10-30%）。

b. BB 大鼠：BB 大鼠來自遠交系 Wistar 大鼠。BB 大鼠通常在青春期後發生糖尿病，雄性和雌性的發病率相似，大約 90％BB 大鼠在 8-16 週齡期間呈現明顯高血糖，該糖尿病表現型非常嚴重，需要胰島素治療來維持生命。

（2）. 第二型糖尿病：

第二型糖尿病的主要致病特徵為胰島素抗性及 β 細胞無法有效代償。因此，第二型糖尿病的動物模式往往包括胰島素抗性模式和/或 β 細胞衰竭模式。為反

映人類第二型糖尿病的發展與肥胖有關，許多第二型糖尿病的動物模型都是肥胖的。常用的第二型糖尿病模型簡述如表 2.1.6-2。

表表 2.1.6-2 第二型糖尿病動物模式概述

誘導機制	模式	主要特徵
單基因的肥胖模式（monogenic）	$Lep^{ob/ob}$ 小鼠	肥胖誘發高血糖
	$Lep^{db/db}$ 小鼠	
	ZDF 大鼠	
多基因的肥胖模式（polygenic）	KK 小鼠	肥胖誘發高血糖
	OLETF 大鼠	
	NZO 小鼠	
誘導肥胖模式	高脂飼養	肥胖誘發高血糖
非肥胖的模式	CK 大鼠	β 細胞功能/質量不足引起的高血糖

A. 單基因的肥胖模式：

雖然人類的肥胖很少是由單基因突變所引起，但單基因肥胖模式常用於第二型糖尿病的研究，其中以瘦素（leptin）信號傳導基因缺陷導致肥胖的模式最廣泛被使用。瘦素主要功能為誘導飽足感，因此缺乏瘦素會導致食慾過盛與肥胖。如 Lepob/ob 小鼠即體內缺乏瘦素，而 Lepdb/db 小鼠和 ZDF（Zucker Diabetic Fatty）大鼠則是缺乏瘦素受體。

a. $Lep^{ob/ob}$ **小鼠**：$Lep^{ob/ob}$ 小鼠是一種嚴重肥胖的動物模式，從 2 週齡開始體重增加及出現高胰島素血症。到 4 週齡高血糖症狀明顯，至 3-5 個月齡時達到最高值，並包括高脂血症、體溫調節異常和身體活動力下降等現象。此外，這些小鼠是不孕的。

b. **Lep$^{db/db}$ 小鼠**：$Lep^{db/db}$ 小鼠是由於瘦素受體中的常染色體隱性突變所導致動物呈現過度攝食、肥胖、高胰島素血症和高血糖。從 3-4 週齡開始出現明顯的肥胖現象、大約 2 週齡時出現高胰島素血症、4-8 週齡出現高血糖症狀。幾個月後就會發生酮症，壽命較短。

c. **ZF（^{Zucker} fatty rats）大鼠和 ZDF 大鼠**：ZF 大鼠具有突變的瘦素受體，造成大鼠的食慾過盛，大約 4 週齡左右變得肥胖，這些老鼠也具有高胰島素血症、高脂血症、高血壓和葡萄糖耐受量不良。近交 Zucker 糖尿病性脂肪大鼠（ZDF）則為 ZF 大鼠突變而衍生出具有致糖尿病表現型的亞型。ZDF 大鼠的肥胖程度低於 ZF 大鼠，但由於他們無法代償的 β

細胞中的細胞凋亡，故有更嚴重的胰島素抗性。大約 8 週齡時開始出現高胰島素血症，隨後逐漸降低胰島素含量。雄性大鼠通常在 8-10 週左右發展出糖尿病，但雌性則不會有明顯的糖尿病出現。

B. 多基因的肥胖模式

多基因的肥胖模式可能是與人類狀況較相近的一個模式，但這些模式中，雄性的症狀較為明顯。

a. KK **小鼠**：KK 小鼠是日本學者 Kondo 培育的一種第二型糖尿病動物品系。他們具有輕度肥胖、高脂血症、嚴重的高胰島素血症等特徵，並有研究證明在肌肉和脂肪組織具有胰島素抗性、胰臟小島肥大和去顆粒化。KK 小鼠品系也會有糖尿病腎病的情形。

b. OLETF （**Otsuka Long-Evans Tokushima Fat**）**大鼠**：OLETF 大鼠是 1984 年在一個遠交品系 Long Evans 大鼠發現的自發性糖尿病大鼠。德島研究所選擇性的育種導致 OLETF 品系在 18 週齡後具有輕度肥胖和遲發性高血糖症，主要為雄性遺傳。OLETF 大鼠之胰臟小島經歷三個組織學階段的變化：在早期（6-20 週齡）主要為細胞浸潤和變性；下一階段（20-40 週）為增生；最後階段為纖維化並被結締組織所取代。另外，這些老鼠也會表現出腎臟併發症。

c. NZO （**New Zealand Obese**）**小鼠**：NZO 小鼠是由選擇性育種所創造出的多基因肥胖模式。這些小鼠在 9-12 週齡時會因瘦素抗性（leptin resistance）而出現高瘦素血症（hyperleptinemia），因而出現多食及肥胖等症狀。這些小鼠因肝臟 fructose-1,6-bisphosphatase 調節受損的結果，導致胰島素抗性及高胰島素血症。隨年齡增長，約 50％雄性小鼠出現高血糖、葡萄糖耐受性不良等糖尿病症狀。

C. 高脂飼養

1988 年首先描述於 C57BL/6 小鼠餵食高脂肪飼料導致肥胖、高胰島素血症和葡萄糖代謝不良。將正常飲食（以卡路里為基礎，通常約 26％蛋白質，63％碳水化合物和 11％脂肪）改變至高脂飲食（其中大約 58％的卡路里能量來自於脂肪）的研究顯示，高脂餵養的老鼠體重可能於第一週即高於正常飼養的老鼠，幾週後體重增加更為明顯，而其體重增加與胰島素抗性和缺乏 β 細胞代償導致葡萄糖耐受量損傷有關。

D. 非肥胖的第二型糖尿病模式

並非所有的第二型糖尿病患者都是肥胖的，因此，非肥胖的第二型糖尿病模式研究也很重要，這種模式主要是因 β 細胞不足最終導致第二型糖尿病。

a. GK（Goto-Kakizaki）大鼠：GK 大鼠是由日本人用葡萄糖耐受性最差的 Wistar 大鼠重複繁殖所創造出來的第二型糖尿病模式大鼠，以葡萄糖不耐和葡萄糖誘導胰島素分泌缺陷為特徵。這個模式的主要致病機制是β細胞質量/功能異常導致葡萄糖代謝異常，而非胰島素抗性。

2.1.6.2 模式建立評估標準：

第一型糖尿病：高血糖、胰島素缺乏。

第二型糖尿病：高血糖、高胰島素血症。

2.1.6.3 模式建立評估方法：

禁食血糖值測定、禁食胰島素值測定、葡萄糖耐量測定（Glucose tolerance test）、糖化血色素、尿糖值及餐後血糖值等。

2.1.6.4 參考文獻

1. Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. J Diabetes Res. 2016; 2016:9051426.
2. Clee SM, Attie AD. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. Endocr Rev 2007, 28: 48–83.
3. Danaei G, Finucane MM, Lu Y et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. Lancet 2011, 378: 31–40.
4. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. Tohoku J Exp Med 1976, 119: 85–90.
5. Hanafusa T, Miyagawa J, Nakajima H, Tomita K, Kuwajima M, Matsuzawa Y et al. The NOD mouse. Diabetes Res Clin Pract 1994, 24 （Suppl.）: S307–S311.
6. Haskell BD, Flurkey K, Duffy TM, Sargent EE, Leiter EH. The diabetes-prone NZO/HlLt strain. I. Immunophenotypic comparison to the related NZB/BlNJ and NZW/LacJ strains. Lab Invest 2002, 82: 833–842.
7. Ikeda H. KK mouse. Diabetes Res Clin Pract 1994, 24 （Suppl.）: S313–S316.
8. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Natori T. OLETF （Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty） rat: a new NIDDM rat strain. Diabetes Res Clin Pract 1994, 24

（Suppl.）: S317–S320.

9. King AJ. The use of animal models in diabetes research. Br J Pharmacol. 2012, 166（3）:877-94.

10. Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. Diabetes 2004, 53 （Suppl. 3）: S215–S219.

11. Yang Y, Santamaria P. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. Clin Sci （Lond） 2006, 110: 627–639.

2.1.7 非酒精性脂肪肝動物模式

隨著肥胖和糖尿病發病率的上升，非酒精性脂肪性肝病（non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD）已成為許多西方國家的主要健康問題。NAFLD 的疾病特徵為過多的脂質堆積在肝細胞中，疾病的進展可從簡單的脂肪變性（steatosis）至非酒精性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis，NASH），嚴重的話，可能導致肝纖維化和肝硬化。據統計，美國人口罹患非酒精性脂肪性肝病及非酒精性脂肪性肝炎的盛行率分別為 30%和 5%。而根據台灣肝病防治學術基金會調查發現國人罹患脂肪肝比率高達 40%，已取代 B 型肝炎及 C 型肝炎成為國人最常見之肝臟疾病。因此，NAFLD 已成為全球重要的健康議題，故建立 NALFD 疾病之動物模式，將有助於了解 NAFLD 並協助進行新的藥物及保健食品之前臨床功效試驗。

NAFLD 主要是因胰島素阻抗造成脂質代謝不正常，使得三酸甘油脂（Triglyceride，TG）堆積於肝臟組織中，引發肝臟脂肪變性，經組織學檢查肝細胞中三酸甘油脂含量高於 5%時，即可診斷為 NAFLD。由於脂肪蓄積，引起氧化傷害、細胞激素、前發炎因子等，使得脂肪肝惡化成脂肪性肝炎，據估計約有三分之一的脂肪肝病人會惡化成脂肪性肝炎（NASH）。當肝細胞脂肪變性同時併發壞死性炎症時，即可診斷為 NASH。

2.1.7.1 模式建立

（1）. 高脂飲食（high-fat diet，HFD）

在 HFD 動物模型中，45-75％的總卡路里攝取量來自脂肪；經由過量攝入脂肪或增加脂肪分解，使體內游離脂肪酸增加，導致三酸甘油酯在肝臟中的積累。典型的 HFD 模型使用由 71％脂肪，11％碳水化合物和 18％蛋白質組成的高脂飼料餵食大鼠三週，與餵飼標準的 Lieber-DeCarli 飲食（含 35％脂肪，47％碳水化合物和 18％的蛋白質）相比，HFD 引起肝臟脂肪變性、血脂濃度幾乎是正常飼量組的兩倍，與人類 NAFLD 患者相似，HFD 大鼠具有胰島素抗性（如血漿胰島素升高）。雄性 C57BL/6 小鼠餵食相同的 HFD 長達 16 週，HFD 小鼠表現出肝臟三酸甘油酯含量增加、肝細胞空泡化等肝臟脂肪變性之表徵；並有高血糖及胰島素抗性現象。HFD 餵飼動物因觀察的到肥胖及胰島素抗性，故與人類 NAFLD 之組織病理和發病機制相似。

（2）. $Lep^{db/db}$ 和 $Lep^{ob/ob}$ 小鼠

A. Lepdb/db 小鼠

Lepdb/db 小鼠是由於瘦素受體中的常染色體隱性突變所導致（Chen et al., 1996）。動物呈現過度攝食、肥胖和糖尿病等症狀，並顯示嚴重的高血糖症、高胰島素血症、高瘦素血症及發展為肝臟大囊泡性脂肪變性（macrovesicular hepatic steatosis）。正常飼料餵飼之 Lepdb/db 小鼠不會自發性發展成 NASH，然而長期卡路里消耗過度（> 1 個月）可能導致肝臟輕微炎症，故單純 Lepdb/db 小鼠是 NAFLD 的良好模式，而不是 NASH 的模式。但如果給予 Lepdb/db 小鼠甲硫氨酸和膽鹼缺乏（MCD）或反式脂肪的飲食，則可成功誘導成 NASH 模式。

B. Lepob/ob 小鼠

Lepob/ob 小鼠因攜帶有瘦素（leptin）基因之常染色體隱性突變，故體內缺乏瘦素。 同樣的，這些老鼠也是嚴重超重、過度攝食、高胰島素血症、高血糖、胰島素抗性，並自發性發展出肝臟脂肪變性，但不引發脂肪性肝炎。但如給予 Lepob/ob 小鼠 MCD 或高脂飲食亦可引發 NASH。

（3）. 甲硫氨酸和膽鹼缺乏（methionine and choline deficient，MCD）的飲食

MCD 飲食是描述飲食誘導 NAFLD 的最佳模式之一。該飲食通常具有高蔗糖含量（約 40%）和中等的脂肪含量（約 10%）。膽鹼和甲硫氨酸缺乏導致 β-氧化受損和極低密度脂蛋白（VLDL）顆粒的生成受損。此外，僅膽鹼缺乏會導致肝臟 VLDL 分泌受損、肝臟脂肪堆積、肝細胞死亡、氧化壓力以及導致細胞素和脂肪激素的變化，但僅有輕微的炎症和纖維化。若加上甲硫氨酸缺乏則可以導致較顯著的發炎現象和促進早期纖維化（8-10 週後）。MCD 飲食 2 週後，可見 AST 和 ALT 顯著增加。儘管 MCD 飲食快速導致 NASH，伴有肝小葉炎症和空泡化（2-8 週），但是動物並沒有像罹患 NAFLD 的人一樣，出現一些代謝症候群特徵，包括肥胖、胰島素抗性和血脂異常。反之，餵食 MCD 飲食的動物呈現顯著的體重減輕（10 週內高達 40%）。因此，此模式通常只被用於研究與 NASH 相關病理及藥理學的治療。

（4）. 高膽固醇飲食（High-cholesterol diet，HCD）

人類許多食物含有高量膽固醇，最近報導指出膳食膽固醇是人類和動物發展

脂肪性肝炎和肝臟炎症的關鍵因素。小鼠餵食僅含 1%高膽固醇的飼料 （1% HCD）顯示血清胰島素顯著增加，但僅輕微增加肝臟重量、血中三酸甘油酯、血中游離脂肪酸和血中 ALT。然而，使用高量膽固醇結合大量脂肪或膽酸鹽餵飼老鼠時，NASH 的特徵變得更加明顯。小鼠餵食高脂肪（15%）、高膽固醇（1%）飲食顯示出明顯的體重增加、嚴重的肝臟脂質積聚，血清 ALT 升高 10 倍、adiponectin 降低、脂肪組織炎症（TNF-α 基因表達增加）和肝纖維化。同樣的，小鼠餵高膽固醇（1.25%）、高膽酸鹽（0.5%）飲食也表現出嚴重的脂肪變性、炎症、肝細胞空泡化和纖維化。HCD 混合高脂或高膽鹽飲食餵飼小鼠其脂肪肝病變都比單純在 HFD 或 HCD 小鼠中顯著。

（5）.膽鹼缺乏性左旋氨基酸飲食（Choline-Deficient L-Amino Acid-defined Diet，CDAA）

CDAA 飲食與 MCD 飲食類似，均缺乏膽鹼。然而，在 CDAA 飲食中，蛋白質被等量的左旋-氨基酸混合物取代。CDAA 飲食可誘導比 MCD 飲食更嚴重的 NASH。在餵飼 20-22 週後，更可見肝臟纖維化。餵飼 CDAA 飲食 22 週後，小鼠體重、血漿三酸甘油酯、總膽固醇以及胰島素阻抗性（Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance，HOMA-IR）顯著增加，顯示胰島素抗性增加。此外，CDAA 飲食可以與高脂飲食結合，快速發展出具有纖維化的 NASH（6-9 週）。

（6）.foz/foz 小鼠

foz/foz 小鼠具有突變的 Alms1 基因，Alms1 基因編碼的蛋白質在初級纖毛的基體中可見：雖然 Alms1 的功能尚未完全明瞭，但可能與在細胞內轉運和食慾調節有關。foz / foz 老鼠呈現病態性的肥胖和過度的食慾，他們也顯示胰島素抗性、adiponectin 減少、增加膽固醇和脂肪變性。foz / foz 小鼠餵飼高脂飲食（HFD）導致更嚴重的 adiponectin 減少、膽固醇增多等代謝異常，因而促進小鼠從簡單脂肪變性轉變成嚴重纖維化的 NASH。然而，飲食誘導 foz / foz 小鼠轉變成 NASH 的嚴重程度取決於小鼠的品種，例如，foz/foz C57BL6/J 小鼠會比 foz/foz BALB/c 小鼠嚴重。

表 2.1.7-1 非酒精性脂肪肝動物模式概述

模式	飲食成分	肥胖	脂肪變性	NASH
HFD	45-75%的總卡路里攝取量來自脂肪。典型的 HFD 模型使用由 71%脂肪,11%碳水化合物和 18%蛋白質組成。	明顯	明顯	輕微
$Lep^{ob/ob}$ 小鼠	-	明顯	明顯	不自發
$Lep^{db/db}$ 小鼠	-	明顯	明顯	不自發
MCD 飲食	飲食通常由蔗糖（40%能量）和脂肪（10%能量）組成，但缺乏甲硫氨酸和膽鹼。	無	明顯	明顯
HCD 飲食	通常動物卡路里攝入量的 1%來自膽固醇。但經常與高脂肪（15%）或高膽酸鹽（0.5%）配合。	明顯	明顯	明顯
foz/foz 小鼠	-	明顯	明顯	明顯
CDAA 飲食	28.9 kcal/g L-glutamic acid、15.8 kcal/g L-aspartic acid、12.7 kcal/g L-arginine 及 10.5 kcal/g L-leucine，無膽鹼酒石酸氫鹽（choline bitartrate）。	明顯	明顯	明顯

2.1.7.2 評估標準

肝臟功能相關酵素及生化指標上升，如 AST（GOT）、ALT（GPT）、三酸甘油酯、膽固醇、葡萄糖上升。萃取肝臟脂質進行三酸甘油酯與膽固醇含量變化之檢測，或以肝臟組織切片觀察油滴分布情形。根據 Brunt 等人（1999 年）發表文獻指出，脂肪變性的嚴重程度可以根據三酸甘油酯堆積於肝臟中之比例做分級，如表 2.1.7-2。

表 2.1.7-2 肝臟脂肪變性之分級

脂肪肝	三酸甘油酯堆積於肝臟中之比例
正常	<5%
輕微	5-33%
中度	33-66%
嚴重	> 66%

2.1.7.3 評估方法

血清檢測肝臟的生化功能：AST（GOT）、ALT（GPT）、三酸甘油酯、膽固醇、葡萄糖。取肝臟樣本，秤重後比較其肝重/體重%，並將取組織以 10%的中性福馬林(formalin)固定，然後以石蠟包埋、切片、蘇木紫－伊紅染色(haematoxylin-eosin stain，H&E stain)）來進行組織病理學觀察。另外，利用其餘肝臟進行三酸甘油酯與膽固醇含量變化之檢測。

2.1.7.4 參考文獻

1. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 1–16.
2. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5286–5296.
3. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM* 2010; 103: 71–83.
4. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99–S112.
5. Lau JK, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol.* 2017, 241（1）:36-44.
6. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, *et al.* Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 502–509.
7. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. JAMA. 2015, 313（22）: 2263-73.
8. Tandra S, Yeh MM, Brunt EM, *et al.* Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2011; 55: 654–659.
9. Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients*. 2017, 9（10）. pii: E1072.

2.1.8 疼痛疾病動物模式

2.1.8.1 前言

疼痛是一種感知現象，它是根據組織中疼痛受體所收集的訊息所建立的，這類訊息於通過脊髓時進行修飾，並到大腦整合形成不同感官體驗與感知。因此必需從多個層面檢視完整疼痛反應。現已發展出一些動物模型，可以研究疼痛表現型（phenotype）是受不同的機制所影響，而好的疼痛疾病動物模式旨在能更準確模擬不同臨床疾病的表徵，並發展其治療方法。現階段疼痛疾病動物模式主要仍以測量異常性疼痛（allodynia）及痛覺過敏（hyperalgesia）的程度、疼痛的情感變化及疼痛對功能和生活品質的影響為主。而臨床前新型止痛藥物研發仍以緩解感受性疼痛（nociceptive pain）、炎症性疼痛（inflammatory pain）和神經性疼痛（neuropathic pain）做為標的。根據全球疾病研究，於2015 年已將偏頭痛排在第五位的慢性病，腰痛和頸部疼痛則分列為第十六位及第十八位，因此近年來頭痛（headache）或偏頭痛（migraine）也被列為新的研發標的。由於慢性疼痛造成嚴重的社會經濟負擔及影響個人生活品質，鑑此，製藥公司、小規模生物技術公司或學術研究單位更不遺餘力於止痛藥物的研發。而利用合適疼痛疾病動物模式用以評估止痛藥物的藥效變成不可或缺的因素。本節內容旨在說明如何測量各式疼痛反應、歸納常規使用疼痛疾病相關動物模式及各動物模式主要的疼痛測試。

2.1.8.2 疼痛行為的測量

如何量化疼痛的方法在各種動物疼痛疾病相關動物模式基本是大同小異的，主要是測定受體反射性（reflexive）或非反射性（non-reflexive）的反應。

（1）. 反射疼痛測試

反射性疼痛測量通常是評估在受體接受熱、冷、機械和電各類刺激後的反應。這些刺激會激活局部的傷害感受器而驅動一連串反應；其中許多回應都可以在沒有神經索（supraspinal）激活的情況下發生，然而這些反應是需要完整的運動系統參與，該類誘發的反身行為測試非常接近人體對有害刺激所呈現出來的反應，例如受到有害的刺激（noxious stimuli（hyperalgesia））或無害的刺激（innocuous stimuli（allodynia））或休息時自發疼痛（rest spontaneous pain）反應是不同的。

反射性疼痛測量可以在受傷部位或受傷部位週邊進行。對損傷部位的刺激所引起疼痛稱為原發性痛覺過敏（primary hyperalgesia）；受傷部位的痛覺閾值（threshold）或敏感度的變化會影響週邊沒有受傷的區域，該痛覺稱為繼發性痛覺過敏（secondary hyperalgesia），並且會致使脊髓中或中樞神經中的神經元敏感化。患有慢性疼痛的患者通常具原發性痛覺過敏及繼發性痛覺過敏[1]，但引發這兩項痛覺的機制並不相同[2]。一般來說，反身疼痛測試可研究異常性疼痛（allodynia）及痛覺過敏 （hyperalgesia）背後相關的機制，可大致分類為使用熱或機械式刺激進行測試：

A. 熱源 （thermal）刺激測試

a. 甩尾測試（tail flick test）

此為最早開發的熱痛覺（thermal pain）測試方法之一，乃應用熱源刺激大小鼠尾根部，熱源強度可自行調整，開啟熱源刺激尾根部後並記錄其甩尾時間[3]，唯要注意該類測試需設定熱源終止時間（cut-off time），以避免尾根部組織受傷。雖然甩尾試驗是動物發生脊髓反射[4]，然而甩尾時間卻仍受腦幹和皮質部修飾[5]。

b. 熱板測試（hot plate test）

熱板測試於甩尾測試後發展出來。以大鼠為例，熱板溫度通常設在52℃，該類測試設定終止時間通常為 30 秒，主要記錄大鼠從放置於該熱板後到彈跳起來的時間或舔腳起始的時間[6]。這類閃避熱源的行為也被認為與脊髓反射有相關。

c. 腳底熱刺激測試（plantar test）

最後發展出腳底熱刺激測試，主要測試嚙齒動物的後腳掌對熱源的反應[7]，與熱板測試相比較，該測試的優點是可於同一動物進行對照實驗，例如左腳打誘導疼痛的刺激物質，右腳沒有打，可於同一隻動物測試雙腳的反應。

B. 機械式（mechanical）刺激測試

機械式行為測量可測量異常性疼痛（對非疼痛性刺激的痛苦反應）及痛覺過敏，該方法最初應用於人體測試[8]。

a. 腳底觸覺敏感度測量

於嚙齒類動物測量異常性疼痛，主要是使用多根 von Frey 纖維絲（filaments）刺激足部，且記錄其反應閾值[9]。以大鼠而言，通常是使用一系列含 0.4 g、0.6 g、1.0 g、2.0 g、4.0 g、6.0 g、8.0 g 及 15.0 g 的纖維絲做測試；用 von Frey 纖維絲刺後腳掌，該纖維絲需呈現一點彎曲的狀態，持續 6 到 8 秒，如果腳掌有撤回，則記錄為正面反應。正面和負面反應可利用公式轉換為 50%的異常性疼痛閾值（allodynia threshold）。亦有實驗室使用單一根 von Frey 纖維絲重複刺激足部，記錄足部反應頻率[10]。Von Frey 纖維絲測試最適合模仿臨床皮膚高敏感性的病症，如神經性疼痛、術後疼痛（post-operative pain）、炎症性疼痛，甚至骨關節炎（osteoarthritis）[11-16]。

b. 加壓痛覺反應測試

通常應用於測試痛覺過敏的程度，利用可不斷增加壓力的測量裝置偵測疼痛反應，使用測痛計（dolorimeter）、校準鑷子（calibrated forceps）或 Randall-Selitto 疼痛測試儀（analgeometer）於肌肉、關節或腳掌上慢慢施加壓力[17-20]，最後記錄其反應壓力。這些測試中，多利用退縮的時間或發聲當作實驗終點。這類疼痛反應類似臨床上纖維肌痛（fibromyalgia）、肌筋膜疼痛（myofascial pain）或骨關節炎的痛覺[21]。

（2）. 非反身疼痛測試

A. 自發性疼痛行為（spontaneous pain behavior）測試

a. 注射發炎誘導物質

此類最常見的疼痛測試，通常於腳掌內注射誘導發炎的物質，如福馬林（formalin）、辣椒素（capsaicin）或芥子油，之後計算舔腳掌的時間或頻率[22]。另外，可於腹腔內打醋酸（acetic acid）或苯醌（phenylquinone），記錄腹腔壁扭曲次數，該測定可模擬類似內臟疼痛模型[23]。然而，要注意的是可引起人類臨床疼痛反應的福馬林、芥子油或醋酸的劑量或濃度並不清楚。

b. 腳掌防護（paw guarding）

於關節疼痛、神經性疼痛和術後疼痛模型中可觀察受體腳掌防護的行為當作疼痛反應半定量測定[24]。另外亦可利用伸展台（CatWalk）測試，測定

四肢負載（weight bearing）的能力[25]，此時有量化數據產出。

B. 避免誘發刺激（avoidance of evoked Stimuli）

主要是用來測試如何避開疼痛中令人感到不悅的成分。這是重要的測試，因為受體可能有類似的感覺閾值，但痛苦的來源可能會有所不同。以熱逃逸測試（thermal escape test）為例子，該裝置由兩個腔室構成，可單獨操縱每個腔室的溫度，記錄受體偏好哪一個腔室或逃離某一個腔室的時間。這與熱板測試不同，因為動物只有單一的地板溫度，且無法逃脫。

C. 生活品質和功能

動物活動和刻板（stereotypical）行為都可以評估疼痛對功能的影響。可以總體評估動物活動、活力、理毛、飲食、姿勢、步態和社交行為，透過這些觀察以瞭解動物是否處於疼痛狀態[26]。舉例而言，測量活動能力（locomotor activity）及站立行為（rearing behavior）可以運用於炎症、神經病變和關節炎相關模型[27]。而車輪運行活動（wheel running activity）也是動物身體活動的一種衡量標準，在急性動物炎症模型中該活動會減少[27]。

2.1.8.3 疼痛疾病相關動物模式

現已開發了多種疼痛疾病動物模型，其中許多模型都是直接模仿臨床狀況，另外有些模型則運用於止痛藥篩選和瞭解止痛的機制。想開發潛在的治療方法或長期療法時，必須瞭解疾病的進程和特色，才容易將基礎研究成果推上臨床測試。以下分別說明常用疼痛疾病模式及建議的實驗方法，唯實驗方法會因應各實驗室條件而改變：

（1）. 感受性疼痛模式 （nociceptive pain model）

感受（nociception）是指感覺神經系統對某些有害或潛在有害刺激的反應。當感受器（nociceptors）遇見強烈的化學物質（例如眼睛中的辣椒粉）、機械刺激（例如切割或壓碎）或感覺神經細胞的熱/冷刺激，會產生訊息，由脊髓傳到大腦，之後會引發各種生理反射動作，通常導致受體有疼痛的感覺。

A. 小鼠甩尾測試

動物：ICR 雄性小鼠（20-26 g） 每組建議隻數：8-10

方法：

1. 調整熱源強度，將熱源照於小鼠尾根部，量測其基礎甩尾時間（baseline）。
2. 篩選基礎甩尾時間介於 6 至 9 秒的小鼠，如某些小鼠甩尾時間低於 6 秒（過度敏感）或高於 9 秒（低敏感度）則不予使用，注意須將熱源刺激終止時間設定為 15 秒以避免尾部組織損傷。
3. 將這些篩選合格的小鼠隨機分配至控制組及處理組。
4. 將待測物質（test substance）以口服方式（或其他方式）給予小鼠，於特定時間後再進行一次甩尾測試。
5. 如果處理組甩尾時間延長且與控制組有統計上顯著差異，該待測物質被認定有潛在止痛效果。

B. 大鼠甩尾測試

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（160-200 g） 每組建議隻數：8-10

方法：

1. 調整熱源強度，將熱源照於大鼠尾根部，量測其基礎甩尾時間。
2. 篩選甩尾時間介於 6 至 9 秒的大鼠，如某些大鼠甩尾時間低於 6 秒（過度敏感）或高於 9 秒（低敏感度）則不予使用，注意須將熱源刺激終止時間設定為 15 秒以避免尾部組織損傷。
3. 將這些篩選合格的大鼠隨機分配至控制組及處理組。
4. 將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再進行一次甩尾測試。
5. 如果處理組甩尾時間延長且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

C. 大鼠熱板測試

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（160-200 g）每組建議隻數：8-10

方法：

1. 設定熱板溫度為 52°C，將大鼠放置於熱板上，量測其基礎撤離（withdrawal）反應時間。
2. 選擇反應時間介於 5 至 10 秒的大鼠，如某些大鼠撤離時間低於 5 秒（過度敏感）或高於 10 秒（低敏感度）則不予使用，注意須將熱板終止時間設定為 30 秒以避免足部組織損傷。
3. 將這些篩選合格的大鼠隨機分配至控制組及處理組。
4. 將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再進行一次熱板測試。
5. 如果處理組撤離反應時間延長且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

D. 大鼠手術疼痛模式

通過皮膚與筋膜縱切口引起的術後疼痛模型，並且將後腳掌的足底肌肉發展為模擬手術過程中出現的表面和深部組織損傷[28]。

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（260-320 g） 每組建議隻數：8-10

方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 依各實驗室麻醉標準操作流程進行大鼠麻醉後，將其皮膚縱切，同時將蹠肌（plantaris muscle）挑起來以手術刀縱向畫肌肉引起傷害，以誘導異常性疼痛，將皮膚進行縫合。
3. 於引起傷害 24 小時後，測量機械性異常性疼痛，選取異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 10.0 g 的大鼠。
4. 將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
5. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

（2）. 炎症性疼痛模式 （inflammatory pain model）

炎症性疼痛的動物模型是將不同種類的刺激物注射入皮膚、腳掌、肌肉、關節和或腹腔，這些刺激物會引起由嗜中性白血球聚集所導致的急性炎症性疼痛以及巨噬細胞浸潤所造成的持續疼痛反應。因此，這些模型同時具有急性和慢性炎症特性，在這些模型中也證實鴉片類藥物（opioids）和非類固醇的抗發炎藥（NSAID）是有療效性的。

A. 小鼠福馬林測試

動物： ICR 雄性小鼠（20-26 g） 每組建議隻數: 8-10

方法：

1. 將待測物質以口服方式（或其他方式）給予小鼠，於特定時間後，於後隻腳掌內注射福馬林（0.02 ml，2%溶液）。
2. 以 5 分鐘的間隔為單位，記錄小鼠舔後腳掌的時間，紀錄期為注射福馬林後 30 分鐘。
3. 此模型前 5 分鐘為急性期，後 10-30 分鐘為慢性期。
4. 如果處理組舔腳掌程度有降低且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

B. 大鼠福馬林測試

動物：ICR 雄性小鼠（20-26 g） 每組建議隻數：8-10

方法：

1. 將待測物質以口服方式（或其他方式）給予小鼠，於特定時間後，於後肢腳掌內注射福馬林（0.02 ml，2%溶液）。

2. 以 5 分鐘的間隔為單位，記錄大鼠舔後腳掌的時間，紀錄期為注射福馬林後 30 分鐘。
3. 此模型前 5 分鐘為急性期，後 10-30 分鐘為慢性期。
4. 如果處理組舔腳掌程度有降低且與控制組且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

C. 卡拉膠誘導（Carrageenan-induced）

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（180-220 g） 每組建議隻數：8-10
方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 於後肢腳掌內注射卡拉膠（0.1 ml 的 1%懸浮液)用以誘導異常性疼痛。
3. 於卡拉膠注射後兩小時，測量機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 10.0 g 的大鼠。
4. 將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
5. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

D. 完全弗氏佐劑誘導（CFA-induced）

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（180-220 g） 每組建議隻數：8-10
方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 於後肢腳掌內注射完全弗氏佐劑（0.1 ml 的 1%浮液）用以誘導異常性疼痛。
3. 於完全弗氏佐劑注射後 24 小時測量機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 10.0 g 的大鼠。
4. 將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
5. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

E. 醋酸誘導腹壁扭曲測試（acetic acid-induced writhing test）

動物：ICR 雄性小鼠（20-26 g） 每組建議隻數：8-10
方法：

1. 將待測物質以口服方式（或其他方式）給予小鼠，於特定時間後，於腹腔內注射醋酸（20 ml/kg，0.5%溶液）。
2. 於醋酸注射後 5 到 10 分鐘，記錄腹腔壁扭曲次數。
3. 如處理組扭曲次數有降低且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

F. 苯醌誘導腹壁扭曲測試（phenylquinone（PQ）-induced writhing test）

動物：ICR 雄性小鼠（20-26 g） 每組建議隻數：8-10
方法：

1. 將待測物質以口服方式（或其他方式）給予小鼠，於特定時間後，於腹腔內注射苯醌（2 mg/kg）。
2. 於苯醌注射後 5 到 10 分鐘，記錄腹腔壁扭曲次數。
3. 如處理組扭曲次數有降低且與控制組且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

（3）. 神經性疼痛模型（neuropathic pain model）

神經性疼痛由周邊或中樞體感系統（somatosensory system）損傷或疾病所引起，並且經常發生在神經系統的創傷之後。神經性疼痛也可在缺血、代謝紊亂或暴露於各種毒素後發生。現已開發了幾種成功的模型來模擬神經性疼痛。

A. 大鼠坐骨神經結紮

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（160-200 g） 每組建議隻數：8-10
方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 大鼠麻醉後，將坐骨神經挑出，以鉻化線在坐骨神經打四個結，用以誘導異常性疼痛。
3. 於坐骨神經打結後 7-10 天測量機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 10.0 g 的大鼠。將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
4. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

B. 大鼠脊髓神經結紮

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（160-200 g） 每組建議隻數：8-10
方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 大鼠麻醉後，將腰椎 L5 及 L6 神經挑出，以 6-0 絲線在 L5 及 L6 神經打一個結，用以誘導異常性疼痛。
3. 於 L5 及 L6 神經打結後 7-10 天測量機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 10.0 g 的大鼠。
4. 將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
5. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

C. 小鼠脊髓神經結紮

動物：C57BL/6 雄性小鼠（26-30 g） 每組建議隻數：10-12
方法：

1. 所有小鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛（mechanical allodynia）基礎值（一般而言皆為於 1-2 g）。
2. 小鼠麻醉後，將 L5 神經挑出，以 6-0 絲線在 L5 神經打一個結，用以誘導異常性疼痛。
3. 於 L5 神經打結後 7-10 天測量機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 0.5 g 的小鼠。
4. 將這些小鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予小鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
5. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

D. 鏈脲佐菌素（Streptozotocin，STZ）誘導糖尿病神經痛

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（225-250 g）每組建議隻數：8-10
方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 於大鼠腹腔內注射溶於 0.1M 檸檬酸鹽緩衝液（pH4.5）的鏈脲佐菌素（STZ，50 mg/kg）。
3. 三天後，偵測血糖值，僅選取血糖值大於 350 mg/dL 的大鼠。
4. 於鏈脲佐菌素給予後 14 天測量機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 10.0 g 的大鼠。
5. 將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
6. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

2.1.8.4 過度疼痛模式（transitional pain model）

（1）.癌症疼痛模型

癌症相關的疼痛可能是由癌症本身引起的，也可能是由化療藥物所引起的痛覺反應。

A. 骨癌症痛

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（180-220 g） 每組建議隻數：8-10
方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 將內含 3×10^4 個 MRMT 乳癌腫瘤細胞的 3 毫升液體注射入骨髓腔中，用來破壞骨小樑及誘導異常性疼痛。
3. 於腫瘤細胞注射後 14 天測量機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 10.0 g 的大鼠。
4. 將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
5. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

B. 癌症藥物化療誘導神經痛

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（280-320 g） 每組建議隻數：8-10
方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 於第 1、3、5 和 7 天在腹腔內注射紫杉醇（Paclitaxel，2mg/kg）誘導異常性疼痛。
3. 於第 14 天測量機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 10.0 g 的大鼠。
4. 將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質（test substance）以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
5. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

（2）. 骨關節疼痛（Osteoarthritis Pain）

骨關節炎通常是透過破壞關節周圍的組織來建立模型。切斷前十字韌帶或膝關節，或者注射碘醋酸單鈉（Mono Sodium Iodoacetate，MIA）都會導致關節破壞及導致炎症反應。

A. 前十字韌帶（anterior cruciate ligament）切斷引起骨關節疼痛

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（180-220 g） 每組建議隻數：8-10
方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 大鼠麻醉後，將右膝關節膝蓋骨上進行縱向切口，用手術刀打開關節的內側，並且使膝蓋骨橫向脫位以暴露股骨髁。
3. 橫切前十字韌帶誘導異常性疼痛。
4. 於術後第 14 天測量機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 10.0 g 的大鼠。
5. 將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
6. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

B. 碘醋酸單鈉誘導骨關節疼痛

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（180-220 g）每組建議隻數：8-10
方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 於關節內注射醋酸單鈉（1 mg /大鼠）誘導異常性疼痛。
3. 於注射後第 21 天測量機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值相差大於 10.0 g 的大鼠。
4. 將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次機械性異常性疼痛。
5. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

2.1.8.5 其它動物模式

A. 偏頭痛模式（Migraine Model）

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（270-320 g）每組建議隻數：8-10
方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後肢機械性異常性疼痛基礎值（一般而言皆為於 15.0 g），僅小於 1%大鼠其基礎值小於 15.0 g。
2. 大鼠麻醉之後，將導管（PE-10，外徑 0.61 mm）穿入蛛網膜下腔，其尾端連接到 20 號針頭，將導管持續水平穿刺，其末端需位於腰椎膨大部。
3. 將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠。
4. 將 CGRP8-37 溶於人工腦脊髓液，透過鞘內（intrathecal）導管注射 CGRP8-37。
5. 需於 CGRP8-37 給予後 90 分鐘內測量後肢機械性異常性疼痛。
6. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

B. 下背部疼痛（low back pain）

動物：Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠（270-320 g） 每組建議隻數：8-10

方法：

1. 所有大鼠要先以 von Frey 纖維絲測量後背機械性異常性疼痛基礎值。
2. 於後背部皮下結締組織左側注射卡拉膠 （0.1 ml 的 3%懸浮液）用以誘導異常性疼痛。
3. 於卡拉膠注射後一週，測量後背機械異常性疼痛，選取機械性異常性疼痛程度跟基礎值有顯著差異的大鼠。
4. 將這些大鼠隨機分配至控制組及處理組。將待測物質以口服方式（或其他方式）給予大鼠，於特定時間後再測量一次後背機械性異常性疼痛。
5. 如果處理組疼痛程度有緩解且與控制組有統計上顯著差異，該物質被認定有潛在止痛效果。

2.1.8.6 Adverse effect test （副作用測試）

許多類嗎啡類疼痛藥物，除了進行藥效評估之外，還需對這些藥物進行副作用評估。這些實驗包含胃腸道蠕動能力（gastrointestinal motility）測試、活動能力（locomotor activity）測試、行為及生理功能（behavior and physiological function）測試、呼吸功能及血液氣體測試及旋轉桿（rotarod）性能測試。

2.1.8.7 參考文獻

1. Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L. Assessment of mechanisms in localized and widespread musculoskeletal pain. Nat Rev Rheumatol. 2010; 6:599–606.
2. Fuchs PN, Campbell JN, Meyer RA. Secondary hyperalgesia persists in capsaicin desensitized skin. Pain. 2000; 84:141–149.
3. D'Amour FE, Smith DL. A method for Determining loss of pain sensation. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. J Pharmacol Exp Ther 1941;72:74-79.
4. Dewey WL, Harris LS, Howes JF, Nuite JA. The effect of various neurohumoral modulators on the activity of morphine and the narcotic antagonists in the tail-flick and phenylquinone tests. J Pharmacol Exp Ther. 1970; 175:435–442.
5. Akil H, Liebeskind JC. Monoaminergic mechanisms of stimulation-produced analgesia. Brain Res. 1975; 94:279–296.
6. Woolfe G, MacDonald AD. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. J Pharmacol Exp Ther. 1944; 80:300–307.
7. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain. 1988; 32:77–88.
8. von Frey M. On the Use of Stimulus Hairs. 1896:71–131.

9. Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. Annual Review of Pharmacological Toxicology. 1980; 20:441–462.

10. Sluka KA. The role of the cyclic AMP transduction cascade in mechanical allodynia and hyperalgesia induced by intradermal injection of capsaicin in rats. Br J Pharmacol. 1997; 122:1165–1173.

11. Baumgartner U, Magerl W, Klein T, Hopf HC, Treede RD. Neurogenic hyperalgesia versus painful hypoalgesia: two distinct mechanisms of neuropathic pain. Pain. 2002; 96:141–151.

12. Farrell M, Gibson S, McMeeken J, Helme R. Pain and hyperalgesia in osteoarthritis of the hands. J Rheumatol. 2000; 27:441–447. [PubMed: 10685812]

13. Lindblom U, Verrillo RT. Sensory functions in chronic neuralgia. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1979; 42:422–435.

14. Rakel BA, Blodgett NP, Bridget ZM, Logsden-Sackett N, Clark C, Noiseux N, Callaghan J, Herr K, Geasland K, Yang X, Sluka KA. Predictors of postoperative movement and resting pain following total knee replacement. Pain. 2012; 153:2192–2203.

15. Tverskoy M, Braslavsky A, Mazor A, Ferman R, Kissin I. The peripheral effect of fentanyl on postoperative pain. Anesth Analg. 1998; 87:1121–1124.

16. Vance CG, Rakel BA, Blodgett NP, DeSantana JM, Amendola A, Zimmerman MB, Walsh DM, Sluka KA. Effects of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation on Pain, Pain Sensitivity, and Function in People With Knee Osteoarthritis:A Randomized Controlled Trial. Phys Ther. 2012

17. Barton NJ, Strickland IT, Bond SM, Brash HM, Bate ST, Wilson AW, Chessell IP, Reeve AJ, Mcqueen DS. Pressure application measurement （PAM）: a novel behavioural technique for measuring hypersensitivity in a rat model of joint pain. J Neurosci Methods. 2007; 163:67–75.

18. RANDALL LO, SELITTO JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1957; 111:409–419. Schafers M, Sorkin LS, Sommer C. Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats. Pain. 2003; 104:579–588.

19. Skyba DA, Radhakrishnan R, Sluka KA. Characterization of a method for measuring primary hyperalgesia of deep somatic tissue. Journal of Pain. 2005; 6:41–47. [PubMed: 15629417]

20. Arendt-Nielsen L, Nie H, Laursen MB, Laursen BS, Madeleine P, Simonsen OH, Graven-Nielsen T.Sensitization in patients with painful knee osteoarthritis. Pain. 2010; 149:573–581.

21. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brainstem stimulation in rats and cats. Pain. 1977; 4:161–174.

22. Blumberg H, Wolf PS, Dayton HB. Use Of Writhing Test For Evaluating Analgesic Activity Of Narcotic Antagonists. Proc Soc Exp Biol Med. 1965; 118:763–766.

23. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. Pain. 1996; 64:493–501.

24. Gabriel AF, Marcus MA, Honig WM, Walenkamp GH, Joosten EA. The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. J Neurosci Methods. 2007; 163:9–16. Cortright DN, Matson DJ, Broom DC. New Frontiers in assessing pain and analgesia in laboratory rodents. Expert Opinion on Drug Discovery. 2008; 3:1099–1108.

25. Cobos EJ, Ghasemlou N, Araldi D, Segal D, Duong K, Woolf CJ. Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: a nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. Pain. 2012; 153:876–884.

26. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain.Pain. 1996; 64:493–501.

27. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. Neurology. 2008; 70:1630–1635.

28. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. Annu Rev Neurosci. 2009; 32:1–32.

2.1.9 心血管疾病模型

2.1.9.1 簡介

心血管疾病是已開發國家國民主要死亡原因之一，且容易併發其他病症，而造成更高的死亡率。心血管疾病牽涉到許多複雜的病理因素，也涉及遺傳和環境因素，因此使它們非常難以預防。心血管疾病包括心臟和循環系統的所有疾病，包括動脈粥樣硬化、冠心病、先天性心臟病和中風等。動脈粥樣硬化通過緩慢進展的病變形成和動脈管腔狹窄引起腦血管疾病和冠心病，粥樣硬化斑塊破裂和血栓形成後，造成急性冠狀動脈綜合症，包括心肌梗塞或中風。近代社會許多心血管疾病的危險因子增加，如高血壓、肥胖和糖尿病導致心血管疾病的急劇上升，這些病症往往會進展為心衰竭。反過來說，這種綜合病徵可以定義為心臟結構或功能的異常，導致心臟無法以與代謝組織需求相稱的速率輸送氧氣，儘管填充壓力是正常的。它是許多不同心血管疾病常見的終末期症狀，因此被認為是多重因素和多重基因所造成的綜合症。

在過去十數年中，我們對心臟衰竭的理解和管理有相當大的進展，然而，隨著預期壽命的延長和急性心肌梗塞的死亡率降低，以及可能導致心臟衰竭的其他病症，該疾病的發病率、患病率、死亡率和經濟成本正在逐步增加。

心臟衰竭通常分為低收縮分率（ejection fraction，EF）心衰竭（failure with reduced ejection fraction，HFrEF）和正常收縮分率心衰竭（heart failure with preserved ejection fraction，HFpEF）兩類。儘管每種分類的定義存在爭議，但低收縮分率心衰竭與收縮功能障礙有關，其特徵是心肌無法收縮進而排出血液。反過來說，正常收縮分率心衰竭與舒張功能障礙有關，因此指的是由於心室舒張功能受損（主要影響舒張早期）或心肌僵硬度增加（主要影響舒張晚期），在低填充壓力下舒張期間干擾容納的血容量。除了在動物模式中複製單純的 HFpEF 相當困難之外，這些也比 HfrEF 費工而且耗時。因此，絕大多數動物模式都是為 HFrEF 開發的。同樣地，心衰竭可以影響右心室、左心室或兩個心室；然而，大多數動物模式均用於表現左心室衰竭。

本節我們將總結最常見的心血管疾病模式，包括在大型和小型動物中進行的模型，旨在幫助更精確完整地理解人類心血管疾病相關的每個層面，包括提供對病理生理學的重要見解，也是評估預測和預防這些心血管疾病的新治療策略的必要工具。

2.1.9.2 動脈粥樣硬化（atherosclerosis）模式

動脈粥樣硬化是一種複雜多因素的疾病，具有不同的病因，協同促成病變發展。小鼠模式已被證實可用於研究動脈粥樣硬化病變的形成和發展，並且文獻上也已廣泛討論了多種不同的可用模式。特別是動脈粥樣硬化的基因剔除（knockout）和基因轉殖（transgenic）小鼠模式，有助於理解動脈粥樣硬化形成中涉及的分子和細胞機制，以及評估新的和現有的動脈粥樣硬化藥物的有效性。

由於野生型小鼠（wild-type）對動脈粥樣硬化病變發展具有抗性，目前用於動脈粥樣硬化的小鼠模式主要是基於脂蛋白代謝的遺傳修飾以及額外的飲食改變。其中，低密度脂蛋白受體缺陷小鼠（LDLR -/- 小鼠）和載脂蛋白 E 缺陷小鼠（apoE -/- 小鼠）是最被廣泛使用的，在這些模式中看到的動脈粥樣硬化病變可能因高血壓或糖尿病等危險因子的加入而加劇。小鼠已被廣泛用作人類動脈粥樣硬化的模型，因為它們與其他物種相比具有優勢，如表 2.1.9-1。

表 2.1.9-1 動脈粥樣硬化的動物模型：優點和侷限性

	優點	侷限性
小鼠	1. 動脈粥樣硬化斑塊發展快速 2. 繁殖週期短 3. 每胎仔數多 4. 已知的基因組 5. 相對容易操縱的基因組 6. 相對便宜 7. 多種非侵入性儀器可用（如超音波、電腦斷層掃描、核磁共振、正子斷層掃描） 8. 豐富的經驗	1. 與人類只有部分相似之處 2. 動脈粥樣硬化比動脈粥樣硬化血栓形成模式更多 3. 血脂非常高
大鼠	1. 簡單、可取得、便宜 2. 有助於再狹窄分析研究	1. 不會發展動脈粥樣硬化
兔子	1. 體型適中 2. 纖維粥樣病變 3. 有用的再狹窄模式 4. 價格適中	1. 需要高血中膽固醇濃度 2. 沒有斑塊破裂模式 3. 血管內皮新生模式而不是動脈粥樣硬化的模式
豬	1. 病變更類似於人類疾病 2. 適用於再狹窄研究	1. 成本高 2. 操作不易 3. 基因操縱工具較少

（1）.低密度脂蛋白受體缺陷小鼠（LDLR -/- 小鼠）

LDLR -/- 小鼠代表由於影響低密度脂蛋白受體的一種突變導致的家族性高膽固醇血症模型，並且血漿脂蛋白形態與人類相似。遺傳上缺乏低密度脂蛋白受體的小鼠表現出極低密度脂蛋白（VLDL）和低密度脂蛋白（LDL）從血漿中的清除延遲。結果，LDLR -/- 小鼠表現出適度的血漿膽固醇濃度升高，並在正常的飼料餵飼過程中慢慢發展出動脈粥樣硬化。有趣的是，LDLR -/- 小鼠的高膽固醇血症和動脈粥樣硬化病變的嚴重程度可以通過以下方式來加速：餵食高脂肪及高膽固醇飲食，或通過將載脂蛋白 B（apoB）基因變異為不可編輯的形式，以及與瘦素（leptin）缺陷小鼠或與 apoB100 基因轉殖小鼠雜交。在這些條件下，主動脈中的病變可以超過泡沫細胞（foam-cell）脂肪堆積階段進展到纖維增生中間階段。

除了 LDLR -/- 小鼠外，LDLR 和 apoE 雙缺陷小鼠（LDLR -/- apoE -/-）即使在常規飼料中也會產生嚴重的高脂血症和動脈粥樣硬化，已被建議作為適合研究抗動脈粥樣硬化化合物作用的動物模式，而且不必給動物餵食致動脈粥樣化飲食。然而，LDLR -/- 和 LDLR -/- apoE -/- 小鼠對降血脂藥物治療的反應，不同於血漿膽固醇的降低而沒有動脈粥樣硬化減少，到有或沒有血漿膽固醇降低的弱病變減少。相反地，這些小鼠對過氧化物酶體增殖物激活受體（PPAR）或肝 X 受體的促效劑有明顯的反應。這種巨大的變異性說明 LDLR -/- 小鼠可能不適合分析藥物的膽固醇降低和抗動脈粥樣硬化作用。

（2）.載脂蛋白 E 缺陷小鼠（apoE -/- 小鼠）

1992 年，有兩個不同的研究團隊透過胚胎幹細胞中的同源重組同時產生了 apoE -/- 小鼠。由於通過 LDLR 和 LDLR 相關蛋白的清除失敗，apoE 基因缺陷小鼠的血漿 LDL 和 VLDL 濃度顯著增加。ApoE -/- 小鼠是第一個被提出，可發展出類似於人類在動脈粥樣硬化的形成及整個病變過程的小鼠模式。

在正常飲食條件下，apoE -/- 小鼠血漿膽固醇濃度顯著升高，並且它們形成的動脈粥樣硬化病變廣泛分佈於整個主動脈中，這種過程可能會因高脂肪飲食而加劇，且雌性小鼠比雄性小鼠更容易受到影響。對 apoE -/- 小鼠的動脈粥樣硬化病變發展的時間順序分析顯示，apoE -/- 小鼠與較大的動物模式以及人類的形成過程非常的相似。ApoE -/- 小鼠動脈粥樣硬化病變的好發部位是主動脈根部，其

次是主動脈弓、頭臂動脈幹、左頸動脈、鎖骨下動脈和冠狀動脈。主動脈病變從最初的脂肪堆積迅速發展，形成具有平滑肌細胞轉移進入的泡沫細胞，以及在中年小鼠中更複雜的病變。晚期病變是異質性的，但通常由壞死的核心組成，周圍是增生的平滑肌細胞和細胞外基質蛋白。

ApoE -/- 小鼠是目前研究動脈粥樣硬化使用最廣泛的動物模式。事實上，許多基因對動脈粥樣硬化發展的影響已經通過將 apoE -/- 小鼠與其他基因改造的動物雜交來檢驗。此外，apoE -/- 小鼠在以下方面可作為一種有用的工具：（i）通過候選基因和基因定位方法，鑑定動脈粥樣硬化易感性修飾基因，（ii）解密分子機制和參與動脈粥樣硬化形成的細胞類型，（iii）研究藥物對動脈粥樣硬化的影響，以及（iv）評估預防病變進展的新療法。在這個意義上，apoE -/- 小鼠模式用於測試史他汀類藥物（statins）的額外治療效果，超過僅僅歸因於膽固醇降低的那些動物模式。最早的觀察之一是辛伐他汀（simvastatin）對 apoE -/- 和 LDLR -/- 兩種小鼠的動脈粥樣硬化形成的效應是相互矛盾的。與辛伐他汀在 LDLR -/- 小鼠中的動脈粥樣硬化保護作用相反，年齡匹配的 apoE -/- 小鼠顯示血清總膽固醇升高和主動脈斑塊面積增加，因此表示辛伐他汀的治療效果可能取決於功能性 apoE 基因的存在。儘管如此，其他史他汀類藥物的抗動脈粥樣硬化作用已在 apoE -/- 小鼠中得到有效證實。其他幾種化合物，如血管收縮素 II（angiotensin II）受體拮抗劑或 PPAR 促進劑在不降低 apoE -/- 小鼠的血漿膽固醇的情形下，也會降低動脈粥樣硬化病變的程度和嚴重程度。然而，最近發現 PPARα 和 PPARγ 促進劑治療的 apoE -/- 小鼠動脈粥樣硬化的增加，與臨床上雙重治療造成的心血管副作用的發現一致。

然而，apoE -/- 小鼠模式的一個主要限制在於斑塊破裂和血栓形成的頻率，這是人類動脈粥樣硬化的兩種常見併發症。老年小鼠偶爾會發現缺血性心肌病，但有趣的是，當 apoE -/- 小鼠與清道夫受體（scavenger receptor）B 類 I 型或其銜接蛋白缺乏的小鼠雜交時，會快速發生冠狀動脈阻塞、心肌梗塞、甚至過早死亡，因此可用於模擬人類冠心病的許多基本特徵。

（3）.基因轉殖小鼠

基因轉殖技術提供了一系列非常有用的小鼠模式來研究高血脂症和動脈粥樣硬化。其中，表達 apoE 突變型的小鼠，例如 apoE3Leiden（E3L）和 apoE（Arg

112→Cys→142）基因轉殖小鼠，被廣泛研究。這些小鼠顯示出與患有異常脂蛋白血症的患者相當的脂蛋白情況，其中血漿總膽固醇和三酸甘油酯主要侷限於（V）LDL。E3L 基因轉殖小鼠患有動脈粥樣硬化病變，具有人類血管病變的所有特徵，從脂肪堆積到輕度、中度和重度斑塊不等。此外，E3L 轉基因小鼠和最近開發的 E3L /膽固醇酯轉運蛋白（CETP）基因轉殖小鼠已被證明對各種降血脂藥物和 PPAR 促進劑比 apoE -/- 和 LDLR -/- 小鼠更敏感。

（4）.糖尿病加速動脈粥樣硬化的小鼠模式

糖尿病是心血管疾病的高危險因子，糖尿病的心血管併發症主要表現為由加速的動脈粥樣硬化引起的缺血性心臟病，以及心肌病。有幾種模式可用於研究與糖尿病相關的動脈粥樣硬化和心肌病，包括 apoE -/- 和 LDLR -/- 小鼠，其中第一型糖尿病是由鏈脲佐菌素（streptozotocin，STZ）或病毒注射誘導的。在兩種小鼠中，糖尿病誘導均未顯著改變血脂濃度，從而可模擬第一型糖尿病患者中加速的動脈粥樣硬化。重要的是，STZ 注射的動脈粥樣硬化小鼠在主動脈竇、頸動脈和腹主動脈中表現出增加的動脈粥樣硬化，以及近端主動脈的鈣化。

簡而言之，小鼠模式在揭示炎症和免疫機制在動脈粥樣斑塊形成和發展中的重要性是非常有用的。最近，由於非侵入性核磁共振（MRI）可準確顯示病變的位置、大小和形狀，亦可區分小鼠動脈粥樣硬化斑塊中纖維和脂質的成分，因此在動脈粥樣硬化小鼠模型中使用 MRI 成像成為研究趨勢。結合非侵入性成像技術，動脈粥樣硬化的小鼠模式如今也用於測試新型造影劑，並用於偵測涉及高風險動脈粥樣硬化斑塊的特定分子。

（5）.支架內再狹窄之嚙齒類動物模式

小鼠再狹窄模式具有易於操作、成本效益低、高通量、可重複性和廣泛提供的分子標記的獨特優點。在小鼠中，由於技術具困難性高，所以限制了對新生內膜（neointima）增生的研究，雖然透過動脈損傷程序的改良，包括環氧樹脂（Epon）珠誘導的內皮剝脫、心導管鋼絲引起的損傷、動脈結紮、電損傷，以及股動脈或頸動脈周圍放置的非限制性 polyethylene 套環，但這些模式的應用有限，因為其血栓形成很少，誘導的新生內膜增生趨於平滑肌細胞為主，與人類病理標本幾乎沒有相似之處。此外，在應用於血管內治療時，抗再狹窄化合物的篩選需要全身給藥。後續開發的適用於評估支架內再狹窄療法的小鼠模式，包括使用能夠使藥

物溶出的 poly（e-caprolactone）套環，以及使用氣球損傷和放置血管內支架術。儘管操作程序上存在挑戰，但使用近交和遺傳修飾的小鼠模型時，這兩個模式可以提供對動脈粥樣硬化病理生理學和新生內膜增生以及血管損傷後再狹窄機制的深入了解。

自 20 世紀 60 年代以來，大鼠被廣泛用作各種有害刺激評估血管對損傷和平滑肌細胞增殖反應的模式。儘管大鼠模式和小鼠模式有同樣受到體型大小相關的限制，但技術的進步允許分別在大鼠頸動脈或主動脈中放置特別設計或商業製造的支架，研究指出頸動脈和主動脈兩種模式的血管反應和血管癒合速率類似。與頸動脈或胸主動脈模式相比，腹主動脈模式具有較小的技術難度，以及更大的新生內膜增殖性反應的優點。類似於小鼠模式，細胞蛋白質抗體的可用性，以及基因轉殖、糖尿病、肥胖和高血壓品種大鼠可使用，這些都有利於使用大鼠進行再狹窄的血管內研究。儘管如此，對大鼠動脈損傷模式仍有一定程度受到質疑；也就是說，以大鼠進行研究所發現的，具有抗再狹窄作用的化合物未能在其他臨床前模型或臨床試驗中得到類似的結果。這可能是由於在大鼠、靈長類動物和其他物種中對動脈損傷的反應所涉及的細胞和分子機制的差異所致。大鼠頸動脈和主動脈模式的血管癒合率似乎與定性使用較大物種的模式相似；然而，大鼠的血管反應具有與小鼠相似的顯著特徵，包括僅有稀疏的血栓形成和纖維蛋白沉積、很小的炎症反應，以及缺乏血管重塑過程。

小鼠模式對於動脈粥樣硬化和支架內再狹窄相關的病理生理機制研究有幫助；儘管如此，這些模式仍有一些缺點，所以研究人員需要謹慎應用和批判性解釋。例如，適合評估支架內再狹窄的小鼠動脈大多是富彈性的，與肌肉動脈相比，它們不易受到損傷，並且在血管損傷後僅具有中度的新生內膜增生反應。此外，彈性小動脈的血流動力學和血管舒縮功能與冠狀動脈本質上不一致，所以這些因素可能影響支架動力學、聚合物生物吸收和藥物釋出曲線，這些都有賴研究人員謹慎評估。

（6）. 其他動物模式

A. 兔子模式：

兔子餵飼高膽固醇飼料的模式已被廣泛用於實驗性動脈粥樣硬化。早在 1913 年，膽固醇被發現導致兔動脈內膜的動脈粥樣硬化病變，這與人類動脈粥樣硬化非常相似。藉由留置在主動脈的聚乙烯導管、氣球血管擴張術

（balloon angioplasty）或氮暴露重複或連續的血管內皮傷害，在正常兔子血管中也發生動脈粥樣硬化病變。因此，許多研究使用了具有高膽固醇的飲食，動脈壁損傷的模式，或者最常見的是這兩種方法的組合。在所有這些模式中，觀察到的損傷可部分地呈現在人類斑塊中看到的狀態，尤其是關於炎症反應的部分；然而血管平滑肌細胞增生則決定了病變程度。

兔子模型主要用於研究降血脂（透過飲食或 statins 類藥物）對動脈粥樣硬化斑塊形成和“穩定”的影響。這些研究有助於揭示降脂對於降低巨噬細胞積聚和動脈粥樣硬化炎症其他方面的機制。另有學者則建立了新的兔子模型，以檢查炎症對動脈粥樣硬化斑塊的影響，目的是研究類風濕性關節炎患者中動脈粥樣硬化特別嚴重的一些機制。簡而言之，該模型使用高脂血症的兔子，並使其股骨損傷，以及誘發急性膝關節炎等組合，這些動物比沒有炎症的動物發展出更嚴重的血管病變。

Shimizu 及其同事開發了動脈粥樣硬化斑塊破裂的兔子模型，結合了與高脂血症飲食相關的侵襲性血管損傷；組織學研究結果顯示，主動脈斑塊具有“易損斑塊”的三個特徵：富含脂質的核心、巨噬細胞的積聚和薄的纖維頂部。此外，還開發了低密度脂蛋白（LDL）受體缺陷型動物模型（WHHL 兔），該模型類似於人類家族性高膽固醇血症。

儘管兔子主動脈的血管直徑小於人頸動脈，但它們仍可用血管內治療裝置進行研究。此外，兔子模式透過 MRI 定量動脈粥樣硬化在主動脈的成分，可準確地量化動脈粥樣硬化的纖維化和脂質成分，並可能允許對動脈粥樣硬化斑塊穩定的治療策略進行連續分析。

B. 豬模式：

預防心臟病發作和中風，取決於易損斑塊的檢測和斑塊穩定療法的發展。目前，沒有單一和黃金標準的易損斑塊動物模型，但豬模式可能是重建人體斑塊不穩定的最佳方式。糖尿病和高膽固醇血症的組合構成了加速動脈粥樣硬化的良好模式，另外已有幾種先進的類似人冠狀動脈粥樣硬化的豬模式，可用來分析冠狀動脈成像技術的發展和驗證。這種動物模型也可用於心臟病學新興技術發展，以及研究藥物支架。此外，豬冠狀動脈粥樣硬化模式可以檢測新生血管外膜形成對動脈粥樣硬化斑塊成分和血管重塑的影響。

2.1.9.3 心衰竭模式

小動物的心臟病模式，特別是大鼠，對於藥理學療法的評估非常有用。此外，在遺傳修飾的小鼠模式中已經鑑定了數個標的基因，研究也已證明許多這些基因在心臟病的發生和發展中至關重要。接下來將介紹目前用於研究心衰竭的動物模式，這些模式總結在表 2.1.9-2 中。

表 2.1.9-2 誘導動物心臟損傷的模式

動物種類	心衰竭模式
大鼠、小鼠	心肌損傷模式 化學方式：異丙腎上腺素（isoproterenol）給藥 電燒方式：重疊燒灼 手術方式：冠狀動脈結紮 心肌缺血—再灌注模式：冠狀動脈左支的短暫性閉塞 心肌肥大—壓力過載模式：主動脈縮窄綁紮；主動脈瓣狹窄 心肌肥大—體積過載模式：動靜脈分流或瘻管 基因轉殖的擴張型心肌病模式：心肌 α-肌動蛋白的突變 尿毒性心肌病模式：5/6 部分腎臟切除術 藥物誘導的擴張性心肌病模式：艾黴素（Doxorubicin）注射
兔子	自發性模式：心肌梗塞型兔子（myocardial infarction-prone WHHL rabbits，WHHLMI）（Watanabe heritable hyperlipidemic，WHHL） 冠狀動脈閉塞模式：類似於小鼠模式，也適用於頸動脈，是一個很好的測試血管內治療的模型 壓力超負荷模式：主動脈綁紮；脈瓣狹窄
狗	微栓塞模式 心搏過速模式：心室安裝心律調節器 壓力過載模式：主動脈瓣狹窄
豬	手術模式：氣球阻塞冠狀動脈 心動過速模式：安裝心律調節器引起的室上性心搏過速

（1）.心肌損傷模式

大鼠模式對心臟損傷的研究是很受歡迎的，因為大鼠除了具有小鼠的許多優點（低成本、易於處理等），它們較大的體型使手術和術後程序更容易執行。手術方法最早是由 Pfeffer 及其同事所提出，主要是結紮冠狀動脈左前支。在此手術過程中，對麻醉的大鼠進行左胸廓切開術，並且通過在胸腔右側的輕微加壓使心臟快速外露。之後將冠狀動脈左前支位於肺動脈流出道和左心房之間結紮或熱燒灼，然後心臟恢復到正常位置，胸腔立即關閉。此手術已被許多研究者導入了若干修改以改善表現和降低動物死亡率，並且左冠狀動脈結紮是在大鼠和其他動

物模型中誘導心肌梗塞損傷的最常見方法。另一個重要的修改是暫時性閉塞，然後再灌注，即允許先前閉塞的冠狀動脈恢復血液流動。因此，左冠狀動脈結紮可用於評估由永久性缺血或缺血—再灌注後引起的各種參數。

以藥物誘導心臟損傷的實驗最早是由 Bagdon 等於 1963 年發表，他們使用 β-1 腎上腺素受體（adrenergic receptor）促進劑 isoproterenol 誘導心臟損傷。在大鼠心臟缺血前給予 isoproterenol，它會發揮心臟保護作用；然而在適當的劑量下，它會造成心肌細胞壞死，並引起廣泛的左心室擴張和肥大。大鼠左冠狀動脈結紮和 isoproterenol 給藥誘導心臟損傷是有效且可重複的方法，其可提供關於人類心臟病的潛在機制的重要訊息。

電燒方式是將被麻醉的大鼠心臟暴露出來後，以烙鐵的尖端，約 2mm，由左心室的心外膜重疊燒灼心肌。雖然這也是一種有效的方法，但電燒方式產生的心臟損傷程度並不一致，這限制了用這種方法獲得的結果的可重複性。

相對於使用小鼠的許多一般優點（易於操作、低懷孕時間等），研究人員選擇牠們作為心衰竭的模式必須考慮兩個重要的侷限性：心臟的小尺寸和相對於人體心血管系統的結構差異。儘管如此，基因轉殖和基因剔除小鼠的廣泛被使用，以及可以相對容易的引入新的遺傳修飾，使得小鼠成為用於研究心衰竭的分子基礎最有吸引力的模型之一，並且由於技術及設備的精進，上述的心肌損傷模式也都已應用於小鼠。

（2）.心肌缺血–再灌注模式

小鼠心衰竭最廣泛使用的模式之一是左心室冠狀動脈結紮手術，其作法與大鼠的手術方法類似，只是需要更精細的操作及純熟的技術。同樣的，它可以用來評估永久性缺血或缺血-再灌注損傷，以再現病人心臟病的狀況。在該方法中，左前降支冠狀動脈被閉塞，然後鬆開閉塞處使血液再灌注至心肌；再灌注過程可以目視監測，也可以通過非侵入性高頻率超音波進行實時記錄。另外，也可以藉由組織病理學技術分析梗塞部位，分析方法是使用伊文思藍染料（Evans blue dye）和氯化三苯基四唑染色（triphenyltetrazolium chloride）顯示風險區域（areas at risk）和梗塞面積，再以電腦軟體進行測量與評估。此模式也被進一步修改，用以分析缺血前提下的心臟，操作方法是左冠狀動脈被反復閉塞以使心臟經歷幾次的短暫缺血和再灌注，最後是永久性閉塞。此方法已經鑑定出幾種缺血狀態下誘發的基因，其可增加對隨後的缺血事件的耐受性。

另一種心肌缺血的模式是以冷凍傷害造成心肌損傷，方法是使用預先浸入液態氮中冷卻的金屬探針，將冷卻的金屬探針接觸到左心室壁上數次，以造成心肌損傷。研究顯示，此法可形成穩定的心肌損傷模式。

（3）.心肌肥大–壓力過載模式

主動脈縮窄（綁紮）是一種成熟的手術技術，可誘導左心室慢性壓力過載和肥大。一種方式是在動物年輕時進行手術綁紮主動脈，最初，綁紮部位對主動脈血流幾乎沒有影響，但隨著動物的生長，收縮的嚴重程度逐漸增加，導致心臟肥大；另一方式是直接綁紮並縮窄主動脈管徑，使心臟肥大；前者需要較長的時間，而後者則可以在較短時間內形成心臟肥大。綁紮的部位可以在幾個主動脈段施行，如主動脈的上行主動脈段綁紮（Aorta ascendens constriction，AAC）、橫向主動脈段綁紮（Thoracic aorta constriction，TAC）或上/下腎-腹主動脈。這些模式已被用於機械地再現主動脈瓣狹窄、主動脈縮窄和系統性高血壓的心臟後果。疾病進展的時間表取決於所選擇的物種、年齡、性別、解剖位置或縮窄程度。

與其他高血壓或心衰竭模式相比，這些綁紮模式所具有的主要優點之一是能夠通過改變縮窄嚴重程度來控制壓力過載的程度。關於胸主動脈縮窄綁紮模式，主要優點是與人類心衰竭進展相似，特別是對於主動脈瓣狹窄患者。因此，其特徵在於初始代償期，左心室同心肥大隨後伴隨左心室功能進一步惡化的心室擴大。TAC 模式的另一個優點是很多相關研究資訊可供參考，它最早在 1994 年由 Rockman 所發表，並且從那時起被廣泛使用，特別是在小鼠中，除了以傳統的胸廓切開術進行外，更可經由近端胸骨中的小切口進行微創主動脈綁紮，大大減低手術風險，提高此模式的成功率。最後，TAC 模式後可利用心臟超音波進行主動脈收縮的壓力梯度量化和左心室肥大的分級，並且持續觀察疾病進展。這兩個模式的缺點在於需要較高的顯微手術技術、手術方法較複雜和設備需求。腹主動脈綁紮模式主要優點在於手術相對簡單，同時與綁紮相關的死亡率較低（10%）。然而，在一些研究中顯示，腹主動脈綁紮模式會激活腎素-血管收縮素-醛固酮系統（RAAS），這也限制了其應用性。此外，由於這些模式的左心室鬆弛率降低，所以對於評估舒張功能障礙相當有價值，因為舒張功能障礙是左心室衰竭進展的重要因素。此外，對於心衰竭的刺激是逐漸發作的，因為病人是從代償性的心室肥大進展到心衰竭的，因此使其與臨床上應用更為相關。

（4）.心肌肥大–體積過載模式

動靜脈分流或瘻管可用來誘發嚙齒動物體積過載，造成心臟肥大以及後來的擴張性心肌病和心衰竭。股動脈至股靜脈或主動脈至大靜脈瘻管雖可導致心衰竭，但在所有研究中死亡率均高於 25%。相較之下，主動脈腔靜脈分流術是一種相對簡單和快速的替代方案，可以誘導心衰竭、具有良好的存活率且無需進行胸廓切開術。與大鼠相比，關於小鼠動靜脈分流的心臟後果的報導仍然很少。手術方法是先通過腹中線切口打開腹腔暴露腔靜脈和腹主動脈，主動脈在腎動脈到後端分叉之間有一小段腔靜脈和腹主動脈相鄰的部位，用 18 號的針頭刺入主動脈，將針推進主動脈，穿透其相鄰的壁並穿透腔靜脈，接著將牛頭犬血管鉗放置在左腎動脈尾側的主動脈上，以防止大出血；一旦主動脈被夾住，針就完全撤回，並用一滴氰基丙烯酸酯膠密封主動脈穿刺點。此方法的優點是，儘管需要剖腹手術，但手術相對快速，而且通常動物耐受性良好。然而，有 7%的病例顯示了分流閉合，這意味著在研究結束時有必要確認分流的通暢性。

（5）.基因改造小鼠的擴張性心肌病模式

分子生物學的發展提供了研究特定基因過度表達或缺失時，與鬱血性心衰竭的病理學關聯性的機會。實際上，基因轉殖小鼠模型將有助於理解鬱血性心衰竭的分子基礎，這可能為其治療的新分子標的開發打開了大門。在小鼠中已成功地引入了大量遺傳基因修飾，有助於研究其在功能獲得和功能喪失結果。已知具有突變或缺乏某些細胞骨架基因的小鼠會引起擴張性心肌病（DCM）。肌營養不良蛋白（dystrophin）基因剔除小鼠就是這種情況，其發展出與人類相似的嚴重肌營養不良症和心肌病。其他基因剔除小鼠，如肌肉 LIM 蛋白、melusin、腫瘤壞死因子-α（TNF-α）、蛋白激酶 C-β2（PKC-β2）和鈣調蛋白激酶 II 等基因剔除後，小鼠也顯示出病人擴張性心肌病的表現特徵。除遺傳修飾的小鼠外，只有少數動物模式能夠令人滿意地模擬擴張性心肌病，如 SHHF/Mcp-fa^{cp}，無論性別或基因型如何，最終都會發生自發性擴張性心肌病，伴隨有皮下水腫、呼吸困難、紫紺、嗜睡、心臟擴大、心室增厚、心腔擴張、腹水、肺水腫和胸腔積液。超過 5000 個心臟基因轉殖及剔除研究現已發表，請參閱下列連結：http://circres.ahajournals.org/cgi/collection/animal_models_of_human_disease。雖然

它們本身不是疾病模型，但它們已經證明對於研究個體信號傳導途徑或研究個體基因的作用是不可或缺的。

（6）.小鼠尿毒性心肌病模式

慢性腎功能衰竭（CKD），隨著時間的推移逐漸喪失腎功能，最終發展成永久性腎衰竭。慢性腎功能衰竭從早期腎病狀態到終末期腎病（ESRD），是心血管疾病和死亡的重要危險因子，並且逐漸發展為稱為“尿毒症心肌病”的臨床表型。CKD 或 ESRD 患者的尿毒症心肌病與心血管異常有關，主要由左心室壓力和/或體積超過負荷引起，導致左心室肥厚、左心室擴張和左心室收縮功能障礙。心臟纖維化是尿毒症心肌病的另一種常見病理過程，其降低心臟順應性，導致左心室舒張功能障礙。即使沒有心臟症狀的患者，嚴重的心臟纖維化也可導致心源性猝死。

5/6 部分腎臟切除術（$5/6^{th}$ partial nephrectomy，$5/6^{th}$ PNx）是用於腎衰竭、尿毒症心肌病和高血壓研究常用的 CKD 動物模式。$5/6^{th}$ PNx 是藉由使 5/6 腎實質失去功能來產生尿毒症，最初開發的大鼠模式採用兩種最常用的方案，即手術切除或梗塞。大鼠 PNx 模型是研究尿毒症心肌病的極其有用的模式，其具有顯著升高的血壓、心臟肥大和舒張功能受損等。後來，由於在小鼠進行遺傳基因操作的廣泛可用性和易用性，於是開發了與大鼠模式類似的技術操作的小鼠 $5/6^{th}$ PNx 模式。

小鼠的 $5/6^{th}$ PNx 模式通過兩步驟手術進行，在第一次手術中，左腎的兩端都被結紮；在第一次手術後 7 天進行的第二次手術，將右腎全摘除，第二次手術後 4 週即可發展為尿毒症心肌病；此種 $5/6^{th}$ PNx 模式與其他方法相比，外科手術更容易且耗時更少；然而它的缺點是殘餘功能性腎臟質量不像腎動脈結紮那樣容易控制。手術後 4 週 $5/6^{th}$ PNx 模式小鼠出現腎功能受損、貧血、心臟肥大、心臟纖維化、心臟收縮和舒張功能下降。

（7）.藥物誘導的擴張性心肌病模式

艾黴素（Doxorubicin，Adriamycin，DOX）是一種蒽環黴素（anthracycline），其廣泛用於細胞抑制癌症治療的藥物。在人類，DOX 治療的主要長期結果之一是會發展成劑量依賴性心肌病，並最終形成充血性心衰竭。因此，了解心臟毒性

心肌病的發病機制對於開發預防與抗腫瘤治療相關的心臟毒性的新療法至關重要。

DOX 每週給藥一次，連續 6 週；或隔天給藥持續 2 週，已經顯示在嚙齒動物中會誘導心肌病和心衰竭；而在兔子中，每週兩次注射，3 個月後可觀察到第一次異常。有趣的是，研究已經顯示，在小鼠單次靜脈內施打 DOX，在 5 天後可誘發顯著的左心室功能障礙，而其冠狀動脈內注射允許較小劑量的 DOX 誘導心衰竭而沒有全身毒性。DOX 誘導的心肌病的特徵在於心室壁變薄和擴張（質量-體積比降低）、收縮和舒張功能降低、以及伴隨液體留滯和神經荷爾蒙的活化。在心肌層面，DOX 促進內在的收縮功能障礙和減少收縮儲備。此外，DOX 損害血管以及心臟內皮功能並誘導心臟中的炎症反應，導致心房和心肌炎的血栓形成。

Anthracycline 類藥物誘導的心臟細胞損傷有多種途徑被提出，例如釋放在心肌細胞中積累的心臟毒性物質、自由基的產生、脂質過氧化以及 DNA、RNA 和蛋白質合成的抑制。其他研究指出心臟毒性途徑包括 Ca^{2+}處理異常、誘導粒線體 DNA 損傷、肌纖維和細胞骨架蛋白的降解，包括肌動蛋白和肌營養不良蛋白，以及干擾各種促生存激酶和腎上腺素能和腺苷酸環化酶功能的變化。所有這些機制都可能導致心肌細胞損傷，最終導致肌細胞死亡，無論是壞死還是細胞凋亡。

DOX 心衰竭誘導模式具誘導時間短、技術簡單、再現性佳、非侵入性以及經濟的優點，此外，它可用於幾種動物物種以引發慢性或急性心衰竭。此模式的主要侷限性在於心室功能不全程度的變化，以及導致高死亡率的心律不整的高發生率。重要的是，已知 DOX 心臟毒性是劑量依賴性的，並且可以在其給藥期間和之後 2-3 天內出現心衰竭症狀，或者在最後一次給藥後 30 天內出現。在人類，甚至在其給藥後 6 到 10 年也可能發生。蒽環類藥物也具有不希望的骨髓、胃腸和腎毒性，但可以通過冠狀動脈內注射給藥來避免。

（8）. 其他動物模式

小動物模型提供了對人類心臟病理生理學的重要見解，然而，嚙齒動物和人類心臟的結構、心跳速率、耗氧量、收縮性、蛋白質表達、甚至幹細胞群體都不同，因此顯然需要大型動物的心衰竭模式進行臨床前的試驗。用於研究心衰竭的第一批大型動物是狗，已經開發了心肌梗塞模型和冠狀動脈的連續微栓塞模式。

然而，心臟損傷的優選大型動物模式是豬，因為豬的側支冠狀動脈循環和動脈解剖結構和人非常相似，並且可以準確地預測梗塞面積。在豬的幾種心肌缺血模式中，最廣泛使用的一種是以氣球將冠狀動脈左前降支閉塞，在該模式中，由股動脈插入心導管，將血管成形術導管將氣球定位在遠離冠狀動脈的第二大對角線分支的位置處上，並且通過氣球充氣阻斷血流誘發心肌梗塞。豬和人的心臟大小相似和類似的生理學意味著該模式比其他物種的模型具有更大的優勢。然而，該方法需要專門的設備、專用的外科設施和技術人員，限制了能夠進行這些研究的實驗室數量。

兔子比豬便宜得多，提供了妥協的解決方案。心衰竭的兔模式，包括冠狀動脈閉塞模式，與其他物種相比具有重大優勢。例如，兔子的肌原纖維蛋白質的組成與人類相似，並且肌纖維網（sarcolemmic reticulum）可消除約 70%的鈣。此外，WHHLMI 兔提供了一種無需外科手術干預的自發性心肌梗塞模式，此模型是透過選擇性繁殖冠狀動脈粥樣硬化 WHHL 兔（Watanabe heritable hyperlipidemic，WHHL）而開發出來的。WHHLMI 模式的主要侷限在於它不具有動脈粥樣硬化斑塊破裂，而在人類中，冠狀動脈斑塊破裂和隨後的血管內血栓形成是急性心肌梗塞的主要原因。儘管存在這種限制，該模型對於研究動脈粥樣硬化相關的心臟併發症也是有效的。

中大型動物心衰竭的另一個模式是左心室的壓力過載，類似大小鼠的橫向主動脈綁紮也可應用在兔子和犬的模式上。犬和豬也可以通過安裝左心室心律調節器誘發心搏過速產生左心室肥大或擴張模式。

2.1.9.4 腹腔動脈瘤模式

動脈粥樣硬化血栓形成腹腔動脈瘤（Abdominal Aortic Aneurysms，AAA）的動物模式是用於研究抑制動脈瘤變性的新治療策略的臨床前評估的必要工具。近年來，對人類 AAA 機制的見解多來自於小鼠模型的研究，彈性蛋白酶（elastase）誘發的 AAA 尤其和人類 AAA 的許多特徵相當類似。本節將簡要概述最常用的 AAA 模型，並介紹最近關於其他動物模型的綜合評論。

（1）. 氯化鈣誘導的 AAA

此方法最初是在兔子模式中所開發的，方法是在腎動脈和髂動脈分叉之間的區域周期性地施用氯化鈣；在 14 天左右可觀察到主動脈有顯著地擴張，如果氯

化鈣與巰基乙酸鹽（thioglycolate）一起施用，並給予動物餵食高膽固醇飲食，則嚴重性會顯著增加。與其他模式不同的是，用氯化鈣誘發 AAA 不需要其他機械性的處理。

（2）.彈性蛋白酶誘導的 AAA

此模式在小鼠的應用是由 Pyo 等人將原彈性蛋白酶誘導的模式修改使適用於小鼠。小鼠主動脈中的彈性蛋白酶灌注最初引起輕度至中度的擴張，隨後在 14 天內逐漸使主動脈直徑擴張超過 100%。在此模式中，內側彈性蛋白的降解被延遲，並且隨後的主動脈壁炎症由整個外膜和內側層中的單核吞噬細胞組成，在外膜的多核細胞相對較少。彈性蛋白酶誘導的損傷增加基質金屬蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）、組織蛋白酶（cathepsins）和其他蛋白酶的表達，且 MMP-9 被發現位於動脈瘤周圍浸潤性的巨噬細胞。因此，彈性蛋白酶誘導的 AAA 似乎重現了人類 AAA 的許多特徵，並且該模式已經成為系統地評估個體基因產物在動脈瘤變性中的作用的有價值且方便的工具。

與氯化鈣誘導的 AAA 相比，此法的主要侷限在於重建內側彈性降解所需的機械應力。然而，彈性蛋白酶誘發的 AAA 類似於導致人類 AAA 的時間過程，包括初期白血球和肥大細胞（mast cells）的聚集，透壁主動脈壁炎症反應的發展，以及最終細胞外基質金屬蛋白酶和其他蛋白酶的上調，其誘導進行內側彈性蛋白和膠原蛋白的降解，導致最終的主動脈擴張。

（3）.血管收縮素 II（Angiotensin II）誘導的 AAA

此模式的開發原先是研究血管收縮素 II（Ang II）的血漿濃度增加是否對高脂血症 apoE -/- 小鼠的致動脈粥樣化過程具有直接影響。出乎意料的是，Ang II 還在這些動物中產生了大的腎上腹主動脈瘤。此模式中，血管壁的炎症與通過 AT1a 受體的信號傳導相關，核因子（NF-）kappaB 介導的促炎基因的誘導，包括 MCP-1、M-CSF、iNOS、COX-2、PPAR 的抑制，激活 NADPH 氧化酶 p47phox、c-JUN Nterminal、Rho 激酶，以及巨噬細胞和細胞外基質成分和降解酶的增強募集，導致血管解剖構造的破裂。儘管在這些模式中，高脂血症本身和動脈粥樣硬化都不是主要決定因素，但與正常血脂的 C57BL/6 小鼠相比，高脂血症 apoE -/- 或 LDLR -/- 雄性小鼠的 AAA 嚴重程度更高（約 60%的小鼠）。此模式有助於證明腎素-血管收縮素（RAS）系統在動脈瘤疾病中的意義。然而，應考慮兩個主

要限制：動脈瘤的位置（此模式發生在腎上與人類的腎下位置相反）和 RAS 抑制的臨床相關性，因為 RAS 在人類 AAA 中的關聯提供了有爭議的結果，所以必須有進一步的研究。

（4）.胸主動脈瘤（TAA）

胸主動脈瘤（Thoracic aortic aneurysm，TAA）的發展與彈性組織退化有關，小鼠模式顯著提升了對其病理學的理解。TAA 是馬凡綜合症（Marfan syndrome，MFS）的一個特徵，這是一種由影響細胞外基質蛋白原纖維蛋白-1 結構或表達的突變引起的疾病，纖維蛋白-1 是一種與細胞外蛋白相關的糖蛋白，包括整合素受體（integrin receptors）和不溶性彈性蛋白。馬凡綜合症中的纖維蛋白-1 突變降低潛伏 TGFβ 的 ECM 螯合，從而使其更易於激活；TAA 的進展由彈性纖維鈣化、血管壁炎症、內膜增生、血管壁結構塌陷、MAP 激酶信號傳導的激活受損以及 ECM 蛋白和基質金屬蛋白酶（MMPs）的合成改變所驅動。使用 TGFβ 拮抗劑的全身給藥已成功用於減輕 MFS 小鼠模式和嚴重且快速進展的 MFS 病童的血管疾病。

（5）.其他動物模式

在小鼠中使用的幾種相同的模式也在兔子中實施，包括彈性蛋白酶注射和在腹主動脈施予氯化鈣。在兔子中使用的另一種模式是在右頸動脈中注入彈性蛋白酶。兔子模式的主要優點是兔動脈瘤在血液動力學和組織學上更接近人類動脈瘤。此外，與大型動物相似，兔動脈瘤可以通過股動脈進入監測，從而為血管內治療提供了一個很好的模型。

豬的 AAA 模式提供了關於 AAA 誘導後發生的變化以及對支架放置的影響的重要訊息。最近開發的豬模式是由兩個部分相結合，一是經由氣球血管擴張成形術進行機械性擴張，再加上注入膠原酶/彈性蛋白酶溶液促進降解。此模式的特徵在於主動脈壁彈性纖維的降解、炎性細胞浸潤和持續的平滑肌細胞損失相關，並逐漸造成 AAA 擴張。本模式和人類 AAA 有許多相似之處，並且該程序也可以用來評估血管內相關事件。然而，儘管有優點，但是豬具有顯著的缺點，包括複雜的動物處理、需要較多的手術室設施、動物的成本增加以及每次測定的樣本數較小等。

2.1.9.5 參考資料

1. G. S. Getz and C. A. Reardon, “Diet and murine atherosclerosis,” Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 26, no. 2, pp. 242–249, 2006.
2. K. S. Meir and E. Leitersdorf, “Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: a decade of progress,” Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 24, no. 6, pp. 1006–1014, 2004.
3. S. Zadelaar, R. Kleemann, L. Verschuren et al., “Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers,” Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 27, no. 8, pp. 1706–1721, 2007.
4. J. F. Bentzon and E. Falk, “Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease?” Current Opinion in Lipidology, vol. 21, no. 5, pp. 434–440, 2010.
5. L. Powell-Braxton, M. V´eniant, R. D. Latvala et al., “A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet,” Nature Medicine, vol. 4, no. 8, pp. 934–938, 1998.
6. J. Jawie ´ n, P. Nastałek, and R. Korbut, “Mouse models of experimental atherosclerosis,” Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 55, no. 3, pp. 503–517, 2004.
7. C. Zaragoza, C. Gomez-Guerrero, J. LuisMartin-Ventura et al., “AnimalModels of Cardiovascular Diseases” Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2011, Article ID 497841, 13 pages
8. T. R. Lizarbe, C. Tar´ın,M. G´omez et al., “Nitric oxide induces the progression of abdominal aortic aneurysms through the matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN,” American Journal of Pathology, vol. 175, no. 4, pp. 1421–1430, 2009.
9. YI. X. Wang, B. Martin-McNulty, V. Da Cunha et al., “Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates angiotensin Iiinduced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein Edeficient mice by inhibiting apoptosis and proteolysis,” Circulation, vol. 111, no. 17, pp. 2219–2226, 2005.
10. L. A. Cassis, M. Gupte, S. Thayer et al., “ANG II infusion promotes abdominal aortic aneurysms independent of increased blood pressure in hypercholesterolemic mice,” American Journal of Physiology, vol. 296, no. 5, pp. H1660–H1665, 2009.
11. H. Toko, H. Takahashi, Y. Kayama et al., “Ca2+/calmodulindependent kinase IIδ causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy,” Circulation, vol. 122, no. 9, pp. 891–899, 2010.
12. M. Shiomi, S. Yamada, A. Matsukawa, H. Itabe, and T. Ito, “Invasion of atheromatous plaques into tunica media causes coronary outward remodeling in WHHLMI rabbits,” Atherosclerosis, vol. 198, no. 2, pp. 287–293, 2008.
13. M. B. West, G. Rokosh, D. Obal et al., “Cardiac myocytespecific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventingmitochondrial permeability transition,” Circulation, vol. 118, no. 19, pp. 1970–1978, 2008.
14. R. Garcia, S. Diebold, “Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat.” Cardiovasc Res., vol. 24, pp.430–432, 1990

15. Falcão-Pires and A. F. Leite-Moreira, “Animal Models of Cardiovascular Disease” D.V. Cokkinos （ed.）, Introduction to Translational Cardiovascular Research, Springer International Publishing Switzerland, pp. 335-369, 2015
16. J.L. O'Connell, M.M. Romano, E.C. Campos Pulici et al., “Short-term and long-term models of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats: A comparison of functional and histopathological changes” Exp Toxicol Pathol. vol. 69（4）, pp. 213-219, 2017
17. C. Weber, H. Noels, “Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options” Nature Medicine, vol. 17, no. 11, pp. 1410-1422, 2011
18. S. H. Kim, K.-J. Kim, J.-H. Kim et al., “Comparision of doxorubicin-induced cardiotoxicity in the ICR mice of different sources” Lab Anim Res vol. 33, no. 2, pp. 165-170, 2017
19. A.C. Gomes, I. F alcao-Pires, A.L. Pires, et al., “Rodent models of heart failure: an updated review.” Heart Fail Rev. vol. 18, pp. 219–49. 2013

2.1.10 高血壓動物模式（Hypertensive Animal Model）

2.1.10.1 簡介

高血壓是導致心血管疾病發展的最重要的風險因素之一，並且在全球每年1700 萬人死亡中佔 50%以上。它是一種異質性疾病，具有多種病因和多種相互作用的遺傳和環境因素，其發病率隨年齡、血漿腎素活性和鈉敏感性而變化。動物模式的使用增加了我們對疾病過程的理解，因為它們藉由控制不同的變因來進行研究。但是，沒有一個模型是理想的，歷史上重要的模型，提高了我們對高血壓的理解。高血壓定義為收縮壓和舒張壓（SBP / DBP）分別大於 140 和 90 mmHg。SBP 在 120 和 139 mgHg 之間，或 DBP 在 80 和 89 mmHg 之間的個體據說表現出高血壓前期。

人類高血壓主要分成原發性高血壓，大約為高血壓患者 90%以上，5%左右之患者為繼發性高血壓。原發性高血壓以現代醫學之各種檢查，還無法找出確切病因，僅知具遺傳傾向，父母有高血壓病史，子女罹患高血壓之機率增加，此種病人必須長期服用降血壓藥物，而各人之用藥種類及劑量也不相同。繼發性高血壓可由腎上腺、腎臟病變、主動脈狹窄、甲狀腺機能過高及中樞神經病變等引起。高血壓為心血管疾病中最主要的危險因素，長期的高血壓為導致腦中風、冠狀動脈栓塞、心肌梗塞、心衰竭及腎功能不良之主要原因，我國人之高血壓罹患率不低（18 歲以上年齡，平均約 14%），而多數之高血壓患者並未接受治療且有效控制血壓，因此造成腦中風及心肌栓塞之高盛行率，成為醫療照應之大問題。因此廣泛及深入的探討高血壓，首先必須確立一種動物模式，以高血壓為例，也就是在一種動物身上產生持續性的高血壓，利用此動物來研究高血壓的成因、機轉，以及可能產生的病變，然後以研究所得資料選擇而應用於人體身上。醫學的研究者對於若干繼發性高血壓動物模式的確立有很大進展，近五十年間，更成功完成自發或遺傳性高血壓動物的純種育養，由此展開了高血壓成因的探討，雖然有若干論點仍未確定，但是對於人類高血壓的成因已提供了不少線索，高血壓動物模式的發展也是經過長期努力的結果。

2.1.10.2 動物模型分類

（1）.物理性動物模式

腎性高血壓模式：模擬腎動脈狹窄的腎狹模型首先在狗中進行，已經逐漸被較小的動物取代。

A. 一腎一狹窄（左側腎動脈狹窄，右腎切除）腎血管性高血壓大鼠模型：

取雄性 Wistar 大鼠，體重 250-300 g，麻醉，切除右腎，分離左腎動脈，讓左腎動脈狹窄至原直徑 1/3。這樣做後大鼠尾動脈收縮壓逐漸升高，第 8 週上升至高峰（平均 165 mmHg），此後血壓維持在高峰，不再明顯升高。

血壓升高機制是由於切除一側腎臟，另一側腎動脈狹窄，造成該側腎動脈缺血，故其血壓升高主要是由於鈉滯留、腎素-血管收縮素以及交感神經活性增高所致。該模型由於成功率較低，血壓不能持續上升，限制了其使用範圍，目前已較少使用。

B. 兩腎一狹窄模型（左側腎動脈狹窄，右側腎保留）腎血管性高血壓大鼠模型：

大鼠麻醉，腹部切創，分離左腎周圍脂肪組織，小心分離左腎靜脈，用絲線環繞左腎動脈，造成左腎動脈狹窄。血壓升高機制由於狹窄一側腎動脈，造成該側腎臟缺血，而另一側腎臟不動，故其血壓升高主要是由於腎臟缺血而造成腎素增多，進而使血管收縮素含量增高所致。

該模型具有簡單、成功率高及一致性強等優點，與人類高血壓病理過程相似，是國際上最常用的經典的高血壓動物模型，它是目前篩選降壓藥物中選用較多的一種模型。也可在此實驗模型基礎上加飲用 2%Nacl 溶液。鈉水滯留和血容量擴張可能是血壓升高的重要原因。

C. 雙腎雙狹窄型腎血管高血壓大鼠模型：

主要是雙側腎臟持續缺血啟動腎素-血管收縮素，血管收縮素升高不僅直接收縮血管，而且增加交感神經遞質的釋放及醛固酮和內皮素等活性物質的釋放，最終導致高血壓形成。

優點：該模型血壓數值高且穩定，隨觀察時間的延長，血壓水準繼續穩步升高，與人類高血壓病的血壓演變過程基本一致。而上述其他類型的腎血管高血壓大鼠血壓數值多在 180 mmHg 左右，且隨觀察時間的延長，血壓水準有所下降，甚至恢復到正常水準。雙腎雙狹腎血管性大鼠術後兩週血壓急

速上升，血壓走勢與雄性自發性高血壓大鼠趨於一致，具備了自發性高血壓大鼠血壓長期穩定並隨鼠齡增長而逐漸增加的特點。雙腎雙狹腎血管性高血壓大鼠能產生與自發性高血壓大鼠相似的血壓數值以及心腦血管併發症，如果在實驗中僅從高血壓這單一因素引起身體其他器官併發症考慮，雙腎雙狹腎血管性大鼠能彌補自發性高血壓大鼠某些方面的不足，而且還有動物來源廣泛、價格便宜、飼養容易、模型複製方法簡單等優點。

因雙腎雙狹窄型腎血管高血壓大鼠模型之自發性腦中風發生率可達56.4%，故又稱其為易中風腎血管性高血壓大鼠。選用體重為 90-120 g 鼠齡的雄性 SD 大鼠，在無菌操作下經腹正中縱切，依次鈍剝分離雙側腎動脈，用縫線綑綁造成狹窄。整個手術不損傷腎臟、肝臟及腎靜脈。實驗前血壓為 110 mmHg，術後一週上升至 124 mmHg，已顯著高於術前血壓水準，術後三週時血壓超過 150 mmHg，部分大鼠血壓可高於 250 mmHg。

腦、心血管及腎臟損害：腎動脈狹窄術後一週則有腦血管通透性增高；血壓高於 180 mmHg 者，持續 3-5 月後，腦內細小動脈有不同程度的透明變化、纖維素樣壞死、動脈壁增生性反應而致管壁增厚、管腔狹窄，有時尚可見微動脈瘤及腦底大動脈頸動脈中層肥厚。其中血壓水準 180 mmHg-200 mmHg 者主要表現為腦細小動脈透明變性；高於 200 mmHg 者，腦內細小動脈則有較明顯的纖維素壞死；此血壓水平維持 5 月以上時，腦內細小動脈增生性反應明顯，有管腔狹窄或閉塞；顯示高血壓所致腦血管損害與血壓高低及持續時間有關。腦內微血管損害在高血壓初期則已發生，隨著血壓的升高及持續時間的延長，腦微血管損害逐漸嚴重，最終發展為管壁壞死、管腔狹窄，周圍腦組織嚴重水腫。該型高血壓大鼠腎臟無嚴重結構與功能損壞，腎臟改變與血壓升高不平行。

D. 腹主動脈狹窄法高血壓大鼠模型：

按 Doering 等的方法用外科縫合絲線做腎上腹主動脈部分結紮手術，使腹主動脈狹窄，血壓升高機制由於使腎上腹主動脈處於部分結紮狀態，造成雙側腎臟缺血，腎素-血管收縮素升高，不僅直接收縮血管，而且增加交感神經遞質釋放及醛固酮和內皮素等活性物質的釋放，最終導致血壓升高。

（2）. 藥理性動物模型

鹽皮質激素或它們的合成衍生物，包括去氧皮質酮（desoxycorticosterone，DOCA），與單側腎切除大鼠氯化鈉用於誘導的高血壓。腎素被抑制並且液體重吸收增加，從而產生低腎素超負荷模型。此模型，關鍵的鈉機制引起高血壓，包括中樞神經系統中的 Ang-II 受體，血管收縮素升高，增加氧化刺激和內皮素，已被確定。除了闡明腎性高血壓的分子機制外，它還為研究疾病的自然病史提供了一個有用的平臺，包括任何併發症，如腎小球硬化、蛋白尿、內皮依賴性血管舒張受損和心肌肥厚都可以研究。

A. DOCA 鹽性高血壓模式：

去氧皮質酮醋酸鹽（deoxycorticosterone acetate salt）誘導的高血壓大鼠模型以雄性 SD 大鼠切除左側腎臟，此後每週皮下注射 DOCA 50 mg/k g，共四週，並飼 1%的鹽水。血壓逐漸上升四週後，血壓顯著升高。血壓升高機制由於大劑量 DOCA（醛固酮的前驅物），與醛固酮有相似的生理作用，回饋性抑制循環腎素-血管收縮素，導致血漿腎素活性低下。因此，是一種低腎素型高血壓模型，此模型是一種繼發性高血壓模型，與人類高血壓中的原發性醛固酮增多症相似，故可以用於原發性醛固酮增多所致高血壓的研究。在 DOCA-高血壓模型中，由於血漿去甲腎上腺素水準升高所證實，由於基時 SNS 活性增強，維持高血壓不需要過量的飲食鹽。醣皮質激素（glucocorticoids）也可用於誘導高血壓，儘管通過腎素-血管收縮素-醛固酮系統（RAAS）啟動產生高血壓，但這種方法不如 DOCA 鹽方法有效。另一種選擇是 RAAS 組成分的慢性輸注，包括 Ang-II。

B. NO 缺乏模型：

一氧化氮（nitric oxide，NO）是一種來自完整內皮的強效血管擴張劑，由氧氣系統（Nitrous Oxide System，NOS）產生。這種產生由血管活性信使引發，包括乙醯膽鹼。藥物誘導高血壓大鼠模型通過長期輸注 NOS 抑制劑 N-硝基-L-精氨酸甲酯（L-NAME）產生 NO 缺乏模型，採用腹腔注射連續四週，以此方法第一週血壓開始增高，以後血壓呈逐漸增高趨勢，至第 2 週為持續穩定性高血壓。血壓升高機制為高血壓患者及動物存在內皮依賴性的血管舒張功能障礙，在持續性的誘導 NO 合成下降過程中，內皮功能障礙可增強壓力反射，通過損害機體的自穩機制中而引起高血壓，升高的血壓又可以進一步損害皮細胞的 NO 合成能力，維持已形成的高血壓。低劑量主要由於

腎血管收縮和腎小球濾過減少而產生體積依賴性的血壓升高。高劑量導致鹽和體積獨立的高血壓，因為其機制是腎和全身血管收縮。

另外，Ben-Ishay 等在 DOCA 鹽及一側腎切除處理後的動物中選擇血壓高的和血壓不高的分別進行近親交配，到第 20 代，確立了兩系動物，即後來命名的以色列高血壓大鼠（SBH）和以色列正常血壓大鼠（SBN），前者血壓比後者稍高，並對 DOCA 鹽十分敏感。

（3）. 環境性動物模型：

環境脅迫，包括單獨或同時引入閃燈、大的噪音和振動的籠子，或長期暴露於飲食高鹽、脂肪或糖，可以被用來誘發高血壓。極端溫度，特別是寒冷，也會誘發高血壓表型，如在暴露於 5℃ 3 週的大鼠中觀察到的。在這些動物中，觀察到血漿和尿兒茶酚胺增加；這些發現與人類的研究結果一致，那些長期在寒冷地區工作的人患有高血壓，冬季記錄的血壓值高於夏季。交感神經系統和腎素-血管收縮素活化的增加的活性。

A. 神經性高血壓模式：

可用狗、大白鼠和家兔等，通過機能性方法或物理方法作用於動物神經系統而誘發條件反射性高血壓和皮層性高血壓模型。在高血壓形成的初期，神經因素是主要的角色。由於一些尚未明確的原因，父母的遺傳因素使得下一代的神經中樞對於外界及內在的刺激較為敏感。

a. 神經精神刺激：

強烈的聲音、電刺激，條件反射衝突等可以引起動物神經中樞強烈興奮及血壓升高。缺點是這種血壓升高不能持久，同時，動物對相同刺激有適應的傾向，因此不能建立持久的高血壓模型。

b. 去除壓力感受器神經：

切斷動物主動弓壓力感受器減壓神經，使減壓反射中樞失去調整血壓的功能，可建立慢性高血壓模型，但是有一部分動物可能在手術後短期內死亡。

B. 高鹽飲食誘導

高鹽飲食誘導的高血壓大鼠模型：取雄性 Wistar 大鼠（220-250 g）餵飼高鹽大鼠飼料（8％氯化鈉液）和飲用 0.85％氯化鈉液。每週測大鼠尾動脈血壓 1 次，至第 6 週動物血壓明顯增高並穩定後，可開始實驗研究。但血壓

升高機制尚不清楚，可能是由於鈉滯留使細胞外液容量增加，因此心排出血量增加；血管平滑肌細胞內鈉升高又導致細胞內鈣離子濃度升高，並使血管收縮反應增強，因此外周血管阻力升高，這些均可促進高血壓的形成。

（4）.遺傳性動物模型

A. 近親繁殖-自發性高血壓大鼠模型

自發性高血壓鼠（稱 SHR），由京都大學 Okamoto 及 Aoki 教授於 1963 年推出，是將血壓為 144-175 mmHg 的雄性 Wistar 大鼠與血壓為 130-140 mmHg 的同種雌鼠交配，其子代選擇血壓高者作為近親交配，三代後，多數動物血壓超過 180 mmHg，稱之為自發性高血壓大鼠（SHR）。通過不斷選種，到 1969 年獲得了近交系 SHR，至 1986 年該系已傳到第 80 代。到現在的發病率幾達 100%。一般而言，SHR 在出生後血壓隨年齡而逐漸升高，在 5 週齡時血壓開始升高，並持續上升，到 10 週齡時血壓可達 180 mmHg。16 週齡時高血壓已形成，收縮壓大於 160 mmHg，並且與人類原發性高血壓形成機制比較相似，其生命期雖較短暫，但在幾個月中由高血壓前期發展到惡性期，可以完全模擬人類高血壓的病程。

血壓升高機制：在高血壓大鼠生長的早期，其血管阻力持續增加，血壓升高，心肌肥大，個體的腎素-血管收縮素系統啟動，此一過程持續到生存晚期，並發展為更嚴重的心肌肥大和鬱血性心功能衰退。隨著高血壓的持續發展，高血壓大鼠出現了與人類高血壓患者相似的併發症-腦和心肌損害，以及腎硬化。

優點：自發性高血壓大鼠從許多方面來看，如發病機制、高血壓心血管併發症、外周邊血管阻力變化、對鹽的敏感性等都與人類高血壓患者相似，是目前國際公認最接近於人類原發性高血壓的動物模型。故其廣泛應用於醫學基礎試驗研究中，如 SHR 高血壓形成的電生理研究，在腎素血管收縮素的研究，在內皮素方面的研究，血管結構與功能方面的研究，都已取得了一定的進展。另外，該模型特別適用於人類高血壓的研究及高血壓藥物篩選。

缺點：飼養條件高、價格較貴、遺傳育種麻煩、需要一定時間、且易變種或斷種，若大量使用尚存在一定困難。

自發性高血壓大鼠另外還有一種亞系，即自發性易中風高血壓大鼠（SHRSP），它是國際高血壓協會高血壓大鼠命名委員 （1986 年 8 月第 11 屆國際高血壓會議上）推薦的高血壓實驗模型。SHRSP 是 Yamori 等於 1970 年起從腦中風的 Stir 後代中用近交方式培育的。SHRSP 出生後 6 週血壓開始升高，l0-15 週齡達 200 mmHg，5-6 月齡達高峰（230 mmHg-250 mmHg），7 月齡略下降。雄性 SHRSP 平均壽命 9 月，雌性為 12 月。其特點是 100％發生高血壓，80％發生腦中風，故可以作為腦中風研究的理想動物模型。

B. 鹽敏感和鹽抵抗性高血壓大鼠模型

Dahl 等用高鹽飲食（8%氯化鈉）及三碘甲狀腺素處理大鼠，發現一部分大鼠血壓升高，而另一部分動物的血壓無明顯變化。他們將血壓最高和最低的大鼠分別進行近親繁殖，三代後，分離出鹽敏感（DS）和鹽抵抗性大鼠（DR）。DS 大鼠攝高鹽飲食即發生高血壓，而 DR 大鼠則不發生。DS 大鼠是環境因素（鹽）與遺傳因素共同作用而引起高血壓的典型模型。

血壓升高機制尚不清楚，可能是由於鈉滯留使細胞外液容量增加，因此心排血量增加。血管平滑肌細胞內鈉水準增高又導致細胞內鈣離子濃度升高，並使血管收縮反應增強，因此外周血管阻力升高，這些均可促進高血壓的形成。

為了進一步純化，Rapp 等將 DS 和 DR 大鼠分別篩選及近親繁殖 20 代，得到兩支近交系動物，分別為鹽敏感性高血壓大鼠（SS/Jr）和鹽抵抗性高血壓大鼠（SR/Jr）。

SS/Jr 大鼠在斷奶後分別飼以高鹽（8%Nacl）和低鹽（0.3%Nacl），其中高血壓發展過程不同。高鹽組血壓迅速升高，3 週後開始有動物死亡，至 8 週則全部死亡；低鹽組血壓緩慢上升，至 6 個月才陸續有動物死亡。SR/Jr 大鼠對高鹽和低鹽的血壓反應很小。

C. 轉基因動物模式

轉基因技術可用於研究不同基因在血壓調節中的特定作用。從廣義上講，這些方法是生成同源和同基因，以及基因剔除。

a. 同基因

同類型族群是指通過與適當的選擇回交將定義的染色體區段引入另一個染色體區段的族群。在結構族群的情況下，轉移整個染色體。例如，將

來自小鼠的突變型腎素基因轉移至大鼠，產生升高的 Ang-II 水準和高血壓，其通過 ACE 抑制被阻止。類似地，人腎素基因插入到小鼠也始終表現出參與腎素-血管收縮素基因的啟動。

b. 基因剔除

血管緊張素原基因的剔除為延遲高血壓的發展和增加一氧化氮（NO）的可用性提供了保護，從而暗示腎素-血管收縮素（RAAS）在血壓調節中是關鍵的。然而，每組顯示出相似程度的心臟肥大，表明這種反應的 RAAS 非依賴性機制。編輯內皮 NOS 和心房利鈉肽的基因剔除會發展為高血壓，而 Ang-II 1a 型受體剔除大鼠則表現出低血壓。醛固酮途徑的重要性顯示在鹽皮質激素受體突變中，賦予組成型受體活性導致早發性高血壓。Liddle 綜合徵是導致人類高血壓的假性醛固酮增多症的常染色體顯性病因，顯示其涉及突變的上皮鈉通道。

基因剔除模型的某些限制需要解決。首先，某些基因缺失的表達可能導致胚胎致死，因此沒有時間研究其發病機制；其次，同種型之間的冗餘導致表型表達被掩蓋，因此有時需要雙重或三重基因剔除。同樣重要的是要注意動物中相同的基因缺失或過表達可能導致表型的不同表達。

2.1.10.3 血壓的測量

血壓（BP）是用於評估哺乳動物心血管功能的重要參數之一。目前以三種方法最廣泛地用於記錄大鼠中的 BP，包括使用侵入式（invasive blood pressure，IBP）動脈內導管、非侵入式（non-invasive blood pressure，NIBP）尾套測量和遠端無線遙測方法記錄。侵入式測量血壓比非侵入式血壓測量方法準確。IBP 是使用導管在任何動脈（例如頸動脈，股動脈等）中直接測量的動脈壓。

當要篩選化合物的抗高血壓活性時，NIBP 測量方式更適合作為基礎血壓值，而侵入式技術通常適用於測量對各種促進劑和拮抗劑的血管反應性。侵入式測量可測得正確的血壓，但有時會由於麻醉干擾正常血壓而導致血壓波動，所以進行侵入式大鼠血壓測量的最佳麻醉方法是氨基甲酸酯或戊巴比妥。

（1）. 侵入式

以手術方式將導管通過右側股動脈置於腹主動脈中以測量血壓，或將導管通過頸靜脈插入右心房以測量右心房壓力。可將所有導管置於頸後，避免動物抓、

咬壞導管，用肝素化（150 IU / ml）0.9%NaCl 溶液填充，並用不銹鋼針塞住。手術恢復後一天，即可將動脈導管和右心房導管連接到壓力傳感器機器，記錄平均動脈壓（MAP）、心率和右心房壓力。

（2）. 非侵入式

傳統的血壓計測量老鼠的血壓時，會遇到很多問題，老鼠無法適應造成血壓值不具有代表性。測量時，無論是採用高溫方法或是低溫方法，實驗動物皆容易因保定的約束性造成動物不適，進而導致實驗動物於實驗過程中掙扎。以往，所有的非侵入間接式尾套血壓測量方法皆對實驗過程中動物任何運動的干擾非常敏感。近年來尾壓監測是使用「光電容積示波器原理」，在氣囊式尾套中置入了高敏感度的感應器，使用時將尾套套住大小鼠尾端即可測量動物尾壓。保定方法也採用改良式的動物置放平台及保定器，提供實驗動物一個約束性較低、實驗過程較不易掙扎的實驗環境。

在尾套的氣囊充氣時期，一旦機器偵測到血流脈動衝擊到血管壁所造成的振幅時收縮壓，氣囊則會開始進行持續緩慢洩氣。當氣囊充氣的阻塞壓力（occlusive pressure）降到與收縮壓相同數值時，波動會從持續緩慢下降轉為突然快速下降，此時則為舒張壓。本系統運用先進的測量技術，並結合光電偵測器來量測實驗動物尾巴脈波，因此可以在比市場上一般可量測到訊號的最低箱體溫度還要低的溫度環境量測到實驗動物的脈波血壓。同時量測出來的數值非常精準，和使用導管侵入式系統所獲得之數據只相差 5 mmHg 以內，比市面上其他的間接式血壓量測系統還要精準。

尾部尾側動脈（尾側內側動脈，CVA）也稱為腹中動脈，源於腹主動脈和中位骶動脈。它被封閉在一個凹槽中，該凹槽被厚厚的筋膜覆蓋，由從尾巴基部到末端的血管突起或尾骨肌形成。動脈壁的厚度從尾部的底部到尖端僅略微減小。類似地，CVA 的管腔直徑從基部到中間段僅略有變化。CVA 具有突出的側支循環，其口徑在到達尾端時會發生變化。許多研究調查體溫調節，微血管手術和解剖結構已經通過利用這個血管作為一個完整的孤立血管床或作為一個小的孤立解剖段進行，科學家已經在自由活動的大鼠中在無壓力條件下建立並改進了慢性 CVA 插管技術長達 12 天。然而，只有少數研究關注血管的體內功能，尤其是血管張力。這些研究表明，CVA 可能是股動脈（Femoral artery，FA）的替代部位，不僅用於重複進行藥物給藥或血液採樣，而且用於連續侵入性動脈血壓監測。

然而，動脈壓波形在從中心位置移動到外圍位置時經歷特徵性的形態變化。中心-外周動脈壓梯度在人類中受到了相當大的關注，這些差異可能導致從不同動脈部位獲得的 BP 測量結果不一致。在我們的初步實驗中，我們注意到在雄性成年 SD 大鼠的正常生理條件下 FA 與 CVA 之間存在小的平均動脈壓（MAP）梯度，儘管未觀察到尾部缺血。目前，引起壓力梯度的因素尚不完全清楚。一些重要因素，如血容量、體溫、動脈彈性和心率，是從不同動脈檢測到的血壓差異中最關鍵的因素。如果與 FA 相比，來自 CVA 的血壓測量結果導致高估或低估，則藥物或液體治療的不當給藥可能使大鼠處於危險之中。據我們所知，沒有人關注大鼠 FA 和 CVA 之間侵入性血壓測量的一致性。在異常實驗條件下這兩條動脈之間的壓力梯度的變化性和 CVA 導管插入術的安全性尚未得到證實。為了確認 CVA 是否可以用作測量部位代替 FA 用於連續有創血壓監測，我們評估了 CVA 中侵入性動脈血壓監測的準確性和安全性，通過評估以下方法同時將測量結果與 FA 進行比較：（A）遠端缺血率；（B）大鼠應變，直腸溫度，血管張力和血容量對 CVA 和 FA 之間差異的影響；（C）整體差異。

（3）. 遠端遙測

遠端遙測是監測清醒和自由移動的實驗動物的生理功能，同時將壓力最小化的先進方法。目前，遠端遙測系統被廣泛地用於血壓、心跳速率、血流量、心電圖、呼吸率、體溫和許多其他生物信號的測量。雖然遠端遙測技術已存在 50 年左右，但可用於監測實驗動物的生理信號且經濟實惠可靠的商業產品在過去 10 年內才出現。特別是，使用遙測技術測量小鼠和大鼠的血壓，有助於研究人員解開與高血壓、心力衰竭等疾病的生理學和病理生理學相關的幾種機制。

遙測已經成為衡量實驗動物血壓的黃金標準，主要是因為該技術可以減少或消除限制動物引起的不適。

遙測裝置的安裝需將動物麻醉，並進行無菌技術手術。手術從腹正中部切口，並使用無菌棉籤暴露腹主動脈，將遙測裝置的導管插入腹主動脈並在上游引導。使用組織粘合劑（Vetbond，3M Animal Care Products，St Paul，MN）固定導管並止血。將遙測裝置的主體放置在腹腔中並縫合到腹部肌肉組織。分別縫合腹部肌肉組織和皮膚。將大鼠保持在加熱墊（38℃）上直至完全從麻醉中恢復，並給

予止痛劑止痛，即可開始記錄血壓，每週可通過使用感測裝置打開發射器，收取每隻動物的數據輸出，做生理數值統計。

2.1.10.4 結語

使用不同的動物模式在不同的藥理學、環境和遺傳模型設置，在病因、病理生理學和人類心血管和代謝性疾病，以及併發症，來檢查藥物的功效，這些記錄是有用且有價值的資訊。然而，這些實驗模型的主要限制是動物物種與人類之間的解剖學差異，雖然共同機制是腎素-血管收縮素活化，但必須仔細考慮物種差異以確保新開發的藥物製劑的安全性。

2.1.10.5 參考文獻

1. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF and Summerville WW: Studies on experimental: I. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischenmia. J Exp Med 9: 347-379, 1934.
2. Hiu Yu Lin, Yee Ting Lee, Yin Wah Chan and Gary Tse Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans （Review） Biomedical Reports 5: 653-659, 2016
3. Iyer A, Chan V and Brown L: The DOCA-salt hypertensive rat as a model of cardiovascular oxidative and inflammatory stress. Curr Cardiol Rev 6: 291-297, 2010.
4. Smookler HH, Goebel KH, Siegel MI and Clarke DE: Hypertensive effects of prolonged auditory, visual, and motion stimulation. Fed Proc 32: 2105-2110, 1973.
5. Tse G, Tse V and Yeo JM: Ventricular anti-arrhythmic effects of Lerman LO, Chade AR, Sica V and Napoli C: Animal models of hypertension: An overview. J Lab Clin Med 146: 160-173, 2005.
6. Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J and Pedrazzini T: Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. Hypertension 29: 1025-1030, 1997.
7. Weinberger MH: Salt sensitivity of blood pressure in humans. Hypertension 27: 481-490, 1996.
8. Okamura T, Miyazaki M, Inagami T and Toda N: Vascular renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats. Hypertension 8: 560-565, 1986.
9. Yamasaki S: Divided renal and caval vein plasma renin activity in two-kidney two-clip hypertension in rabbits and variations of blood pressure, plasma volume and renal function following unilateral nephrectomy. J Urol 138: 1457-1460, 1987.
10. Sato K, Abe K, Seino M, Yasujima M, Imai Y, Sato M, Hiwatari M, Omata K, Tanno M, Kohzuki M, *et al*: Renal vein plasma renin activity in patients with unilateral renovascular hypertension. Jpn Circ J 52: 431-436, 1988.

2.1.11 骨關節疾病動物模式

骨頭相關的疾病對群體大眾的生活影響甚鉅，而這類的疾病像是退化性關節炎與骨質疏鬆症等則好發於高齡化的社會中。研究統計顯示，在台灣骨質疏鬆的病患大多是高於 50 歲的長者，且女性的比例是男性病患的兩倍多；骨質疏鬆的病患則會因為體內骨質的大量流失，造成骨折風險提高，相同的研究則發現在未來二十年內，光是在台灣的骨折案例一年就可能會增加到五萬例。因此若能釐清造成骨骼肌肉疾病的機制，則能夠減少診斷的時間並且更有效率的進行預防與治療。

2.1.11.1 退化性關節炎動物模式

膝蓋關節承受身體重量並具有極佳的緩衝能力，方便身體的移動並參與平衡及肌肉與骨骼的協調。骨關節炎（Osteoarthritis，OA）為普遍的退化性關節疾病，通常於膝關節、髖關節及指關節都有可能發生，且好發於老年人、肥胖及具有代謝疾病或是工作持續荷重等特定族群；其病理學特徵包括軟骨下硬骨的重塑、軟骨組織持續的惡化變薄及軟骨細胞凋亡。由於小鼠飼養與操作的便利性，因此在此詳述於小鼠所進行的 OA 疾病模式。

（1）. 自發性的 OA 模式

許多小鼠品系會自然發展成具有 OA 的表現型，像是 STR/ort 品系的老鼠就是一種自發性 OA 模式的小鼠，這種品系的老鼠在 12 到 20 週齡時便會出現跟人類類似的軟骨損傷，而且公鼠明顯的會比母鼠來得嚴重，在同樣的飼養條件下，其體重也比一般其他品系的實驗鼠來得重，但是目前無法證明此肥胖是導致軟骨損壞的主因。DBA/1 品系的公鼠則是在四個月大時開始表現 OA 的病徵，研究發現其致病的因素與隱性基因跟荷爾蒙的表現有關。其他像是常見的 C57BL/6 與 BALB/c 品系的老鼠也會自然出現 OA 的病狀，但是通常都需要飼養到 1 至 2 年才會發病。雖然許多品系的老鼠都會有自發性 OA，但其發作的時間依舊會與品系跟性別有關。而在上述所提到的品系中，STR/ort 品系被研究的最為透徹，且越來越多證據顯示出此品系與人類臨床表現最為相關，可能是用來評估 OA 新藥最具潛力的動物模式。

（2）.表現特定基因所誘發的 OA 模式

許多基因轉殖鼠也能夠自發性表現出 OA，例如大量表現有缺陷的人類第二型膠原蛋白（COL2A1）與第九型膠原蛋白（COL9A1）的轉殖鼠，都發現會出現早發性的 OA 表現型。此外，表現會破壞軟骨細胞外基質（extracellular matrix，ECM）的酵素也能夠誘發 OA 模式，像是基質金屬蛋白酶（MMPs）家族中的 MMP13 就能很有效率的將第二型膠原蛋白分解掉，因此小鼠身上大量表現 MMP13 後則會產生與在人類 OA 病人身上觀察到相同的病徵。除了影響細胞基質的完整性外，破壞骨骼肌與關節發育相關的訊息傳遞路徑也能誘發 OA 模式，例如以 COL2A1 啟動子驅動表現的顯性抑制（dominant negative）的 p38 Mitogen-activated protein kinase （MAPK）則會在成鼠造成嚴重的膝蓋關節炎，類似的機制也出現在大量表現缺失的 TGF-beta type II receptor（DNIIR），與 Smad ubiquitin regulatory factor 2 （Smurf2）等轉殖基因鼠身上。有趣的是，過度表現較穩定的 β-catenin 會誘發 OA 的發生，但是有研究顯示當老鼠表現大量的 β-catenin 訊號抑制因子 ICAT （inhibitor of β-catenin and T-cell factor）卻也會產生 OA。後來研究發現，ICAT 過度表現也會抑制 bone morphogenetic protein（BMP）與血管內皮生長因子（vascular endothelial growth factor，VEGF），影響軟骨細胞活性與血管新生，最後形成 OA。

（3）.剔除特定基因所誘發的 OA 模式

相較於轉殖基因鼠，基因缺失老鼠的品系則多出許多，這些基因大都是與細胞外基質恆定或是骨骼與關節發育相關的訊息傳遞因子，例如 *Col11a1* 的缺失直接就造成不正常的蛋白聚糖（proteoglycan）而導致人類患有早發性 OA。然而若在小鼠身上此基因同型合子（homozygous）都缺失時，小鼠將在出生時就死亡，因此只有缺失一半的異型合子（heterozygous）才能存活且具有 OA 表現型，相同的現象也在 *Col2a1* 缺失的老鼠身上觀察到。另外的研究發現，*Col9a1* 同型合子缺失不會造成小鼠死胎，而是會在四個月大以後逐漸出現膝蓋關節軟骨的退化，並隨著年紀增長而越來越嚴重。

健全的軟骨細胞外基質大都由具有小分子白胺酸重複序列的蛋白聚糖所構成（small leucine-rich proteoglycans，SLRPs），這些蛋白分子會與可溶性的生長因子結合而調控其功能，因此當這些因子缺失時則會導致 OA。根據不同的結

構，SLRPs 大略可分成三大類（I-III）。例如大量表現在骨頭、肌腱與軟骨的第二類 SLRP fibromodulin。

（4）.利用手術誘發骨關節炎的小鼠模式

利用手術方式使關節的緩衝喪失，進而誘發 OA 最常使用的方法為前十字韌帶橫切術（ACLT）及內側半月板切除術（destabilization of the medial meniscus，DMM）。這二種手術模擬人類退化性骨關節炎所產生的病理特徵，包括持續性的關節軟骨退化、骨關節腔發炎、免疫細胞的浸潤、軟骨下硬骨的重塑及骨贅的形成。關節處於長期不穩定的狀態間接引起週邊骨骼肌肉組織的萎縮，同時因關節相互摩擦使得軟骨細胞流失及滑膜發炎。

（5）.利用化學物質誘發骨關節炎的小鼠模式

小鼠骨關節炎(OA)疾病模式可利用不同的化學藥物直接注射入關節腔內，藥物的種類多元，包括單碘乙酸鹽（monoiodoacetate）、木瓜蛋白酶（papain），乳糜蛋白酶（chymopapain）、膠原酶（collagenase）、TGF-β、IL-1β、皮質類固醇（corticosteroid）等已被用於誘發類似 OA 的病理特徵，而此病理特徵亦包括疼痛、滑膜發炎及巨噬細胞增生等現象。目前最廣泛使用誘發 OA 的化學物質為膠原酶（collagenase）或蛋白水解酵素（proteolytic enzyme），膠原酶主要破壞軟骨基質中的複合蛋白質多醣體之機制可用來模擬 OA 初期的病理變化。膠原酶注射一次於 10 週齡的小鼠膝蓋關節腔內，並於 10 週之後進行病理檢查，即可發現膝關節發生嚴重的軟骨退化、軟骨下硬骨的硬化與變形及骨贅的形成，同時伴隨著行動力降低等現象。

2.1.11.2 骨折模式

骨頭具有支撐、保護和運動等功能，當伴隨年齡、疾病或因為直接、間接的外力造成碎裂或變形造成骨折時，常合併骨組織附近血管破裂和週邊軟組織腫脹，引起發炎、水腫與骨壞死的症狀。骨折主要分為閉合性骨折（closed fracture）與開放性骨折（open fracture）二種，閉合性骨折指骨折的部位沒有與外部接觸，所以受外界感染機率低，大部份採取外部固定治療。開放性骨折則是骨折的部位已暴露於體外，因此可能會接觸到環境中的細菌，所以通常會給予抗生素治療。

（1）.動物模型選擇條件

年齡、性別和小鼠品系的差異都會影響骨折的癒合程度，例如 DBA / 2 和 C3H 小鼠會比 C57BL / 6 小鼠的骨折癒合更快。由於雌性小鼠的股骨和脛骨的骨髓間質幹細胞比雄性小鼠的含量少，因此癒合能力也比較差。年齡也會影響骨折的癒合，老年小鼠成骨細胞對成骨刺激的反應減少，軟骨細胞分化和成熟延遲，將導致軟骨內骨分化延遲；年齡還與調節血管生成的因子表達減少有關，進而影響骨折癒合過程中的血管形成過程；老化的間質幹細胞也顯示出組織修復和再生的速率降低，因此，年齡是骨折癒合研究中應考慮的要點之一，因為小鼠於 6 至 8 週齡時即達性成熟，此時具有骨融合之現象，所以可選擇此年齡的小鼠進行骨折研究。此外，在任何研究中均應避免手術固定不同大小的骨頭，因此建議使用體重 20 克左右的老鼠，因為這種大小的老鼠的股骨直徑通常為 2 到 2.5 毫米。對於需固定骨骼的動物研究，應密切注意選用年齡和體重匹配的小鼠。

（2）.小鼠骨折癒合模式

A. 肋骨骨折模式

在吸入麻醉下，確保小鼠已無腳趾收縮反射，並將眼藥膏塗在眼睛上以防止其乾燥，除去右胸前的皮毛，並用優碘和 70％乙醇擦拭手術部位。使用手術刀刀片，切開右胸皮膚找到右側的第八根肋骨，並使用剪刀在肋骨的長軸上垂直切割。

B. 脛骨骨折模式

閉合脛骨骨折模型使用 0.2 mm 不銹鋼銷釘固定脛骨，然後使用三點彎曲裝置骨折，從而產生可重複的橫向或稍微傾斜的骨折模式。可以使用脛骨骨折模型進行機械測試，該模式的主要缺點是使用銷釘時缺乏軸向和旋轉穩定性，膝關節移位的高風險以及髓腔內損壞的可能性。因此建議在使用脛骨骨折模式時，小鼠應植入不銹鋼針，使其與脛骨的彎曲縱軸匹配，以利於將其引入髓腔。配合實驗可以控制腓骨是否斷裂，因為腓骨的狀態會影響脛骨固定的整體穩定性並會影響癒合環境。

C. 股骨骨折模式

股骨是管狀骨，被肌肉覆蓋得更厚，與脛骨相比，股骨的直徑相對一致且較大，這有助於使用較大的植入物，例如固定板以及內部和外部固定器的

螺釘。在使用三點彎曲裝置折斷股骨之前，將 0.2 mm 不銹鋼針插入股骨的髓腔，以在骨折過程中保持軸向對準並避免大的位移。這種方法有助於控制骨折部位，並實現標準化的骨折癒合環境。該模型可用於創建標準骨折，並且可移除髓內釘以研究骨折癒合的其他方面和影響。

（3）.模式建立

A. 三點彎曲裝置骨折模式（以股骨作為說明）

a. 利用舒泰 Zoletil 50（50 mg/ml）與鎮靜劑 Xylazine（Rompun）混合使用將小鼠全身麻醉。

b. 將小鼠腹部朝上，將其膝蓋彎曲，並用 15 號手術刀在膝關節上方劃一縱切口，隨後在髕骨與膝關節伸展機制中劃一切口，要注意避免傷害股四頭肌與膝關節伸展機制之間的連結，以便在手術後可以移動小鼠。

c. 利用鑷子橫移膝關節伸展機制將其橫向半脫位後，露出股骨的遠端以及脛骨的近端。從股骨的滑車槽中心使用 27 號 x ½英吋 TB 針頭插出一個孔洞，以利插入銷釘。

d. 埋入 TB 針頭的尖端（大約是普通小鼠股骨的長度）並取出，然後以逆行方式將 25 號脊柱針的通管針插入髓管的長度。當插入遇到皮質骨產生阻力時即可。

e. 用骨鉗將其與股骨修剪平整，然後用鑷子將其埋入下方，並施加輕微的向下力。必須注意不要使膝關節向後移位，並且注意不要破壞十字韌帶。

f. 使用鑷子將膝關節伸展機制拉回到其解剖位置。

g. 然後用 5-0 可吸收的鉻色腸線縫合切口。

h. 小鼠仍處於麻醉狀態的情況下，使用小型動物骨折裝置，這裝置是利用重物放在手術四肢上產生骨折。

i. 將其重物的高度設定在撞擊時產生足夠大的彎矩以使骨骼斷裂。而其重物之重量和高度的條件應根據具體的小鼠品系、年齡和性別做調整。

j. 在手術後於小鼠尚未清醒狀態立即進行 X 光照射，確認髓內釘位置並沒有偏移且骨折處的骨頭沒有粉碎。

k. 術後管理：手術後，可通過腹膜內注射給小鼠注入多達 500 µL 的無菌鹽水，幫助它們術後恢復。

l. 在加熱的恢復床上監視動物，直到它們從手術中醒來。清醒後，將它們放回籠子裡。

m. 手術後幾天繼續對小鼠進行密切監視,以確保它們能夠正常康復並恢復活動能力。術後 3 天每 6 小時皮下注射鹽酸丁丙諾啡鎮痛藥（0.03 mg / kg）或者在於術後給予 Buprenex 可以維持鎮痛 48 小時。切勿給予 NSAID，根據研究已經確認會影響手術後的骨癒合。

n. 骨折後很少發生感染。通常不需要術後預防性使用抗生素。若在一週內產生腫脹或者小鼠出現嗜睡的狀態，需注意傷口狀況，如果發現感染，則必須對動物實施安樂死，因為這可能會影響骨骼的癒合。

B. 股骨不完全骨折模式

a. 利用舒泰 Zoletil 50（50 mg/ml）與鎮靜劑 Xylazine（Rompun）混合使用將小鼠全身麻醉。

b. 將小鼠腹部朝上，於股骨內側從髕骨內側緣中點用 15 號手術刀向內側做切口，切口大小依據動物體型大小而定，在股骨中段用線鋸或用直型鑽針，由股骨內側鋸開至外側，切勿鋸斷外側之皮質骨。

c. 然後用 5-0 可吸收的鉻色腸線縫合切口。

2.1.11.3 骨質疏鬆模式

根據世界衛生組織（WHO）統計，骨質疏鬆症是西方最常見的疾病，同時也是於全球排名第二大醫療保健支出。骨質疏鬆的特徵是骨量減少（骨質減少），如骨骼組織的微結構強度減少同樣增加骨折風險。骨質疏鬆可以是其他疾病的原發性或繼發性疾病。原發性骨質疏鬆症可進一步分為兩個類型，I 型骨質疏鬆症也稱為停經後骨質疏鬆症，通過增加骨轉換和加速鬆質骨質流失，增加椎骨骨折的風險；II 型骨質疏鬆症或稱為年齡依賴性（老年）骨質疏鬆症，影響老年婦女和男性，其病因遠不及 I 型骨質疏鬆症清楚。II 型骨質疏鬆症不會伴有骨轉換增加，但導致髖部骨折風險增加，死亡率更高，發病率高於 I 型骨質疏鬆症，遺傳因素、飲食、激素水平、身體活動以及並存的疾病都會影響骨質疏鬆的風險和疾病發生，但是確切的病因尚不清楚。

（1）.動物模型選擇條件

許多 inbred 實驗小鼠可用於骨質疏鬆症的研究，例如 129SI/Svlmj（129）、C3H/HeJ（C3H）、BALB/cJ（Bc）、DBA/2J（DBA）、及 C57BL/6（C57）等。自發性骨質疏鬆疾病模式可建立於各種基因轉殖動物，或經由年齡、飲食、手術及類固醇的變化來誘發。研究發現自發性骨質疏鬆疾病於雜交品系 CW-1 小鼠會隨著週齡的增加而流失近 60％的骨小樑及皮質骨；近親交配小鼠在 6 至 24 週齡的 C57BL / 6 亦發現其骨小樑脛骨近端的骨質重量流失約 60％與皮質骨的 12％脛骨骨幹端的厚度變薄。

（2）.模式建立

A. 類固醇誘發的骨質疏鬆

醣皮質激素（glucocorticoids ）為常用於治療炎症和其他疾病的抗發炎藥物，但是臨床上證實長期口服含醣皮質激素的藥物會引起骨質疏鬆。實際上，因服用含有醣皮質激素治療藥物所引起的骨質疏鬆症的發病率僅次於雌激素缺乏症，因此，醣皮質激素誘導的骨質疏鬆動物模型對於了解基本的潛在機制非常有價值。

B. 以手術的方式誘發骨質疏鬆

雌性激素於體內的水平下降通常可見於停經後的婦女，而雌性激素於體內的濃度與骨質密度具有相當大的關係。因此，將雌性小鼠進行卵巢切除手術模擬停經後婦女的骨質疏鬆疾病成為主要應用於研究的動物疾病模式。

2.1.11.4 參考文獻

1. Brommage R, Ohlsson C. Translational studies provide insights for the etiology and treatment of cortical bone osteoporosis. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2018;32（3）:329-340.
2. Cannarella R, Barbagallo F, Condorelli RA, Aversa A, La Vignera S, Calogero AE. Osteoporosis from an Endocrine Perspective: The Role of Hormonal Changes in the Elderly. J Clin Med. 2019;8（10）. pii: E1564.
3. Cao, Y.; Liu, X.; Deng, N.; Jiao, Y.; Ma, Y.; Hasty, K. A.; Stuart, J. M.; Gu, W., Congenic mice provide evidence for a genetic locus that modulates spontaneous arthritis caused by deficiency of IL-1RA. PLoS One 2013, 8, （6）, e68158.

4. Chen, M.; Zhu, M.; Awad, H.; Li, T. F.; Sheu, T. J.; Boyce, B. F.; Chen, D.; O'Keefe, R. J., Inhibition of beta-catenin signaling causes defects in postnatal cartilage development. J Cell Sci 2008, 121, （Pt 9）, 1455-65

5. Chen, S.; Birk, D. E., The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. FEBS J 2013, 280, （10）, 2120-37.Khosla S, Farr JN, Kirkland JL. Inhibiting Cellular Senescence: A New Therapeutic Paradigm for Age-Related Osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab. 2018;103（4）:1282-1290.

6. Holyoak, D. T.; Otero, M.; Armar, N. S.; Ziemian, S. N.; Otto, A.; Cullinane, D.; Wright, T. M.; Goldring, S. R.; Goldring, M. B.; van der Meulen, M. C. H., Collagen XI mutation lowers susceptibility to load-induced cartilage damage in mice. J Orthop Res 2018, 36, （2）, 711-720.

7. Javaheri, B.; Razi, H.; Piles, M.; de Souza, R.; Chang, Y. M.; Maric-Mur, I.; Hopkinson, M.; Lee, P. D.; Pitsillides, A. A., Sexually dimorphic tibia shape is linked to natural osteoarthritis in STR/Ort mice. Osteoarthritis Cartilage 2018, 26, （6）, 807-817.

8. Khosla S, Farr JN, Kirkland JL. Inhibiting Cellular Senescence: A New Therapeutic Paradigm for Age-Related Osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab. 2018;103（4）:1282-1290.

9. Kyostio-Moore, S.; Nambiar, B.; Hutto, E.; Ewing, P. J.; Piraino, S.; Berthelette, P.; Sookdeo, C.; Matthews, G.; Armentano, D., STR/ort mice, a model for spontaneous osteoarthritis, exhibit elevated levels of both local and systemic inflammatory markers. Comp Med 2011, 61, （4）, 346-55.

10. Li, H.; Wang, D.; Yuan, Y.; Min, J., New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis. Arthritis Res Ther 2017, 19,（1）, 248.

11. Lian WS, Ko JY, Chen YS, Ke HJ, Hsieh CK, Kuo CW, Wang SY, Huang BW, Tseng JG, Wang FS. MicroRNA-29a represses osteoclast formation and protects against osteoporosis by regulating PCAF-mediated RANKL and CXCL12. Cell Death Dis. 2019;10（10）:705.

12. Lorenz, J.; Grassel, S., Experimental osteoarthritis models in mice. Methods Mol Biol 2014, 1194, 401-19.

13. Lu, Y. C.; Lin, Y. C.; Lin, Y. K.; Liu, Y. J.; Chang, K. H.; Chieng, P. U.; Chan, W. P., Prevalence of Osteoporosis and Low Bone Mass in Older Chinese Population Based on Bone Mineral Density at Multiple Skeletal Sites. Sci Rep 2016, 6, 25206.

14. Nakata, K.; Ono, K.; Miyazaki, J.; Olsen, B. R.; Muragaki, Y.; Adachi, E.; Yamamura, K.; Kimura, T., Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing alpha 1（IX） collagen chains with a central deletion. Proc Natl Acad Sci U S A 1993, 90, （7）, 2870-4.

15. Namdari, S.; Wei, L.; Moore, D.; Chen, Q., Reduced limb length and worsened osteoarthritis in adult mice after genetic inhibition of p38 MAP kinase activity in cartilage. Arthritis Rheum 2008, 58, （11）, 3520-9.

16. Ricks, M. L.; Farrell, J. T.; Falk, D. J.; Holt, D. W.; Rees, M.; Carr, J.; Williams, T.; Nichols, B. A.; Bridgewater, L. C.; Reynolds, P. R.; Kooyman, D. L.; Seegmiller, R. E., Osteoarthritis in temporomandibular joint of Col2a1 mutant mice. Arch Oral Biol 2013, 58, （9）, 1092-9.

17. Saamanen, A. K.; Salminen, H. J.; Dean, P. B.; De Crombrugghe, B.; Vuorio, E. I.; Metsaranta, M. P., Osteoarthritis-like lesions in transgenic mice harboring a small deletion mutation in type II collagen gene. Osteoarthritis Cartilage 2000, 8, （4）, 248-57.

18. Seegmiller, R. E.; Bomsta, B. D.; Bridgewater, L. C.; Niederhauser, C. M.; Montano, C.; Sudweeks, S.; Eyre, D. R.; Fernandes, R. J., The heterozygous disproportionate micromelia （dmm） mouse: morphological changes in fetal cartilage precede postnatal dwarfism and compared with lethal homozygotes can explain the mild phenotype. J Histochem Cytochem 2008, 56, （11）, 1003-11.

19. Serra, R.; Johnson, M.; Filvaroff, E. H.; LaBorde, J.; Sheehan, D. M.; Derynck, R.; Moses, H. L., Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. J Cell Biol 1997, 139, （2）, 541-52.

20. Stoop, R.; van der Kraan, P. M.; Buma, P.; Hollander, A. P.; Billinghurst, R. C.; Poole, A. R.; van den Berg, W. B., Type II collagen degradation in spontaneous osteoarthritis in C57Bl/6 and BALB/c mice. Arthritis Rheum 1999, 42, （11）, 2381-9.

21. Wang, C. J.; Iida, K.; Egusa, H.; Hokugo, A.; Jewett, A.; Nishimura, I., Trabecular bone deterioration in col9a1+/- mice associated with enlarged osteoclasts adhered to collagen IX-deficient bone. J Bone Miner Res 2008, 23, （6）, 837-49.

22. Wang FS, Lian WS, Weng WT, Sun YC, Ke HJ, Chen YS, Ko JY. Neuropeptide Y mediates glucocorticoid-induced osteoporosis and marrow adiposity in mice. Osteoporos Int. 2016;27（9）:2777-2789.

23. Wu, Q.; Kim, K. O.; Sampson, E. R.; Chen, D.; Awad, H.; O'Brien, T.; Puzas, J. E.; Drissi, H.; Schwarz, E. M.; O'Keefe, R. J.; Zuscik, M. J.; Rosier, R. N., Induction of an osteoarthritis-like phenotype and degradation of phosphorylated Smad3 by Smurf2 in transgenic mice. Arthritis Rheum 2008, 58, （10）, 3132-44.

24. Yuan J, Tickner J, Mullin BH, Zhao J, Zeng Z, Morahan G, Xu J. Advanced Genetic Approaches in Discovery and Characterization of Genes Involved With Osteoporosis in Mouse and Human. Front Genet. 2019;10:288.

25. Zhu, M.; Tang, D.; Wu, Q.; Hao, S.; Chen, M.; Xie, C.; Rosier, R. N.; O'Keefe, R. J.; Zuscik, M.; Chen, D., Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. J Bone Miner Res 2009, 24, （1）, 12-21.

第二節 中大動物（含反芻類）

本章課程安排時數：6 小時

本章學習目標：

1. 中大動物以國內比較方便取得的兔、小型豬為主。犬隻有其科學應用的特殊性，亦會做介紹及說明。
2. 本節以接軌產業界為目標，以未來可能會發展或應用之具有啟發性質的動物模式為主。例如人類用 3C 的時間越來越長，以兔眼科模式的乾眼症研究就極具實用性；另外從事癌症研究的人醫指出，囓齒類的癌症模式研究結果通常無法適用於人類臨床，所以想建立犬癌症模式，或許能讓學生更有啟發性。
3. 各動物模式主要內容包括模式建立、特性介紹、應用領域、特殊照護及福祉，並簡要說明該模式成功建立的標準，以利讀者學習及應用。

紐西蘭白兔（New Zealand white，NZW）分類屬穴兔（*Oryctolagus cuniculus*）經常被用於各種實驗，例如（1）醫材植入：國際常用物種包括狗、羊、山羊、豬或兔子，研究人員可以選擇最適合他們研究設計的物種，而有關骨頭植入材料的測試，兔子是最常被用於篩選植入物材料的首選物種。（2）多株抗體生產：對多數免疫學研究人員，兔子被認為是良好的多株抗體生產平臺。

豬隻（*Sus scrofa*）當作臨床前動物試驗模式的實驗動物是因為豬的生理解剖，心血管系統，神經系統，內分泌系統，骨骼結構，跟人類最為相似。生技醫學的研究領域中，大多先以小動物如小鼠、大鼠、兔子作為試驗動物，後續進行中大動物試驗，若以犬或非人類靈長類當作實驗動物，較易引起動物保護與倫理之爭議，使用豬隻當作實驗動物則較無動物保護爭議的發生。

臺灣以蘭嶼小型豬（Lanyu pig）為主力（包括李宋豬），經農委會畜產試驗所 1980 年自蘭嶼引進小耳種蘭嶼豬 4 公 16 母，進行保種與遺傳資源保存。蘭嶼小型豬 6 個月齡時性成熟，體重約在 25 公斤左右；1 歲齡時約 40-45 公斤；2-2.5 歲齡時，生理性成熟，生長板關閉，體中約在 50-60 公斤，後續體重維持在 60-70 公斤，蘭嶼小型豬體型適中，售價合理且取得容易，適合進行生技醫學臨床前動物試驗；飼養照護人員經適當訓練後，對於飼養管理與術後照護相關操作技術，容易上手。

畜產試驗所積極規劃小型豬品系的選育計畫，發展符合生物科技與生命科學實驗用小型豬種。同時辦理實驗動物於醫藥研究用途的推廣與利用，增進生醫研究單位對小型豬的了解，並提供協助運送服務，蘭嶼小型豬成為試驗動物之應用比例逐年提高，所以發展蘭嶼小型豬為實驗動物極具市場潛力，更會成為醫學研究與醫材開發試驗之主流。

近年來，蘭嶼小型豬已成為研究單位與生技產業界，進行生物醫學與臨床前動物試驗研究的新寵，例如急慢性肝衰竭動物模式，心血管的心肌缺血試驗、心瓣膜冷凍保存、心瓣膜移植試驗、高血脂豬隻冠狀動脈再狹窄試驗、心臟超音波及心導管操作訓練、血管支架開發試驗、中央靜脈導管相容性試驗；以脾臟進行止血敷料研究開發試驗；以肺臟進行肺臟移植與肺臟損傷灌流保護試驗、奈米銀吸入動力學試驗；以膀胱進行膠原蛋白尿失禁填補劑開發試驗；在神經則進行坐骨神經損傷幹細胞修護試驗，對於骨骼試驗，則有關節軟骨細胞再生修護試驗、骨質疏鬆症模式、及各種骨科醫材的開發試驗；在消化系統有發炎性腸炎模式建立及藥物開發試驗；細胞治療方面有糖尿病皮膚幹細胞治療試驗、骨髓幹細胞、臍帶血幹細胞採集與保存試驗；在皮膚試驗應用方面，有燒燙傷藥物開發試驗、止血敷料研究開發試驗、自體皮膚細胞培養移植試驗；豬隻經餵飼高脂高膽固醇飼料後可以進行高血脂症試驗研究，餵飼有機鉛後，可以進行血鉛參考血樣之製備，提供鉛作業勞工職業健檢參考血樣之用；更可藉由採集不同種原、不同品系之豬隻血液，建立豬隻血液生化參考值，提供試驗豬隻健康狀態監控之用；利用抗原的注射可以由豬隻血液中純化抗體，採取豬隻血液進行高濃度血小板血漿（Platelet-rich plasma, PRP）製備。藥物開發及篩檢方面，以豬為生物工廠，由豬的血液或尿液中萃取純化具有藥理活性的代謝物當作治療藥物，可以降低藥物副作用對人類所造成的傷害。以豬隻進行藥物動力學、藥物交互作用試驗，由於豬隻血液量夠，可以避免以小鼠或大鼠試驗採血時，所造成的血液自然稀釋的誤差，只是試驗藥物量多，成本比較高，但可以進行交叉設計試驗，落實 3R 原則。豬的眼睛結構大小與人相近，可以進行眼角膜保存試驗、仿生眼晶片之試驗。豬的牙床構造相較於其他動物更近於人類，所以豬隻是進行牙植體研發試驗的動物。豬的內臟結構與人相似，所以成為醫師外科訓練及解剖教學操作的試驗動物。

犬隻（*Canis lupus familiaris*） 亦是非常有價值的動物模式。以 2012-2013 年文獻為例，電腦搜尋“beagle”生物醫學科學出版物，大部分為藥理學或毒理學

領域（pharmacology or toxicology），特別是藥物動力學、替代藥物輸送系統和心血管藥理學的研究。其他常見研究領域包括牙齒和牙周病以及手術、整形外科手術、骨骼生理學和影像學研究以及犬傳染病、前列腺泌尿外科和眼科等領域之研究。另有具有獨特的自發性疾病之品種，如華盛頓西雅圖大學保種了一批灰牧羊犬（gray collies），可應用於周期性造血（cyclic hematopoiesis）相關疾病的研究。



圖 2.2-1 小型豬膝關節修復試驗

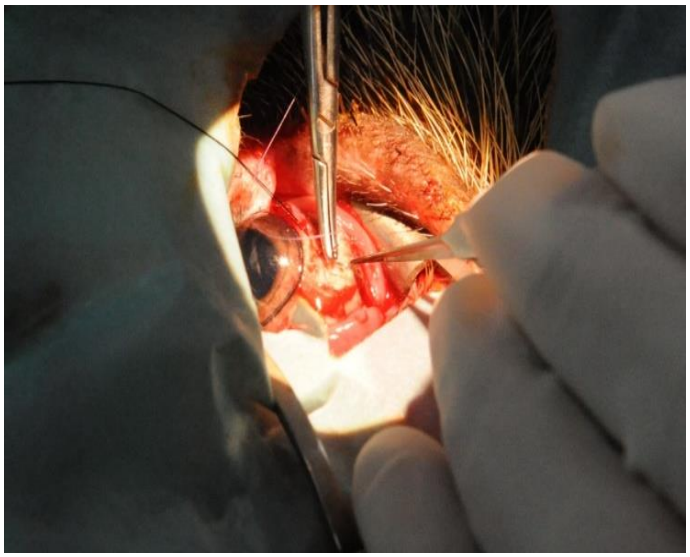


圖 2.2-2 小型豬眼角膜試驗試驗

2.2.1 熱原試驗兔模式（Rabbit Pyrogen Test）

2.2.1.1 特性介紹

熱原（pyrogen）是指任何能引起體溫升高的物質，兔熱原試驗（rabbit pyrogen test）是指將試驗物質製成無菌水溶液後，進行實驗兔之靜脈注射，於規定的時間內測量其肛溫之變化，藉此評估試驗物質是否造成熱原反應。19 世紀末人們對注射製劑引起的不良反應稱為“injection fever”，1912 年 Hort 和 Penof 是首次設計熱原測試的人，當時熱原物（pyrogenic agent）被認為是內毒素且來自革蘭氏陰性，隨後幾年，發現無菌（sterility）並不一定等同無發熱性（apyrogenicity）。熱原是由微生物和非微生物物質（microbial and non-microbial substances）組成的異質性污染物；微生物中最為著名的熱原是內毒素（lipopolysaccharide，LPS），是由革蘭氏陰性菌產生的；其他微生物物質包括來自革蘭氏陽性細菌的脂磷壁酸（lipoteichoic acid，LTA）、酵母（yeasts）、真菌（fungi）和病毒顆粒；非微生物熱原物質可能是橡膠顆粒、微塑膠粒，或金屬化合物。由於藥廠所使用的水經常被發現是熱原污染的來源，於是 1942 年《美國藥典》（USP）第 12 版納入了熱原試驗（pyrogen test）。

2.2.1.2 模式成功建立的標準

有關兔熱原試驗中實驗兔的條件包括：需選擇體重不低於 1.5 公斤成兔，給予均衡的飲食，食物不可含抗生素，測試前一週內實驗兔無減重現象發生。但有下述兩種情況不可選用：A.該兔在 3 天內曾參與熱原試驗且測試結果為通過測試（pass）。B. 該兔在 3 週內曾參與熱原試驗，測試結果為不通過測試（fail）。

飼養環境條件：必須將實驗兔置於安靜區域，環境保持恆溫 20-23℃，測試期間不可餵食餵水，排除干擾以免實驗兔興奮。

玻璃器皿、注射器和針頭要求：用水徹底清洗所有玻璃器皿、注射器和針頭，置於 250℃的熱空氣烤箱中 30 分鐘，若 200℃則放置 1 小時。

保定箱條件：疏鬆保定實驗兔脖子，脖子以外部分仍可以讓其自由行使坐姿，不可以使用皮帶來保定，保定 1 小時後方可記錄溫度，測試過程中實驗兔不可離開保定箱。

溫度計條件：溫度計誤差值為正負 0.1℃，任何一次量測溫度計插入肛門的深度固定約為 5 cm，如用電子溫度計測量，溫度計可以留置在肛門中。

2.2.1.3 模式建立

虛擬測試（preliminary test 或 sham test）：不管是首次參加抑或曾參加過但 2 週前未參加熱源試驗的實驗兔，皆需在試驗前先調適（condition）一到三天，調適意指將等張生理鹽水保溫至 38.5℃，以每公斤 10 cc 行靜脈注射，肛溫從注射前 90 分鐘開始記錄，持續記錄到注射後 3 小時，肛溫如升高大於 0.6℃時即將該兔淘汰，通過虛擬測試之實驗兔以 3 隻為一組開始進行主試（main test）。

產品的製備和注射（preparation and injection of the product）條件：在注射前將液體加熱到大約 38.5℃，將待檢測的產品溶入無熱原生理鹽水，然後慢慢地將混合液於 4 分鐘內以每公斤體重 0.5 毫升到 10 毫升完成耳靜脈注射。

初始溫度（initial temperature）和最高溫度（maximum temperatures）的紀錄：“初始溫度"意指兔子前 90 分鐘體溫之紀錄，每隔 30 分鐘記錄一次，選其中連續兩次的平均值作為初始溫度；實驗兔之初始溫度需在 38.0℃ 與 39.8℃之間，超出則應淘汰。 "最高溫度" 意指在注射後每隔 30 分鐘記錄一次體溫，持續記錄 6 次，在這 6 次中選擇最高一次之溫度。最高溫度和初始溫度差即為反應（response），當兩者相減為負時，則視為零回應（zero response）。

測試結果判讀（interpretation of results）：美國版藥典、歐洲版藥典及其他國家藥典對測試結果判讀，略有不同，以美國版藥典為例說明：3 隻兔子為一組的溫升總和不超過 1.4℃，並且個別兔子的溫升皆小於 0.6℃，則表示測試物通過測試（pass）；一但溫升總和超過 1.4℃，則須繼續測試其他 5 隻兔子，在這 8 隻兔子中，個別溫升大於等於 0.6℃的兔子不超過 3 隻，且 8 隻兔子的溫升反應總和不超過 3.7℃，則表示測試物通過測試。另以歐洲版藥典為例說明：首先以 3 隻為第 1 組進行測試，如果肛溫上升總和不超過 1.15℃，即表該受測物質通過測試；如果肛溫上升總和超過 1.15℃，但不超過 2.65℃，則繼續測試第 2 組，但如果第 1 組的肛溫上升總和超過 2.65℃，即表該受測物質不通過測試（fail）。以此類推，第 1 組+2 組共 6 隻兔子的通過（低於）與不通過（高於）門檻為 2.80℃與 4.30℃，第 1 組+第 2 組+第 3 組 9 隻兔子的通過（低於）與不通過（高於）門檻為 4.45℃與 5.95℃。

表 2.2.1-1 初期到最終之體溫紀錄表

	最初體溫（℃）	最終體溫（℃）					
		30 分鐘	60 分鐘	120 分鐘	180 分鐘	240 分鐘	300 分鐘
第 1 組動物							
第 2 組動物							
第 3 組動物							

表 2.2.1-2 熱原試驗結果

	個別動物體溫上升（℃）	群組動物體溫上升（℃）	試驗結果
第 1 組動物			（+/-）
第 2 組動物			
第 3 組動物			

2.2.1.4 應用領域

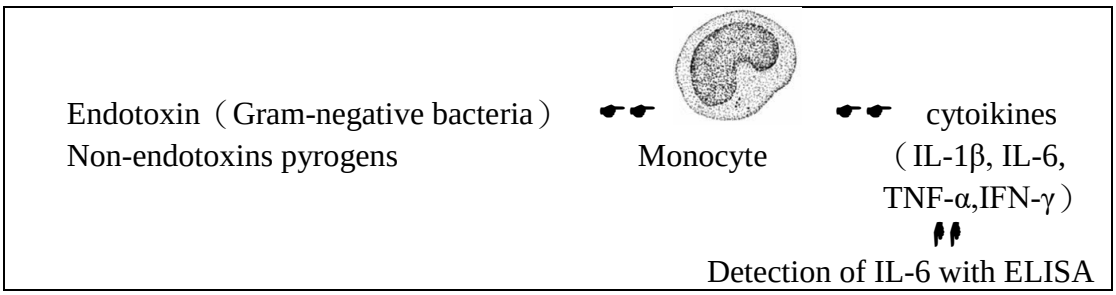
對於製藥公司而言，患者安全一直是當務之急，但製藥過程中的微生物汙染風險並不侷限於活微生物和完整的微生物細胞，生產過程中微生物的細胞成分殘留亦可能是熱原的來源，熱原物質注射到人體後會引起危及生命的發燒反應，因此進行熱原檢測是一項必要的監管要求，以確保產品品質和患者安全。測試熱原的方法目前有三種，分別為兔熱原試驗（rabbit Pyrogen Test），鱟血測試（Limulus Amebocyte Lysate test，LAL test）和單核細胞活化測試（Monocyte Activation Test，MAT），國內目前多數藥廠多以生產「學名藥」為主，而生產「學名藥」的藥廠仍普遍使用兔子做熱原試驗。

2.2.1.5 特殊照護及福祉

由於兔熱原試驗試過程中，實驗兔遭受長時間保定難免造成焦慮緊迫，常引發動保議題，加上實驗兔被反覆使用亦會造成熱原耐受性，因此亟需開發替代試驗。第一個也是最成功的替代方法是利用鱟（馬蹄蟹，horseshoe crabs）血液中的提取物（lysate of amoebocytes）來檢測細菌內毒素，該檢測於 20 世紀 70 年代上市，並成為兔熱原試驗的替代品，但因鱟血測試（LAL test）無法檢測到非內毒素熱原，且以野生鱟血試驗取代兔子，亦會導致野生鱟群減少的問題，為避免不

人道議題發酵且使台灣本島及澎湖、金門的鱟族群免於滅絕，應思考不用動物進行熱原檢測，在這種情況下單核細胞活化測試（MAT）提供了一個有價值的替代方法。

單核細胞活化試驗（MAT）方法已被 2005 年歐洲替代方法驗證中心（ECVAM，European Center for the Validation of Alternative Methods）和 2008 年機構間替代方法驗證協調委員會（Interagency Coordinating Committee on Validation of Alternative Methods，ICCVAM）對熱原點的檢測進行了合格的驗證。自 2010 年以來，它一直是《歐洲藥典》2.6.30 章節熱原檢測的藥典方法之一，MAT 也被 FDA“工業指南--熱原和內毒素檢測問答（Guidance For Industry – Pyrogen and Endotoxins testing: Questions and Answers）“提示作為兔子熱原檢測的替代品”；此外，美國藥典<151>熱原測試篇，還提到“這是一種經過驗證的、等效的體外熱原或細菌內毒素檢測方法，可以用於取代活體兔熱原檢測”。單核細胞活化試驗是檢測全熱原（包括內毒素和非內毒素熱原） 的唯一體外檢測方法，檢測的原理與操作，以 PyroMAT™系統為例，該系統使用冷凍保存的 Mono-Mac-6（MM6）人類單核細胞作為單核細胞的來源，單核細胞被熱原物質啟動後產生白血球介素-6（interleukin-6），並藉由測量單核-IL-6 來確定對熱原物質的反應強弱。首先將酵素免疫分析法（Enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA) 的微量多孔盤（microplate）塗上一種專門針對 IL-6 的抗體，因 MM6 細胞在培養階段會釋放 IL-6 分子，將細胞上清液轉移到 ELISA microplate 後，IL-6 分子會被 microplate 上原本塗有的抗體抓住，再添加鍵結 enzyme 的二級抗體，之後清洗掉任何未結合的分子，最後加入 enzyme 的 substrate，檢測顏色反應，顏色的深淺與上清液中的 IL-6 產量成正比，此時可藉由吸收讀取器進行測量。



2.2.1.6 参考文献

1. Meisel J .Determination of Pyrogens: Comparison of Different Methods. ALTEX. 1995;12（2）:89-92.
2. Fennrich S, Hennig U, Toliashvili L, Schlensak C, Wendel HP, Stoppelkamp S. More than 70 years of pyrogen detection: Current state and future perspectives. Altern Lab Anim. 2016 Jul ;44（3）:239-53.
3. Hartung T .The human whole blood pyrogen test - lessons learned in twenty years. ALTEX. 2015;32（2）:79-100.

2.2.2 刺激性試驗兔模式（Rabbit Irritation test）



兔皮膚刺激性試驗：實驗兔皮膚實驗區及對照區皆無出現紅斑（erythema）、水腫（oedema）、痂皮（eschar）等刺激性反應。

2.2.2.1 特性介紹

刺激的定義為對單一、重複或連續使用的物質/材料產生局部非特異性炎症反應（localized non-specific inflammatory response），進行刺激試驗的目的為評估物質/材料是否含有引發刺激之成分，如無刺激反應產生可謂為相容。要如何判斷是否相容?目前有 ISO 10993、ASTMF748-95 及 FDA Guidance documents （G95-1） 等三大國際性相容性評估標準，台灣所採用的標準為 CNS14393:2004，然而台灣 CNS14393 及美國 FDA（G95-1）皆是引用 ISO 10993 標準，故 ISO 10993 是當今世界醫療器材最完整的生物性評估標準。國際標準化組織（ISO）為 International Organization for Standardization 的縮寫，ISO 10993 為評估醫療器材相容性的條款（Biological evaluation of medical devices）。相容性評估的主要目的乃確保醫療器材、原料、化粧品等物質，不管是以直接或間接接觸人體，它們皆不會釋放有毒物質而造成人體局部或全身性的細胞毒性、致癌性或生殖毒性，也不會導致人體引起發炎、免疫、毒性反應、溶血、血栓形成等危害。ISO 10993 條款下有 20 個子項，其中第 10 個子項（ISO 10993-10 ）為刺激試驗（Tests for irritation and skin sensitization）。刺激試驗所引起的非特異性炎症反應是一種可逆

反應，如發生不可逆反應會導致細胞死亡稱之為壞死（necrosis），可逆反應主要特徵是皮膚局部出現紅斑（redness）。依據測試部位不同，刺激試驗可分為皮膚刺激試驗（Skin Irritation Test）、皮內刺激試驗（Intracutaneous Irritation Test）、眼刺激試驗（Eye Irritation Test）、腸道/生殖道刺激試驗（Vaginal Irritation Test）、口腔刺激試驗（Oral Irritation Test）等

2.2.2.2 模式成功建立的標準

常用刺激試驗有三種，A.皮膚刺激試驗兔模式：此模式乃將被測試物直接或以貼片吸取萃取液，貼附於實驗兔之皮膚表面，來觀察實驗兔局部皮膚或黏膜是否出現局部非特異性發炎反應或呈現紅斑（erythema）、水腫（oedema）、痂皮（eschar）等刺激性反應，皮膚若有損傷產生，需觀察損傷是否為可逆性反應。B.皮內刺激兔模式：此模式乃將萃取過後之萃取液注射到實驗兔皮內，觀察是否出現刺激性反應。C.眼刺激兔模式又稱為德萊茲測試（Draize Test）: 此模式乃將萃取液滴在實驗兔眼球，觀察眼球（角膜、結膜、虹膜）是否出現刺激性反應。

2.2.2.3 模式建立

皮膚刺激係指施用測試物質達到 4 小時後，對皮膚造成「可逆」損傷的結果，茲以皮膚刺激試驗兔模式說明：取三隻健康實驗兔，適應期一週，於試驗前 4~24 小時，以電剪將兔子背上的毛剃除，剃除總面積約為 10cm x 15cm，然後將該區畫成四格（如下圖 2.2.2-1） 。

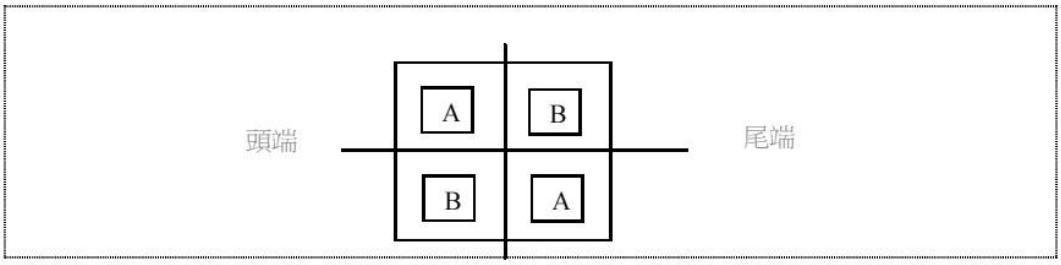


圖 2.2.2-1

取無菌紗布（2.5cm x 2.5cm）吸取 0.5 ml 待測物，然後將該紗布貼在圖 B 的位置，作為實驗區；另取無菌紗布（2.5cm x 2.5cm）吸取 0.5ml 0.9%生理食鹽水，然後將該紗布貼在圖 A 的位置，作為對照區；紗布須以透氣膠帶與彈性繃帶固定，於 4 小時後，移除繃帶、膠帶及紗布，並取蒸餾水清洗 A、B 區。於移除繃帶、膠帶及紗布後第 1、24、48 和 72 小時四個時間點觀察實驗區之皮膚反應（包括

紅斑（erythema）、水腫（oedema)），再依據 Score System of Skin Reaction 評分，之後根據 Primary Irritation Index 公式算出測試物質結果是屬於可忽略（negligible)、輕微（slight)、中度（moderate）或嚴重（severe)。

2.2.2.4 應用領域

供應人類所使用之生醫材料、原料、化粧品等之安全性有賴動物刺激性試驗來把關，但也因此頻遭動保團體激烈反對，對此議題世界各國立場不一，例如歐盟禁止在其境內銷售經動物試驗的化妝品，也呼籲停止動物試驗；日本對非藥物類的化妝品不要求進行動物試驗，亦不禁止動物試驗；美國食品與藥品管理局（FDA)則支持動物試驗;中國大陸規定出口的化妝品可免除動物試驗;台灣 2019 年起建議禁止化妝品動物試驗測試。

2.2.2.5 特殊照護及福祉

令人憂慮的是一旦禁止動物試驗,那誰來為化妝品安全性把關？於是人類開始思考替代方法，例如取人造皮膚進行化妝品化學試驗，抑或取屠宰後之牛眼來測試角膜混濁和滲透率測試試驗；雖然體外試驗取得了相當大的進展，但目前還未有令人完全滿意的結果，因此目前仍需藉助動物試驗。ISO 10993 是開發安全產品的重要工具，此工具結合其他標準和準則，例如包括經合組織準則（OECD Guidelines）、美國藥典（U.S. Pharmacopoeia）和歐洲藥典（the European Pharmacopoeia)，測試交由訓練有素的人員利用 GLP（Good Laboratory Practice）來進行，並恪遵動物福利相關的條例。為了減少動物使用數量，對於刺激試驗，ISO 也提出了一個循序漸進的方法，(1）進行待檢測物質的化學鑒定和分析。第（2）搜尋待測物質成分以及相關文獻。(3）考慮體外試驗（*in vitro* test）是否可代替活體試驗（*in vivo* test)。(4）為了確保活體動物試驗之重現性和靈敏度，實驗設計應有正控制組（positive-control substance)，以顯示陽性反應並驗證測試系統。(5）若已證明為非刺激物，則可考慮在人身上進行皮膚刺激試驗。

2.2.2.6 参考文献

1. Zhang P, Li Q. Revisit the 21-day cumulative irritation test - statistical considerations. Cutan Ocul Toxicol. 2017 Mar;36（1）:29-34.
2. Adriaens E, Guest R, Willoughby JA Sr, Fochtman P, Kandarova H, Verstraelen S, Van Rompay AR. CON4EI: Slug Mucosal Irritation （SMI） test method for hazard identification and labelling of serious eye damaging and eye irritating chemicals. Toxicol In Vitro. 2018 Jun ;49:77-89.
3. Sugiyama M, Akita M, Alépée N, Fujishiro M, Hagino S, Handa Y, Ikeda H, Imai N, Jitsukawa S, Katoh M, Kurihara K, Kyotani D, Nomura S, Okamoto Y, Okumura H, Omori T, Sugibayashi K, Todo H, Toyoda A, Ohno Y. Comparative assessment of 24-hr primary skin irritation test and human patch test data with in vitro skin irritation tests according to OECD Test Guideline 439 （for quasi-drugs in Japan）. J Toxicol Sci. 2018;43（12）:751-768.

2.2.3 多株抗體兔模式（Polyclonal Antibody Production in Rabbits）



2.2.3.1 特性介紹

19 世紀 von Behring 及 Kitasato 發現從痊癒動物身上之血清，經由注射可以保護其他動物，此物隨之被描述為“抗毒素”（antitoxins），這也是抗體（antibody）最早的用語。抗體的結構為何？茲以免疫球蛋白 G（IgG）為例簡單敘述，這個分子是由二條重鏈 （二條長鏈並列，狀似雙手併攏向上拱成 Y 字形）及二條輕鏈（狀似二條落單扁擔）組成，並藉由雙硫鍵將這四條鏈連接在一起，組合後 Y 字型抗體又可分為頭端之 Fab（antigen-binding fragment）區及尾端之 Fc（crystallizable fragment）區，在 Fab 區之末端為高變位點（hypervariable sites），其形似鎖，可以辨識抗原（antigen）之抗原決定區（epitope）並與之結合，兩者關係就像鎖和鑰匙，只有互補才能芝麻開門。

抗體如何產出的呢？當動物受到外來物質入侵，外來物質稱為抗原，包括細菌或者各種巨大分子，尤其蛋白質是相當強的抗原，體內的免疫系統即會對此外來物產生免疫反應，所謂免疫反應簡而言之是指抗原經由巨噬細胞（macrophage）吞噬後呈現給 B 細胞（B cell or B lypmphocyte）及輔助 T 細胞（helper T cell）辨識，B 細胞經由辨識過程加上輔助 T 細胞刺激後，會複製分化成記憶性 B 細胞（memory B cell）及漿細胞（plasma cells），漿細胞進而產生抗體，一個 B 細胞只能產生一種抗體來對抗一種抗原決定區，如有多個抗原決定區，宿主會產生多種 B 細胞，多種不同的抗體。一個抗體只與蛋白質分子上的一小段長度大約在六

到十來個胺基酸鏈結合，這一小段蛋白稱為抗原決定區（epitope），而一個分子量較大的蛋白質就可能有數個抗原決定區，稱為多價抗原（multivalent antigen），可以引發不同類型的 B 細胞分泌不同的抗體，傳統免疫方法所得到的血清，即含有不同抗體的混合物，可以有效地清除抗原維護生物體的健康，這種抗體叫做多株抗體（polyclonal antibody）。生產抗體之漿細胞壽命不長，難於體外培養，所以無法於體外產生抗體，西元 1975 年由 Kohler 及 Milstein 兩位研究人員將骨髓瘤細胞與漿細胞融合稱之為融合瘤細胞（hybridoma），再經由篩選及單株化後，大量產生抗體，由於單一融合瘤細胞株為個別的漿細胞與骨髓瘤細胞融合而成，所以只能產生單一的特定抗體，而這樣由單一融合瘤細胞株所產生的抗體稱為單株抗體（monoclonal antibody），單株抗體可對應相關的抗原決定區。

2.2.3.2 模式成功建立的標準

多株抗體製作可選擇山羊、大鼠、兔等動物，小鼠因為體型較小較少採用。臨床上，亦可抽取恢復期患者或經過免疫後人類的血清獲取多株抗體來治療病人。要成功建立模式必須知己知彼，多株抗體的缺點：（1）每次免疫後所取得之抗體皆會有個體上的差異，無法保證每一批血清所含之多株抗體皆有相同的效價，因此需於每次取得血清後重新訂出反應曲線。（2）分子構造相似的抗原，由於含有共同或相似的抗原決定區，之後所產生的抗血清對這些相似的抗原都會產生反應，也就是所謂的多株抗體會有交叉反應，一旦專一性不足就會常常出現假陽性。（3）多株抗體容易取得，如果源自動物，注入患者體內後，亦容易產生過敏反應等副作用。

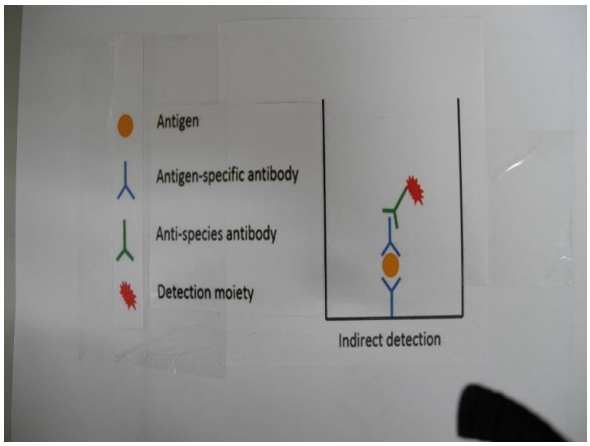
2.2.3.3 模式建立

多株抗體製造方法：要製造多株抗體說來簡單，原理是將特定抗原注入實驗兔，因抗原分子上有很多抗原決定區，便可誘導出很多不同的抗體，之後抽血分離血清，這些血清便含有大量多株抗體。製造多株抗體相關流程如下：（1）選擇成兔（2-2.5 公斤），適應期 1 週；（2）準備免疫抗原（immunizing antigen），抗原的純度和製備方法非常重要，免疫材料必須採用幾乎不具毒性的物質（如尿素、醋酸為腐蝕性毒性物質），且對動物或人員不會構成致病性或毒性，如果必須使用有毒或致病性免疫原，研究人員必須說明其合理性，並得到 IACUC 的批准。（3）注射抗原：在兔子背部脊椎兩側選 2-4 個點進行皮下注射是最常見的

方法，皮下注射最多可選 8-10 個點，每一個點 0.1-0.25 ml；肌肉注射最多可選 2 個點，每一個點 0.25 ml；皮內注射最多可選 5-8 個點，每一個點 0.025 ml；不推薦經由腹腔注射。每個點可注入液體體積：皮下注射最多為 1.5 ml，肌肉注射最多為 0.5 ml，皮內注射最多為 0.05 ml。嚴禁選擇兔子腳墊（Footpad）注射抗原。抗原注射前須以 0.2 micron 濾紙過濾，注射部位要剃除毛髮並以酒精、優碘或氯己定（chlorhexidine）消毒。（4）使用佐劑：因完全弗氏佐劑（Freund's Complete Adjuvant，簡稱 CFA 或 FCA）對兔子有潛在的危害影響，所以只限於第一次抗原免疫注射時使用，人員使用佐劑時應特別小心避免針尖部扎到自己，以免造成注射部位長期疼痛。（5）抽血：抽血量多寡攸關實驗設計也涉及動物生命安危，一般而言活兔全身血液量每公斤約有 57-65 cc，如過多血液於瞬間流失會危及生命，建議每次抽血以每公斤體重 7.7 cc 為上限，每 2 週可重複一次。（6）實驗期間研究人員應清楚敘述於何時及用何種方法來評估免疫反應，例如免疫檢定（immunoassay）、西方墨點法（western blot）或免疫螢光（immunofluorescence）。

2.2.3.4 應用領域

多株抗體可用於臨床治療，由於多株抗體對特定之抗原決定區具有高度敏感和高度特異性，它們在生物醫學基礎研究領域也有廣泛的應用，例如可用於西方墨點法（western blot）、免疫組織化學分析（immunohistochemistry）、流式細胞技術（flow cytometry）、免疫細胞化學分析（immunocytochemistry）、免疫沉澱法（immunoprecipitation）、染色質免疫沉澱/測序（ChIP/ChIP-seq）、阻斷及活化反應、酵素免疫分析法（ELISA）、電泳膠遲緩分析（EMSA）等實驗。



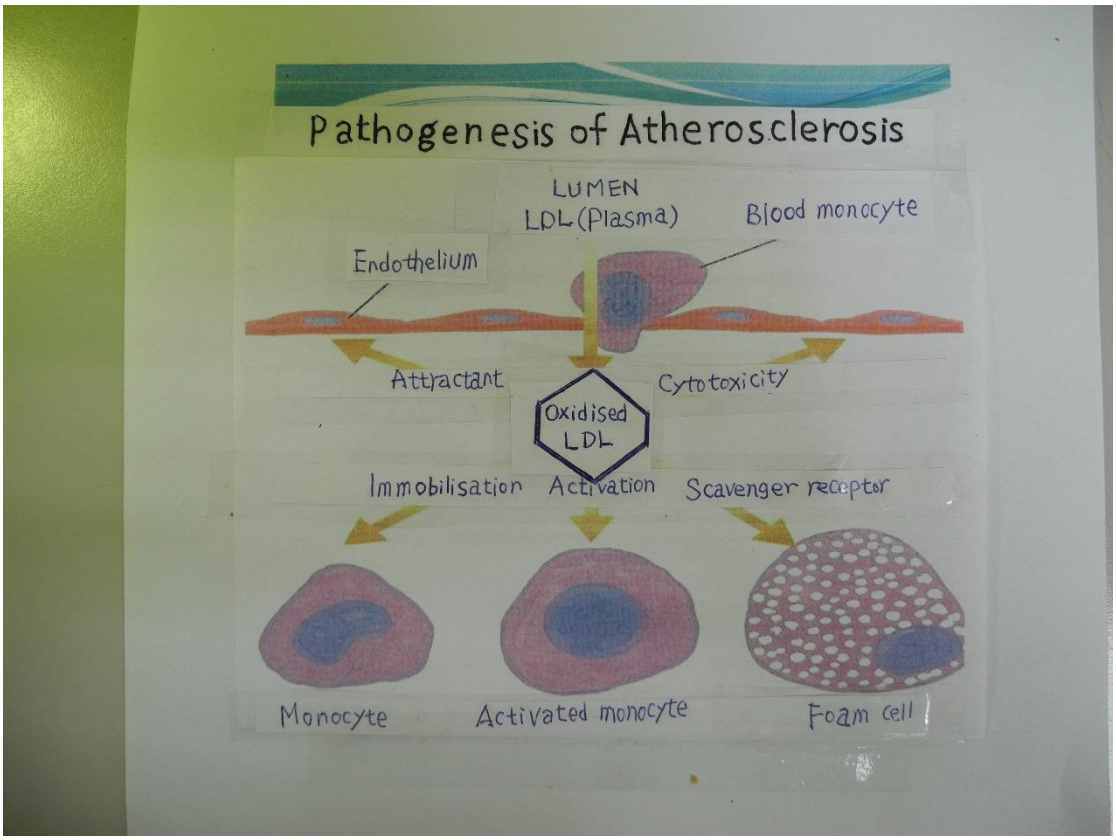
2.2.3.5 特殊照護及福祉

生產多株抗體需要將抗原注入實驗動物體內，這將會使得實驗動物產生痛苦，和其他的動物實驗一樣，多株抗體的生產需要機構內動物實驗照護及使用委員會的監督。生產多株抗體亦可考慮替代方法，例如選擇雞、大鼠、天竺鼠、山羊等動物，亦可考慮從雞蛋蛋黃中回收抗體，這是一種非侵入性也是替代活體實驗的方法。另外目前已有許多生技公司提供客製化優質服務，例如製程短（1.5 個月到 3 個月）、可代為進行抗原的設計並以奈米級技術製備抗原、提供獨家專利佐劑可提高免疫效率、保證抗體品質，例如 ELISA titer 至少≥1：64,000，最終還能提供免疫分析研發服務，協助客戶進行免疫學試劑盒開發。

2.2.3.6 參考文獻

1. Lee ES, Walker CS, Moskowitz JE, Johnson VA, Kendall LV.Cationic Liposome-Oligonucleotide Complex as an Alternative Adjuvant for Polyclonal Antibody Production in New Zealand White Rabbits （*Oryctolaguscuniculus*）. Comp Med. 2017 Dec 1;67（6）:498-503.
2. Wang S, Kalim M, Liang K, Zhan J. Polyclonal antibody production against rGPC3 and their application in diagnosis of hepatocellular carcinoma. Prep Biochem Biotechnol. 2018 May 28;48（5）:435-445.
3. Nakazawa M, Mukumoto M, Miyatake K. Production and Purification of Polyclonal Antibodies. Methods Mol Biol. 2016;1474:49-

2.2.4 動脈硬化兔模式（Rabbit Model of Atherosclerosis）



2.2.4.1 特性介紹

1908 年俄羅斯醫生 Ignatowsk 將富含蛋白質的肉類、牛奶和蛋黃的食物餵給兔子食用，結果兔子出現主動脈壁動脈粥樣硬化（atherosclerosis），而發生動脈粥樣硬化的原因是因為有過多的低密度脂蛋白（low-density lipoprotein，LDL）堆積在動脈壁的內皮層下空間（sub-endothelial space of the arterial wall），經歷氧化成為氧化低密度脂蛋白（oxLDL），並誘導趨化性（chemotaxis）作用，意即血液細胞被招募到受傷的動脈壁，此時血液中單核球（monocytes）會穿透內皮層並攝取 oxLDL 成為泡沫細胞（foam cells），泡沫細胞等同抗原呈現細胞，他們會分泌介質，使炎症進一步長期存在，並刺激血管平滑肌細胞的遷移，從動脈壁的血管中層（tunica media）遷移到內皮層下空間，之後受到血小板衍生型生長因子（platelet-derived growth factor，PDGF）的調節，於是血管平滑肌細胞出現異常的增殖率並分泌細胞外基質蛋白（extracellular matrix proteins），力助纖維表面（fibrous cap）的形成，此纖維表面會保護斑塊核心（the core of the plaque），使其免受血循環細胞血小板的影響。在動脈粥樣硬化斑塊形成過程中會出現巨噬細

胞增殖，凋亡細胞（apoptosis）和胞葬作用（efferocytosis），凋亡細胞可能被移除，導致病灶縮小，凋亡細胞積累亦可能會引發炎症，從而加劇斑塊的不穩定性，斑塊破裂會造成腦中風、心肌梗塞和心衰竭，造成顯著的發病率和死亡率。動脈粥樣硬化主要發生於人類、靈長類和豬，但亦可以在其他物種誘導發生，例如使用基因改造或飲食改變亦可誘導動物出現動脈粥樣硬化，其中最為熟知的物種是紐西蘭大白兔（NZW）。兔一般飼料之膽固醇含量約小於 0.01%，抽血檢測 3-16 個月齡的紐西蘭白兔，其血漿膽固醇濃度約在 30-90 mg/dl 之間，意指正常餵養下，是不容易引發自發性動脈粥樣硬化。要引發動脈粥樣硬化通常需要餵食高膽固醇飼料（從 0.2%到 2% 的膽固醇）。當兔子餵食 2%膽固醇的食物時，它們的血漿膽固醇值會迅速升高超過 200 mg/dl，幾週後就會出現顯著的血管病變，因為這種病變是可複製且動物之間的差異小，所以是非常有價值的動物模式。

2.2.4.2 模式成功建立的標準

建立動脈硬化兔模式優勢在於其體型小易於保定，且成本低廉供應無慮，加上兔子脂蛋白代謝與人相似；但劣勢為兔子病變部位與人不同，兔子主要病變部位是在主動脈弓和胸降主動脈，而人類主要病變部位是在冠狀動脈和腹主動脈。動脈硬化靈長類模式優勢在於它們的心臟解剖和生理與人類非常相似，但劣勢是需耗相當長時間才能誘發動脈粥樣硬化，且倫理議題也限制了它們的使用。

2.2.4.3 模式建立

動脈硬化模式製造方法分成兩類，第一類、建立高血脂動脈硬化兔模式：以 0.3 - 0.5%膽固醇飲食加上 3%大豆或玉米油，按重量餵養 4 週，兔子的平均膽固醇濃度即可上升到約 800 mg/dl。第二類、建立正常血脂動脈硬化兔模式：於正常血脂兔之主動脈埋置聚乙烯導管（aortic polyethylene catheter）、氣球擴張血管成形術（balloon angioplasty）或氮暴露（nitrogen exposure）來造成動脈粥樣硬化病變。

2.2.4.4 應用領域

動脈粥樣硬化是一種進行性炎症性疾病，其特徵是動脈血管壁有脂質累積，長期進展導致動脈粥樣硬化斑塊形成，造成動脈管腔變窄。這種斑塊可以多年不變，也可以迅速破裂觸發血栓形成，造成心肌梗塞和中風等急性心血管事件。使

用動物模式的目的是希望瞭解斑塊形成的分子機制，此外，還可以評估新藥物治療方法。兔子是第一個被用於研究人類動脈粥樣硬化的動物，其他如小鼠、大鼠、天竺鼠、田鼠、鳥類、狗、豬和非人類靈長類動物亦可用於動脈粥樣硬化研究，但他們之間多少存有差異，例如降脂藥物 statin，對於兔子與人類非常有效，但對大鼠和小鼠則為無效，乃因大小鼠脂蛋白代謝與人類不同；由於兔子和人類之間脂蛋白代謝有相似之處，常成為檢測降血脂藥物的首選模式。目前有常用三種兔子可用於研究人類動脈粥樣硬化和脂質代謝: （1） 膽固醇餵養的兔，（2）渡邊可遺傳的高脂血症兔（Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit），由於該兔缺乏低密度脂蛋白受體（LDL receptors），類似於人類家族性高膽固醇血症，（3）基改兔（transgenic and knock-out）。

2.2.4.5 特殊照護及福祉

將兔子膽固醇濃度維持在 800 mg/dl，即等同於人類家族性高膽固醇血症之膽固醇濃度（1,000 mg/dl），此濃度雖不會影響兔子，但如果維持濃度超過 2,000 mg/dl，會是不良的模式，因這種高血漿膽固醇濃度在人類高膽固醇血症患者中從未見過。

2.2.4.6 參考文獻

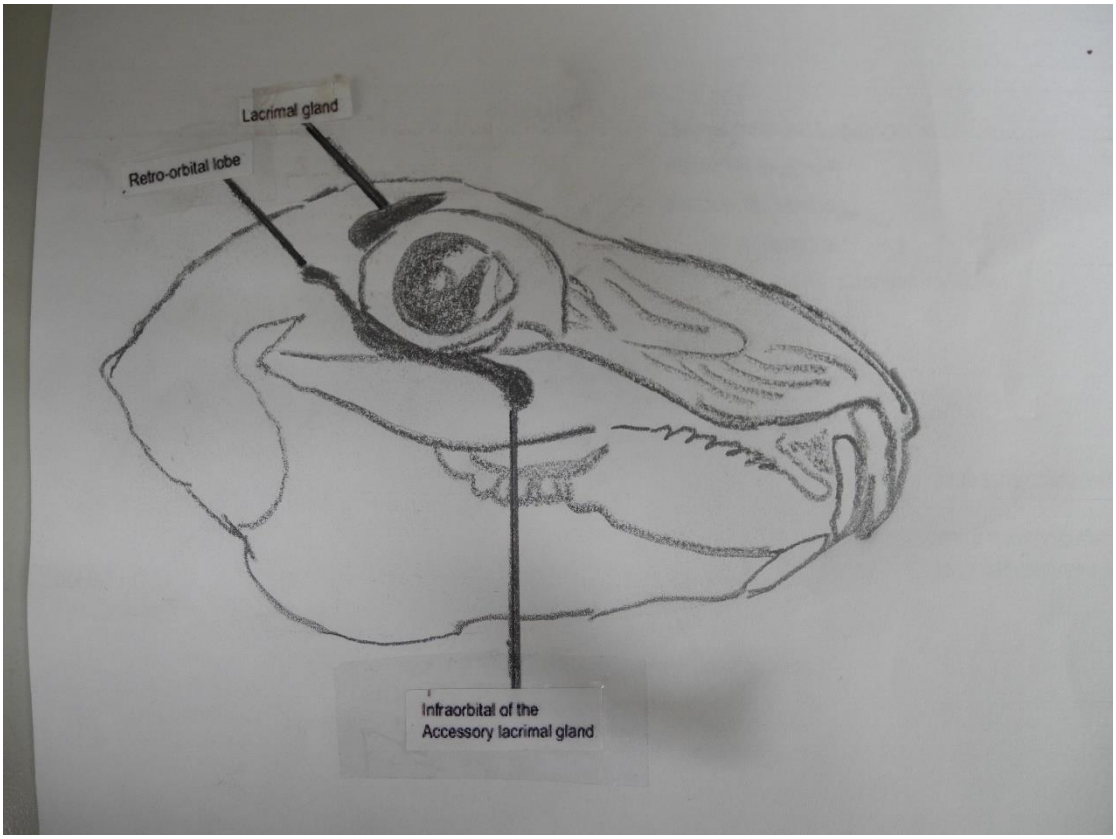
1. Fan J, Chen Y, Yan H, Niimi M, Wang Y, Liang J. Principles and Applications of Rabbit Models for Atherosclerosis Research. J Atheroscler Thromb. 2018 Mar; 25（3）:213-220.
2. Fan J, Kitajima S, Watanabe T, Xu J, Zhang J, Liu E, Chen YE. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. Pharmacol Ther. 2015 Feb; 146:104-19.
3. Li X, Zhang R, Li Z, Ning C, Wang Z, Dang M, Peng Y, Han X, Sun L, Tian J.Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging Quantification of Adventitial Vasa Vasorum in a Rabbit Model of Varying Degrees of Atherosclerosis. Sci Rep. 2017 Aug;7（1）:7032.

2.2.5 乾眼症兔模式（Rabbit Model of Dry Eye Disease）



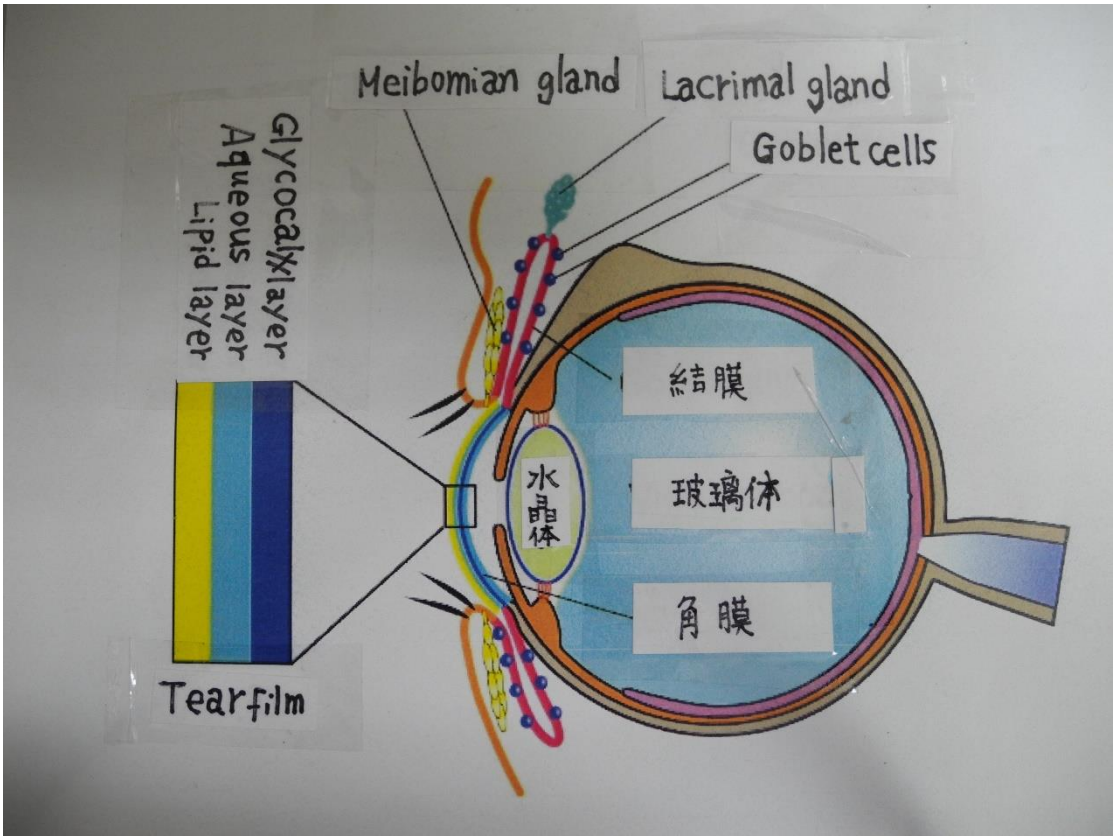

2.2.5.1 特性介紹

乾眼症是一種當代流行疾病，造成乾眼症的危險因子與過度使用電子產品、荷爾蒙代謝變化、自體免疫疾病、感染、服用某些藥物、手術、使用隱形眼鏡及環境等有關。由於電腦、智慧手機和隱形眼鏡對現代生活至關重要，據估計每 10 個日本人中就有一個患有乾眼症，而長時間待在冷氣房，目不轉睛死盯著 3C 螢幕加上淚液分泌不足，使得乾眼症有越來越年輕化的趨勢。乾眼症一般分為兩型，第一型為「過度揮發型」（evaporative）意指眼淚過度揮發，第二型為「分泌不足型」（aqueous deficient）意指眼淚產生不足。這兩型都會導致淚膜（tear film）失去平衡，隨之而來眼淚就會變成高滲透壓而引起眼睛的不適。最常見症狀是眼睛乾澀，而為了緩解乾澀所帶來的不適，人類便會不自主地頻繁眨眼，除了眨眼外，尚有眼睛發紅、怕風畏光、異物感、疼痛等症狀。兔子眼眶上有三個腺體，分別是淚腺、副淚腺和第三眼瞼腺體；淚腺（lacrimal gland）位於眼眶的後背區，副淚腺位於眼眶的下部；兔子利用淚腺和第三眼瞼腺體的分泌物來滋潤、潤滑和沖洗眼球的表面，其中淚腺所產的分泌物是清澈的，但第三眼瞼腺體所產的分泌物是乳白色的。淚膜是由腺體分泌物與來自瞼板腺（*meibomian* gland）和杯狀細胞（goblet cells）的分泌物組成的。眼淚從結膜囊通過鼻淚管排出到鼻子裡。



淚膜分為三層，依序是脂肪層、淚水層、黏液層。淚膜最外層為脂肪層，主要成分是由瞼板腺分泌，完整無破損之脂肪層可以用來保護其下層之淚水避免過快揮發，脂肪層一旦破損其下層之淚水就會溢流出來。淚膜中間層為淚水層，主要成分是由淚腺分泌，除了水分外亦含蛋白質，可提供角膜氧氣及營養，其中 Mucin 5AC 是淚膜主要的蛋白質，乾眼症患者淚液中 Mucin 5AC 濃度會下降。淚膜最內層為黏液層，主要成分是由結膜杯狀細胞分泌，可鎖住淚液。淚膜覆蓋角膜，兔子角膜橫軸長度約 15 mm（人類 11.7 mm），縱軸長度約 13.5-14.0 mm（人類 10.6 mm），角膜厚度在中心約為 0.3-0.4 mm（人類 0.5 mm），在角膜周邊約為 0.45 mm （人類 0.7-1.0 mm），也就是說角膜中央部份較薄，旁邊較厚。角膜除了保護眼睛內部亦提供眼睛約三分之二的屈光力，角膜有 3 至 5 層的上皮（epithelium），中間為基質層（stroma）內有膠原纖維，底層分別是戴氏膜（Descemet membrane）和內皮（the endothelium），人之角膜共分五層，分別是上皮、鮑曼層（Bowman’s layer）、基質、戴氏膜與內皮。因為這些角膜層都是透明的，所以光散射也是最小的。上皮由非角化複層細胞組成（nonkeratinized stratified epithelium），由上到下分別是表面細胞（Surface cells）、翼狀細胞（Wing cells）、與柱狀細胞（Columnar cells）。上皮的厚度約為 53 μm，約占角膜厚度的 10%，

上皮就像皮膚一樣，細胞老化脫落之後，下方的細胞會補位。鮑曼層是一個纖維網狀結構，厚度僅 8 到 14 μm。基質是角膜最厚的構造，富含膠原蛋白纖維，約佔角膜整體厚度的 90%；戴氏膜功能為支持內皮。鮑曼層與戴氏膜兩者合起來厚度占角膜不到 4%。內皮是由單層的內皮細胞構成，內皮細胞對於維持角膜的含水量至為重要，當內皮細胞數量不足或功能喪失，會使得角膜水腫、變得不透明，進而嚴重妨害視力。正常角膜為透明狀，淚液分泌多寡會影響角膜品質，換言之角膜的透明度是取決於淚液是否正常分泌，正常情況下淚液源源不絕，維持淚膜動態平衡，淚液不僅可以濕潤營養眼球，也可使眼球免於受到感染和發炎。



2.2.5.2 模式成功建立的標準

嚙齒動物眼球體積小較不適合從事人類眼科疾病如乾眼症、青光眼、年齡相關性黃斑部病變、光致視網膜病變、白內障和葡萄膜炎等臨床前的藥物療效和安全性研究，也不適合測試新的藥物輸送方法，但儘管它們體積小，特殊品系具有免疫遺傳學和基因改造，則可以用於乾眼症致病機制的研究。而兔子主要優勢在於兔子的眼球近似於人，兔子眼眶位於頭骨的兩側，眼眶開口方向與兔首橫切面成 85 度，眼球前後長度約 16-19 mm，水平長度約 18 mm，不是純圓形結構（人類眼球前後長度約 24 mm，水平長度約 23.5 mm，接近圓形），加上大量解剖和

生理資料，因此常用於手術與藥物輸送方法之研發。好的動物模式不僅可用於研究乾眼症的病理生理學和發病機制，也可用於發展新的治療方法。

2.2.5.3 模式建立

「過度揮發性乾眼症」常見於人類眼瞼閉合不全、眨眼頻率下降、眼瞼發炎等狀況，為模擬此類乾眼症患者，茲以紐西蘭白兔建立機械式抑制兔眼瞼開閉模式：將兔子深度麻醉後，以開眼器將動物一眼之眼瞼撐開，眼瞼撐開維持之時間分別為 3 小時、6 小時、半日及一日，然後在上述不同時間點進行淚液分泌檢查（Schirmer's test），以 Schirmer 淚液分泌檢查紙條來測量紙帶的潤濕長度，並與另一眼對照組相較，以測試淚液產生是否受影響。或於上述不同時間點將螢光染液滴入眼球表面，並以裂隙燈顯微鏡（slit lamp microscope）測試螢光評分，屆時再將動物犧牲、取角膜檢體做組織學評估。

2.2.5.4 應用領域

為了模擬乾眼症不同的成因，不少學者曾提出，例如手術切除淚腺形成淚液產生不足、讓淚腺持續性發炎建立類似於人乾眼乾嘴症（Sjögren syndrome）、切除動物睾丸造成雄激素缺乏、讓動物處於乾燥環境、藥物阻斷淚腺中的 muscarinic receptors 等方法，然而，似乎很難單靠一個模式即可完全反映乾眼症疾病的複雜性。

2.2.5.5 特殊照護及福祉

淚液不僅可以濕潤營養眼球，也可使眼球免於受到感染和發炎。與人類相比，兔子每小時眨眼約 10-12 次，兔子可以忍受較長時間不眨眼可能和其獨特的的哈氏腺貢獻脂肪層形成穩定的淚膜有關，靈長類及犬多不具此腺體，長時間不眨眼會形成乾眼性角膜結膜炎。因此，本模式對其動物福祉影響有限，僅需正常照護即可。

2.2.5.6 參考文獻

1. Xiong C, Chen D, Liu J, Liu B, Li N, Zhou Y, Liang X, Ma P, Ye C, Ge J, Wang Z. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 May;49（5）:1850-6.

2. Higuchi A, Inoue H, Kaneko Y, Oonishi E, Tsubota K.Selenium-binding lactoferrin is taken into corneal epithelial cells by a receptor and prevents corneal damage in dry eye model animals. Sci Rep. 2016 Nov 11;6:36903.
3. Tseng CL, Chen ZY, Renn TY, Hsiao SH, Burnouf T. Solvent/Detergent Virally Inactivated Serum Eye Drops Restore Healthy Ocular Epithelium in a Rabbit Model of Dry-Eye Syndrome. PLoS One. 2016 Apr 21;11（4）.

2.2.6 牙科植入物實驗犬模式（Canine Model for Dental Implant Materials）



2.2.6.1 特性介紹

如何取代缺牙的想法已經近 1000 年，人類最早曾嘗試使用貝殼或石子來取代缺失的牙齒，於 1950 年代，有一位年輕的瑞典研究員 Per-Ingvar Brnemark 正從事一項骨頭血液流動的研究，目的是要觀察兔子腿骨組織中的血液循環，於是他在兔子的腿上安裝了一個光學元件，光學元件被固定在一個鈦製盒中，經過一段時間後，當他從兔子身上取出光學元件的時候，發現鈦金屬和骨頭幾乎是分不開，當時認為這種現象幾乎不可能發生的，此種現象也就是所謂的骨整合（osseointegration），科學的突破往往是無意或偶然發現，鈦作為牙植入物材料帶來了牙科革命性的變化。人體骨頭對於外來物通常都會有免疫排斥反應，所以金屬要充當植入物，必須能與身體骨細胞和平相處，也就是要具有生物相容性（biocompatibility），生物相容性材料分為三種等級，第 1 種，生物可忍受性材料（biotolerant material），此類材料不適合做植入物，例如 PMMA（polymethylmethacrylate）；第 2 種，生物鈍性材料（bioinert），骨細胞可忍受此類材料，例如鈦金屬（titanium）或氧化鋁（alumium oxide），骨細胞會在這類

材質的表面形成骨組織；第 3 種，生物活性材料（bioactive materials），此類材料會與骨質組織產生一連串化學反應，例如 hydyoxyapatite 或 calcium phosphate ceramic 多用於人工骨粉或塗抹於植入物表面。

2.2.6.2 模式成功建立的標準

要成為良好的牙植入物，植入物必須先進行 *in vitro* 試驗，證明細胞活性狀況良好且植入物具有耐磨抗壓等物理性質，接著才進行 *in vivo* 動物試驗，證明有骨整合效果。活體常用動物模式包括嚙齒類、兔類、犬類、豬類和靈長類。兔或鼠因口腔面積狹小有礙植牙手術操作，豬則需考慮其體型涉及術前術後照護之難度，靈長類獼猴因涉及動物保育及成本問題，以上動物常不列入植牙模式首選之動物，實驗犬因其下顎骨（如臼齒等）與人類之咬合情形較為相似，且實驗犬容易接受保定及術後觀察，所以常作為植牙動物模式。

2.2.6.3 模式建立

以氧化鋯（Zircionum）植入物植牙動物模式為例，可選用一歲齡 beagle 犬，植牙前需先拔除下顎三顆前臼齒（P2、P3、P4）及第一大臼齒（M1），之後讓實驗犬休息三個月，此期間需每日觀察並記錄犬隻口腔復原狀況，待確認完全復原後才可執行後續植牙手術，進行植牙手術時可將三支植入物植入拔除牙齒殘留之無齒區，完成植牙後並等到預計時間到達後即可終結實驗，移除實驗犬下顎，連同牙齒將下顎切塊，浸泡於 10%福馬林，完成組織固定脫鈣後佐以微電腦斷層、X 光等影像對照。

2.2.6.4 應用領域

有關牙科植入物特性如何影響臨床效果，牙醫學界已有充分的研究與瞭解，這些特性包括植入物的表面成分、微觀結構、是否具有足夠的韌性和強度、是否具有生物相容性並能抵抗腐蝕和壓裂。牙科植入物依材料組成分為幾類：第一類，鈷鉻鉬合金（Cobalt-chromium-molydenum），此類材料屬於 biotolerant material，有離子釋出腐蝕之慮。第二類，純鈦金屬（pure titanium），此類材料屬於 bioinert，由 99%鈦金屬加上氧與微量的鐵碳氦氫等元素組成，可提高抗腐蝕性，但對抗較大咬合力仍嫌不足。第三類，鈦合金（Titanium-aluminum-vanadium alloy），其機械強度（tensile strength）比純鈦金屬高兩倍以上，常用於植入物、牙冠、牙橋

和假牙；但因為鈦合金含釩（vanadium）和鋁（aluminum）仍有釋出產生毒性之慮，為此開啟了無釩和無鋁鈦合金植入物。第四類，氧化鋯，雖然含有金屬元素但並非鋯金屬而是氧化物陶瓷；鋯可以與骨骼以及鈦金屬結合，免除患者對金屬過敏的擔憂。選擇鋯的潛在優勢包括零腐蝕風險，但因鋯的使用時間相對較短，所以其耐用壽命尚未完全得到證實。上述第三類鈦合金通常是臨床牙醫師選擇植入物的 "黃金標準"，而氧化鋯植入物會異軍突起乃是因為臨床上常發現鈦金屬植入物在齒周牙齦部容易產生暗沉色，應病患美觀要求，牙醫師已著手使用氧化鋯植入物，包括牙冠牙橋的使用。在過去的幾十年裡，植牙已經成為修復缺失牙齒的可靠方法，在此期間，對於牙植入物的材料也進行了廣泛的研究，並對物理和化學特性如何影響治療臨床結果的理解有了很大的改善。

2.2.6.5 特殊照護及福祉

植牙後犬隻病歷須個別管理，手術時所給予的麻藥劑量、抗生素劑量、手術部位、手術時間、清醒時間、麻醉時反應等需做詳細記錄，術後亦需記錄給藥狀況與身體狀況直至實驗結束。

2.2.6.6 參考文獻

1. Wancket LM. Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. Vet Pathol. 2015 Sep;52（5）:842-50.
2. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. Eur Cell Mater. 2007 Mar 2;13:1-1013:1-10
3. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. Periodontol 2000. 2015 Jun;68（1）:66-82.

2.2.7 關節軟骨受損修復實驗犬模式 （Canine Model in Cartilage Repair）

2.2.7.1 特性介紹

關節軟骨位於關節的兩端，人類的膝蓋關節軟骨大約只有幾公分厚，緊鄰軟骨組織的正下方正是骨骼，兩者在結構上有明顯的不同，硬骨組織具有豐富的血管和神經，新陳代謝非常旺盛，相反地軟骨組織不具有任何血管和神經，新陳代謝非常緩慢。關節軟骨一旦破損，兩塊硬骨就會直接碰撞，就會造成疼痛感。其次關節軟骨像一塊吸滿水的海綿，其中水分佔最多約 80%，其次是第二型膠原蛋白，和醣蛋白，軟骨細胞佔最少約 1-5%，軟骨細胞可分泌第二型膠原蛋白和醣蛋白，他們造就軟骨組織強韌的特性，再加具有吸水性，使得軟骨可以承受壓力，軟骨組織像海綿，受到擠壓時，水分會從軟骨組織中流到底下的硬骨組織中，當壓力消除時，水分又重新流回軟骨組織中，藉由這樣的機制，可以抵消對於硬骨所產生的壓力，又加上關節軟骨的表面十分平滑，關節間又有關節液的潤滑，就像齒輪間的機油一樣，使得運動所產生的摩擦力非常小，可以避免關節軟骨磨損，由於有這些特性可免於運動傷害。反過來說，一旦軟骨細胞所分泌的膠原蛋白和醣蛋白變少，就會導致整個類似海綿的結構崩解，軟骨變薄了，承受壓力的功能也減少了，長期承受重力就會產生臨床症狀。關節軟骨損傷和退行性變化是導致人類不良於行的主要原因，茲以退化性關節炎為例，退化意指在兩個關節軟骨處產生病理變化，退化性關節炎跟年齡有關，年齡不同，會有不同程度的退化，30 歲以上大約 1%可見到關節軟骨退化，40 歲以上是 10%，50 歲以上是 40%，60 歲以上則為 50%，經由 X 光片察看，可看到諸如關節表面凹凸不平、關節腔變窄以及長骨刺等畫面。退化性關節炎症狀主要是關節疼痛、關節僵硬、關節腫大、關節變形，另外在扭動關節時常可聽到不正常的磨擦聲響。軟骨一旦受到損害，如不修復，磨損會與日擴大，當磨損擴大到軟骨下方骨頭時，就會有疼痛感覺、關節腫脹等症狀產生，關節軟骨嚴重損壞時，雖然可選擇部分膝關節置換（內側、前側）及全膝關節置換手術，但金屬關節的壽命僅有十五到二十年，對於年邁的病人或許不是問題，但是對於二、三十歲的年輕患者來說，就非常不合適了，所以務必尋求其他療法。關節軟骨損傷和退行性變化現行治療方法包括：（1）關節復健動作（2）藥物（止痛藥或類固醇）減輕症狀（3）關節腔注射玻尿酸保護軟骨表面，展望未來治療，希望能誘使軟骨細胞自己製造第二型膠原蛋白，以維持軟骨正常的功能。



圖一： 目前的退化性膝關節置換手術治療可以分成部分膝關節置換(內側、前側)，和全人工膝關節置換兩種。圖／秀傳醫院提供

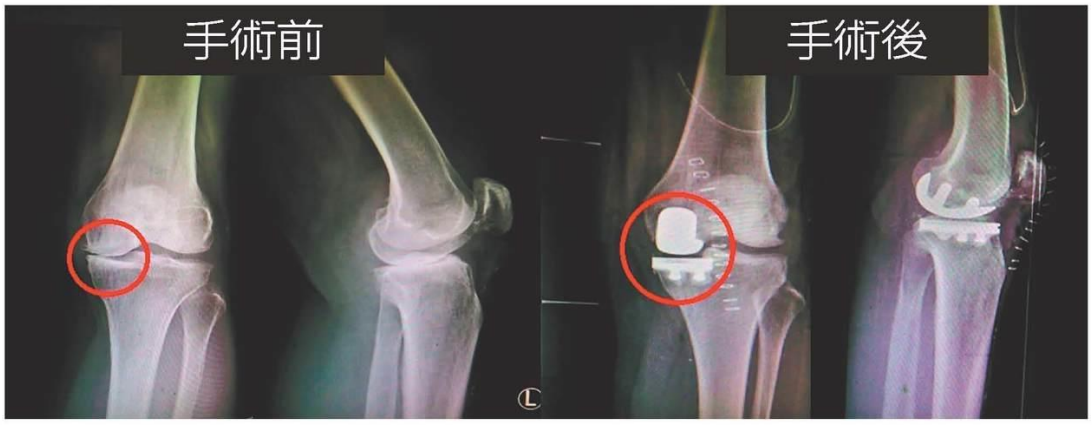


圖 2.2.7-1（上）、圖 2.2.7-2（下左）、圖 2.2.7-3（下右）

資料來源：秀傳醫院提供（2019）

2.2.7.2 模式成功建立的標準

2010 年美國測試與材料學會（ASTM）發佈了《關節軟骨植入物標準指南》有關受損缺陷大小（A critical size defect）的定義，就是指在沒有外力介入的情況下動物無法自行修復的最小缺陷尺寸（直徑）。以股骨髁（femoral condyle）為例，ASTM 建議缺陷大小不應超過關節表面的 15% 至 20%，深度從 1 mm 到 10 mm 不等，實驗結束後需進行外觀評估、組織學評估、生化評估和生物力學評估，以及適當的統計分析。

2.2.7.3 模式建立

首先選擇來源合格的實驗犬，年齡大於 18 個月（狗的骨骼成熟度約在 12 至 24 個月間），體重大於 20 公斤，在膝蓋以手術造成大於或等於 5 mm 的軟骨缺損

病變（典型的缺損手術是在股骨內髁（medial femoral condyle）造成 3 mm 至 12 mm 直徑大小的缺損），正常股骨內髁的關節軟骨厚度為 0.95 mm 到 1.3 mm，此等軟骨厚度可以施行全厚度的軟骨缺損（full-thickness chondral defects），意指缺損只涉及軟骨組織。對照組則為對側未經造成缺陷的正常關節，接著進行自體骨軟骨移植或同種異體移植，或支架植入物。術後對狗進行臨床評估（pain、effusion、 muscle mass、quality of life、subjective and/or objective gait analysis），影像評估（arthroscopy、radiography and/or MRI），6 個月後為實驗終點施予安樂死時進行 gross、biomechanical、histologic and biochemical outcome measures。

2.2.7.4 應用領域

避免關節惡化可以進行移植，移植包括 1.自體移植，移植物來自患者本人，所以沒有排斥的問題，恢復速度快，但礙於患者能提供供移植物組織有限，且同時也製造了另一個傷口，可能會引起該部位的壞死，所以方法有其侷限性。2.異體移植，可從腦死者取得移植物或從其他活體取得移植物，但礙於供應、排斥及感染疾病等問題，也可使用動物移植物，但同樣也有排斥和傳染病的問題，並沒有廣為採用。未來關節軟骨缺損修復技術是利用組織工程概念，在試管內、活的有機體內或是活的有機體外進行，其主要的研究領域可分為（1）細胞：例如間葉幹細胞（mesenchymal stem cells）是軟骨胚胎細胞（chondrogenic cells）的可能來源。（2）載體（scaffold）：能存放這些細胞的生物可分解性材質，並提供這些細胞生長利用，例如像聚乳酸-甘醇酸（PLGA）、膠質、甲聚醣（chitosan）和各種不同水凝膠質。（3）生長因子（growth factor）：能促進這些細胞生長的因子，例如許多有顯著意義的生長因子，包括 BMP family、IGF 和 TGF。

模式成功建立的標準：幾十年來，動物模式一直是軟骨修復研究的支柱，不論是大鼠和兔子等小動物模式，或是狗、豬、綿羊、山羊和馬等大動物模式，它們分別都有好處也有其侷限性，兩者間存在最大的差異是缺損軟骨會自發性癒合，例如嚙齒類動物，他們會持續的發生軟骨內成骨（endochondral ossification）。嚙齒類動物不易成為模式的原因諸如他們的關節體積小、關節軟骨非常薄、手術空間小難操作、術後不易包紮、負重和物理治療困難，而且大鼠和兔子的步態和運動特徵與人類也有很大的不同。然而好處是，嚙齒類動物具有成本效益和空間效率優勢，允許基因操作和使用異種細胞和組織，這項優勢使得嚙齒類動物成為病

理機轉、篩選藥物、生物製劑、醫材和方法的有效模式。狗關節軟骨極適合臨床相關的操作和結果評估，尤其是術後可施加繃帶、矯形器、負重和物理治療。越大型的動物由於其關節軟骨較厚，允許施以部分及全厚度軟骨修復（partial thickness and full thickness chondral repair），純就軟骨大小而言，馬是最適合的模式。雖然較大的動物可能更接近人類的臨床情況，但它們在後勤、財政和倫理方面都必須有更大的顧慮，在規劃研究時，應對每個動物模式進行多因素分析，選定適當的動物模式以達到研究計畫目標。

2.2.7.5 特殊照護及福祉

狗和人類之間的情感交流及其作為家庭寵物受歡迎的地位，凸顯了人們對實驗犬研究的倫理擔憂，這些擔憂也促進 3R 的推廣。但在關節軟骨受損與修復犬模式，術後管理或康復方案仍可能需要借重犬模式。由於我們似乎還沒有出現最理想的臨床前動物模式，因此，研究人員應根據已發表的科學文獻選擇合適的動物模式進行軟骨組織或軟骨組織工程研究。關節軟骨修復的現有重建手術變得越來越複雜，需要精確的動物模式來測試，將新的手術技術轉譯為適當的臨床治療。

2.2.7.6 參考文獻

1. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and Repair.Tissue Eng Part B Rev. ;2010 Feb;16（1）:105-15
2. Cook JL, Hung CT, Kuroki K, Stoker AM, Cook CR, Pfeiffer FM, Sherman SL, Stannard JP.Animal models of cartilage repair. Bone Joint Res. ;3（4）:89-94. Apr.2014.
3. Dias IR, Viegas CA, Carvalho PP. Large Animal Models for Osteochondral Regeneration. ; Adv Exp Med Biol. 2018;1059:441-501

2.2.8 自發性癌症實驗犬模式（Canine Spontaneous Tumor model）



2.2.8.1 特性介紹

癌症被視為是一種威脅生命的疾病，佔全世界已開發國家第二大死因，也是開發中國家的第三大死因，現階段治療可以選擇包括外科切除、放射線、化學、標靶、免疫細胞、基因等療法。癌症雖不是絕症但若輕忽恐也會要人命，而市井聞癌色變皆肇因於治療過程之曲折複雜，唯有深入瞭解癌症之轉移與生長，方能做好事前預防及有效治療。至於克癌之道或許可以引用孫子兵法所云，上兵伐謀、其次伐交、再次伐兵、其下攻城之策略。欲瞭解癌症之轉移與生長，可藉助動物模式來建立癌症發病機制和治療方法。癌症動物模式可根據癌症產生的方式加以分類：（1）自發性腫瘤模式（spontaneous tumor models）：顧名思義就是指癌症自然發生，例如一些近交品系（inbred strains）老鼠特別容易發展出不同形式的癌症。（2）病毒誘發腫瘤模式（virus induced tumor models）：常見的致癌病毒如 Friend leukemia 病毒 及 Rous sarcoma 病毒等。（3）輻射誘導腫瘤模式（radiation induced tumor models）：例如紫外線（UV）是輻射致癌物。（4）化學藥品誘導腫瘤模式（chemically induced tumor models）：例如 DMBA（9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene）。（5）移植腫瘤模式（transplantable tumor models）：藉由皮下注射或腹腔注射等途徑將癌細胞株或組織（cancer cell lines or tissues）移植在小鼠或大鼠身上。（6）基改小鼠腫瘤模型（genetically engineered mouse tumor models）：此模式之腫瘤不像移植性腫瘤，他們具有自然生長和轉移等特徵。以上幾種腫瘤模式大多以老鼠為研究對象。而據估計，在美國每年約有 400 萬隻家犬罹患癌症，

家犬所罹患之自發性癌症包括非霍奇金淋巴瘤（non-Hodgkin's lymphoma，NHL）、前列腺癌（prostate carcinoma）、肺癌（lung carcinoma）、頭頸部癌（head and neck carcinoma）、乳腺癌（mammary carcinoma）、黑色素瘤（melanoma）、軟組織肉瘤（soft tissue sarcoma）和骨肉瘤（osteosarcoma）。由於家犬與飼主朝夕共處一室，兩者擁有許多相同的生活環境背景，故家犬極適合作為家人癌症的衛兵犬。自發性癌症雖然沒有嚴格的流行病學數據可提供，粗估美國家犬每年罹患率為每 10 萬隻家犬約有 5300 個病例，遠遠高過人類每 10 萬人有 500 個病例 。

2.2.8.2 模式成功建立的標準

一般研究抗癌藥物所使用的小鼠模式通常是選擇近交品系（inbred），這些動物具相同年齡性別，餵飼相同飲食並被安置在無特定病原（SPF）環境中。任何一種小鼠模式皆有其使用上之侷限性，理由茲略舉如下：第一、在小鼠身上所使用的抗腫瘤藥物約只有 11% 是被准許用於人類；第二、在基改小鼠（genetically engineered mice）身上產生之腫瘤無法完全反映人類自發性惡性腫瘤的異質性和複雜性，且過度簡化癌症治療；第三、免疫功能不全的小鼠（immunocompromised mice）被用於權充是人體腫瘤免疫細胞之異種移植宿主（human tumor-immune cell xenografts）和取自病患腫瘤組織或細胞之異種移植宿主（patient-derived xenografts），無法完全表達腫瘤與宿主間相互作用的複雜性；第四、擬人化小鼠（Humanized mice）的使用雖可避開免疫缺陷小鼠的一些問題，然而相對上此模式維持費用昂貴且技術複雜。反觀家犬是大型雜交品系（outbred），免疫能力完全，可自發性產生腫瘤，其基因組成和人類相比相似性也遠高於小鼠。當然純就基因組成而論，非人類靈長類動物（NHP）與人類最相似，然而，有趣的是，在動物中心飼養的非人類靈長類動物其自發性癌症的發病率似乎很低，因此很少被用於自發性腫瘤模式研究。在家犬與人類自發性腫瘤模式之間有相似之處也有差異之處，例如惡性肥大細胞瘤（malignant mast cell tumors）和血管肉瘤（hemangiosarcoma）是家犬最常見的惡性腫瘤，但這些癌症在人類中並不常見。人類非霍奇金淋巴瘤（non-Hodgkin’s lymphoma）發病率為每 10 萬人有 19.6 個病例，家犬發病率似乎更高，2014 年美國約有 250, 000 例家犬患有淋巴瘤。人類之結直腸癌、胰腺癌和肺癌三者累計約占美國癌症死亡人數的 40%，而家犬三者累計發病率則不到 1%。此外，家犬乳癌發病率也明顯低於人類乳癌發病率。

就特定癌症而言，了解人類和家犬之間發病率的差異是很重要的, 因這種差異有利於癌症治療的臨床轉譯（translation）。

2.2.8.3 模式建立

家犬通常會被飼主養到終老，終老的年齡也是癌症高風險的年齡，再加上家犬犬口規模夠大（美國本土估計超過 7,000 萬隻家犬），癌症病例數量適足以為新藥建立動物模式，在美國每年就有接近 400 萬件癌症病例發生。另外狗壽命不到 20 歲是人類壽命的五分之一，看到家犬癌症的進展就好像看到人類癌症以 5 倍速度快放進展，間接可以縮短新藥開發時程，及時評估癌症療效，轉化為人類更好的癌症藥物。

2.2.8.4 應用領域

由於實驗犬心血管系統、泌尿生殖系統、神經系統和肌肉骨骼系統方面與人類極為類似，長期以來一直是新藥開發臨床前試驗的關鍵動物模式。全球每年有超過10萬隻實驗犬被用於科學研究，藥物安全測試通常占實驗犬數量的60-85%，另一常見用途則為癌症藥物的研發。家犬自發性腫瘤與人類惡性腫瘤具有許多共同特徵，尤其當犬基因圖譜完成後，家犬自發性癌症自然而然就被納入癌症研究的主流之一。

2.2.8.5 特殊照護及福祉

隨著人類和犬隻壽命不斷延長，加上寵物主人願為他們的愛犬尋找癌症治癒方法，延長動物的生活品質，於是在私人轉診獸醫醫院和獸醫教學醫院就有針對腫瘤專門科別的的特殊照護和治療因應產生。參與犬自發性癌症研究之家犬需要飼主同意書。

2.2.8.6 參考文獻

1. Archana Chavan .Animal models of cancer: a review ; International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research ; 2013. January . 4（1）:19-28
2. de Brot S, Robinson BD, Scase T, Grau-Roma L, Wilkinson E, Boorjian SA, Gardner D, Mongan NP The dog as an animal model for bladder and urethral urothelial carcinoma: Comparative epidemiology and histology. Oncol Lett. 2018 Aug;16（2）:1641-1649.
3. Shearin AL, Ostrander EA. Leading the way: canine models of genomics and disease. Dis Model Mech. 2010 Jan-Feb;3（1-2）:27-34

2.2.9 小型豬模式-骨質疏鬆症模式（Osteoporosis Model in Miniature Pig）

2.2.9.1 特性介紹

骨質疏鬆症（osteoporosis），希臘文 porous bones，意為「多孔的骨頭」主要是骨質密度低於平均值，及骨質流失高於一般平均值，女性在更年期停經後因雌激素下降，骨質疏鬆情況會加劇，因此需要利用適當有效的動物試驗模式，進行預防與治療骨鬆疾病的藥物或醫材研發。通常是以性成熟的小型豬建立骨質疏鬆症模式，可用於骨質流失和其他的骨科相關醫材研發。

小型豬為雜食性，生理性成熟後體型變異不大，骨骼結構與人類的相似，所以常當作研究骨質疏鬆模式及骨科醫材研發的實驗動物。

2.2.9.2 模式成功建立的標準

母豬於 8-10 月齡進行卵巢摘除手術，並餵以低鈣飲食，術後每 3 個月定期進行骨密度檢查，於豬隻腰椎進行雙能 X 光吸收計量法（dual-energy X-ray absorptiometry，DXA）之骨密度（bone mineral density，BMD）檢查，預計一年後試驗豬隻可以造成骨鬆的模式。

2.2.9.3 模式建立

由於小型豬的生長板（growth plate）在 2.5 至 3 歲齡時閉合，代表著骨質密度最高峰，隨後骨鈣的需求也將下降，成骨細胞（osteroblast）的作用將低於破骨細胞（osteroclast），骨骼因而逐漸產生骨質流失，不再成長。為了試驗研究期程，只能利用 8-10 月齡進行母豬摘除卵巢手術，以模擬女性停經後的骨質疏鬆症狀，在餵以低鈣飼料，雖與人類的實際骨質疏鬆情況不盡相同，但亦可建立骨質疏鬆的動物模式。

試驗豬隻如果採用 2.5 歲齡後之生長板閉合骨齡成熟的母豬，進行卵巢摘除後，再餵以低鈣飼料，所建立女性停經後骨質疏鬆症的動物模式，將會更符合人類骨鬆疾病模式。但是試驗期程及費用將會是一大問題。



圖 2.2.9-1 卵巢摘除手術



圖 2.2.9-2 雙能 X 光骨密度測定

2.2.9.4 應用領域

建立骨質疏鬆症模式，可用於骨質流失相關治療研究和其他的骨科相關醫材研發之用。

2.2.9.5 參考文獻

1. Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, Danielsen CC, Sogaard CH, Franks AF, Stevens ML. Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation. Bone. 1993;14（3）:379-382.
2. Kim SW, Kim KS, Solis CD, Lee MS, Hyun BH. Development of osteoporosis animal model using micropigs. Lab Anim Res. 2013;29（3）:174-177.

2.2.10 小型豬模式-心血管疾病研究模式（Atherosclerosis Model in Miniature Pig）

2.2.10.1 特性介紹

豬隻的心血管系統與人類相近，豬和人類一樣是雜食動物，所以豬通常是研究人類心血管疾病的最佳動物，所以動脈硬化成因更是相同，都是因為異常脂質和斑塊的在內皮細胞下堆積，於血管壁形成泡沫細胞，失去彈性，造成動脈粥樣硬化。尤其當冠狀動脈因異常脂質和脂肪斑塊的堆積，冠狀動脈變窄，無法供應心臟足夠血液和所需的氧氣，就會造成心肌梗塞，危害生命。因此藥廠為研發治療心臟病和拯救生命，及降低藥物副作用的藥物努力，在藥物開發過程中，臨床前的試驗過程必須有動物試驗研究。

2.2.10.2 模式成功建立的標準

採血檢測血中膽固醇和脂蛋白含量，可以看到明顯升高，甚至看到乳糜血；如果剖檢亦可觀察到主動脈脂肪斑，除了連續餵食高脂肪、高膽固醇（HFHC）飼料外，可使用機械性損傷動脈血管壁，造成再灌流傷害（reperfusion injury）有動脈內泡沫細胞（foam-cell）及動脈粥狀瘤（atheroma）產生，進而造成心肌梗塞。

2.2.10.3 模式建立

利用 8-10 週齡的豬隻，餵飼含 16%飽和脂肪和 4%膽固醇飼料時，幾週後，可見血中膽固醇和脂蛋白含量明顯升高，甚至有乳糜血；且剖檢亦可觀察到主動脈有脂肪斑的動脈粥樣硬化。

試驗豬隻餵食高脂飼料 6 個月才會出現動脈部分阻塞的病變，主要是動脈內泡沫細胞（foam-cell）及動脈粥狀瘤（atheroma）產生，而冠狀動脈梗塞（myocardial infarction）可能因機械性地傷害而加速形成，所以利用氣球擴張術的損傷（balloon injury）方式，進而增加心肌梗塞的機會。

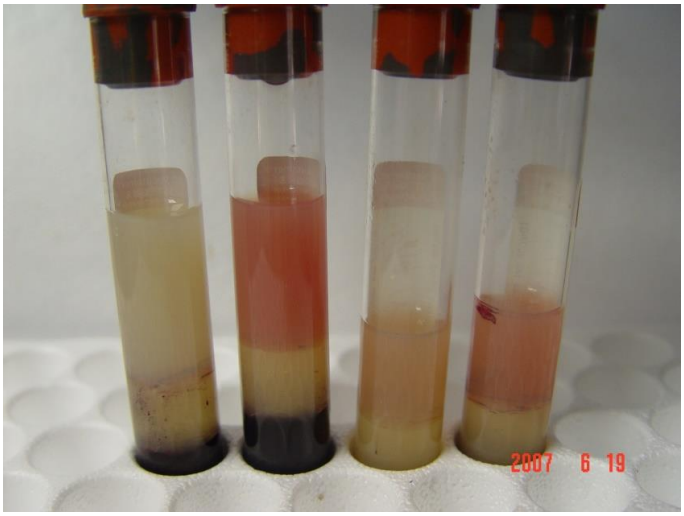


圖 2.2.10-1 乳糜血

2.2.10.4 應用領域

豬時常被用來當作研究膽固醇和脂蛋白代謝的試驗動物，尤其是心臟冠狀動脈的解剖結構和永久性缺血後血管新生模式，與人類非常相似。另外在血液中低密度脂蛋白（LDL）氧化沉積在動脈形成粥狀硬化的過程更似相同，膽固醇與脂蛋白的轉化過程也是跟人相近，因此成為膽固醇和脂蛋白代謝相關研究的最佳試驗動物。

2.2.10.5 參考文獻

1. Godfrey S. Getz and Catherine A. Reardon Animal Models of Atherosclerosis Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 May; 32（5）: 1104–1115.
2. Sandra Artinger, Carolin Deiner, Christoph Loddenkemper, Peter L Schwimmbeck, Heinz-Peter Schultheiss, and Klaus Pels. Complex porcine model of atherosclerosis: Induction of early coronary lesions after long-term hyperlipidemia without sustained hyperglycemia Can J Cardiol. 2009 Apr; 25（4）: 109–114.
3. Damir Hamamdzic and Robert L. Wilensky. Porcine Models of Accelerated Coronary Atherosclerosis: Role of Diabetes Mellitus and Hypercholesterolemia. Journal of Diabetes Research. 2013.

2.2.11 小型豬模式-糖尿病的動物模式（Diabetes Mellitu Model in Miniature Pig）

2.2.11.1 特性介紹

糖尿病（diabetes mellitus，DM）是一種代謝性疾病，主要成因為胰臟無法生產足夠的胰島素，或細胞對胰島素不敏感，造成血糖長期高於標準值；通常會有吃多、喝多、尿多及體重下降的「三多一少」症狀。可分為第一型糖尿病與第二型糖尿病，如不進行治療，會引發許多併發症。包括傷口癒合緩慢及皮膚癢、心血管疾病、中風、慢性腎臟病、糖尿病足、以及視網膜病變等。

第一型糖尿病是因為胰臟產生胰島素的細胞被破壞，無法生產足夠的胰島素或喪失產生胰島素功能，引起體內葡萄糖代謝的受阻。第二型糖尿病是因為細胞對胰島素產生不正常拮抗作用或是沒有反應，胰臟並沒有任何病理問題，造成葡萄糖代謝不良所引起的，通常與胰島素分泌受損有關。

2.2.11.2 模式成功建立的標準

由於第一型糖尿病誘發成功的豬隻和人類罹患第一型糖尿病之間的病徵有許多相似之處，因此以誘發第一型糖尿病的豬可以用來研發人類第一型糖尿病的治療方式。

第二型糖尿病豬的誘發，通常可以 STZ（75 mg/kg）靜脈注射來誘發，誘發後豬隻血糖呈現不穩定狀態，與人的第二型糖尿病病徵相似，尤其是血脂異常第二型糖尿病豬，觀察到的血脂數值與糖尿病患者相近，可以在血管病變發現與糖尿病患者類似的早期動脈粥樣硬化病變。

2.2.11.3 模式建立

第一型糖尿病動物模式可以用豬隻以鏈球菌素（Streptozotocin, STZ）或阿洛桑（Alloxan）誘發;以 STZ 所誘發的豬隻第一型糖尿病與人類的第一型糖尿病相近，且血糖穩定偏高；但以 Alloxan 所誘發的第一型糖尿病，卻因為 Alloxan 毒性大，常常造成豬隻死亡，或是誘發後豬隻血糖不穩定。以 STZ 誘發豬隻為第一型糖尿病的步驟大概如下，通常進豬後，適應環境 7-10 天後；採取血樣，進行連續血液檢查三天（0-3 天建立基準點）；接著開始餵食高油脂、高糖飼料，於餵飼前後測血糖（0-7 天）；再以 STZ（150 mg/kg）靜脈注射，採取血樣，進行血

液檢查；每天餵食高油脂、高糖飼料，並測飯前、飯後血糖，並依飯前測得血糖數值，施打胰島素，如飯前血糖值維持在 350-550 之間，即認定成功誘發豬隻第一型糖尿病。

2.2.11.4 應用領域

豬隻的糖尿病模式，與人類病徵相同，所以可以用來研究藥物開發及治療方式的研究，豬隻胰島細胞分離純化後，以移植的方式，植入胰臟中，治療糖尿病患者的糖尿病。由於幹細胞治療的蓬勃發展，在豬隻開發幹細胞治療模式，將幹細胞植入胰臟中，幹細胞經分化成胰島細胞，誘導分泌胰島素代謝血中葡萄糖，同樣可以治療糖尿病。由於人類和豬胰島素非常相近，功能相同，因此異種移植可能是治療糖尿病的新方法。

2.2.11.5 參考文獻

1. Elin Manell. 2013, The Pig as an Animal Model for Type 1 Diabetes Mellitus – with focus on carbohydrate and fat metabolism. Institutionen för Kliniska vetenskaper
2. Gabel H, Bitter-Suermann H, Henriksson C, SaveSoderbergh J, Lundholm K, Brynger H. Streptozotocin diabetes in juvenile pigs. Evaluation of an experimental model. Horm Metab Res 1985; 17: 275–80.
3. Myeong-Seop Lee, Ki-Duk Song, Hee-Jun Yang, Chester D. Solis, Soo-Hyeon Kim, and Woon-Kyu Lee. Development of a type II diabetic mellitus animal model using Micropig. Lab Anim Res. 2012 Sep; 28（3）: 205–208.
4. Aileen JF King. The use of animal models in diabetes research. Br J Pharmacol. 2012 Jun; 166（3）: 877–894.

第三節 水生、兩棲動物

本章課程安排時數：2 小時

本章學習目標：

1. 斑馬魚具有光週期誘發產卵、體外受精、胚胎透明、胚胎發育期短、器官形成的過程易於觀察、性成熟期短、可以物理及化學方法產生變種魚、可用分子生物學方法改變特定基因的表現及產生基因轉殖魚等特性。
2. 兩棲類具有多產卵、卵夠大、胚胎發育期短、蝌蚪透明，20 至 30 天就可變態成蛙且是雙套染色體等特性，適合做顯微注射、發育生物、生理生態、環境毒理與人類疾病等研究。
3. 本節以斑馬魚之急毒性測試模式、行為模式、環境干擾物質的檢測、兩棲類再生研究等做為應用方向的介紹。

斑馬魚（*Danio rerio*）與人類基因組間高度同源，有 70％的人類基因具有至少一個顯而易見的斑馬魚直系同源基因，且 80%的人類疾病相關基因可在斑馬魚找到對等的基因。在一些器官組織如耳朵、肌肉、心臟、眼睛、血液、脊柱、胰臟及腎等所產生的缺陷，與人類這些器官疾病之病理特徵相似，且為相同基因變異所造成。現階段斑馬魚實驗應用領域分為基礎科研與轉譯科研兩部分，基礎科研包含發育生物學、胚胎學、基因遺傳學、營養代謝學、行為認知學、細胞與信息傳導等；轉譯科研包含致病機轉研究（包括癌症）、老化疾病、神經退化性疾病、急性生物毒性測試、慢性環境污染物測試與藥物篩選等。斑馬魚因為基礎研究非常扎實，尤其基因轉殖技術及方法的成熟，被廣泛的應用於各種毒物試驗與藥物篩選平台。斑馬魚比起其他模式動物相對的便宜、子代數量又多，所以較容易讓研究人員當作替代的動物模式，尤其符合現今國際間不遺餘力推動的動物研究 3R 精神。

兩棲動物（Amphibia）因基礎生理已被廣泛瞭解且對不同的環境有不同的生理適應能力，所以被廣泛做為基礎生理與應用生理學、發育生物學、免疫學、再生醫學、環境與遺傳毒理學的實驗動物模式。兩棲類與人類的親緣關係更近，以兩棲類做為實驗動物模式時，其研究結果應用在生物醫學更可信賴。

2.3.1 魚類及斑馬魚胚生物急毒性試驗模式（Acute Toxicity Test）

2.3.1.1 簡介

魚類常被用來檢測水中之有害物質，羅漢魚為台灣之原生種魚，鯉魚更是我國重要之養殖魚類，為了可以更詳細的了解廢水汙染對本土水資源之影響，環保署曾召集專家學者研議，制訂一個以鯉魚、羅漢魚的仔魚為測試魚種的方法，並公告此方法作為排放廢水之生物急毒性檢測方法。雖然參考 OECD TG236，但本方法主要係以羅漢魚（Pseudorasbora parva）或鯉魚（Cyprinus carpio）的仔魚為試驗生物，以靜水式生物毒性試驗方法檢測生物急毒性，計算 96 小時之半致死濃度（lethal concentration 50%，LC50）或急毒性單位（acute toxic unit，TUa）。

斑馬魚除了作為基礎發育生物學及基因遺傳學的模式生物外，斑馬魚的胚胎也常被用來做毒性試驗，尤其在提倡替代方案的今天，斑馬魚胚的毒性測試已是國際公認為非常合適並且最常被使用的方法之一。數量多而透明的胚胎，加上發育成長快速，在 24 小時之內可以由一個受精卵長成一隻小魚，而在 5 天之內幾乎所有的器官都已具備；這些特性使科學家可以研究各種物質對動物成長、發育中各個不同階段的影響。集合許多研究成果及經過多年的改進，歐盟的經濟合作暨發展組織（Organization for Economic Cooperation and Development，OECD）於 2013 年公佈了斑馬魚胚胎急性毒性測試的方法（TG-236）。隨著 OECD 的方法被廣泛的應用於各種毒物試驗，愈來愈多研究人員也開始利用相同的原理，以各種不同基因轉殖的斑馬魚或魚胚來進行化學物質之毒性測試如肝毒性、腎毒性等試驗。

因應國際間 3R 的原則及在國內動保團體的努力推動下，環境檢驗所於 106 年 3 月公告了斑馬魚胚的生物急毒性檢測方法，所以目前可以使用羅漢魚、鯉魚及斑馬魚胚等方法來進行生物急毒性試驗。

2.3.1.2 模式內容

（1）. 以鯉魚、羅漢魚的仔魚為測試魚種的方法

試驗內容及所有注意事項請參閱以下連結

生物急毒性檢測方法－羅漢魚靜水式法 （NIEA B902.13B）
https://www.epa.gov.tw/DisplayFile.aspx?FileID=2955568FACF619DD
生物急毒性檢測方法－鯉魚靜水式法 （NIEA B904.13B）
https://www.epa.gov.tw/niea/FE0C2E42A553B580

（2）.斑馬魚胚的生物急毒性檢測方法

試驗內容及所有注意事項請參閱以下連結

「生物急毒性檢測方法－斑馬魚胚胎半靜水式法」（NIEA B909.10C）
https://www.epa.gov.tw/DisplayFile.aspx?FileID=59AD7F6450A3845A

以上這三個方法主要以 OECD TG-236 或 ISO-15088 為主的試驗模式，除公告方法中所提到之所有需要符合的事項，還須注意以下各點。

2.3.1.3 注意事項

（1）.使用健康的鯉魚、羅漢魚之仔魚以及健康的斑馬魚配對所收集之受精卵作為實驗之用。

（2）.整個測試過程對環境及所使用溶液均需要有嚴格的控制，如水溫、溶氧量以及 pH 等。

2.3.1.4 適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水及環境用藥之生物急毒性檢測。

2.3.1.5 參考文獻

1. OECD. Guideline for the Testing of Chemicals, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity（FET）Test, 2013.
2. OECD. Validation Report （Phase 1） for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157,2011.
3. U.S. EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, EPA-821-R-02-012, 2002.
4. ISO. International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs （Danio rerio）. ISO15088:2007（E）, 2007
5. Francois Busquet et al., OECD validation study to assess intra- and inter laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing, Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2014,69, 496–511.
6. Stefan Scholz et al., Analysis of the relevance and adequateness of using Fish Embryo Acute Toxicity （FET） Test Guidance （OECD 236） to fulfil the information requirements and addressing concerns under REACH, Report ECHA-UFZ contract ECHA/2014/341,2016

2.3.2 利用基因轉殖斑馬魚來偵測內分泌之干擾物質（EASZY Assay, Detection of Endocrine Active Substance Acting Through Estrogen Receptor, using transgenic cyp19a1b-GFP zebrafish embryos）

2.3.2.1 簡介

Tg（cyp19a1b-GFP）為一種帶有綠螢光蛋白（green fluorescent protein，GFP）的基因轉殖斑馬魚，其螢光蛋白的表達受到 cyp19a1b 基因的調控，進而轉譯為腦中的 aromatase。這個基因有兩大特質（1）綠螢光蛋白僅表現於斑馬魚大腦中的神經幹細胞（radial glial cell，RGC）（neuronal precursor）（2）對雌性素（estrogens）特別敏感，並且可以調控雌激素（E2）的表現。因此，可利用此轉殖基因斑馬魚來確認待測之化學物是否會影響水生生物的雌激素表現變化。用此相同原理，可以利用已知或自行建置的斑馬魚品系來進行雌激素、雄激素或甲狀腺素之環境干擾物質的檢測。

2.3.2.2 試驗內容

（1）. 將健康的轉殖基因斑馬魚 Tg（cyp19a1b-GFP）配對並收集受精卵。

（2）. 將 100 顆受精卵於 4 hour post-fertilization (hpf)前分成五組試驗（溶劑控制組 solvent control 溶液、正控制組 0.5nM E2 及 3 種不同稀釋濃度之受測液體各 20 ml）放入 10 公分培養皿，並放置於 28℃的培養箱中培養。

（3）. 每 24 hpf 更換五組各 20 ml 的試驗溶液，更換至 72 hpf。

（4）. 72 hpf 後，將小魚移至黑盤透明底的 96 孔盤（REF 675090），並在顯微鏡下調整小魚於孔洞的位置，盡量保持在中間。

（5）. 將 96 孔盤移至 ImageXpress Micro High content system 掃描魚隻螢光表現。

（6）. 利用 MetaXpress-MDCStore2.3 software 分析數值。

（7）. 整個測試過程需要嚴格控制以下幾項因子：

a. 所有溶液需要有足夠的溶氧量（≧60%），pH 值必須介於 6.5-8.5 之間。

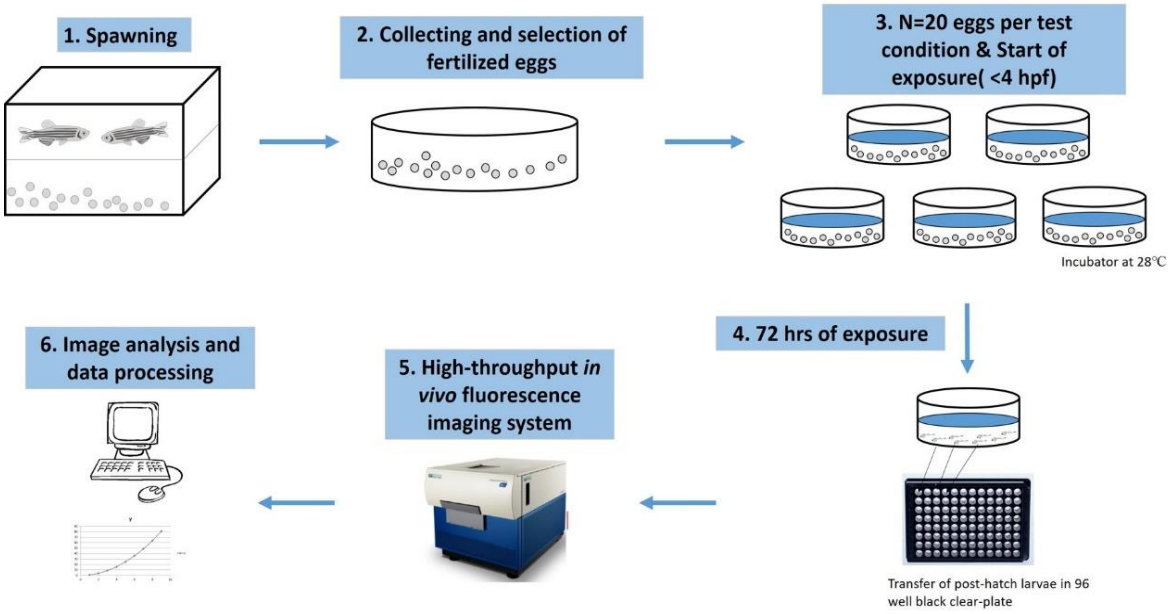
b. 轉殖基因魚需事先篩選，以確保其背景螢光表現強度的一致性。

c. 在 2 day post-fertilization (dpf)時，溶劑控制組的胚胎存活率必須高於 70%，孵化率需高於 80%。

2.3.2.3 應用範圍

一般水溶性的化學物質均可適用。脂溶性的化學物可以先溶於少量有機溶劑中（如 1% 的 DMSO、0.1%的 methanol 或 Ethanol）再進行稀釋。目前最常被用來檢測廢水、及一些食品包裝溶出物是否產生水生生物之荷爾蒙干擾毒性。

2.3.2.4 圖示檢測步驟



2.3.2.5 參考文獻

1. Tong SK, Chung BC et al. A cyp19a1b-gfp （aromatase B） transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. Genesis. 2009 Feb; 47（2）:67-73.
2. Brion, Y. Le Page, B. Piccini, O. Cardoso, S.-K. Tong, B.-C. Chung, O. Kah Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic （cyp19a1b-GFP） zebrafish embryos PLoS One, 7 （5） （2012）, p. e36069.
3. Detection of Endocrine Active Substance, acting through estrogen 2 receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish embrYos （EASZY assay）.

2.3.3 斑馬魚之行為試驗 （Zebrafish Behavior Test）

2.3.3.1 簡介

斑馬魚也經常被用來做行為試驗的動物模式，舉凡憂鬱、空間記憶、顏色偏好及智能學習等研究均有使用斑馬魚的文獻報導。智能學習行為實驗為動物模式常見的行為實驗之一，在斑馬魚的行為研究中，經過反覆學習可利用其辨識特定線索與飼料的獎勵之間的連結，來研究其認知與記憶能力。斑馬魚的仔魚也可以用來進行游動的行為測試，但因斑馬魚仔魚體積過小，一般錄影機所錄的仔魚行為影片因解析度不夠清楚，很難用軟體來分析其軌跡。所以幼魚行為實驗會通常會在行為分析箱中進行，目前市面上可以買到至少兩種商業產品如 Noldus（DanioVision）及 View Point （ZebraBox）、並且用其所發展的軌跡追蹤分析系統來進行實驗分析。

2.3.3.2 成魚行為測試

（1）. 試驗內容

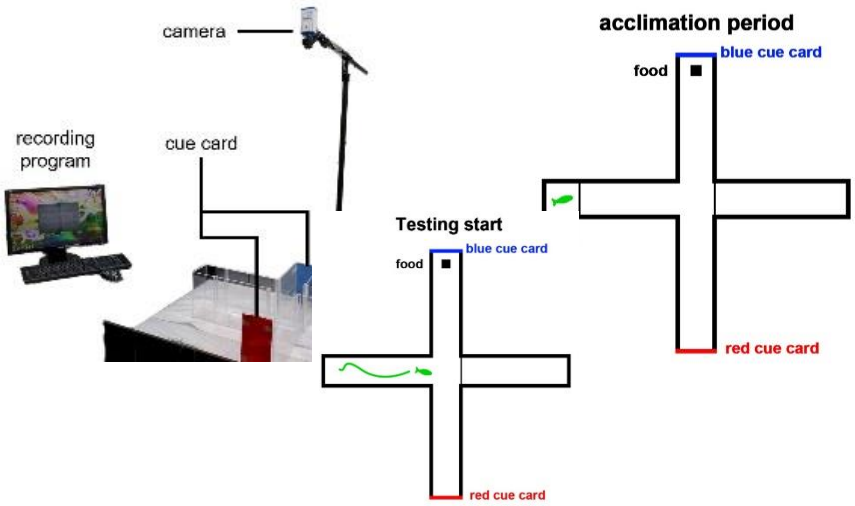
A. 選定待測之成魚，不以投料方式餵食，而是以 3 塊方形海綿各約 9 立方公分用剪刀剪出小缺口並塞入約 0.04 公克飼料（如下圖所示）置於飼養缸餵食。方塊餵食時間為 30 分鐘，每日兩餐（於上、下午固定時間）。



B. 於行為研究室架設錄影鏡頭、十字迷宮、電腦等設施。

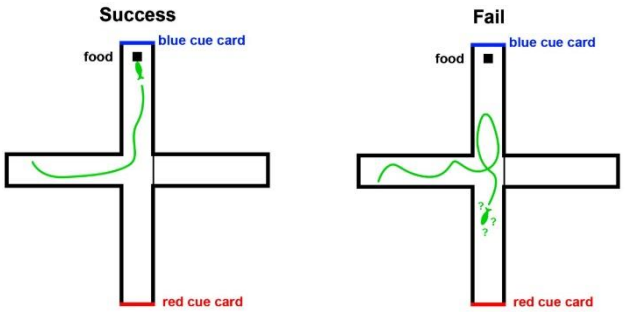
C. 將待測成魚從飼養房移出，並置於行為研究室一小時，使魚適應其空間環境。

D. 將待測成魚撈至水迷宮，並適應水中環境（如下圖所示）。



E. 將匝道打開後，讓魚隻尋找含有飼料的方塊海綿位置，訓練其在水迷宮找到飼料的能力。通常在一週內斑馬魚可以成功地記住飼料所在的位置。

F. 當訓練完成後，打開攝影機記錄影片，從魚隻放入適應水環境、打開匝道，到魚隻找到飼料所在的位置為止，需全程記錄（進行試驗時海綿內不含食物，以確定魚隻已經完全記住食物的位置）。



G. 以 Noldus EthoVsison XT 軟體分析魚隻游動軌跡，常用的軌跡參數包含：找到海綿所需的時間（latency）、游動速度（velocity）、總游動量（total movement）等。

H. 整個測試過程需要嚴格控制以下幾項因子：

d. 在第一步驟於魚缸中訓練餵食時，其方塊海綿需保持立於缸底，讓魚隻可以看到飼料的那一面，另外進水管需關閉，避免海綿遭受水流衝擊。

e. 整個行為實驗流程，除了在方塊海綿中吃到飼料之外，所有測試魚隻並不會再投料餵食。

f. 行為研究室在實驗中盡量減少外在環境（噪音）的干擾。

g. 實驗流程中，其訓練天數、魚隻適應水環境與記錄魚隻找飼料的時間等，可因研究需求而有所調整。

（2）. 應用範圍

可應用於斑馬魚腦神經科學上對於空間記憶、顏色喜好以及智能學習等的實驗。

2.3.3.3 斑馬魚幼魚行為測試

（1）. 試驗內容（以 DanioVision）機型為例

A. 將待測魚種配對並收集受精卵。

B. 經孵化後，依實驗設計將幼魚放入培養盤中（如 6 孔、24 孔或 96 孔盤等）並置於 Noldus DanioVision 行為箱中。





C. 以軟體設定實驗設計，如光亮、震動等刺激是否對待測幼魚的行為有所差異。

D. 以 Noldus EthoVsison XT 軟體分析魚隻游動軌跡。

E. 整個測試過程需要嚴格控制以下幾項因子：

A. 實驗流程中，DanioVision中的參數可因自行研究需求而有所調整，但應盡量避免重複多次或規律性的刺激，以減少魚隻因對刺激產生麻痺而造成無效刺激。

B. 為了獲得較佳的活動軌跡攝影效果，一般使用至少6天以上的仔魚來進行行為偵測實驗。

C. 行為偵測儀器所放置的桌面最好可以防震，以避免對行為測試產生干擾。

（2）.應用範圍

可以檢測幼魚/成魚的遊動速度、總游動量及其對特定刺激所產生之行為差異變化等。

2.3.3.4 參考文獻

1. Aoki, R., Tsuboi, T. & Okamoto, H. Y-maze avoidance: an automated and rapid associative learning paradigm in zebrafish. Neurosci Res 91, 69-72, doi:10.1016/j.neures.2014.10.012（2015）.
2. Grone, B.P.; Qu, T.; Baraban, S.C.（2017）. Behavioral Comorbidities and Drug Treatments in a Zebrafish scn1lab Model of Dravet Syndrome. eNeuro, 10, 1523.
3. Tristan Darland and John E. Dowling. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. PNAS September 25, 2001 98（20） 11691-11696
4. Zhang, J.-L.; Souders, C.L.; Denslow, N.D.; Martyniuk, C.J.（2017）. Quercetin, a natural product supplement, impairs mitochondrial bioenergetics and locomotor behavior in larval zebrafish（Danio rerio）. Toxicology and Applied Pharmacology, 327, 30-38.
5. Sison, M. & Gerlai, R. Associative learning in zebrafish（Danio rerio）in the plus maze. Behav Brain Res 207, 99-104, doi:10.1016/j.bbr.2009.09.043（2010）.

2.3.4 斑馬魚胚篩藥模式（Drug Screening Using Zebrafish Embryos）

2.3.4.1 簡介

相較於其他實驗動物，斑馬魚的基因轉殖實驗相對簡單而且有很高的成功率，加上斑馬魚的魚胚產量多且容易收集、胚胎早期是透明的等特性，使斑馬魚胚成為進行藥物篩選實驗時一個很重要的模式動物。研究人員可以利用基因轉殖的方法將其想要研究的基因接上各種不同顏色的螢光蛋白，並選用特別的啟動子（promoter），將這個基因在他所想要的斑馬魚器官或組織上表達，進而利用偵測螢光蛋白的表達強度以得知這個基因表現的情形。例如 Tg（fli-1:GFP）為一種血管帶有綠螢光蛋白（GFP）的基因轉殖斑馬魚，如果將促進血管生成的藥物添加於斑馬魚胚胎的培養液中，魚胚的血管生成增加會促使其螢光表現的強度增加，於是可以利用自動螢光偵測儀來進行高通量的篩選，進而找出最有效促進血管生成的藥物，這是一個快速、有效、相對經濟的篩藥方法，非常合適用來當作大量藥物篩選時的先行方法（Pre-screen）。

2.3.4.2 試驗內容

（1）. 將健康的基因轉殖的斑馬魚（視不同需要使用不同品系的基因轉殖魚）配對並收集受精卵。

（2）. 將 100 顆受精卵於 4 hpf（hour post fertilization）前分成五組試驗（溶劑控制（solvent control）溶液、控制組（control）及 3 種不同稀釋濃度之受測液體各 20 ml）放入 10 公分培養皿並放置於 28℃的培養箱中培養。

（3）. 每 24 hpf 更換五組各 20 ml 的試驗溶液，持續更換至 72 hpf。

（4）. 72 hpf 後，將小魚移至黑盤透明底的 96 孔盤（REF 675090），並在顯微鏡下調整小魚於孔洞的位置，盡量將仔魚保持在中間。

（5）. 將 96 孔盤移至 ImageXpress Micro High content system 掃描胚胎的螢光表現。

（6）. 利用 MetaXpress-MDCStore2.3 software 分析數值。

（7）. 整個測試過程需要嚴格控制以下幾項因子：

A. 所有溶液需要有足夠的溶氧量（≧60%），pH 值必須介於 6.5-8.5 之間。

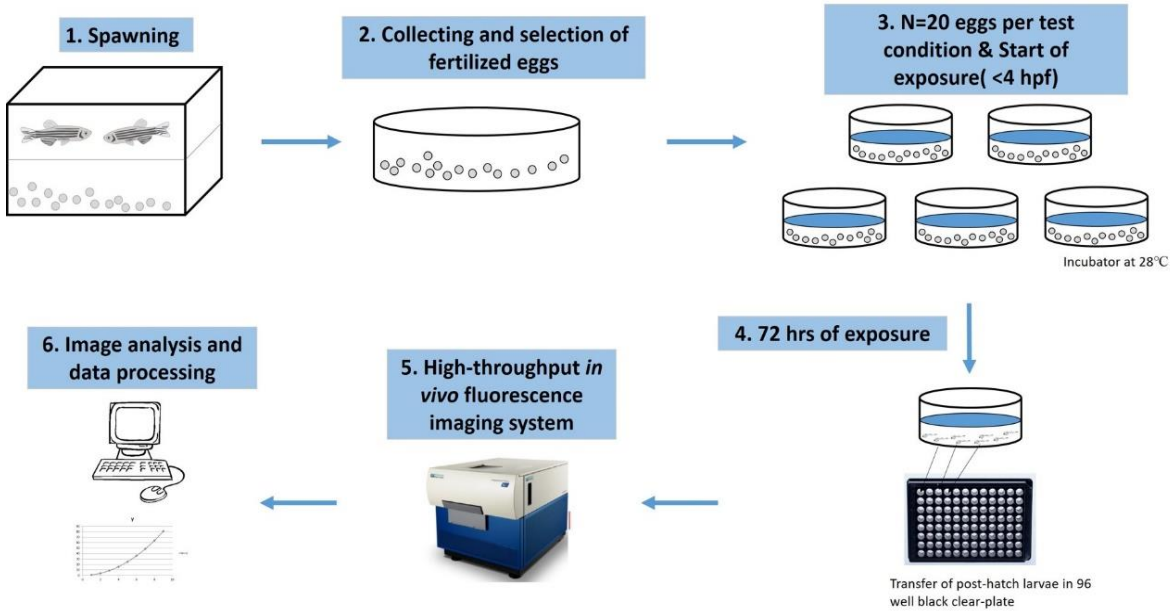
B. 轉殖基因魚需事先篩選，確保其背景螢光表現強度的一致性。

C. 在 2dpf 時，溶劑控制組的胚胎存活率必須高於 70%，孵化率需高於 80%。

2.3.4.3 應用範圍

一般水溶性的化學物質均可適用。脂溶性的化學物可以先溶於少量有機溶劑中（如 1% 的 DMSO、0.1%的 methanol 或 Ethanol）再進行稀釋。

2.3.4.4 圖示檢測步驟



2.3.4.5 參考文獻

1. Tong SK, Chung BC et al. A cyp19a1b-gfp （aromatase B） transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. Genesis. 2009 Feb; 47（2）:67-73.
2. Brion, Y. Le Page, B. Piccini, O. Cardoso, S.-K. Tong, B.-C. Chung, O. Kah Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic （cyp19a1b-GFP） zebrafish embryos PLoS One, 7 （5） （2012）, p. e36069.
3. Detection of Endocrine Active Substance, acting through estrogen 2 receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish embrYos （EASZY assay）.

2.3.5 兩棲類常用之研究模式

2.3.5.1 簡介

兩棲類被廣泛做為基礎生理（如呼吸生理、生殖生理等）與應用生理學（如環境生理、生理生態學、演化生理等）、發育生物學、免疫學、再生醫學、環境與遺傳毒理學的實驗動物模式。以兩棲類做為實驗動物模式，可歸納出以下優點，包括:（1）基礎生理學已被廣泛瞭解，且生理上與哺乳動物之間有足夠的相似性；（2）表現形態、生理與生活史的多樣性，且廣泛棲息在各種環境，顯示對不同的環境有不同的生理適應能力，因此可應用在各種生理實驗；（3）多數種類具有複雜生活史（complex life cycle），即有卵、幼體（larva）、亞成體（juvenile）與成體等生活史階段，會經歷變態的過程，然而，也有直接發育（direct development）的種類（即生活史沒有幼體階段，可直接從卵發育成亞成體）。卵粒大，外面僅有膠囊，一般透明且胚胎發育快，適合做顯微注射；卵孵化後，從幼體到成體階段，一般會經歷形態與生理改變，這些發育特性，使其適合應用在發育生物、內分泌或生物醫學上的研究；（4）一般容易飼養，且有些種類在室內容易繁殖，如非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）；（5）考量物種間在演化上的親緣關係，相較於魚類（如斑馬魚），兩棲類與人類的親緣關係更近，做為動物模式時，研究結果應用在生物醫學上會可靠（Burggren and Warburton 2007; Burlibaşa and Gavrilă 2011; Liu et al. 2016）。

做為實驗動物模式的兩棲類主要是無尾類（Anura）（蛙類）與有尾類（Urodela）（蠑螈、水螈）。過去至少有七次諾貝爾獎（1920-1991 年）得主研究所使用的實驗動物就是兩棲類（Burlibaşa and Gavrilă, 2011），顯示其應用的價值；這些研究者所使用的種類包括食用蛙（*Rana esculenta*）、林蛙（*Rana temporaria*）、豹蛙（*Rana pipiens*）、沙棲蟾蜍（*Bufo arenarum*）、北冠水螈（*Triton cristatus*）與南冠水螈（*T. taeniatus*）。目前常被使用的兩棲類模式動物主要是美洲牛蛙（*Rana catesbeiana*）、海蟾蜍（*Rhinella marinus*）、非洲爪蟾（*X. laevis*）與墨西哥鈍口螈（Axolotl）（*Ambystoma mexicanum*）。近年，更有學者建議可以小雨蛙（*Microhyla fissipes*）做為新一代的模式動物（Liu et al., 2016）。此種蛙主要分在東亞與東南亞，包括臺灣，一次可產 240-450 顆卵、卵夠大（0.8-1.0 mm）適合做顯微注射、卵產出後 24 小時孵化、蝌蚪透明，20 至 30 天就可變態成蛙、是雙套染色體，這些特

徵被認為適合做為發育生物、生理生態、環境毒理與人類疾病等研究（Liu et al. 2016）。以上所提到的兩棲類，除了典型具有水棲與陸棲階段生活史的種類外，有些種類是終年水棲。因此在飼育與照護，以及麻醉處理上會有不同。

2.3.5.2 水棲兩棲類

這部分所指的水棲兩棲類，包括蛙類蝌蚪、水棲性兩棲類幼蛙與成蛙，以及水棲型蠑螈成體的飼育與照護要點

（1）. 蝌蚪

蝌蚪是專指無尾類幼體的稱呼。飼養蝌蚪時，建議飼養在控溫的生長箱內，一般飼養溫度控制在常溫（24-26℃）即可，但建議仍應依據不同種類野外棲息環境的溫度範圍去設定溫度。根據實驗需求將蝌蚪單獨或多隻一起飼養，飼養密度建議為 1/100 ml（隻/水量）。飼養用水可使用自來水，但水需要經過曝氣，建議事先使用打氣機打氣至少一天，飼養時，每兩天更換一次水。建議以透明或半透明塑膠盒或箱飼養蝌蚪，以方便觀察，飼養時，建議以穿洞的透明塑膠蓋蓋著，可減少水分蒸散與溫度波動。可根據蝌蚪原始棲地的特性決定是否以打氣機打氣以維持適當溶氧量，一般來說，屬於流水環境生活的蝌蚪在飼養時就需要打氣。光週期一般建議控制在日夜時間比為 12 小時:12 小時或 14 小時:10 小時。大多數種類的蝌蚪都是素食偏雜食的食性，文獻中提及的餵食餌料包括魚飼料、兔子飼料或煮熟的青菜，也有文獻（Liu et al. 2016）指出有些種類（如小雨蛙）可餵食煮熟的蛋或豐年蝦；然而，比較建議的飼料是以煮熟的青菜餵食，因為以煮熟青菜餵食的優點是多數蝌蚪的食性都能接受，而且水質不易惡化汙染。使用的蔬菜種類以白莧（杏）菜（*Amaranthus inamoenus*）或菠菜（*Spinacia oleracea*）為佳。可將青菜用電鍋加水蒸熟放涼，再以果汁機打碎後，以這些青菜汁進行餵食蝌蚪；蒸熟打碎後的青菜，由於顆粒較小，適合刮食性與濾食性蝌蚪取食；未食用完的菜汁可冷凍，以備之後的餵食。除特殊的實驗考量，大多數種類的蝌蚪腸胃清空率很快，必須每天持續足量餵食，否則可能因斷食過久而影響食慾，最終導致厭食而死亡。蝌蚪每日的攝食量可能因種類與發育階段（一般參考 Gosner（1960）的蝌蚪發育判別表）不同而不同，建議初期時可嘗試餵食較多的量以評估後續的餵食量。若以濃度為 0.8 g/ml（菜重/水量）的白莧菜菜汁為例，每天的餵食用量用菜汁體積算（用大針筒計量注入），依據蝌蚪發育期數去分配，早期

的蝌蚪（Gosner 26 期到 30 期，體重約 0.2 g 以下的個體），餵食量為 0.5 ml/隻；中期的蝌蚪（Gosner 31 期到 35 期，體重約 0.4 g 以下的個體），餵食量為 1 ml/隻；晚期蝌蚪（Gosner 36 期到 41 期，體重約 0.6 g 以下的個體），餵食量為 1.5 ml/隻。另外，食卵性蝌蚪（如臺灣的艾氏樹蛙）可用未煮熟的雞蛋蛋黃餵食，可一個禮拜餵食一次（Liang et al. 2002）。當蝌蚪達到變態時（Gosner 42 期），即至少一個前肢伸出體外時，需擺入漂浮物（如保麗龍）以方便變態中的蝌蚪登陸，避免在變態過程中淹死。

（2）. 水棲性兩棲類的幼蛙與成蛙

這裡以實驗動物模式最常利用的非洲爪蟾（*X. laevis*）為例，此種蛙類從蝌蚪到成體，都是完全水棲性。飼養方法主要參考自 McNamara et al. （2018）。飼養蝌蚪時，以透明水箱飼養為佳，應控溫在 23-25℃，建議飼養密度為 2-4 /1L（隻/水量），而飼養成蛙時，水溫建議控溫在 18-20℃，建議飼養密度為 1/3L（隻/水量）。飼養時，使用逆滲透水，並且以海鹽和碳酸氫鈉，分別調節電導度和 pH，每週檢查水質，飼養設備的建立可取決於實驗室的需求和資金，以建立有過濾與監測水質的水族設備為佳。光週期一般建議控制在日夜時間比為 12 小時:12 小時或 14 小時:10 小時。飼養蝌蚪時，須以打氣機打氣以維持適當溶氧量，但須注意打氣量。換水時，建議以每天更換 10%水量的比例更換。餵食蝌蚪的餌料建議使用專門的水生生物飼料（如 sera Micron Growth Food, sera North America, Montgomeryville, PA, USA）。蝌蚪每日的餵食量須依發育階段調整。餵食變態後小蛙與成蛙，可使用專用飼料（如 Nasco Frog Brittle for Post-Metamorphic *Xenopus*, Nasco, Fort Atkins, WI, USA）與魚飼料（如 Bio Vita Fry Pellet, Bio-Oregon, Longview, WA, USA）按比例混和去餵食，每日餵食量可依個體體型與發育階段去調配，可參考 McNamara et al.（2018）。

（3）. 水螈

這裡以再生醫學研究最常利用的動物模式墨西哥鈍口螈（Axolotl）（*A. mexicanum*）為例。此種有尾類從幼體到成體，都是完全水棲性。飼養時，水溫建議控溫在 15-22℃ （Pasmans et al. 2014）。飼養幼體時，飼養密度可依體型大小去調整；成體體長最大可達 30 cm，因此，飼養成體時，建議水族箱的長度至少 80 cm，飼養密度為 1/20 L（隻/水量）。飼養時，不建議成體與幼體混養。飼

養裝置類似一般水族箱養魚的方式，以透明水箱飼養為佳，水族箱上面要用附有紗網的蓋子蓋著，以避免動物可能逃跑，水位高度大概維持 15-20 cm。光週期一般建議控制在日夜時間比為 12 小時:12 小時或 14 小時:10 小時。水族箱內要養殖一些水草，可提供水螈躲藏，以及透過水草的光合作用可提高水中溶氧，但另一方面，須注意水草飼養密度，以避免夜間時，水草呼吸作用時消耗大量水中溶氧。此外，水底可佈置 PVC 塑膠管或打破切半的花盆以供動物躲藏。飼養用水可使用自來水，但水需要經過曝氣，建議事先使用打氣機打氣至少一天。墨西哥鈍口螈的野外環境為湖泊，偏靜水環境，原則上，飼養時不需額外打氣，但若有過濾與監測水質的水族設備，可維持穩定的水質條件更佳。餵食幼體可使用解凍後的冷凍紅蟲（搖蚊科：Chironomidae 的幼蟲）或切碎的蚯蚓，而較大的個體可使用較大的蚯蚓餵食。餵食量可依個體體型與發育階段去調配，幼體需要每天餵食，而成體可每隔兩到三天適量餵食一次。

2.3.5.3 陸棲兩棲類

這部分所指的陸棲兩棲類，包括陸棲性蛙類的幼蛙與成蛙，以及陸棲型蠑螈成體的飼育與照護要點

（1）. 幼蛙

蛙類蝌蚪在變態期間（Gosner 42 至 Gosner 46 期）不需要進食，只需擺入漂浮物（如保麗龍）以方便變態中的蝌蚪登陸，當蝌蚪變態至完全縮尾（Gosner stage 46）被視為是幼蛙。飼養時，建議飼養在控溫的生長箱內，一般飼養溫度控制在常溫（24-26℃）即可，但建議仍應依據不同種類野外棲息環境的溫度範圍去設定溫度。光週期一般建議控制在日夜時間比為 12 小時:12 小時或 14 小時:10 小時。以透明或半透明塑膠盒或箱飼養幼蛙，以方便觀察，飼養箱上面要用附有細孔紗網的蓋子蓋著，以避免幼蛙以及餵食的活餌（如果蠅）逃跑。水族箱底部可鋪設兩到三層的廚房紙巾，以澆水噴霧器噴水以維持濕度，大概是紙巾表面有一層薄水層的溼度即可，以鋪設紙巾的方式飼養可方便環境清理，建議一週清理環境一次。內部應擺放小水盤，視每日水分蒸散狀況加水，以提供幼蛙浸泡維持皮膚潮濕用，飼養用水可使用自來水，但水需要經過曝氣。此外，箱內須擺設簡單的小盆栽，並放置 PVC 塑膠管或打破切半的花盆以供動物躲藏。餵食幼蛙以昆蟲為主，可使用跳蟲（內顎綱、彈尾目）或果蠅，為了餵食方便，可選用殘翅或無翅

品種的果蠅餵食。另外，為避免幼蛙發育時有缺鈣問題，可用鈣粉適當撒在餵食的果蠅身上後，再進行餵食。餵食量可依個體體型去調配，幼蛙需要每天餵食。

（2）. 成蛙

成蛙飼養條件及方法，與幼蛙類似，只是到成蛙階段，可餵食的活餌體積可更大且更多樣。建議可搭配餵食的活餌包括麵包蟲、蟋蟀或蚯蚓，為避免缺鈣問題，可用鈣粉適當撒在餵食的餌料身上後，再進行餵食。餵食量可依個體體型與取食狀況去調整，原則上，一週可餵食數次，另外，可放置小餌料盆讓成蛙自由取食。

（3）. 陸棲性蠑螈成體

這裡以臺灣產的觀霧山椒魚（*Hynobius fuca*）飼養為例。飼養時，須飼養在控溫的生長箱內，一般飼養溫度控制在常溫（15-16℃）即可。光週期一般建議控制在日夜時間比為 12 小時:12 小時或 14 小時:10 小時。將動物個別飼養於半透明或透明飼養箱（長 31.5 公分 x 寬 20 公分 x 高 13 公分）內，箱子兩側分別至少打三個小洞以維持空氣流通，飼養箱上面要用塑膠蓋子蓋著，以避免動物逃跑。飼養箱底部可鋪設兩到三層的廚房紙巾，以澆水噴霧器噴水以維持濕度，大概是紙巾表面有一層薄水層的溼度即可，以鋪設紙巾的方式飼養可方便環境清理，建議一週清理環境一次。內部應擺放小水盤，視每日水分蒸散狀況加水，以提供個體浸泡維持皮膚潮濕用，飼養用水可使用自來水，但水需要經過曝氣。使用至少兩塊頁岩塊對疊以產生空間，或使用打破切半的花盆，以方便個體躲藏，這些掩體上可鋪設野外採集的苔蘚，可維持飼養環境濕度或提供個體其它躲藏的空間。以蚯蚓餵食，可依個體體型去調配活餌大小或適當切塊餵食，一般每隔兩到三天餵食一次即可。

2.3.5.4 參考文獻

1. Burggren WW, Warburton S （2007） Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. ILAR journal 48:260-269.
2. Burlibaşa L, Gavrilă L （2011） Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. Applied Ecology and Environmental Research 9:1-15.
3. Gosner KL （1960） A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica 16:183-190.

4. Green DE （2001） Anesthesia of amphibians in the field. USGS Standard Operating Procedure. ARMI SOP.
5. IACUC F （2014） Guidelines for the Preparation and Use of MS222 （TMS, tricaine methanesulfonate） for Animal Procedure, Florida Atlantic University, USA.
6. Liang M-F, Huang C-H, Kam Y-C （2002） Effects of intermittent feeding on the growth of oophagous （*Chirixalus eiffingeri*） and herbivorous （*Chirixalus idiootocus*） tadpoles from Taiwan. Journal of Zoology 256:207-213.
7. Lillywhite HB et al.（2016）Anesthesia and euthanasia of amphibians and reptiles used in scientific research: should hypothermia and freezing be prohibited? Bioscience 67:53-61.
8. Liu L-S, Zhao L-Y, Wang S-H（2016）Research proceedings on amphibian model organisms. Zoological Research 37:237.
9. McNamara S, Wlizla M, Horb ME （2018） Husbandry, general care, and transportation of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. Xenopus. Springer, pp 1-17.
10. Pasmans F, Bogaerts S, Janssen H, Sparreboom M （2014） Salamanders: Keeping and Breeding. Natur und Tier - Verlag GmbH, Münster, Germany.

第三章 基礎技術

在生命科學的進展及生物醫學發展的過程中，實驗動物是研究人員常常接觸的研究材料，在生物醫學的應用上扮演極重要的角色，因為人為的疏失與技術不良常是導致實驗失敗或是發生感染的主要原因，操作技術本身都有可能造成動物的疼痛或痛苦，並損害動物福祉與實驗結果。因此學習相關的實驗動物操作技巧與熟練的實驗動物操作技術，不只能減少動物因人員不熟悉操作流程或因重複操作而受苦，同時也會提高動物實驗的成功率及增加實驗結果的穩定性，更有助於改善整體實驗的品質，相信對使用者在基礎及應用科學的發展上會有很大的幫助。鑒於如此，研究人員於進行實驗前，必須具備專業資格及技術訓練、建立評估動物福祉的機制及強化實驗動物倫理觀念。本課程主要是協助研究人員更有效進行動物實驗研究，減少不必要的動物犧牲並提升動物福祉，唯有所有動物實驗研究人員及管理者都能了解 3R 精神的重要，並實際行動，展現負責任的態度，才能發揮動物實驗真正的價值。

實驗動物痛苦的來源，不一定因為生理的疼痛，而是來自環境或實驗操作所導致之恐懼或緊迫。例如同樣在保定動物時，對人類接受度低的動物（如兔子）比對人類接受度高的動物（如狗）容易因為不信賴而產生恐懼。

保定技術要熟練，方易順利進行試驗，也不會使動物產生緊迫，而遭動物攻擊。保定技術並無標準動作，只要能不易發生意外地迅速確實達成目的，皆為人道的好方法。 故本節所述之技術，僅針對上述 5 種實驗動物，簡介最常見的方法。在此提醒，在捉拿動物時，應隨時以眼睛餘光注意動物頭部之動向，以免被啃咬或抓傷，再者，只要不怕遭動物攻擊，動作很快就會熟練，進而使動物產生最少之緊迫。保定過程中，若遭動物抵抗，應立刻放開，待其休息一會兒，重新再試。若遭動物攻擊受傷，輕微之皮肉傷，可至保健室，內備有急救箱，若嚴重者，請迅速請求協助，至醫院急診處求診。在此再次提醒，將動物自飼育籠拿出前，應先以肥皂洗手，戴上恰當之手套，方可進行。

1985 年，由 Moron & Griffiths 建立了一套可作為依據的評估方法，此種方法用了 5 種資料來評估動物於實驗中所可能遭受的疼痛狀況，這 5 種資料包含有：體重、外觀、臨床症狀、先天性的行為及對刺激的反應等。許多研究均顯示魚類就如同哺乳類一樣可以感覺疼痛，他們疼痛的感覺由周邊到腦部主要是由身

體脊髓丘腦（spinothalamic tract）傳達到腦部三叉神經（trigeminal tract），而分子層面的研究顯示，當魚類接受各種的痛覺刺激後，不管是前、中、後腦的基因表現均有所改變，尤其以前腦的改變最多，這與哺乳類對疼痛感受的機制是很相似的。科學家甚至在魚類的腦中發現鴉片的受體（opiate and opioid receptors）。這一切均證明魚類有疼痛感受，而且這痛覺可以影響到他們的腦部，而並不只是一種簡單反射（simple reflex）。

各種實驗可能造成的動物疼痛、緊迫及臨床症狀分類，如下表 3-0 陸生動物、3-1 水生動物之疼痛分級。

表 3-0 陸生動物疼痛分級

疼痛及緊迫分類	動物操作	臨床症狀
B. 不引起不適或緊迫	僅單純養於人為的飼育環境，無實驗進行	無不良反應
C. 極小的不適或緊迫，不需用藥緩解	1.注射（靜脈、皮下、肌肉、腹腔）、口服 2.採血（不包含眼窩採血等動物需鎮靜之方法） 3.短時間禁食或禁水 4.完整的麻醉 5.被核准的安樂死方法	無不良反應
D1. 短時間的輕微緊迫或疼痛，需給予適當的藥物緩解	1.麻醉中插管 2.全身麻醉下進行次要存活性手術 3.全身麻醉下進行非存活性手術 4.暴露於不致命性的藥物或化學物下，未對動物造成顯著的物理性變化	動物應無自殘、食慾不振、脫水及過動現象，但休息或睡眠時間增加，喊叫次數增加，攻擊性/防禦性行為增加，或社會化行為退縮及自我孤立
D2. 中等至嚴重程度的緊迫或疼痛，需給予適當的藥物緩解	1.在全身麻醉下進行主要存活性手術 2.長時間的物理性保定 3.誘導行為上的緊迫，如：剝奪母親照顧、侵略性行為、掠奪者/誘餌之相互作用 4.誘導解剖學或物理學異常造成的疼痛或緊迫輻射性病痛 5.藥物或化學物損害動物體的生理系統	1.行為異常 2.不整理皮毛 3.脫水 4.不正常的喊叫 5.長時間的食慾不振 6.循環系統之瓦解 7.極度倦怠或不願移動 8.中等至嚴重程度的局部或全身性感染

表 3-0 陸生動物疼痛分級（續）

疼痛及緊迫分類	動物操作	臨床症狀
E. 對神智清醒、未麻醉的動物,造成劇烈疼痛且接近或超過疼痛極限，無法以藥物或其他方式緩解（這些實驗需經 IACUC 及獸醫人員謹慎監督）	1. 毒性試驗、微生物試驗或腫瘤試驗於不做治療下導致動物重病或瀕死 2. 使用藥物或化學物嚴重損害動物生理系統而造成動物死亡、劇烈疼痛或極度緊迫 3. 未麻醉情形下使用麻痺或肌肉鬆弛劑 4. 燒燙傷或大規模皮膚創傷 5. 任何會造成接近疼痛閥值且無法以止痛劑解除該疼痛的操作步驟（如：關節炎模式、眼睛/皮膚刺激性試驗、強烈炎症反應模式、視覺剝奪、電擊/加熱試驗等） 6. 未經 IACUC 核准的安樂死方法	1. 自我孤立 2. 社會化行為嚴重退縮 3. 休息或睡眠增加 4. 嚴重的食慾不振 5. 動物外表的顯著改變 6. 極度倦怠 7. 垂死

表 3-1 魚類疼痛分級

疼痛及緊迫分類	動物操作	臨床症狀
B. 不引起不適或緊迫	僅單純養於人為的飼育環境,無實驗進行	無不良反應
C. 不引起不適或緊迫	僅單純撈取及放回、飼育、交配、產蛋等及早期的胚胎研究（< 7dpf）	無不良反應
D. 極小的不適或緊迫，需事先用藥麻醉或緩解措施	1. 剪魚鰭 2. 尾鰭植入標示用的 chip、tag、elastomer 或上色 3. 人工取出魚軟/精子 4. 各種手術包括（眼窩注射注射、腹腔注射、括取麟片、皮膚及鰓做病理檢查等） 其他需要手術後恢復及暫時特殊照料的實驗步驟	可能導致輕微出血，但無不良反應、半天內就能恢復的手術
E. 中等至嚴重程度的緊迫或疼痛，需事先麻醉並給予適當的後續處理	1. 化學性誘變處理（如 ENU 處理） 5. 切除/凍傷小部分心臟	需要較長時間的恢復的手術並可能導致魚隻不適甚至死亡

精緻化（Refinement）是指減少實驗動物可能經歷的疼痛，並給予動物更適合的飼養環境、更純熟的操作技術、更精準的實驗設計，以及更人道的實驗管理。所以提升實驗操作人員的實際操作技術，並強化動物實驗操作者之人道方式動物操作技能，將有助於免除或盡可能降低動物的疼痛與痛苦並提升動物福祉。

本章節將深入淺出地介紹各種動物之基本實驗操作技術如基本注射方式（皮下、肌肉、靜脈注射、兔皮內注射、魚類眼窩注射）、試驗物質投藥方法（口服、腹腔注射）、採血方式（犧牲前大量採血方法、大鼠尾靜脈採血、小鼠顎下採血）及基本保定與麻醉注意等相關課程講解與討論，提升實驗操作人員的基礎技術，並同時強化操作人員之人道方式動物操作技能，務使對實驗動物的痛苦和傷害降到最低程度，符合現今國際間不遺餘力推動的動物研究 3R 精神中之精緻化（Refinement）原則。

第一節 實驗動物基本注射方式

本章課程安排時數：0.5 小時

本章學習目標：

1. 學習包括小鼠、大鼠、兔、小型豬、犬等實驗動物基礎的皮下、肌肉、靜脈注射方法。
2. 了解各個動物的注射部份、投藥量限制等，以精緻化的態度，完成基礎技術操作。

3.1.1 實驗動物之皮下注射方法

3.1.1.1 目的

提供實驗動物皮下注射之方法。

3.1.1.2 注意事項

皮下注射之溶液需避免極端的酸鹼值，以免造成注射部位組織發炎與壞死。

3.1.1.3 材料

（1）. 適當大小的針筒與針頭

（2）. 70-75 % 酒精棉

（3）. 棉球

3.1.1.4 作業程序

（1）. 常見注射部位

A. 嚙齒類、犬與兔：頸部後側或軀幹，亦可選擇皮膚張力較低的部位。

B. 小型豬：耳朵後方或後肢與腹部之間的皺摺處。

（2）. 投藥量限制

物種 （單位）	犬 （ml/kg）	小型豬 （ml/kg）	兔 （ml/kg）	大鼠 （ml/kg）	小鼠 （ml/kg）
皮下注射 建議投藥量	1-2	1-2	1-2	10	10-20

（3）.操作程序：

A. 以保定架或適當的方式保定動物。

B. 以非持針手的大拇指和食指（或中指）輕柔地夾起欲注射部位之皮膚，使皮膚呈現帳篷樣，帳篷樣的中心即為注射部位。

C. 以酒精棉消毒欲注射部位之皮膚。

D. 將注射針以稍微平行身體之角度插入注射處，以避免插入下方肌肉層。插入後可稍微提起針頭，以確認針頭位於皮下而非肌肉組織。

E. 針尖插入後，回抽針筒以產生負壓，如回抽後有負壓且針頭未抽到血液，即可將注射物質注入皮下。如回抽針筒無負壓或有抽取到血液，表示針尖位於體外或位於血管內，此時需拔出針頭進行止血。

F. 注射後緩慢拔出針頭，確認注射物質無滲漏後，使用棉球按壓注射部位。

G. 為避免注射物質滲漏，於完成注射後可暫不將針頭移出皮下，停留於原位數秒後，使注射物質擴散後再移除針頭。當皮下張力過大時，也會導致注射物質的滲漏，須考慮減少注射物質之體積，或選用適當大小的針頭，或選擇皮下張力較小之注射部位。

3.1.1.5 參考文獻

1. Susan M. T. （2015）, Small Animal Clinical Techniques, 2nd ed. Elsevier Health Sciences.
2. Diehl, K., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. and Vorstenbosch, C. V. （2001）, A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J. Appl. Toxicol., 21: 15-23.
3. Michael R. T., Walter A., Robert P. M., （2015） Techniques of Experimentation. Laboratory Animal Medicine, 3rd ed. Academic Press, 1201-1262.

3.1.2 實驗動物之肌肉注射方法

3.1.2.1 目的

提供實驗動物肌肉注射之方法。

3.1.2.2 注意事項

（1）.若動物有嚴重的凝血不良，需避免實施肌肉注射。

（2）.肌肉注射之溶液需避免有極端的酸鹼值，以免造成肌肉組織發炎與壞死。

（3）.避免於單點注射過量的溶液，以免造成疼痛及肌肉組織發炎壞死。

（4）.需多次肌肉注射時，建議輪替肌肉的注射位置，避免在同一個注射部位反覆投藥。

3.1.2.3 材料

（1）.適當大小的針筒與針頭

（2）.70-75 % 酒精

（3）.棉球

3.1.2.4 作業程序

（1）.常見注射部位

A. 犬、兔及大小鼠：肌肉注射主要施打於後肢之股四頭肌群（Quadriceps muscle group）、半膜肌及半腱肌群（Semimembranosus–semitendinosus muscle group），在犬也可選擇前肢之肱三頭肌群（Triceps muscle group）作為肌肉注射部位。

B. 小型豬：肌肉注射主要施打於耳後的頸部肌肉、後肢之半膜肌及半腱肌群（Semimembranosus–semitendinosus muscle group）及臀肌（Gluteal muscle）。

（2）.投藥量限制

物種 （單位）	犬 （ml/kg）	小型豬 （ml/kg）	兔 （ml/kg）	大鼠 （ml/site）	小鼠 （ml/site）
肌肉注射 建議投藥量	0.25-0.5	0.25-0.5	0.25-0.5	0.1-0.2	0.05-0.1

（3）.操作程序：

A. 以保定架或適當的方式保定動物。

B. 以酒精棉消毒欲注射位置之皮膚。

C. 將注射針插入適當位置：

a. 注射部位為半膜肌及半腱肌群（Semimembranosus–semitendinosus muscle group）時，以非持針的手由後方握住半膜肌及半腱肌群，大拇指放置在股骨位置，針尖朝後注射於股骨後方的肌肉，以避免傷害到位於股骨後側的坐骨神經。

b. 注射部位為股四頭肌群（Quadriceps muscle group）時，以非持針的手由後腿前方握住股四頭肌群，大拇指放置在股骨位置，針尖朝前注射於股骨前方的肌肉。

c. 注射部位為肱三頭肌群（Triceps muscle group）時，以非持針的手由前腿後方握住肱三頭肌群，大拇指放置在肱骨位置，針尖朝後注射於肱骨後方的肌肉。

d. 注射部位為耳後的頸部肌肉時，需於耳朵向後可覆蓋的範圍內進行肌肉注射，由於此處皮下脂肪層較薄，針尖垂直插入此範圍的肌肉即可。

D. 針尖插入肌肉後，回抽針筒以產生負壓，若回抽沒有回血，則將溶液注射入肌肉內；若回抽時回血，則需將針拔出止血後，於附近位置重新下針。

E. 注射完後拔出針頭，可使用乾淨棉球輕柔按壓注射位置。

3.1.2.5 參考文獻

1. Susan M. T.（2015）, Small Animal Clinical Techniques, 2nd ed. Elsevier Health Sciences.
2. Diehl, K., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. and Vorstenbosch, C. V.（2001）, A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J. Appl. Toxicol., 21: 15-23.

3.1.3 實驗動物之靜脈注射方法

3.1.3.1 目的

提供實驗動物靜脈注射之方法。

3.1.3.2 注意事項

（1）.若動物有嚴重的凝血不良，需避免實施靜脈注射。

（2）.靜脈注射之溶液需避免黏滯性高的溶液或懸浮液，以免造成血管栓塞壞死。

3.1.3.3 材料

（1）.適當大小的針筒、針頭與留置針

（2）.70-75％ 酒精

（3）.棉球

（4）.保定架

（5）.加熱墊、溫水等溫和之加熱工具

3.1.3.4 作業程序

（1）.常見注射部位

A. 小鼠與大鼠：側尾靜脈（lateral tail vein）

B. 兔：外隱靜脈（lateral saphenous vein）或耳緣靜脈（marginal ear vein）

C. 犬：頭靜脈（cephalic vein）或外隱靜脈（lateral saphenous vein）

D. 小型豬:耳緣靜脈(marginal ear vein）或外隱靜脈(lateral saphenous vein）

注意：耳緣靜脈若栓塞有耳翼壞死風險，須謹慎操作。

（2）.投藥量限制

物種 （單位）	犬 （ml/kg）	小型豬 （ml/kg）	兔 （ml/kg）	大鼠 （ml/kg）	小鼠 （ml/kg）
單次快速靜脈注射投藥量	2.5	2.5	2	5	5
慢速靜脈注射最大投藥量	5	5	10	20	25

（3）.操作程序：

A. 以保定架或適當的方式保定動物，露出欲注射部位。

a. 於小鼠、大鼠或兔，其欲注射靜脈管徑較細時，可使用加熱墊、溫水等方式使血管擴張，但須注意避免溫度過高造成燙傷。

b. 於兔、小型豬或犬，可於欲注射靜脈近端處直接加壓使血管擴張。

B. 以酒精棉消毒欲注射部位之皮膚。

C. 將注射針以平行血管之走向刺穿皮膚插進靜脈內。小型豬和犬，注射針需與皮膚約呈 15 度夾角刺穿皮膚插進血管。

D. 針尖插入血管後，回抽針筒以產生負壓，如回抽後可見血液，則表示針尖已進入血管，即可將溶液注入血管中。如於注射過程中針尖移出血管，或注射時遇有阻力時需停止注射，應先拔出針頭進行止血後再重新操作。

E. 完成後，輕緩地移除針頭並立即以乾淨棉球按住注射孔，進行止血，以避免發生血腫；若發生血腫，則該部位應避免再注射。為避免損害血管內膜，勿於抽回注射針的同時以棉球按壓注射部位。

3.1.3.5 參考文獻

1. Sarah W., Maggie L.,（2013）. Handbook of laboratory animal management and welfare. 4th ed. Wiley-Blackwell.
2. Diehl, K., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. and Vorstenbosch, C. V.（2001）, A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J. Appl. Toxicol., 21: 15-23.

第二節 大、小鼠

本章課程安排時數：0.5 小時

本章學習目標：

1. 學習利用大小鼠之口服投藥方法、腹腔注射方法，將藥物或試驗物質進行試驗。
2. 學習如何操作犧牲前大量採血方法、大鼠尾靜脈採血方法、小鼠顎下採血方法。

3.2.1 大小鼠之口服投藥方法

3.2.1.1 目的

提供大/小鼠以餵食針口服給予藥物或試驗物質之方法。

3.2.1.2 材料

（1）. 適當大小的餵食針：市售有不銹鋼餵食針及塑膠餵食針可以選擇，可彎曲的塑膠餵食針安全性較高。

（2）. 針筒：依動物體型選擇適當的針筒大小。

3.2.1.3 作業程序

（1）. 建議投藥量與餵食針大小

物種	大鼠	小鼠
口服建議投藥量	10 ml/kg	10 ml/kg
適合的餵食針大小	16 G	19-21 G

（2）. 投藥前準備：

A. 將動物秤重以決定投藥量。

B. 量測插入的餵食針長度：將大/小鼠保定，量測口腔到劍突（Xiphoid process）之距離即為餵食針適合插入之長度。

C. 將餵食針連接針筒，抽取適當的投藥量，將藥物或試驗物質填滿餵食針空腔。餵食針外圍應以紙巾擦拭乾淨，以免動物口腔殘留味道不好甚至是有刺激性的藥物或試驗物質，也可避免餵食針外殘留的液體增加投藥量。

（3）.口服投藥操作流程：

A. 保定動物：以手將大鼠保定，使其頭部向上延伸成為直立的姿勢，頭頸部需固定不可轉動。若為小鼠則將頸背部皮膚抓起保定，使其前肢外展，並固定頭頸部。保定時需注意勿壓迫到胸腔以免阻礙呼吸。

B. 插入餵食針：將餵食針伸入口腔中，將餵食針輕輕向後壓，使動物的頭部上仰，讓食道形成一直線，沿著硬顎中間偏左的位置慢慢滑入食道中，過程中應無明顯阻力。若過程中遇到阻力勿強行插入，請將餵食針拔出，重新保定後再插入餵食針。

C. 餵食針插入至適當的深度後，緩慢給予藥物或試驗物質，以避免液體反流導致誤入氣管。若大/小鼠於投藥過程中出現任何咳嗽、呼吸困難或是劇烈掙扎等情形，應立即停止投藥並將餵食針取出。

D. 投藥完成後，平順地抽出餵食針，將大/小鼠放回飼育盒中。

E. 投藥後需觀察動物，確認動物沒有出現不適的反應再離開。若動物有任何不適的反應，應諮詢單位的獸醫師。

3.2.1.4 注意事項

（1）.插入餵食針時若誤入氣管，動物會立即出現咳嗽反射，若藥物或試驗物質被投予到氣管中，動物會立即出現呼吸困難及死亡的情形。

（2）.若動物劇烈掙扎，應先將餵食管抽出，以免其傷害食道甚至造成食道穿孔，待動物保定好後再新插入餵食管。若發生食道穿孔的情形，動物會因感染而呈現疼痛、不適以及死亡等情形。

（3）.口服投藥後，如動物出現非預期之死亡，建議剖檢以釐清可能的原因。

3.2.1.5 參考文獻

1. National Health and Medical Research Council, Australian Government.（2008）. Guidelines to promote the wellbeing of lab animals used for scientific purpose: The assessment and alleviation of pain and distress in research animals.
2. Diehl, K., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. & Vorstenbosch, C. V. （2001）. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol., 21: 15-23.
3. BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement.（2001）. Refining procedures. for the administration of substances. Lab Anim., 35:1–41.

3.2.2 大小鼠之腹腔注射方法

3.2.2.1 目的

提供大/小鼠腹腔注射之方法

3.2.2.2 材料

（1）. 無菌針筒：依投藥體積選擇適合的針筒

（2）. 無菌針頭：依動物體型選擇適合的針頭

（3）. 無菌溶液

（4）. 70-75 % 酒精棉

（5）. 棉球

3.2.2.3 作業程序

（1）. 投藥量限制與適合的餵食針大小

物種	大鼠	小鼠
腹腔注射建議投藥量	10-20 ml/kg	20-80 ml/kg
適合的針頭大小	23-26 G	25-27 G

（2）. 投藥前準備：

A. 將動物秤重以決定投藥量。

B. 將針頭連接針筒，抽取適當的投藥量，將藥物或試驗物質填滿針頭空腔。

（3）. 腹腔注射操作流程：

A. 保定動物：將動物頭部向下傾斜，如此可使腹腔臟器向前滑動避免針頭意外刺入臟器。

a. 小鼠保定（圖 3.2.2-1）：將小鼠的頸背部之皮膚提起，尾巴夾在無名指及小拇指之間完成保定。小鼠之腹腔注射由單人進行即可。

b. 大鼠保定（圖 3.2.2-2）：以大拇指和食指扣住大鼠頸部，食指和中指則固定左側前肢將大鼠提起，另一手則固定後肢及尾巴。大鼠之腹腔注射建議由雙人進行，一人保定動物，另一人做腹腔注射較為穩妥。



圖 3.2.2-1：小鼠腹腔注射保定姿勢



圖 3.2.2-2：大鼠腹腔注射保定姿勢

B. 以酒精棉消毒欲注射部位，將腹部分為四個象限，腹腔注射的理想部位為右下方腹部（圖 3.2.2-3）。



圖 3.2.2-3：腹腔注射入針處

C. 針頭與身體夾角約 20-40 度，斜面朝上將針頭刺入腹腔內，勿在腹腔內隨意移動針頭以免傷害臟器。

D. 回抽針筒應感覺到負壓，以確認針頭沒有意外刺入腹腔臟器，若回抽為負壓，則將藥物或試驗物質注射入腹腔；若回抽針筒時出現血液、尿液或是腸內容物等，則需將針頭拔出，此汙染的針頭、針筒及其內的無菌溶液應丟棄，重新抽藥並重複腹腔注射的操作流程。

E. 腹腔注射完成後，將針頭抽出，並確認注射部位沒有異常後，將大/小鼠放回飼育盒中。若注射部位有少量出血時，以乾淨紗布或乾棉球加壓止血即可。

F. 腹腔注射後需觀察動物，確認動物沒有出現不適的反應再離開。若動物有任何不適的反應，應諮詢單位的獸醫師。

3.2.2.4 注意事項

（1）.腹腔注射不適用於懷孕的動物，以免針頭刺入妊娠子宮。

（2）.保定時需注意力道及時間，若保定過緊可能造成動物呼吸困難，甚至窒息死亡；若保定過鬆，動物可能轉頭啃咬操作者；若保定時間過長或動物已經出現明顯緊迫的徵兆，先將動物放入飼育籠內待其回復正常後再重新操作。

（3）.若腹腔注射的溶液非無菌溶液，或是針尖意外刺入腸道內，可能會引起腹膜炎的發生，動物會呈現拱背腹痛等不適的情形。

3.2.2.5 參考文獻

1. National Health and Medical Research Council, Australian Government. （2008）. Guidelines to promote the wellbeing of lab animals used for scientific purpose: The assessment and alleviation of pain and distress in research animals.
2. Diehl, K., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. & Vorstenbosch, C. V. （2001）. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol., 21: 15-23.
3. Wolfensohn, S., & Lloyd, M. （2013）. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. 4th ed. Blackwell Science ltd.

3.2.3 大小鼠之犧牲前大量採血方法

3.2.3.1 目的

提供大/小鼠犧牲前採取大量血液之方法，此法僅適用於犧牲前的動物，可經由心臟或後腔靜脈採集大量且品質良好的血液。

3.2.3.2 材料

（1）. 注射針筒及針頭：小鼠適用 23-25 G 的針頭及 1 ml 針筒，大鼠適用 19-23 G 的針頭及 3-5 ml 針筒。

（2）. 採血管：依所需採集的檢體準備適合的採血管 （參見表 3.2.3-1）。

（3）. 二氧化碳或適當之麻醉劑。

表 3.2.3-1：常用之採血管及抗凝劑

檢體	抗凝劑	採血管外觀	用途
全血	K_2EDTA	紫頭管	血液學檢查 體液檢查（腦脊髓液及腹水等）
血漿	Sodium citrate	藍頭管	血液凝固分析
	Sodium heparin	綠頭管	生化學檢查、藥物分析
	Lithium heparin	綠頭管	生化學檢查、氨（ammonia）分析
血清	無	空白管	生化學檢查
	無	黃頭管 （含助凝劑及分離膠）	生化學檢查

3.2.3.3 作業程序

（1）. 作業限制：犧牲前大量採血僅可在已預定要犧牲且深度麻醉的動物上執行，心臟採血的疼痛分級為 USDA Category D。

（2）. 採血流程：

A. 使用合適之麻醉劑或二氧化碳，使動物進入深度麻醉。

a. 測試並確認動物已喪失角膜反射（corneal reflex）及趾間痛覺反射（toe pinch）。

b. 心臟採血：使動物背側躺（dorsal recumbency），以手觸摸心臟跳動的位置，將針頭由劍突（Xiphoid process）下方中間偏左的位置插入，針

尖穿過橫膈膜並朝向頭部的方向。進針角度約為 15 - 30 度。針尖進入心臟後，開始回抽針筒將血液抽出，回抽時勿施加過多的負壓，以免造成心房/心室塌陷。若回抽針筒時未見血液流出，則將針頭稍微退後並微調方向後再次進入心臟。

c. 後腔靜脈採血：由腹正中線切開皮膚及腹部肌肉，將腸道移開即可見到後腔靜脈，將針尖刺入後腔靜脈中，開始回抽針筒將血液抽出。

d. 採血完成後，即可將針頭抽出，並確認動物死亡。

3.2.3.4 注意事項

（1）. 心臟採血不適用於需要做腹腔灌洗以採集細胞的動物，因採血過程可能導致血液汙染到腹腔。

（2）. 採血時需避免針頭過細、回抽針筒的力道過大及大力搖晃檢體，以避免血球破裂造成溶血。

3.2.3.5 參考文獻

1. Parasuraman, S., Raveendran, R., & Kesavan, R.（2010）. Blood sample collection in small laboratory animals. J Pharmacol Pharmacother., 1（2）: 87–93.
2. Hoff, J.（2000）. Methods of Blood Collection in the Mouse. Lab Anim., 29（10）:47-53.
3. National Health and Medical Research Council, Australian Government.（2008）. Guidelines to promote the wellbeing of lab animals used for scientific purpose: The assessment and alleviation of pain and distress in research animals.

3.2.4 大鼠尾靜脈採血方式

3.2.4.1 目的

提供大鼠由尾靜脈採集血液之方法，此方法可適用於需多次採血的動物。

3.2.4.2 材料

（1）. 針頭 / 蝴蝶針：使用 21-23 G 的針頭。

（2）. 採血管：依所需採集的檢體準備適合的採血管。

（3）. 70 - 75% 酒精棉

（4）. 棉球。

3.2.4.3 作業程序

（1）. 尾靜脈採血使用兩側的側尾靜脈，尾巴的解剖構造截面圖如圖 3.2.4-1。

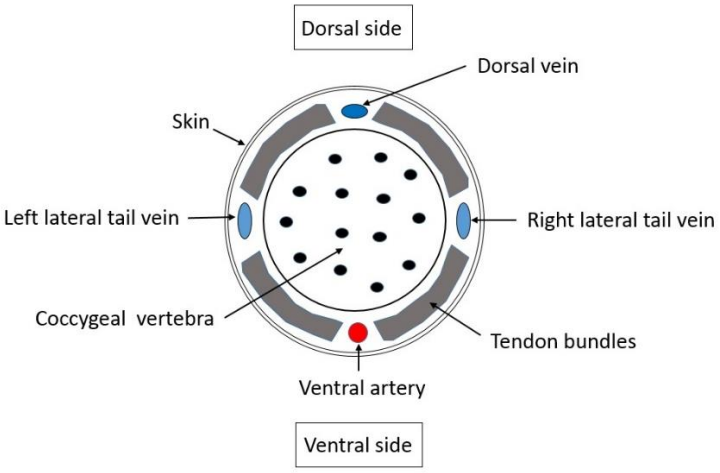


圖 3.2.4-1：大鼠尾巴截面圖

（2）. 尾靜脈採血前準備：

A. 將大鼠放入大小適合的保定架。

B. 溫熱尾靜脈（可使用加熱墊或是溫水浴），使血管擴張以利採血

a. 加熱墊法：可先將大鼠尾巴放置在加熱墊上使血管擴張，加熱墊上可覆蓋紙巾或抗污紙以免尾巴直接接觸熱源，需注意加熱墊的溫度，以免造成尾巴皮膚燙傷。

b. 溫水浴：將大鼠尾巴浸泡於 40-42℃的溫水中約 40-50 秒，再以紙巾將尾巴上的水擦乾。

（3）. 尾靜脈採血流程：

A. 將大鼠連同保定架側轉 90 度（大鼠呈現右側躺或左側躺），使側尾靜脈位於上方。

B. 以酒精棉消毒皮膚後，一手固定尾巴，另一手持針頭或是蝴蝶針插入側尾靜脈。若使用針頭，則用事先準備好的採血管盛接流出的血液；若使用蝴蝶針，則連接針筒並徐緩給予負壓使血液流入針筒，完成後再轉移至採血管中。採血過程中可由尾巴根部向末端方向按摩以加速血流速度。若中途脫針則先將針頭拔出，完成止血後再重複上述的採血流程。

C. 採完血後，拔出針頭並以乾棉加壓止血，若使用含抗凝劑的採血管則需將血液及抗凝劑混合均勻。

3.2.4.4 注意事項

（1）. 採血時針頭大小不宜過細，針筒施加負壓時不宜過度用力，以免血球破裂造成溶血。

（2）. 採血量限制：兩週內的採血總量不可超過 15 %的總血量（囓齒類總血量約佔體重的 6-7 %）。

3.2.4.5 參考文獻

1. Parasuraman, S., Raveendran, R., & Kesavan, R.（2010）. Blood sample collection in small laboratory animals. J Pharmacol Pharmacother., 1（2）: 87–93.
2. Lee, G., & Goosens, K. A. （2015）. Sampling blood from the lateral tail vein of the rat. J Vis Exp.,（99）, 52766.
3. Wolfensohn, S., Lloyd, M.（2013）. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. 4th ed. Blackwell Science ltd.
4. Hedrich, H.（Ed.）.（2012）. The Laboratory Mouse. 2nd ed. Academic Press.

3.2.5 小鼠頷下採血方式

3.2.5.1 目的

提供小鼠由 submandibular vein 採集血液之方法，此方法單次可採取約 0.2 ml 品質優良的血液，可適用於需多次採血的動物。

3.2.5.2 材料

（1）. 刺胳針（Lancet）：依動物體型選用適合的刺胳針，小於八週齡及體型較小的小鼠使用 4 mm 的刺胳針即可，大於八週齡或體型較大的小鼠可選用 5 mm 的刺胳針。

（2）. 採血管：依所需採集的檢體準備適合的採血管。

（3）. 70 - 75% 酒精棉。

（4）. 棉球。

3.2.5.3 作業程序

（1）. 提起小鼠頸背部皮膚加以保定，使臉頰部位露出。

（2）. 下針處為小鼠眼角及嘴角的連線相交處（如下圖 3.2.5-1）。

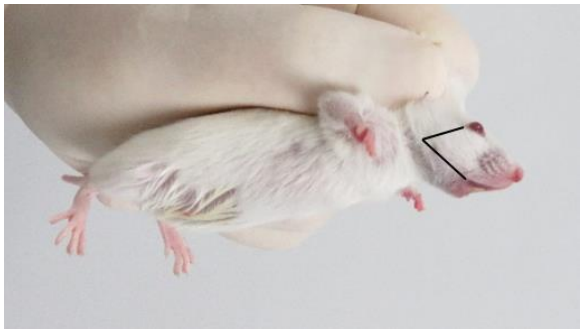


圖 3.2.5-1 小鼠眼角及嘴角連線相交處

（3）. 將刺胳針於下針處插入後拔出，即可見到血液流出，插入刺胳針時需注意需垂直下針處，以免誤傷到耳道造成耳道出血。

（4）. 以採血管盛接流出的血液，若使用含抗凝劑的採血管則需將血液及抗凝劑混合均勻。

（5）. 採完血後，以乾淨棉球加壓止血，止血後將小鼠放回籠內觀察。

3.2.5.4 注意事項

（1）.保定力道勿過大，以及保定時間勿過長，以免小鼠因為緊迫而導致死亡。若小鼠於保定過程中呈現不適的狀態，先將小鼠放回原飼育籠觀察，直到恢復正常後才可再度採血。

（2）.採血量限制：兩週內的採血總量不可超過 15%的總血量（囓齒類總血量約佔體重的 6-7%）。

（3）.若小鼠於臉頰採血後出現耳道出血、無法維持平衡、或是虛弱癱軟的情形，請諮詢單位的獸醫師。

3.2.5.5 參考文獻

1. Golde, W. T., Gollobin, P., & Rodriguez, L. L.（2005）. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. Lab Anim., 34（9）:39-43.
2. National Health and Medical Research Council, Australian Government.（2008）. Guidelines to promote the wellbeing of lab animals used for scientific purpose: The assessment and alleviation of pain and distress in research animals.

第三節 兔

本章課程安排時數：0.5 小時

本章學習目標：

1. 學習實驗兔之皮內注射方法、採血方法。

2. 採血可能對動物造成不適，可以考慮於採血前半小時使用局部麻醉乳膏。但須確認該動物皮膚不會對其乳膏過敏。

3.3.1 實驗兔之皮內注射方法

3.3.1.1 目的

提供實驗兔皮內注射之方法。

3.3.1.2 材料

（1）. 適當大小的針筒與針頭（25-27 G）

（2）. 70-75 % 酒精棉

（3）. 棉球

（4）. 紗布

3.3.1.3 作業程序

（1）. 投藥量限制：每個注射部位之注射體積於兔子為 0.05 ml，投予總量不可超過 0.4 ml。

（2）. 準備程序：

A. 皮內注射前一天，以電動剃毛剪剃除實驗兔背部之部分皮膚毛髮，再以沾水潤溼的紗布清潔已剃除毛髮之皮膚區域，並檢視該區域之表皮是否完整。若表皮有刮痕、傷口紅腫或皮膚病，則不建議使用。頸背部皮膚應避免作為實驗部位，因為該處需用來操作移動與保定動物。

B. 剃毛後之動物可單獨飼養，一隻一籠，以防剃毛區域因動物相互舔舐或抓、咬而受傷。

C. 注射當天，應再檢視剃毛區表皮，若新生毛髮太長，則需再次剃毛。

（3）.操作程序：

A. 將實驗兔置於操作平台上，保定者以雙手分別固定動物之頭頸部及軀體後半部，將其身體拉直，露出待注射之皮膚區域，力道不可太緊以免窒息。由操作者以酒精棉輕輕擦拭該區域，予以清潔及消毒。

B. 以注射針抽取足量之注射液，由操作者一手持注射針，另一手以大姆指及食指夾緊待注射部位之皮膚或以大姆指及食指撐開待注射部位之皮膚，固定注射位置。將注射針斜面朝上，以 5 - 15 度角入針，待針尖斜面完全進入皮膚後（注意不可穿入至皮下），注射針再以與皮膚平行方向推入皮內約 1-2 mm。

C. 緩緩注入注射液。注射時會略有阻力。一邊注射一邊觀察注射部位皮膚，正確注射至皮內會形成一個小粒狀突起；若無形成小粒狀突起則移出注射針，於其他部位重新操作。

D. 注意：皮內無大血管分布，平行入針後至適當深度後不需回抽，直接注射。

E. 注射完成後，應使動物回復正常姿態，並避免緊繃、按壓或搓揉注射部位皮膚而造成注射液滲漏。若注射部位有些微滲血或注射液，可以乾棉球吸除。

F. 每個注射部位間應保持足夠間距，避免紅腫等皮膚反應擴展而彼此相連。

3.3.1.4 注意事項

此項操作可能對動物造成不適，可以考慮於注射前半小時使用局部麻醉乳膏，但須確認該動物皮膚不會對其乳膏過敏。

3.3.1.5 參考文獻

1. Wolfensohn, S., & Llyod, M.（2013）. Handbook of laboratory animal management and welfare. 4th ed. Blackwell Science ltd.
2. Hau, J., & Schapiro, S. J.（Eds.）.（2010）. Handbook of laboratory animal science - Volume I: Essential principles and practices. 3rd ed. CRC Press.
3. Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., & Vasbinder, M. A.（2011）. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. J Am Assoc Lab Anim Sci. 50（5）: 600-613.
4. BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement.（2001）. Refining procedures for the administration of substances. Lab Anim., 35: 1–41.

3.3.2 實驗兔的採血方法

3.3.2.1 目的

提供實驗兔周邊血液採集方式，以利進行各項血液相關之分析，此方法可適用於多次採血的動物。

3.3.2.2 材料

（1）. 適當大小的針筒、針頭（22-25 G）、蝴蝶針與留置針

（2）. 70-75 % 酒精棉

（3）. 棉球

（4）. 保定架

（5）. 加熱墊、溫水等溫和之加熱工具

3.3.2.3 作業程序

（1）. 採血建議部位：耳緣靜脈(marginal ear vein)、耳中央動脈(central ear artery）（圖 3.3.2-1）或外隱靜脈（lateral saphenous vein）



圖 3.3.2-1：兔耳翼上的動靜脈

（2）. 操作步驟：

A. 耳動靜脈採血程序：

a. 以保定架或適當的方式保定動物，暴露出耳翼，採血部位可先進行剃毛。若血管管徑較細時，可使用加熱墊、溫水等方式使血管擴張，須注意避

免溫度過高造成燙傷。

b. 以酒精棉擦拭耳背採血部位進行清潔與消毒，並使血管清楚浮現(可以加壓血管近端耳根處幫助血管浮現)。

c. 以附針針筒或留置針進行採血

- 利用附針針筒進行採血：將針頭斜面朝上，以接近水平角度入針，穿入皮膚直至血管，見到回血後，固定針頭位置，緩慢抽拉針筒活塞使血液流出。若中途脫針，可將針取出重新操作，再次入針時，往前次入針處更近端方向（更接近頭部或軀幹）入針。
- 利用留置針進行採血：留置針針頭斜面朝上，以接近水平入針，穿入皮膚直至血管，確認是否有血液流出，若有則將硬針退出，軟針順血管方向平行推入，硬針完全退出後，將埋設好的軟針與針筒連接抽取血液。若無血液流出，則將留置針取出重新操作。再次入針時，往前次入針處更近端方向（更接近頭部或軀幹）入針。

d. 待取得所需血量後，輕緩地移除針頭並立即以乾淨棉球按住入針孔，進行止血，以避免發生血腫。為避免損害血管內膜，勿於抽出針頭的同時以棉球按壓入針部位。

B. 外隱靜脈採血程序：

a. 保定者以適當的方式保定動物，採血部位可先進行剃毛。

b. 保定者扣住實驗兔膝部上端壓住外隱靜脈，並由尾側向外側略為扭轉，以使外隱靜脈拉直，採血者再以酒精棉擦拭欲下針部位，使外隱靜脈更清楚浮現。

c. 同 3.3.2.3(2).A.c-d 但是入針角度非接近水平，而以約 15 度夾角角度入針。

C. 犧牲前頸靜脈採血程序：

a. 犧牲前之大量採血會造成動物不適，須先進行麻醉。動物進入深度麻醉後，保定者使動物仰躺，頸部拉直後仰，若有肉垂（dewlap）盡量撥開撐緊皮膚，採血部位可先進行剃毛。

b. 保定者加壓頸靜脈入胸處，採血者一手固定好血管，以酒精棉擦拭欲下

針部位，使頸靜脈更清楚浮現；若無法清楚看到頸靜脈時，可輕觸採血部位確認頸靜脈之位置，並再次消毒。

c. 以附針針筒或針筒接蝴蝶針進行採血：將針頭斜面朝上以約 15 度夾角角度入針，見到回血後固定針頭位置，緩和抽拉針筒活塞使血液流出。若中途脫針，可將針取出重新操作。頸靜脈血流豐沛，須確實加壓止血後方可重新操作。

d. 同 3.3.2.3（2）. A.靜脈採血。

3.3.2.4 注意事項

（1）. 若發現血液不易抽出或血流不順時，不宜過度用力抽針筒活塞，應重覆操作步驟 3.3.2.3 （2）.A 或 B 或 C，適當入針後，再進行抽血。

（2）. 動脈止血較為不易，耳動脈採血後需立即並確實完全止血，避免血腫造成耳翼傷害。

（3）. 耳動靜脈採血可能對動物造成不適，可以考慮於採血前半小時使用局部麻醉乳膏，但須確認該動物皮膚不會對其乳膏過敏。

（4）. 採血量限制：兩週內的採血總量不可超過 1％的動物體重，犧牲前採血不在此限。

3.3.2.5 參考文獻

1. Wolfensohn, S., & Llyod, M.（2013）. Handbook of laboratory animal management and welfare. 4th ed. Blackwell Science ltd.
2. Diehl, K., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. & Vorstenbosch, C. V. （2001）. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol., 21: 15-23.
3. Parasuraman, S., Raveendran, R., & Kesavan, R.（2010）. Blood sample collection in small laboratory animals. J Pharmacol Pharmacother., 1（2）: 87–93.
4. Fox, J. G., Anderson, L. C., Otto, G. M., Pritchett-Corning, K. R., & Whary, M. T.（2015）. Laboratory Animal Medicine. 3rd ed. Elsevier Academic Press.

第四節 犬

本章課程安排時數：0.5 小時

本章學習目標：

1. 提供實驗犬利用口胃管或膠囊錠劑，經由口服方式投予藥物或試驗物質之方法。
2. 提供實驗犬周邊血液採集方式，以利進行各項血液相關之分析。

3.4.1 實驗犬的口服投藥方法

3.4.1.1 目的

提供實驗犬利用口胃管或膠囊錠劑,經由口服方式投予藥物或試驗物質之方法。

3.4.1.2 材料

（1）.注射針筒

（2）.口胃管

（3）.飲用水

3.4.1.3 作業程序

（1）.投藥量限制

物種	犬
口服液體 建議投藥量	5-15 ml/kg

（2）.操作程序：

A. 先安撫實驗犬，使動物較為平靜。

B. 由實驗犬的齒縫間以注射針筒注入少量飲水，以潤濕其咽喉及食道。

C. 藥物或試驗物質投予

a. 膠囊或錠劑投予

- 抬高實驗犬之頭部並使頸部伸直後，一手握住鼻吻部，拇指伸入犬齒後之上顎硬顎，輕微施力打開實驗犬之口腔；另一手施力於下顎門齒處，將口腔更為打開。

- 將膠囊或錠劑迅速投入實驗犬之舌頭根部，並儘可能推入食道；若動物反抗則暫緩操作。
- 確定塞入後，立即將實驗犬之上下顎閉合，維持頭頸部伸直，並以注射針筒餵食少量飲水以助其吞嚥，或以其他方式如輕撫咽喉或頸部、輕觸鼻部或向鼻孔吹氣，亦有助於動物吞嚥。
- 待動物出現吞嚥動作後，再打開其口腔以檢查是否確實吞入。
- 完成投予後，觀察實驗犬有無異狀。若動物將膠囊或錠劑吐出，則先檢查吐出之膠囊或錠劑外觀是否完整，若藥錠仍完整，則依前述之操作步驟再行投予；若膠囊已沾濕軟化會產生黏性，應更換膠囊。

b. 液態或流體物質投予

- 以人員保定犬隻，或將犬隻固定於保定架上。
- 測量口胃管需推入之長度，推入長度約為口鼻經肩峰至第十肋硬軟肋結合的距離，並標記於管上。
- 抬高實驗犬之頭部並使頸部伸直後，一手握住鼻吻部，拇指伸入犬齒後之上顎硬顎，輕微施力打開實驗犬之口腔；另一手施力於下顎門齒處，將口腔更為打開。
- 將口胃管前端置於舌頭根部，將實驗犬上下顎閉合，固定鼻吻部避免犬隻咀嚼。
- 口胃管藉由吞嚥動作緩緩推入食道，推入口胃管至事先標記好之長度。回抽注射針筒可見胃液或胃內容物，即表示口胃管進入正確位置。若過程中犬隻劇烈掙扎或出現咳嗽等症狀，應立即取出口胃管，待動物安定後重新操作。
- 投予物質以另一支注射針筒抽取後接於口胃管末端，緩緩注入。投予完後，再注入少量飲水沖洗。
- 平順穩定地抽出口胃管。

D. 觀察動物狀況，確認動物沒有出現不適的反應再離開，若動物有任何不適的反應，應諮詢單位的獸醫師。

3.4.1.4 注意事項

（1）.插入口胃管時若誤入氣管，動物會立即出現咳嗽反射，若藥物或試驗物質被投予到氣管中，動物可能會立即出現呼吸困難甚至死亡的情形。

（2）.液體或流體物質投予時，選取之口胃管大小需適合用於該實驗犬，並且注意投予物質是否能順利流通於該管徑。若投予物質黏滯性過大或高濃度之懸浮液，可能在投藥過程中阻塞。

3.4.1.5 參考文獻

1. Wolfensohn, S., & Llyod, M.（2013）. Handbook of laboratory animal management and welfare. 4th ed. Blackwell Science ltd.
2. Diehl, K., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. & Vorstenbosch, C. V.（2001）. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol., 21: 15-23.
3. Fox, J. G., Anderson, L. C., Otto, G. M., Pritchett-Corning, K. R., & Whary, M. T.（2015）. Laboratory Animal Medicine. 3rd ed. Elsevier Academic Press.
4. BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement.（2001）. Refining procedures. for the administration of substances. Lab Anim., 35: 1–41

3.4.2 實驗犬的採血方法

3.4.2.1 目的

提供實驗犬周邊血液採集方式，以利進行各項血液相關之分析，此方法可適用於多次採血的動物。

3.4.2.2 材料

（1）. 適當大小的針筒、針頭（21- 23 G）、蝴蝶針與留置針

（2）. 70-75 % 酒精棉

（3）. 棉球

3.4.2.3 作業程序

（1）. 採血建議部位：頭靜脈（cephalic vein）、外隱靜脈（lateral saphenous vein）或頸靜脈（jugular vein）

（2）. 操作步驟：

A. 前肢頭靜脈採血程序：

a. 以適當的方式保定動物，採血部位可先進行剃毛。

b. 保定者以大姆指於實驗犬肘部上端壓住頭靜脈，並由內向前外側略為扭轉，以使頭靜脈拉直（圖 3.4.2-1），採血者再以酒精棉擦拭欲下針部位，使頭靜脈更清楚浮現。若無法清楚看到頭靜脈時，可輕觸實驗犬前肢確認頭靜脈之位置，並再次消毒。



圖 3.4.2-1：犬前肢頭靜脈

c. 以附針針筒或留置針進行採血

- 以附針針筒進行採血：一手固定肢體，另一手將針頭斜面朝上以約 15 度夾角角度入針，穿入皮膚直至血管，見到回血而確定進入血管後，固定針頭位置，緩慢抽拉針筒活塞使血液流出。若中途脫針，可將針取出重新操作。再次入針時，往前次入針處更近端，接近軀幹方向入針。
- 利用留置針進行採血：一手固定肢體，另一手持留置針，針頭斜面朝上，以約 15 度夾角角度入針，穿入皮膚直至血管，確認是否有血液流出，若有則將硬針退出，軟針順血管方向平行推入，硬針完全退出後，將埋設好的軟針與針筒連接抽取血液。若無血液流出，則將留置針取出重新操作再次入針時，往前次入針處更近端，接近軀幹方向入針。

d. 待取得所需血量後，輕緩地移除針頭並立即以乾淨棉球按住入針孔，進行止血，以避免發生血腫。若發生血腫，則該部位應避免再採血。為避免損害血管內膜，勿於抽出針頭的同時以棉球按壓入針部位。

B. 後肢外隱靜脈採血程序：

a. 以適當的方式保定動物，使動物側躺或站立。採血部位可先進行剃毛。

b. 保定者扣住實驗犬膝部上端壓住外隱靜脈，並由尾側向外側略為扭轉，以使外隱靜脈拉直（圖 3.4.2-2），採血者再以酒精棉擦拭欲下針部位，使外隱靜脈更清楚浮現。

c. 同 A 第 c 及 d 步驟。

C. 頸靜脈採血程序：

a. 以適當的方式保定動物，使實驗犬呈坐姿，保定者固定前肢，並使頭後仰暴露出頸溝（jugular groove），採血部位可先進行剃毛。

b. 採血者一手拇指加壓頸靜脈入胸處，食指固定好血管減少滑動，以酒精棉擦拭欲下針部位，使頸靜脈更清楚浮現。

c. 以附針針筒或針筒接蝴蝶針進行採血：將針頭斜面朝上以約 25 度夾角角度入針，見到回血後固定針頭位置，緩和抽拉針筒活塞使血液流出。若中途脫針，可將針取出重新操作。頸靜脈血流豐沛，須確實加壓止血後方可重新操作。

d. 同 A 第 c 及 d 步驟。



圖 3.4.2-2：犬外隱靜脈

3.4.2.4 注意事項

（1）. 若發現血液不易抽出或血流不順時，不宜過度用力抽針筒活塞，應重覆操作步驟 3.4.2.3（2）.A 或 B 或 C，適當入針後，再進行抽血。

（2）. 採血量限制：兩週內的採血總量不可超過 1 %的動物體重，犧牲前採血不在此限。

（3）. 犧牲前之大量採血會造成動物不適，須先進行麻醉，建議自頸靜脈採血。動物進入深度麻醉後，保定者使動物仰躺或側躺，頸部拉直後仰，暴露出頸溝，其餘步驟同 3.4.2.3（2）.A.b 及 d。

3.4.2.5 參考文獻

1. Wolfensohn, S., & Llyod, M.（2013）. Handbook of laboratory animal management and welfare. 4th ed. Blackwell Science ltd.
2. Diehl, K., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. & Vorstenbosch, C. V.（2001）. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol., 21: 15-23.
3. Fox, J. G., Anderson, L. C., Otto, G. M., Pritchett-Corning, K. R., & Whary, M. T.（2015）. Laboratory Animal Medicine. 3rd ed. Elsevier Academic Press.

第五節 豬

本章課程安排時數：2 小時

本章學習目標：

1. 學習豬隻保定、採血、麻醉、氣管內導管置入術、導尿管置入術等基本技術。
2. 後續學習如何以皮膚、靜脈、口服、皮下、肌肉給藥方法，提供豬隻試驗物質。

3.5.1 保定

3.5.1.1 目的

固定實驗豬隻，減少實驗豬隻緊迫，以利執行試驗豬隻藥物注射、麻醉、採血及照護。

3.5.1.2 材料

（1）.趕豬板。

（2）.約束籠。



3.5.1.3 作業程序

（1）.執行試驗豬隻藥物注射、麻醉、採血及照護時。

（2）.操作步驟：

一人以趕豬板將試驗豬隻壓制至豬欄邊，限制豬隻行動，另一人即可執

行試驗豬隻藥物注射、麻醉、採血及照護操作。

3.5.1.4 注意事項

執行試驗豬隻保定時，需要 2 人執行，以減少豬隻緊迫，及確保人員安全，不會受傷。



3.5.1.5 參考文獻

1. M. Michael Swindle, Alison C. Smith, 2015. Swine in the Laboratory: Surgery, Anesthesia, and Experimental Techniques. 3rd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.
2. Peter J. A. Bollen, Axel K. Hansen, Aage K Olsen Alstrup,2010.The Laboratory Swine. 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.

3.5.2 採血

3.5.2.1 目的

採集實驗豬隻血液，進行與血液相關試驗、檢測分析。

3.5.2.2 材料

（1）. 採血套筒。

（2）. 採血針（21 G）。

（3）. 採血管（SST、EDTA、HEPARIN、ACD 等）。

（4）. 中央靜脈導管套組（7F）。

（5）. 70-75 % 酒精棉。

（6）. 無菌紗布。

（7）. 血袋（500 cc/250 cc）。

3.5.2.3 作業程序

（1）. 採血部位：耳靜脈（ear vein）或頸靜脈（jugular vein）

（2）. 操作步驟：

A. 耳靜脈採血程序：

a. 試驗豬隻在 Isoflurane 輕微麻醉下以趴姿進行。

b. 以酒精棉擦拭採血部位，進行消毒。

c. 以手捏壓耳朵根部近心端靜脈，輕拍靜脈血管使血管擴大，再持真空採血針套組，沿較直血管進針刺入皮膚血管，推入真空採血管，血液回流至採血管中置適當量，緩慢拔出真空採血管即可。

d. 血液採集後，移除採血針頭，以棉球/紗布按壓採血針孔，進行止血，以避免發生血液持續滲漏。

B. 頸靜脈採血程序：

a. 試驗豬隻在 Isoflurane 輕微麻醉下以仰躺姿勢進行。

b. 以酒精棉擦拭採血部位-頸部至前肢凹陷處，進行消毒。

c. 在最低凹陷處插入真空採血針套組，針刺入皮膚血管，推入真空採血管，血液回流至採血管中置適當量，緩慢拔出真空採血管即可。

d. 因為試驗豬隻在麻醉下進行血液採集，而此部位血管較大條，所以可以

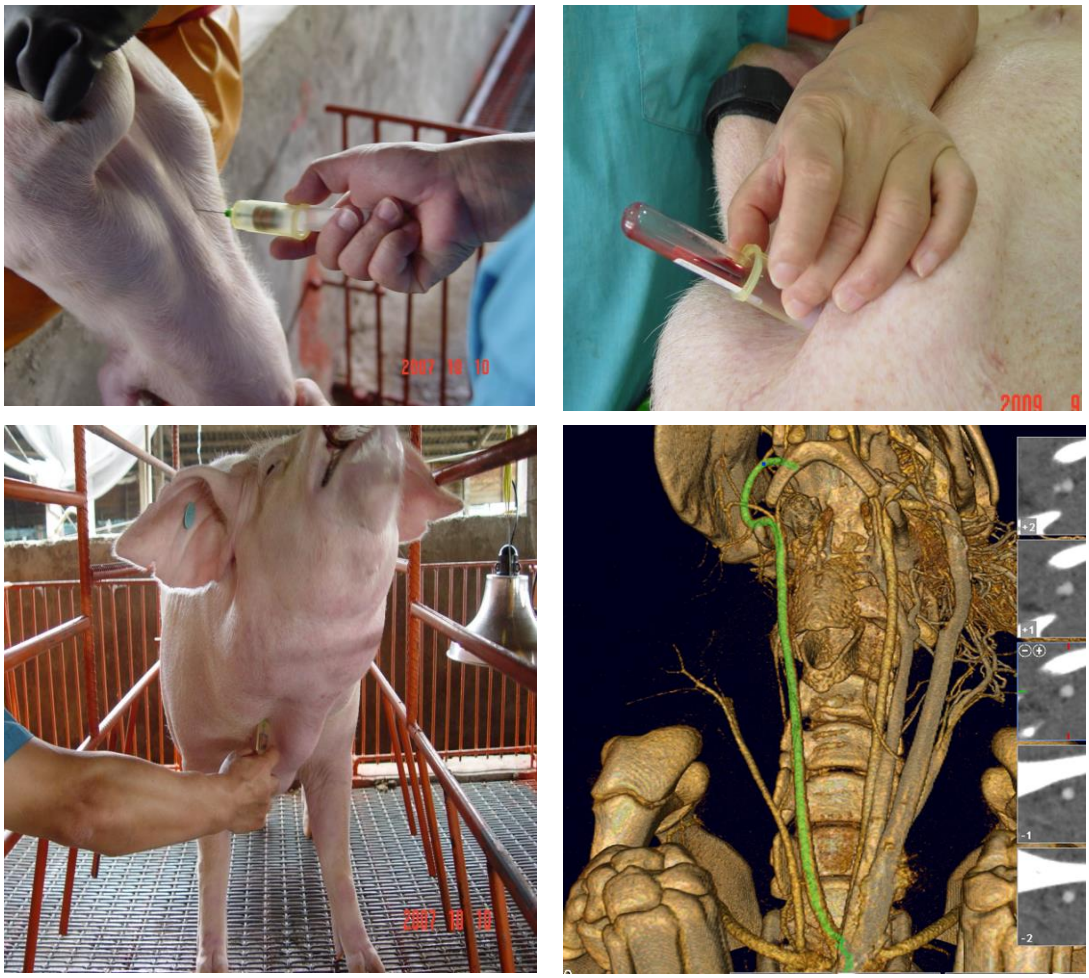
更換採血管，進行大量採血，或是置入中央靜脈導管利用血袋大量採血。

3.5.2.4 注意事項

（1）.若發現採血管中，血液採集不順暢時，可以緩慢抽出採血針，再推入採血針後即可將針刺入血管，血液可以順暢流入採血管或採血袋中。

（2）.採血總量每次不可超過 20％的總血量（實驗豬隻總血量約佔體重 7-8％）。

（3）.大量採血後，必須輸注適量的葡萄糖液或乳酸林格氏液補充之。



3.5.2.5 參考文獻

1. M. Michael Swindle, Alison C. Smith, 2015. Swine in the Laboratory: Surgery, Anesthesia, and Experimental Techniques. 3rd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.
2. Peter J. A. Bollen, Axel K. Hansen, Aage K Olsen Alstrup,2010.The Laboratory Swine. 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.

3.5.3 麻醉

3.5.3.1 目的

確保試驗豬隻於手術進行中免予疼痛刺激，試驗順利進行，維護動物福祉。

3.5.3.2 材料

（1）. 硫酸阿托品

（2）. 畜舒坦

（3）. 舒泰 50

（4）. isoflurane

3.5.3.3 作業程序

（1）. 豬隻保定後，肌肉注射硫酸阿托品（atropine sulfate）劑量為 0.04 mg/kg。

（2）. 肌肉注射畜舒坦，劑量為 4 mg/kg。

（3）. 注射 10 到 15 分鐘後，再肌肉注射麻醉劑舒泰 50，劑量為 4.4 mg/kg。

（4）. 醉注射後移至手術室前，隨時注意維持豬隻的生命跡象與體溫。

（5）. 插入氣導管後，肌肉注射預防性抗生素 Cefazolin 15 mg/kg 及止痛劑 Mobic® 0.4 mg/kg，將豬隻依手術需要之體位，保定於手術檯上。

（6）. 接上氣體麻醉機及呼吸監控系統。

（7）. 麻醉藥使用劑量與麻醉開始到結束時間需記錄於麻醉紀錄表。

3.5.3.4 注意事項

（1）. 嚴謹的手術監控，有助手術成功率大為提升。監控項目包括麻醉程度的深淺與生理機能之觀察如呼吸系統。大多數的麻醉藥都可以判別麻醉深度，例如出現自發動作表示麻醉太淺，手術操作的刺激出現血液動力和呼吸狀態突然變化亦表示麻醉太淺。可靠的徵象（reliable signs）可根據 A.肌肉張力（muscle tone）、B.眼瞼反射（palpebral reflex）、C.瞳孔大小（pupil aperture）這些現象來評估。麻醉中評估呼吸系統可利用呼吸的次數、胸腔起伏等現象來評估。

（2）. 麻醉中的豬隻將連接上生理監控儀，持續量測豬隻呼吸、心跳、體溫、及血壓。工作人員隨時注意豬隻生理狀態，於每 30 分鐘記錄一次，如有任何異常則依狀況進行即時處理並通報獸醫師。

（3）. 惡性高熱（Malignant hyperthermia）：試驗豬隻因全身麻醉而導致嚴重的反應，包括肌肉僵硬、呼吸急促、心跳加快、心律不整、血中二氧化碳濃度增加，導致電解質不平衡、體溫急遽上升（每五分鐘上升 1°C），橫紋肌溶解，導致死亡。可能誘發惡性高熱的原因有先天基因異常、吸入性麻醉劑（主要是 halothane，但亦可見於 isoflurane、desflurane、sevoflurane）、去極化肌肉鬆弛劑（succinylcholine）等。目前台灣治療惡性高熱的解劑為靜脈注射 dantrolene，若試驗中有豬隻發生惡性高熱，應立即停止手術，協助豬體降溫（泡冰水），立即連絡合作獸醫院以取得 dantrolene 給藥。若有發生惡性高熱，應記錄豬隻來源，同一批血源的豬隻應禁止再購入。

3.5.3.5 參考文獻

1. M. Michael Swindle, Alison C. Smith, 2015. Swine in the Laboratory: Surgery, Anesthesia, and Experimental Techniques. 3rd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.
2. Peter J. A. Bollen, Axel K. Hansen, Aage K Olsen Alstrup,2010.The Laboratory Swine. 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.

3.5.4 氣管內導管置入術

3.5.4.1 目的

維持試驗豬隻呼吸道通暢、進行麻醉等操作。

3.5.4.2 材料

（1）.合適氣導管。

（2）.喉鏡。

（3）.導管內導線。

（4）.空針筒。

（5）.聽診器。

3.5.4.3 作業程序

（1）.試驗豬隻在深度鎮靜麻醉下以趴姿進行。

（2）.將試驗豬隻上顎置於拱形鐵架上，將下顎下壓，使口腔張開。

（3）.持喉鏡柄將喉鏡置入口腔緩慢推進，直到會厭，應直接挑起會厭，即可顯露氣管入口。

（4）.將氣導管置入口腔，接近喉頭時，準確輕巧地將導管尖端插入氣管入口。再將導管推入氣管內，並以空針筒由氣導管擴張囊打入適量空氣，以完全塞入氣管。導管插入氣管內的深度依豬隻大小而異。

3.5.4.4 注意事項

插管完成後，需確認導管已推入氣管內再固定。確認方法有：

（1）.壓試驗豬隻胸部時，導管口有氣流。

（2）.氣導管於吸氣時管壁清亮，呼氣時可見明顯的"白霧"樣變化。

（3）.試驗豬隻如有自主呼吸，接麻醉機後可見呼吸袋隨呼吸而張縮。





3.5.4.5 參考文獻

1. M. Michael Swindle, Alison C. Smith, 2015. Swine in the Laboratory: Surgery, Anesthesia, and Experimental Techniques. 3rd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.
2. Peter J. A. Bollen, Axel K. Hansen, Aage K Olsen Alstrup,2010.The Laboratory Swine. 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.

3.5.5 導尿管置入術

3.5.5.1 目的

採集試驗豬隻尿液，進行檢測分析

3.5.5.2 材料

（1）. 合適導尿管。

（2）. KY 潤滑膏。

（3）. 針筒。

（4）. 消毒清潔劑。

3.5.5.3 作業程序

（1）. 試驗豬隻在輕度鎮靜麻醉下以趴姿進行。

（2）. 操作步驟：

A. 戴無菌手套，以紗布沾消毒劑（75 %酒精）消毒尿道口及外陰部。

B. 確定尿道口位置，將導尿管端塗上潤滑膏後，再置入膀胱。

C. 以空針筒抽取適量生理食鹽水打入擴張囊，以確保導尿管在膀胱中不易滑出。

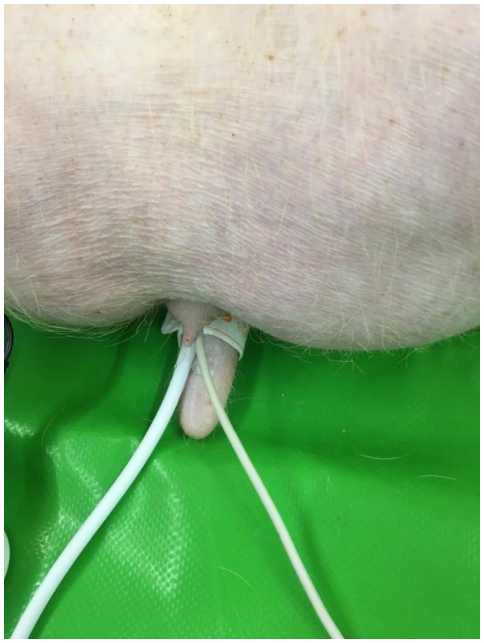
3.5.5.4 注意事項

（1）. 此操作方法只適用母豬，公豬需要用超音波導引，直接以膀胱穿刺法進行尿液採集。

（2）. 為保持導尿管暢通，應避免拉扯及壓折。

（3）. 導尿管發生阻塞或膀胱感染時，應立即更換導尿管。

（4）. 導尿管放置 72 小時以上時，容易會產生菌尿症，故不應長期留置。





3.5.5.5 參考文獻

1. M. Michael Swindle, Alison C. Smith, 2015. Swine in the Laboratory: Surgery, Anesthesia, and Experimental Techniques. 3rd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.
2. Peter J. A. Bollen, Axel K. Hansen, Aage K Olsen Alstrup,2010.The Laboratory Swine. 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.

3.5.6 豬隻口服、注射、皮膚塗抹給藥技術

3.5.6.1 口服方式 Oral Administration

口服藥可分為固體及液體型態 ，一般治療時可以加在飼料中給予，不需要耗費太多人力，為最方便、安全的給藥方式。但若藥物味道不佳，可將藥物與飼料加入糖粉調味，以減輕苦味增加適口性餵服藥物。

如果進行藥物試驗，則必須在輕微麻醉下，以餵管餵服試驗藥物，以確保藥物完全食入，達成試驗目的。

3.5.6.2 注射方法 Injection Admistration

注射給藥可以達到藥效迅速且劑量準確之目標，但必須先保定豬隻，需要較多人力，且在注射給藥過程中，須採外科無菌技術執行，以避免藥劑、空針及針頭之汙染，造成豬隻傷害。通常肌肉注射部位以耳後及後腿部外側為主，靜脈注射則以耳靜脈為注射適當部位。通常靜脈、肌肉、皮內及皮下注射方法，皮內注射通常是進行藥物過敏反應測試所做皮膚試驗。

（1）. 材料

A. 針頭（needle）：

針頭號碼越大，尺寸越小，管徑大小以“Gauge”表示，針體長短不一，長度為 1/4-5 吋，依使用目的選擇不同長度之針頭。

B. 空針筒（syringe）：

空針筒之材料有大多為塑膠製，依藥物之用途及注射量選擇其容量。

C. 消毒劑：

包括 75 %酒精與優碘。

（2）. 注射給藥的原則

遵守無菌原則，包括洗手、藥物的準備及注射部位皮膚的消毒。

（3）. 注射部位的消毒

A. 肌肉、皮下與皮內注射須以 75 %酒精消毒，殺菌效果較好。

B. 靜脈注射以優碘消毒後，再使用 75 %酒精消毒一次。

（4）. 靜脈注射法（Intravenous Injection，IV）

A. 注射部位：耳靜脈為最常注射位置。

B. 注射角度：針頭與靜脈呈 15-45 度角，斜面向上，刺入靜脈。

C. 注射量：一般注射量為 2-50 cc.，如果靜脈輸液則依照情況給予適當藥物輸入量。

D. 操作方式：

耳朵注射部位先用優碘，再用 75 %酒精消毒，以拇指壓住耳根處靜脈血管，使血管充血脹起來，同時繃緊皮膚，將針頭刺入，輕輕回抽針心，確定已插入血管後，才鬆開壓住處、注入藥物。注射完畢拔出針頭後，給予加壓止血，或將留置針留在血管中，接上三方接頭以利後續靜脈給藥。

E. 注意事項：

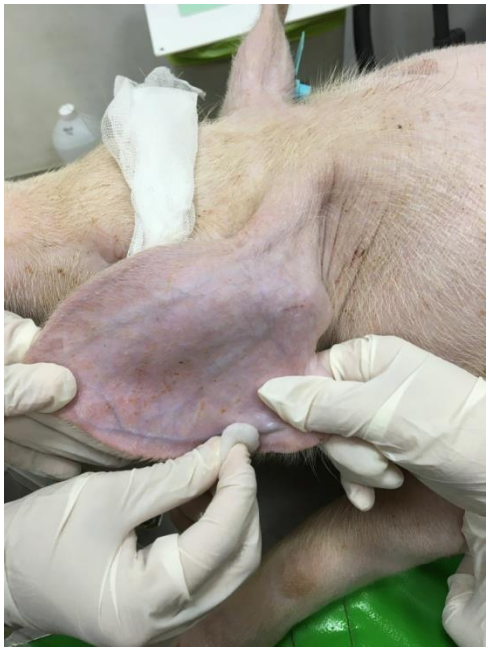
a. 嚴格遵守外科無菌技術原則，以防感染敗血症或菌血症。

b. 須注意靜脈血腫、靜脈炎、組織損傷或壞死、注射部位的感染及過敏反應等。

c. 油性劑、懸濁劑不可用此法注射，否則會引起栓塞。

d. 稀釋藥物時，應盡量以未使用過之無菌稀釋溶液來稀釋。

e. 應常更換注射部位，通常三天要更換注射部位，以免損傷血管壁而產生血栓。









（5）.肌肉注射法（Intramuscular Injection，IM）

A. 注射部位：耳後頸上部、大腿外側部位。

B. 注射角度及深度：針頭與皮膚垂直 90 度，針頭插入至少 2/3 長。體型駕小豬隻可選用較短較細的針頭，且勿插入太深；較胖的豬隻，則選用較長的針頭。

C. 注射量：每次 2-5 cc，勿超過 10 cc。

D. 注意事項：

肌肉注射不當易導致注射部位產生膿瘍、囊腫、組織壞死、形成疤痕，所以必須確保無菌操作。

（6）.皮下注射法（Subcutaneous Injection，SC）

A. 注射部位：耳後頸部、背部皮膚部位。

B. 注射角度及深度：依注射部位組織厚度及針頭的長短而定。一般以 45-60 度角將針頭插入皮膚；若為使用胰島素空針時，採 90 度插入針頭。

C. 注射量：不宜超過 1.5 cc

D. 注意事項：

避免注入到肌肉層，注射時可輕捏起皮膚；同部位應避免重複多次注射，以免引起發炎或是皮下硬痛、腫脹。

（7）. 皮內注射法（Intracutaneous Injection，IC）

A. 注射部位：耳後頸部，通常使用白豬，以方便判讀試驗結果。

B. 注射角度：使用 24 G 以上針頭，針頭斜面向上，與皮膚呈 5-15 度角，將針頭斜面完全插入真皮中，但不可過深。

C. 注射量：0.1 cc，使皮膚隆起直徑約 0.8 公分之水泡。

D. 注意事項：

a. 注射時不需反抽，輕拔出針頭後，勿按揉該處，以免影響試驗結果。

b. 須注意局部皮膚發紅、腫、癢、發疹、蕁麻疹等過敏反應之症狀。

3.5.6.3 皮膚塗抹給藥法 Skin Application

A. 部位：背部、腹部、耳朵

B. 劑量：依照需要給予適當藥物劑量

C. 操作方式：

先洗淨皮膚，以旋轉或環形塗適量藥物於皮膚，視情況必要時，以無菌紗布覆蓋、膠帶或網狀繃帶固定。

3.5.6.4 參考文獻

1. M. Michael Swindle, Alison C. Smith, 2015. Swine in the Laboratory: Surgery, Anesthesia, and Experimental Techniques. 3rd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.
2. Peter J. A. Bollen, Axel K. Hansen, Aage K Olsen Alstrup,2010.The Laboratory Swine. 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.

第六節 水生、兩棲動物

本章課程安排時數：2 小時

本章學習目標：

1. 學習魚類與兩棲類的基本保定與麻醉注意事項。
2. 進一步介紹斑馬魚的基因檢測、腹腔注射、抽血、強制餵食與眼窩注射等方式。

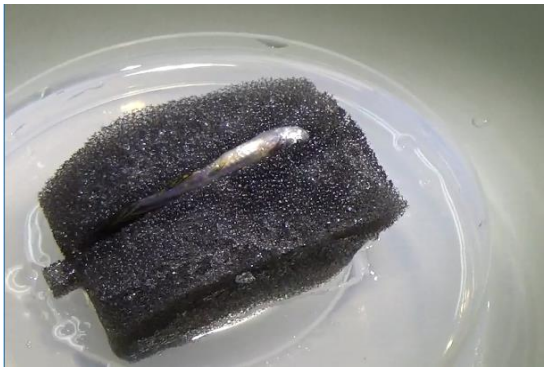
3.6.1 魚類與兩棲類之保定

3.6.1.1 魚類

魚類為水生動物，除非實驗需要，否則以飼養於魚缸中為主，需要撈取魚隻時，必須使用手撈網，魚隻離水後盡量避免直接用手抓取，要進行檢查時可將魚隻由大型飼養缸中撈出至小型缸中（單獨一隻）以利觀察。需要進行實驗時先將魚隻麻醉後再將其固定於濕潤的海綿上，以利操作。

保定方法包括：

（1）.將魚隻固定於吸滿麻醉劑之泡棉凹槽中（避免用手直接接觸魚體）。



（2）.使用隔離冰浴: 將魚隻放置於用濕潤紙巾包覆的冰寶上利用低溫達到保定的效果。



3.6.1.2 兩棲類

兩棲類幼體，可使用乾淨的撈網直接撈取，但水棲性或陸棲型兩棲類成體須徒手抓取。由於兩棲類表皮非常濕滑，抓取時，建議徒手抓取，比較能控制個體，但抓取前，應先將手洗乾淨擦乾後，噴濃度 75%的酒精在手上消毒，待手乾後，再進行抓取。若要換抓取不同種類或不同族群的個體，須重複上述的雙手清潔流程，以避免對其它個體造成病菌感染。另外，要特別注意的是，由於兩棲類是外溫動物，對溫度變化十分敏感，抓取較小的個體時（如:比巴掌小的個體），抓取時間不能太長，以避免個體因人體體溫較高而發生痙攣，甚至衰竭的狀況。

3.6.1.3 參考文獻

1. Zebrafish Book （http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html）
2. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals （2011）, National Academic Press, USA.

3.6.2 魚類與兩棲類之麻醉

3.6.2.1 魚類

魚類麻醉的進行一般以浸泡式為主，經常使用的藥劑及濃度如下：

常用實驗魚類麻醉劑	劑量	注意事項
MS-222 （tricaine, methanesulfonate） $C_{10}H_{15}NO_5S$	25~200 mg/L （依不同魚種及大小而定）	1.配製時利用碳酸氫鈉（sodium bicarbonate）調整pH至中性並避光保存 2.為目前美國FDA唯一准許用於魚類的麻醉藥劑
Clove oil（丁香油） 2-phenoxyethanol $C_6C_5OCH_2CH_2OH$	< 0.5 ml/ L （依不同魚種及大小而定）	Clove oil為油狀，濃縮液應用95%的ethanol來配製，在使用前再稀釋至所需濃度
Benzocaine hydrochloride $C_9H_{11}NO_2$.HCl	25-100 mg/ L	1.配製時利用碳酸氫鈉（sodium bicarbonate）調整pH至中性並避光保存. 2.劑量使用時要很小心，容易因過度麻醉而致死

將魚隻浸泡於適當濃度之麻醉溶液中，靜置約 5-10 分鐘後，用塑膠夾子夾一下魚尾鰭，看魚隻是否仍有反應，以確定達到完全麻醉。

3.6.2.2 兩棲類

（1）.浸泡

浸泡式麻醉適用於兩棲類幼體與成體，無論是無尾類或有尾類。基本流程是先將個體浸泡在麻醉劑，待實驗處理完後，再移除至淡水讓其恢復。麻醉劑一般是將 3-氨基苯甲酸乙酯（3-aminobenzoic acid ethyl ester）粉末加入淡水配成 MS-222 溶液，建議安全濃度是 0.5 g / L（Green 2001），注意 pH 值不能低於 6（Green 2001）。在麻醉處理的容器內麻醉動物，並監測動物麻醉的深度；當用手抓取動物，不會明顯掙扎，或使用探棒碰觸，不會有明顯逃跑反應時，表示個體已麻醉。麻醉所需的時間與兩棲類的種類、發育階段以及體型大小有關。一般蝌蚪（體長 2 cm 以下）麻醉時間約 5 分鐘，較大的個體約需 7-10 分鐘，成體（體長 5 cm 以上）一般可能都需要至少 10 分鐘，以觀霧山椒魚（體長 10 cm 的個體）為例，約 15~30 分鐘可將動物麻醉。另外，也可以使用 2-三氯甲基-乙-丙醇（1,1,1-Trichloro-2-methyl-2-propanol hemihydrate）所配置的麻醉劑，使用時，將一茶匙的

粉末（約 1.43g）溶於 1 公升的水，以斑腿樹蛙（*Polypedates megacephalus*）成體（體長約 4.5 cm）為例，麻醉時間約 9 分鐘。

水棲性兩棲類的麻醉後恢復，只要將動物移至原飼養水族箱中的水，即可慢慢恢復，一般蝌蚪約 5 分鐘即可恢復正常活動。而陸棲性兩棲類在讓其恢復前，可先用淡水沖洗後，再移至沾濕的海綿上，然後鋪上稍微沾濕的海綿在動物背面以避免其慢慢恢復時發生脫水情況；以觀霧山椒魚為例，一般約 10-15 分鐘內即可恢復正常活動。

（2）. 注射與冷藏

小型兩棲類的麻醉以浸泡式麻醉較安全且方便，但大型蛙類，如美洲牛蛙，則建議使用腔內注射（intracoelomic injection）麻醉，建議濃度為 0.1-0.4 g/1L （IACUC 2014）。

過去認為以冷藏冷凍方式對兩棲類動物進行麻醉或安樂死是屬於不人道的方法，然而，近年有許多生理學的研究佐證，顯示這樣的方式是可被接受且人道的，且已受到國際著名兩棲爬行動物學者連署發表所支持（Lillywhite et al. 2016）。在麻醉時，可將動物裝入盒內，放入冰箱冷藏（4℃）一段時間後達成，這個方法目前才開始被推廣幾年，由於不同種兩棲類的生理條件與體型大小不同，麻醉所需的時間會不同，所以理想的冷藏麻醉時間仍有賴更多資料去建立標準。

3.6.2.3 參考文獻

1. AVMA Guidelines on Euthanasia, Guide for care and used of laboratory animals （2013）
2. Green DE （2001） Anesthesia of amphibians in the field. USGS Standard Operating Procedure. ARMI SOP.
3. IACUC（2014）Guidelines for the Preparation and Use of MS222（TMS, tricaine methanesulfonate） for Animal Procedure, Florida Atlantic University, USA.
4. Lillywhite HB et al.（2016）Anesthesia and euthanasia of amphibians and reptiles used in scientific research: should hypothermia and freezing be prohibited? Bioscience 67:53-61.
5. Claudia Harper; Christian Lawrence（2011）The Laboratory Zebrafish, CRC Press, Taylor & Francis Group. Landon.
6. Zebrafish housing, husbandry, health, and care :IACUC considerations （2012, ILAR, vol. 53, no. 2）

3.6.3 斑馬魚基因檢測實驗-剪尾鰭 （Zebrafish Genotyping Test-with Fin Clipping）

3.6.3.1 簡介

斑馬魚的基因檢定可以在胚胎或成魚時期進行，一般大量的基因檢測，常使用剪下的尾鰭作為檢體，由尾鰭中抽取 DNA，先經 PCR 反應，再利用特殊酵素來分解 PCR 產物，最後利用分析跑電泳膠的成果來判定魚隻的基因型。此實驗為斑馬魚常見之基礎試驗，因不同基因型之斑馬魚無法從外觀判定，所以必須利用剪尾鰭並抽取其 DNA，並以分生實驗來鑑定其基因型。

3.6.3.2 試驗內容

（1）. 將待剪尾鰭之斑馬魚進行麻醉（將魚隻放入含有 3-胺基苯甲酸（Tricaine）濃度為 168 mg/ml 的養殖水缸中靜置約 5-10 分鐘）。

（2）. 待魚隻靜止不動後，以酒精燈消毒後的剪刀剪取一葉尾鰭的約 1/3，並放置於含有 50 µl 100%甲醇（Methanol）的 Eppendorf 中。

（3）. 將剪取尾鰭後的魚隻放入恢復缸（含有甲基藍 1 µg/ml 的 400 ml 養殖水）中等待魚隻恢復後，再將其放回原飼養缸中。

（4）. 尾鰭樣品可以被保存於甲醇中，並儲存於-20℃冰箱裏，需要時再進行抽取樣品 DNA 的實驗。

（5）. 要進行 DNA 萃取前，先加熱以去除甲醇，再添加 lysis buffer 並加熱來萃取 DNA。

（6）. 將萃取出之 DNA 進行 PCR 反應（PCR 反應之條件設定，將依不同之檢測基因而調整）。

（7）. 利用添加各種不同之限制酶來分解 PCR 的產物。

（8）. 將分解過的 PCR 產物拿來跑電泳，由電泳膠上呈現之各個片段 DNA 的位置來判讀基因型。

（9）. 整個測試過程需要嚴格控制以下幾項因子：

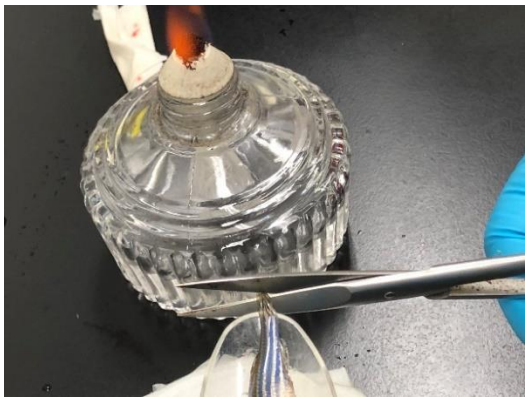
A. 操作實驗過程中需全程配戴手套。

B. 配置麻醉劑 Tricaine 的濃度需事先測試，濃度過高會導致魚隻死亡。

3.6.3.3 應用範圍

需要確定斑馬魚基因型的各項實驗。

圖示實驗步驟如下：





魚隻需要事先麻醉，剪刀需要事先進行消毒，剪取一葉尖端約 1/3 的尾鰭。

3.6.3.4 參考文獻

1. Wei Wu1, Alexander James Hale2,3, Simone Lemeer1 & Jeroen den Hertog. Differential oxidation of proteintyrosine phosphatases during zebrafish caudal fin regeneration. Scientific Reports 2017,7: 8460 | DOI:10.1038/s41598-017-07109-8.
2. The Zebrafish Information Network（ZFIN）protocols （https://wiki.zfin.org/display/prot/Fin+Amputations）

3.6.4 斑馬魚腹腔注射試驗 （Intraperitoneal Injection into Adult Zebrafish）

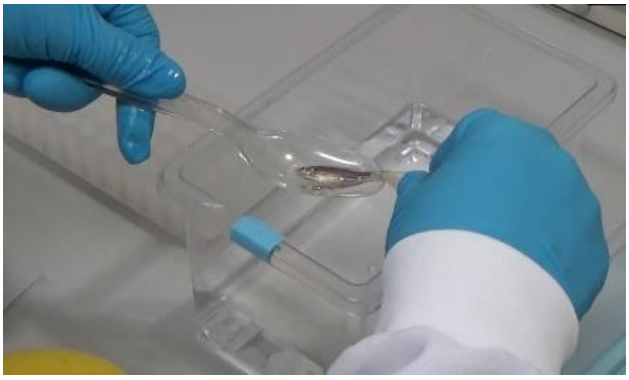
3.6.4.1 簡介

隨著斑馬魚作為醫學研究之動物模式的日益增廣，各種藥物處理方式必須要可以在斑馬魚上施行，浸泡試驗是化學藥物處理斑馬魚的一種最常用而且最方便的方法，但是這種方法卻難以得知實驗進行中每條魚吸收多少試劑，特別是用於與代謝研究相關的研究時，無法僅用浸泡試驗來進行，此時可以透過腹腔注射來給予斑馬魚精確的藥量。

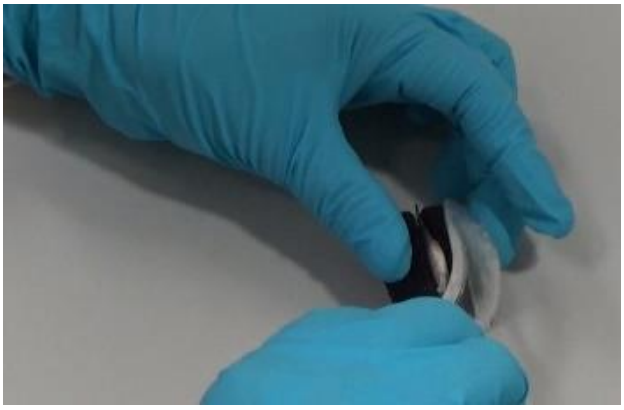
3.6.4.2 試驗內容

（1）. 將待注射之斑馬魚進行麻醉（將魚隻放入含有 3-胺基苯甲酸（Tricaine）濃度為 168 mg/ml 的養殖水缸中靜置約 5-10 分鐘）。

（2）. 待魚隻適度麻醉後，用小型塑膠夾子試夾尾鰭，以確定魚隻是否已經完全麻醉。



（3）. 使魚隻背躺並固定於濕潤的泡棉上。



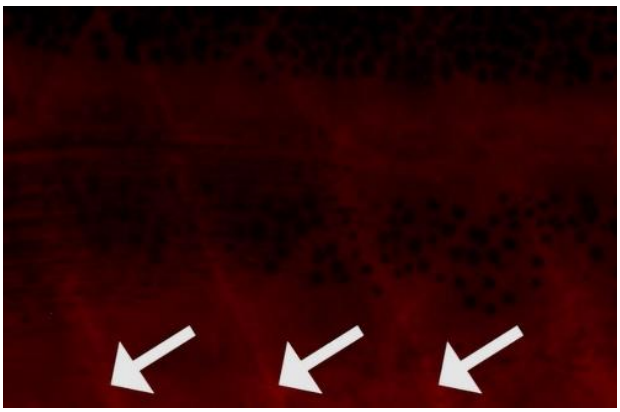
（4）. 使用 Hamilton 注射針筒（1701LT）加針頭（32 G） 使用 10 µl 紅螢光染劑（rhodamine dextran）（10 mg/ml）當作指示劑。

（5）. 將針頭插入斑馬魚腹部靠近腹鰭的起始端。



（6）. 將注射後的魚隻放入含有甲基藍的養殖水中（1 μg/ml），等待魚隻恢復。

（7）. 注射完 2 小時後於螢光顯微鏡下進行腹部肌肉層觀察，若注射成功的魚，可在其腹部肌肉層中明顯觀察到紅螢光的表現。



（8）. 整個測試過程需要嚴格控制以下幾項因子:

A. 操作實驗過程中需全程配戴手套。

B. 配置麻醉劑 Tricaine 的濃度需事先測試，濃度過高會導致魚隻死亡。

C. 此實驗需要反覆練習，必須在魚隻的肌肉中成功的檢視到所使用的染劑後，才可以開始施打藥劑。

3.6.4.3 應用範圍

給藥或需注射任何物質於斑馬魚腹部肌肉層的實驗。

3.6.4.4 參考文獻

1. Kinkel MD, Eames SC, Philipson LH, Prince VE. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. J Vis Exp. 2010 Aug 30; （42）.

3.6.5 斑馬魚抽血技術（Blood Collection）

3.6.5.1 簡介

斑馬魚的抽血技術是一個很精細卻很實用的技術，需要非常小心及熟練地來執行。由於斑馬魚體型非常小，故可以抽取的血液非常有限。多次採血可以下針的部位不多，一般會從眼窩後血管（retro-orbital）或背主動脈（dorsal aorta）下針。隨著斑馬魚的科學應用日益廣闊，血液檢測的利用也將更普遍。

3.6.5.2 試驗內容

（1）. 抽血針的準備

A. 利用 1.0 毫米外直径的玻璃毛细管，經拉針機拉成封閉式的兩根玻璃微毛细管針。

B. 斜切玻璃微毛细管針，理想尖端直徑應該大約 100-200 μm。如果尖端直徑太窄，血液不易流入針管內。

C. 配置 5 mg/ml 的濃度的 heparine 溶液，並用此溶液潤濕採血管。

D. 將含有 heparine 的抽血針連接於一端含有口接器的塑膠管上，以利於採血步驟的進行。

（2）. 麻醉

將斑馬魚深度麻醉（將待抽血之斑馬魚放入含有 3-胺基苯甲酸（Tricaine）濃度 168 mg/ml 的養殖水缸中靜置約 5-10 分鐘，待魚隻完全麻醉）。

（3）. 採血

A. 一次性採血

切開腹部，直接由心臟採血或切斷頭部後由背主動脈（dorsal aorta）採血，這樣可以取得最多的血液，但是一隻魚僅能採一次血。

B. 重複性採血

a. 將針頭以 30-45 度角插入採血部位，避免穿刺到胃腸道。

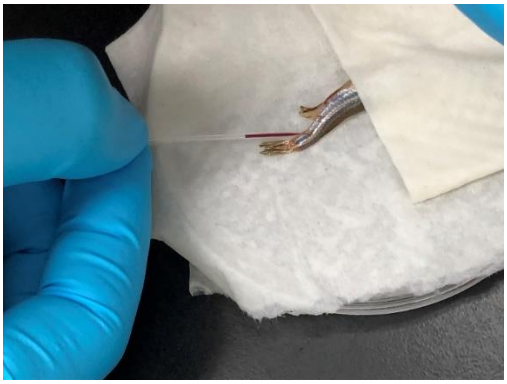
b. 沿着腹側脊柱用手往尾部主軸線滑下至靠近泄殖腔附近，找到下針的地方。

c. 小心地用針尖移除部分鱗片。

d. 開始利用塑膠口吸氣吸取血液。並用另一指的手指朝出血方向輕輕按壓。

e. 需要注意的是，一旦血液進入採血針，立即停止按壓，以方便順利採血。

f. 採血完畢後，將採血針輕輕抽出魚體，並用濕軟的紙巾按壓下針處約 10-20 秒以確定完全止血後，再將魚放入預備的恢復缸中使其完全恢復。





（4）.注意事項

A. 使用此方法的取血量及頻率建議為: 每週採血量≤ 0.4 %的魚隻體重; 隔週採血量≤ 1 %的魚隻體重，以減少因抽血過多所產生的魚隻死亡或貧血現象。

B. 此實驗需要反覆練習，必須在能夠成功地掌握魚隻尾部背主動脈的血管位置後，才可以成功地取得足夠的血液。

3.6.5.3 應用範圍

此方法可以廣泛地應用於血液學、代謝症候群如肥胖等及藥物動力學之研究。

3.6.6.4 參考文獻

1. Zang, L., Shimada, Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., Nishimura, N. Repeated Blood Collection for Blood Tests in Adult Zebrafish. *J. Vis. Exp.*（102）, e53272, doi:10.3791/53272 （2015）.
2. Zang, L., Shimada, Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., Nishimura, N. A novel, reliable method for repeated blood collection from aquarium fish.Zebrafish. 10,（3）, 425-432（2013）.
3. Carmichael, C., Westerfield, M., Varga, Z. M. Cryopreservation and in vitro fertilization at the zebrafish international resource center. Methods Mol Biol. 546, 45-65（2009）.
4. Thorson, T. B. The partitioning of body water in Osteichthyes: phylogenetic and ecological implications in aquatic vertebrates. Biol Bull-US. 120, 238-254（1961）.
5. Conte, F. P., Wagner, H. H., Harris, T. O. Measurement of blood volume in the fish（Salmo gairdneri gairdneri）. Am J Physiol. 205, 533-540 （1963）.
6. Diehl, K. H., et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol. 21,（1）, 15-23（2001）.

3.6.6 斑馬魚強制餵食技術（Zebrafish Gavage）

3.6.6.1 簡介

魚類的進食可依餵食次數及餵食量來加以控制，但是由於魚類生活於水中，食物投注於魚缸後，較難判斷魚隻的攝食情況。強制餵食一般用於定量攝食試驗，是確保每隻斑馬魚的攝食量相當的一種實驗方法。

3.6.6.2 試驗內容

（1）. 將餵食管（LS22/6K）連接 10 µl 餵食針筒針尖（VAHBPU-T22），以完成餵食器的製作。

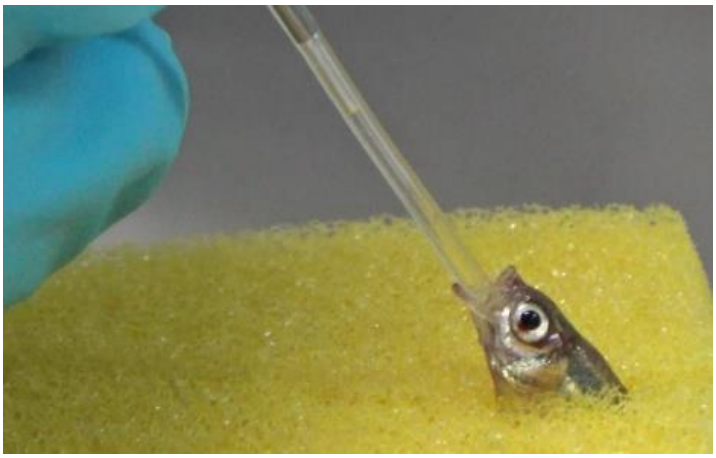
（2）. 將餵食之斑馬魚進行麻醉（將魚放入含有 3-胺基苯甲酸（Tricaine） 濃度為 168 mg/ml 的養殖水缸中靜置約 5-10 分鐘），待魚隻完全麻醉。

（3）. 將欲餵食之溶液定量吸入餵食器當中。

（4）. 完全麻醉的斑馬魚即可移至濕潤海綿中，利用海綿將魚隻夾住固定（魚隻頭部朝上）。



（5）. 將餵食管緩慢深入斑馬魚吻部，通過鰓蓋後即可開始灌入溶液。



（6）. 灌食後之魚隻放入含有甲基藍（1 μg/ml）的 400 ml 養殖水，等待魚隻恢復。

（7）. 整個測試過程需要嚴格控制以下幾項因子：

A. 操作實驗過程中需全程配戴手套。

B. 配置麻醉劑 Tricaine 的濃度需事先測試，濃度過高會導致魚隻死亡。

C. 餵食器操作時必須經由魚之口中插入，切記要超過鰓蓋的部分再行餵食，以避免由鰓蓋處溢流出。

3.6.6.3 應用範圍

強制餵食可應用於餵食食物、藥物等欲固定攝食量之試驗。

3.6.6.4 參考文獻

1. Ji, J., Thwaite, R., Roher, N. Oral Intubation of Adult Zebrafish: A Model for Evaluating Intestinal Uptake of Bioactive Compounds. *J. Vis. Exp.*（139）, e58366, doi:10.3791/58366 （2018）.

3.6.7 斑馬魚眼窩注射技術（Retro-Orbital Injection in Zebrafish）

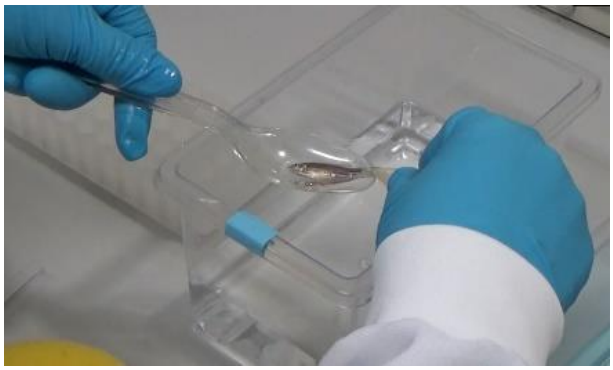
3.6.7.1 簡介

動物的血管注射是給藥或快速供給動物各種物質的最佳途徑，斑馬魚的眼窩後方有一個靜脈是進行血管注射的好地方。許多研究也顯示這種注射方法是出血量少且對魚隻傷害較小的注射方法。

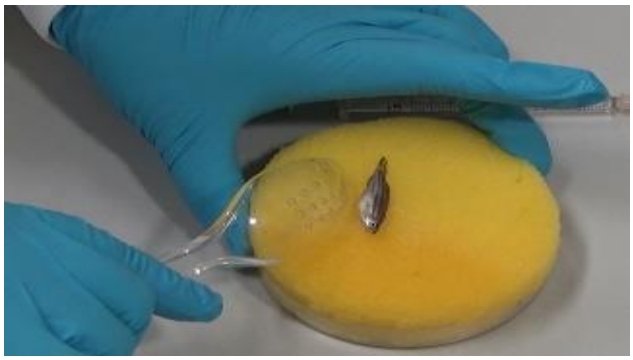
3.6.7.2 試驗內容

（1）. 將待注射之斑馬魚進行麻醉（將魚隻放入含有 3-胺基苯甲酸（Tricaine）濃度為 168 mg/ml 的養殖水缸中靜置約 5-10 分鐘），待魚隻完全麻醉。

（2）. 待魚隻沒有反應後，用小型塑膠夾子夾尾鰭確定魚隻是否已經無法活動，以確定達到深層麻醉。

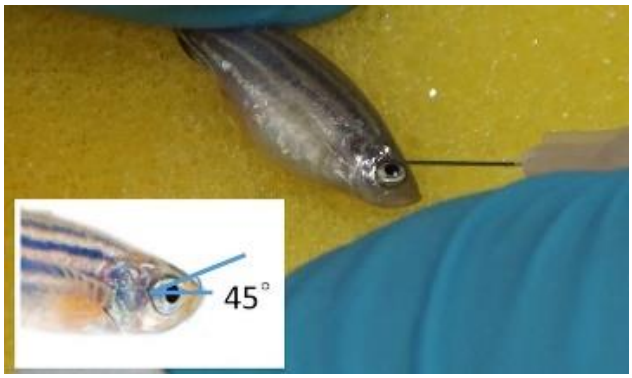


（3）. 使魚隻側躺於濕潤的泡棉上。



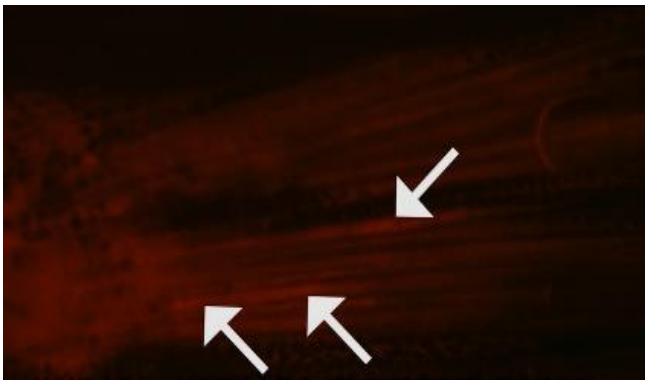
（4）. 使用 Hamilton 注射針筒（1701LT）加針頭（32 G）抽取 10 µl 紅螢光染劑（rhodamine dextran）（10 mg/ml）。

（5）. 與魚隻眼珠成 45 度角的傾斜度，將針頭插入眼窩後靜脈中。



（6）. 將注射後的魚隻放入含有甲基藍（1 μg/ml）的 400 ml 養殖水，等待魚隻恢復。

（7）. 注射 2 小時後於螢光顯微鏡下觀察魚鰭，注射成功後，魚隻尾鰭的血管中可以觀察到紅螢光的表現。



（8）. 整個測試過程需要嚴格控制以下幾項因子：

A. 操作實驗過程中需全程配戴手套。

B. 配置麻醉劑 Tricaine 的濃度需事先測試，濃度過重會導致魚隻死亡。

C. 此實驗需要反覆練習，必須在魚隻的血管中成功的檢視到所使用的染劑後，才可以開始施打藥劑。

3.6.7.3 應用範圍

給藥或注射任何物質於斑馬魚血管中的實驗。

3.6.7.4 參考文獻

1. Emily K. Pugach, Pulin Li, Richard White, and Leonard Zon. Retro-orbital Injection in Adult Zebrafish. *J Vis Exp*. 2009; （34）: 1645.

第四章　手術技術與操作準備

手術泛指暴露、分離、切割、縫合身體皮膚或黏膜層覆蓋的組織的操作程序。一般而言手術伴隨不同程度的疼痛與緊迫，因此適當的麻醉方法、良好的技術、術後照顧、止痛、預防感染與炎症反應都是操作人員必備的技能。

施加在動物的所有外科手術、麻醉劑、鎮痛藥、抗生素或其他藥物必須在動物使用計畫（animal use protocol）中描述，並經 IACUC 核准。抓取處理動物和/或進行外科手術的人員必須在動物使用計畫中詳列，並在進行任何外科手術或其他程序之前進行適當的訓練，以熟悉相關必要操作與技術。

手術可依術後動物是否存活分為存活手術（survival surgery）與非存活手術（non-survival surgery）兩大類。存活手術是指動物進行麻醉與手術操作步驟後，需甦醒且持續存活一段時間，因此對無菌操作與操作步驟要求較嚴謹；非存活手術則於動物麻醉中完成實驗操作並直接進行安樂死，因此對無菌程序的要求較不嚴格，但一些基本操作如動物剃毛、人員配戴手套與口罩、器械及手術部位的消毒清潔等還是必要的。

除了以動物術後是否存活進行分類之外，還可依手術對動物體的侵入性細分為重大手術（Major Surgery）與次要手術或小型手術（Minor Surgery）。重大手術是指侵入頭顱、腹腔或胸腔、骨骼關節手術或對動物體機能會造成永久性損傷的手術。執行重大存活性手術時，除了深度麻醉與無菌操作，同時也需盡可能降低術後感染的機會。小型手術是指不侵入體腔或對動物體機能不會造成永久性損傷的手術，如體表血管插管、傷口縫合等。相較於重大存活性手術（Major survival Surgery），小型存活手術（Minor survival Surgery）的操作條件較不嚴苛，但仍須符合無菌操作標準，並給予適當的麻醉。

以下略述幾種常見的操作及分類：

1. 不涉及需要關閉縫合切口的操作：用於實驗應用、檢查，或用於治療誘發或自發的疾病或病症等程序，包括：

（1）. 注射

（2）. 包紮/上石膏（casting）

（3）. 醫學照影（Imaging）

（4）. 抗體生產

（5）. 血液/液體收集

（6）. 經由天然開口進行內視鏡檢查，但不涉及活體組織採樣

（7）. 非侵入性生理監測

（8）. 不暴露體腔的活組織檢查（biopsy）

（9）. 骨髓抽吸（Bone marrow aspirate）

2. 小型存活手術：不暴露體腔或通常不會導致重要生理或生理功能受損的外科手術，包括：

（1）. 不會暴露硬腦膜的顱骨鑽孔或大腦皮下植入物

（2）. 周邊血管插管（Peripheral vessel cannulation）

（3）. 閹割（陰囊或前恥骨方法）

（4）. 不涉及骨骼之口腔手術和拔牙

（5）. 經由天然開口進行內視鏡檢查，但涉及活體組織採樣

（6）. 小指或尾部截肢切除

（7）. 淺表損傷的外科修復

3. 重大存活性手術：穿透體腔（即顱、胸、腹、滑膜、骨盆、眼或眼眶、骨骼、關節或骨髓）的外科手術，涉及廣泛的組織切除或橫斷，或有可能產生嚴重的損傷動物體或生理功能，包括：

（1）. 肌腱/韌帶修復或受傷

（2）. 卵巢子宮切除術

（3）. 所有切開術（例如開腹手術 laparotomy、氣管切開術）和切除術

（4）. 所有涉及切口的檢查（例如腹腔鏡檢查 laparoscopy）

（5）. 植入中央裝置（Implantation of central devices）

（6）. 切斷術（Amputation，截肢，切除身體部位）

（7）. 眼球摘除（Enucleation）

（8）. 涉及角膜切創的眼科手術（Eye surgery involving corneal incision）

（9）. 中央套管插入（中央入路）

（10）. 肌肉骨骼系統修復，損傷或活組織生檢

（11）. 廣泛的組織切除/橫斷（例如，神經或肌肉切除）

另外，會影響重大手術或小型手術分類的因素，還包括麻醉持續時間、切口的大小和位置、組織解剖切割的量和進行手術的動物特性等具體情況進行評估。

4. 非存活性手術：動物進行該手術後，在麻醉恢復之前即被安樂死。

通常傷害愈多組織的手術在術後愈容易引起疼痛或不適，例如單純的切開、縫合及導尿會引起輕度的疼痛，但若涉及骨折、韌帶手術、胸腔手術、脊椎手術及截肢則常引起嚴重程度的疼痛。若於手術前或手術中即使用止痛劑，會比手術之後再給予止痛劑更能有效抑制或阻擋疼痛路徑，而得到更良好的止痛效果。如果動物在手術前便已有疼痛的病灶或表現，應增加疼痛治療的劑量。有些種類的藥劑，如鎮靜劑、抗焦慮劑等，雖沒有止痛效果，但是配合止痛或麻醉劑給予時，可以使麻醉的恢復較平順，並減少手術後動物的不安。通常手術後的疼痛在 24 小時內會達到高峰，所以手術後的動物應讓其在熟悉安靜的環境恢復，密切觀察並依狀況持續使用適當的止痛劑，以確保動物沒有過度的不適或者其他的變化。

第一節 存活手術程序：（嚙齒類及中大動物）

本章課程安排時數：2 小時

本章學習目標：

1. 學習嚙齒類及中大動物在手術前的器械、動物、人員準備以及術中程序及術後管理的注意事項。
2. 學習止痛藥的應用及麻醉狀態的判讀。

4.1.1 手術前準備

4.1.1.1 手術位置（Surgery location）

進行重大存活性手術，需要 IACUC 核准的專用手術室，並具有獨立的動物和術者（外科醫生）準備區域，及一個單獨的手術後恢復區域。進行小型存活手術，需要 IACUC 核准的手術區域，並強烈建議要有單獨的準備區域和恢復區域。

嚙齒類動物對手術設施的要求相較於其他中、大型動物物種較為簡單，一般而言，嚙齒類動物不需要專門的手術設施，但手術區域應具有以下組成：動物準備區域、術者準備區、動物繫留（holding）恢復區域和手術區域；並盡可能包括安樂死區域。

無論手術位置如何，當一個區域使用於手術時，不應進行其他活動，且應保持清潔，並盡量減少動線交錯。手術準備，例如剪毛、拭洗和麻醉誘導應遠離將要進行手術的地方。手術區域應避免靠近走廊和門，因為氣流會導致灰塵污染。將要進行手術的區域表面必須是無孔洞、密封、耐用和可消毒的。在手術期間，該區域應是清潔不雜亂，並且僅限於執行該程序的人員進入，手術前應對操作台表面進行消毒。

於桌子，手術台等硬表面常用的消毒劑（disinfectants）包括：

- 在不具有機物質或嚴重污染的情況下，醇（70％乙醇，85％異丙醇（isopropyl alcohol））作用 15 分鐘。
- 四級氨化合物（Roccal，Quatricide）可被有機物快速去活性，並可讓革蘭氏陰性細菌的滋生。
- 醛類（Aldehydes），例如戊二醛（glutaraldehyde）（Cidex，Cide Wipes，Cetylcide-G）可快速消毒表面，但其具毒性，需遵循職業安全要求。

- 苯酚類（Phenolics）（來舒 Lysol，TBQ）對金屬有一定腐蝕性，但受有機物質的影響小於其他消毒劑。
- 次氯酸鈉（Sodium hypochlorite）（Clorox 10%溶液）具有腐蝕性，活性因有機物而降低。
- 二氧化氯（Chlorine dioxide）（Clidox，Alcide）可在 3 分鐘內殺死增殖生物（vegetative organisms），具腐蝕性，活性因有機物而下降，必須新鮮配製使用。
- 克羅希西定（Chlorhexidine）（Novalsan，Hibiclens）迅速殺菌和持久，可有效對抗許多病毒，在血液存在下具活性。

一般動物手術基本用品應包括無菌器械包、無菌用品（覆巾、紗布、手套、沖洗液、托盤）、消毒劑或高壓滅菌器或熱玻璃珠消毒器，以及加熱水毯或加熱保溫燈，而嚙齒動物手術板（rodent surgery board）是一個不錯的配備。在開始手術前，應使用放大鏡檢查嚙齒動物精緻手術器械的尖端是否有缺損。

4.1.1.2 器械準備（Instrument preparation）

使用滅菌器械（高壓滅菌器，氣體滅菌器或化學滅菌器）對執行手術非常重要。在高壓滅菌器中蒸汽滅菌（121℃ 15 分鐘或 131℃ 3 分鐘）非常有效，乾熱箱（Dry heat in a chamber）或熱玻璃珠滅菌器（250℃，15 秒）內的乾熱效果同樣良好，但在接觸動物組織之前必須冷卻手術器械。環氧乙烷氣體（Ethylene oxide gas，EO）熱箱放置在化學通風櫃中，以相對濕度為 30%的溫度作用時，是一種良好的滅菌劑，但環氧乙烷對人體有害，且對組織非常刺激，因此利用此法消毒的器械在用於動物之前必須充分通氣，以排除器械殘留之環氧乙烷。汽化過氧化氫（vaporized hydrogen peroxide）或環氧乙烷可用於無法高熱或高壓處理的儀器、裝置或供應品；也可以使用化學滅菌劑，但是，滅菌的有效性取決於與器械充分接觸的時間、適當的混合、溶液的新鮮度以及從器械中去除有機物質。應使用適當的滅菌指示劑對所有滅菌方法進行確效（validation），並對所有滅菌設備進行適當的測試和維護。消毒劑（disinfectants）不應當作滅菌劑（sterilants）使用。而消毒劑必須塗佈所有器械表面，並且必須用溶液填充其管道，完成消毒程序後，必須使用無菌生理食鹽水或無菌水沖洗掉手術器械中所有殘留化學品，以避免組織損傷。遵循製造商的說明，避免混合不相容的化合物，並記住這些化學品大多

數具危害性是危險性化學品。

滅菌是完全減少微生物的生命，這可以通過加熱，化學品或輻射達到滅菌效果。滅菌劑（Sterilants）與殺芽孢劑（sporocides）基本上是相同作用，它們殺死所有微生物，包括細菌內生孢子。另一方面，消毒劑（disinfectants）可在指定的條件下殺死某些活躍生長（vegetative）的細菌，但對真菌（fungi）、病毒、結核分枝桿菌（Mycobacterium tuberculosis）或細菌孢子（bacterial spore）無效；這些試劑僅在根據製造商的說明使用時才有效，並且可能被血液、體液或組織等有機物質降低活性。因此消毒劑（disinfectants）不應當作滅菌劑（sterilants）使用。

常見的化學滅菌劑包括：

- 2%戊二醛（Glutaraldehyde） 需作用 10 小時（Cidex，Abcocide）。根據不同類型，活化後保質期為 14-28 天。
- 8%甲醛（Formaldehyde）加 70%酒精作用 18 小時。
- 7%穩定過氧化氫（hydrogen peroxides） 需作用 8 小時（加速過氧化氫，Virox STF，Sporox），保質期 21 天。
- 7.35%過氧化氫和 0.23%過乙酸（peracetic acid） 混合作用 3 小時（EndoSpor plus）。保質期 14 天。
- 二氧化氯 1:5 稀釋溶液作用 6 小時。必須每天新配製（Clidox）使用。
- 1.37%次氯酸鈉（Sodium hypochlorite）作用 6 小時。活化後（Alcide）的保質期為 14 天。

由於大多數囓齒動物手術是以批次進行的，因此建議使用一套以上的無菌器械，在執行 4 到 5 隻囓齒動物手術後，更換新的無菌包裝器械。手術器械應盡量減少污染，例如放置在無菌蓋布上或在每隻動物手術之間將器械浸泡酒精中。此外，根據功能分開器械操作有助於確保無菌性，例如在皮膚上使用的器械不應使用在腹腔內。

在不同動物之間進行手術時，使用過的器械應以無菌紗布將血液和組織先擦拭乾淨，再以無菌生理食鹽水沖洗，並使用熱玻璃珠滅菌器滅菌或按照製造商的建議浸泡在消毒劑中。如果使用玻璃珠滅菌器，請記住在重新使用之前讓器械有時間冷卻。如果使用消毒劑，則在下一隻動物使用器械之前，務必用無菌生理食鹽水沖掉消毒劑。

常見的化學消毒劑（chemical disinfectants）包括：

- 醇類：70％乙醇或 85％異丙醇（isopropyl alcohol），在沒有有機物質或嚴重污染的情況下，需持續 15 分鐘。
- 醛類（Aldehydes）（Cidex，Metricide，Cetylcide-G，Wavicide）消毒 45 分鐘，根據配方重複使用 14-30 天。
- 次氯酸鈉（Sodium hypochlorite）（Clorox 10％溶液）具有腐蝕性，活性會因有機物而降低。
- 二氧化氯（Chlorine dioxide）（Clidox，Alcide）在 3 分鐘內殺死增殖生物，具腐蝕性，活性會因有機物而下降，故必須新鮮配製使用。克羅希西定（Chlorhexidine）（Novalsan，Hibiclens）迅速殺菌和持久，可有效對抗許多病毒，在血液存在下仍具活性。

當進行多個無菌手術或存活性手術時，動物手術必須使用完全消毒的器械包開始；如果出現意外污染，應準備額外的無菌器械包。在手術結束時，將器械浸泡在消毒劑溶液中，然後用刷子、大量肥皂和水清潔器械；用清水徹底沖洗器械，存放前徹底擦乾器械。某些器械可能需要特殊處理才能進行清潔。器械可經高壓滅菌或氣體滅菌，為可能的下一次手術預先做準備。

4.1.1.3 術者準備

在刷手之前，術者應先戴上手術帽、面罩和清潔的實驗罩袍或手術刷手服。使用含有殺菌劑（例如克羅希西定 chlorhexidine）的手術刷手膏，從手指尖一直到肘部開始刷洗。在刷洗結束時，用無菌毛巾由手指尖到肘部擦乾雙手。旋轉毛巾，另一手重複此擦乾過程。

打開無菌手套上的紙張覆蓋物（外包裝應該已經打開），並確保不接觸任何非無菌表面。萬一不小心用長袍或手套觸摸未消毒的表面，則更換無菌的新長袍和新手套。戴上無菌手套後，把手放在面前，確保雙手放在桌子上方，腰部以上，不高於肩膀，始終在面前保持無菌區。

（1）. 對於重大存活手術：

A. 術者（外科醫生）必須穿著乾淨的刷手服、鞋套、面罩、手術帽或 bonnet 帽、無菌手術衣和無菌手套。

B. 在穿衣和戴手套之前，必須取下手、手腕和手臂上所有首飾及鬆散下垂的耳環。

C. 使用無菌擦洗刷和/或經認可的無水手術溶液（例如 Avagard TM）在手和下臂進行手術前刷洗。

D. 處理每隻動物必須戴一副新的無菌手套，如果懷疑或觀察到污染，必須更換無菌新手套。

E. 在手術過程中，房間內的其他人也必須穿著專用的外罩、鞋套、面罩和手術帽或帽子；如果接觸動物或其生物物質，則必須戴手套。

（2）.對於小型存活手術：

A. 在手術過程中，術者（外科醫生）必須戴口罩、手術帽或帽子、無菌手套、清潔的一次性個人防護裝備（PPE）罩袍服或乾淨的實驗外袍。

B. 必須取下手、手腕和手臂上所有首飾及鬆散下垂的耳環。

C. 處理每隻動物必須戴一副新的無菌手套，如果懷疑或觀察到污染，必須更換無菌新手套。

D. 在手術過程中，房間內的其他人必須佩戴專用的外罩、面罩和手術帽或帽子。

E. 如果在手術過程中使用輻射，人員必須經過適當的訓練和屏蔽保護。

4.1.1.4 動物準備

（1）.術前準備

在手術之前，正確識別動物個體是很重要的。要取得動物體重、年齡、性別、品系、族群歷史資訊和健康狀況。確定動物是否已經適應動物設施，一般在從供應商送達設施後適應 3-5 天就足夠了，但在某些情況下，這段適應時間可能需要長達兩週。

進行動物個體檢查以確定動物是否健康和活躍。如果可能，可以進行簡單的實驗室檢查，例如血容比、血糖或尿液分析。

對於嚙齒類動物來說，食道逆流很少發生，因此通常不需要在手術前禁食；但對其他物種，適當的禁食可以減少術中嘔吐阻塞呼吸道的意外；在任何情況下，禁食應限制在 8-12 小時，禁食可最大限度地減少個體對麻醉藥物劑量的反應。

術前給予輸液並考慮先發性止痛（preemptive analgesia）。麻醉誘導後，在眼睛上塗抹眼藥膏（如 Puralube），以防止角膜乾燥。

（2）.處理動物皮膚準備

準備處理動物皮膚的區域大約是需要手術區域兩倍大，準備工作應與外科手術不同的單獨位置（工作台或房間）進行。應該從手術部位移除毛髮（使用帶有＃40 刀片的手術刀或脫毛膏，脫毛膏會刺激皮膚，因此使用脫毛膏後應徹底沖洗該區域），然後以皮膚消毒劑（例如碘伏膏（iodophors）或克羅希西定（chlorhexidine））和酒精交替刷洗手術區域。碘伏膏（Iodophors，Betadine，Prepodyne，Wescodyne）可減低多種微生物的活性，但在有機物存在下會降低消毒劑活性。克羅希西定（Chlorhexidine，Novalsan，Hibiclens）對許多病毒具有快速殺菌，持久和活性，即使在血液存在的情況下仍具活性。

紗布海綿或 Q-tips 棉花棒可用於擦洗。避免使用酒精潤濕大面積的皮毛，因為有可能誘發體溫過低。在去除可見污垢和碎屑後，至少應進行三次交替的圓形（從內到外）擦洗消毒劑（克羅希西定擦洗、碘擦洗等）和沖洗（加溫無菌鹽水、無菌水或酒精）。擦洗過程應沿著切口線開始並向外延伸，而不是由外（髒）朝向中心（乾淨）擦洗。

（3）.蓋覆巾（Draping）

無菌覆巾可用於包裹器械包和/或在切口部位周圍形成無菌區域，覆巾可以是布、紙或其他合適的無菌材料，但必須在用於動物之前進行消毒。覆巾的使用取決於即將進行的操作性質。如果是一個手術干預最少的短暫程序，可以不使用覆巾，但是，應將器械的尖端保持在無菌區域內，並避免使用器械接觸未消毒的區域。對於更廣泛的操作區域，則必須使用毛巾、彈力織物或塑膠保鮮膜來覆蓋，覆巾有助於保持無菌區域並保持動物體溫。

使用無菌覆巾覆蓋動物之前，須確保動物在手術表面上適當固定，可以使用腿帶、定位墊、沙袋或一次性泡沫墊等；對於較大的動物種類，建議在壓力點上使用墊子以減少相關神經損傷的可能性。

（4）.體熱散失（Heat loss）

當麻醉持續時間大於 10 分鐘或進行任何體腔暴露的程序時，必須提供外部熱源（如循環水毯或 Bair-Hugger®）。由於嚙齒類動物的體表面積與其體重比相對較大，傾向於迅速散熱，因此手術中應始終保持動物溫暖（Keeping rodent warm），優先選擇使用加熱水毯、溫熱的流體袋或充滿溫水的手套。注意動物尾部、耳部和腳部也會散失熱量，而失溫會顯著延長麻醉時間，從而增加併發症的風險。

（5）.體液流失

動物在手術過程中會經歷大量的體液流失，體液損失主要是由於體腔蒸發和失血造成的。如果預估長時間體腔暴露或顯著失血，應給予等張溶液（如 LRS 或 0.9%NaCl），劑量為 5-10 mL / kg /小時。嚙齒類動物由於體積小和總體液含量較小，故特別容易受到術中體液流失的影響，可藉由用溫熱的無菌生理食鹽水沖洗手術區來減少術中體液流失；在手術前和手術結束時，皮下注射 3-5%體重的溫熱無菌等張溶液（isotonic fluids）；經由燒灼（cauterizing）或結紮（ligating）潛在的血液流失血管以控制手術中的失血；手術後應監測動物體重、飲水量和食物攝入量。

4.1.2 術中程序及術後管理

4.1.2.1 術中程序（Intra-operative procedures）

應輕柔處理組織，避免不必要的創傷或乾燥乾裂。只應用適當的器械進行最小程度的解剖。結需紮可能出血的血管，避免污染切創口部位。良好的手術技術可以預防感染、出血甚至死亡等手術後併發症，且應保持適當的手術和術後紀錄。

打開體腔的手術需要兩到三層閉合，其中體壁與皮膚應分開縫合。應使用適合於該動物組織的無菌縫合材料、縫合技術和正確的針頭縫合傷口。沒有鋒利邊緣之錐形針或圓形針，使用於腹膜、腸、腎等軟組織。具有鋒利邊緣的針則使用於緻密、難以穿透的組織（如皮膚）。

通常，可吸收縫線（例如貓腸線、vicry、dexon）使用於軟組織。血管應以可緩慢吸收的（例如 vicryl、dexon、PDS、maxon）或不可吸收的縫合線（例如尼龍線、絲線）結紮。皮膚應使用不可吸收的縫合線（例如乙炔線、聚丙烯線）、外科凝膠或不銹鋼傷口夾和皮釘。使用閉合皮膚傷口的不可吸收縫合材料應在傷口癒合後（7-10 天）或兩週內（以先發生者為準）拆除。

4.1.2.2 術後管理（Post-operative management）

術後應每 10-15 分鐘檢查一次動物，密切監測麻醉恢復情況，準備好提供呼吸支持，並協助翻身直到動物甦醒。可使用加熱水毯、熱水袋或加熱燈（避免灼傷），給予溫熱的無菌等張溶液並保持動物溫暖。動物從麻醉中恢復後，應監測食物和水的攝取量並提供營養支持，給予適當止痛藥並檢查是否有不適或疼痛的跡象。研究者（PI）應按照核定的動物使用計畫書中的描述提供術後照護，術後使用之藥物包括鎮痛藥、抗生素和/或麻醉藥逆轉，該動物使用計畫書應諮詢獸醫人員協商制定。

當完全甦醒的動物返回籠舍時，必須將帶有手術觀察記錄的貼紙貼在籠卡上，貼紙上必須記錄手術日期，以及去除傷口夾、皮釘或皮膚縫合線的日期，直到創口充分癒合，並去除皮膚縫合線或傷口夾。必須在術後監測期間記錄動物每日施用的藥物/物質的全名、給藥劑量、給藥途徑和健康狀況；並根據需要進行鎮痛治療，如果動物未顯示出疼痛的臨床症狀，則必須記錄在案（例如：未觀察到疼痛的臨床症狀，未給予鎮痛藥。），並且必須在動物的外科手術文件中保存所有術後管理紀錄。

對於長時間的非存活手術程序，重要的是注意無菌技術，以確保動物模型的穩定性和成功的結果。術者（外科醫生）應戴手套，器械和周圍區域應維持清潔且無雜物。在計畫核准之前，獸醫和 IACUC 應逐案評估使用無菌技術形式、手術監測和 IACUC 核准的手術室的要求。

（1）.疼痛管理（Pain management）

任何導致人類疼痛的程序都被認為會引起動物疼痛。鎮痛藥應該施用術後一段時間，以確保手術中的疼痛和不適已經消退。大多數關於嚙齒類動物鎮痛的資訊是主觀且是傳聞的，因為缺乏對應於鎮痛劑量的血清藥物濃度的充分資訊。任何藥劑放入水中會由於適口性差而導致飲水攝入量不足，以及水解導致藥劑降解，而有攝入劑量不準確的風險；因此給予嚙齒類動物止痛藥的方法主要經由腸胃外給藥而非口服給藥。

（2）.疼痛的跡象（Signs of pain）

以下是顯示動物可能處於疼痛狀態的跡象：

- 籠中沒有糞便表明厭食症（Anorexia）
- 不喝水導致脫水，可由皮膚隆起（tenting of the skin）來證明
- 蜷縮起來，不願意移動，偏愛肢體或守住創口部位
- 沒有理毛反映在皮毛皺褶或髒汙
- 過度舔/抓，切創口部位發紅和腫脹，以及自殘
- 攻擊性（Aggressive）的行為，特別是在試圖抓取動物時
- 尖叫，掙扎，磨牙，抽搐，顫抖，抽搐，虛弱
- 喘氣，呼吸困難，鼻腔/眼部紅褐色分泌物
- 肢體發冷或泛藍色（體溫過低），四肢發熱或泛紅色（體溫過高）

4.1.3 止痛藥（analgesics）

4.1.3.1 鴉片類藥物（Opioids）

口服鴉片類藥物主要用於人類的慢性低強度疼痛，但由於明顯的首渡代謝（first pass metabolism）導致難以獲得有效的血液和組織藥物濃度，因此對實驗動物的急性、高強度疼痛價值可疑。據報導，嗎啡、羥二氫可待因酮（oxycodone、羥考酮、羥可酮）、配西汀（meperidine、哌替啶）和潘他唑新（pentozocine）在嚙齒類動物中是不適口且無效的，而口服的丁丙諾啡（buprenorphine in jello 丁基原啡因舌下錠）則是有效的。

- 丁丙諾啡（Buprenorhine）是一種有效的部分 μ-促效劑（partial mu-opioid receptor agonist)，具有長作用持續時間（6-8 小時），但具有上限效應（即增加藥物量不會增加超過一定劑量的鎮痛作用）。Buprenorhine 具有明顯的鎮靜作用，大劑量使用後可能會形成異食癖。如果與三溴乙醇（tribromoethanol）組合使用，它可能在 SCID 小鼠中引起過度的術後運動並影響傷口癒合。
  - 芬太尼（Fentanyl）是一種有效的短效鴉片類促效劑，可在手術過程中提供鎮痛作用。除非在手術之前給予，否則無法控制急性術後或嚴重疼痛。它是強烈的呼吸抑制劑，經粘膜給予舒芬太尼（sufentanil）和阿芬太尼（alfentanil）在大鼠中產生深層的鎮痛、鎮靜和呼吸暫停。鞘內注射阿芬太尼（alfentanil）和舒芬太尼（sufentanil）可在嚙齒類動物中提供有效的局部鎮痛作用。
  - Nalbuphine，一種混合鴉片類促效劑/拮抗劑，有效 2-4 小時。它還具有上限效應（天花板效應 ceiling effect），它可逆轉芬太尼（μ 受體），同時通過 κ 受體維持一些鎮痛作用。
  - 嗎啡和羥嗎啡酮（oxymorphone）可提供 2-3 小時的極佳鎮痛效果，可以使用 Duromorph 緩慢釋放。可待因（Codeine）和二氫可待因（dihydrocodeine）分別具有低等效力和中等效力，可提供與對乙醯氨基酚 paracetamol 的組合，可抑制咳嗽。哌替啶（Meperidine）（哌替啶 pethidine、杜冷丁、dolantin、eudolat、isonipecaine、demerol）是平滑肌的解痙藥（spasmolytic），有口服或注射劑型，因會引起深刻的組織胺釋放，不可靜脈注射給藥。

- 酒石酸布托啡諾（Butorphanol tartrate（stadol，torbugesic，torbutrol））是一種混合促效劑/拮抗劑，是一種明顯的 μ 拮抗劑，它可以逆轉芬太尼 fentanyl，同時通過 κ 受體維持一些鎮痛作用。它提供 2-4 小時的中度鎮痛。潘他唑新（Pentazocine）對嗎啡的鎮靜作用較小，可提供口服或注射製劑。
- 納洛酮（Naloxone）是一種鴉片類拮抗劑。它逆轉了促效劑和促效劑/拮抗劑的作用。它的作用時間短，沒有鎮痛作用。

4.1.3.2 非類固醇抗發炎藥 Non-steroidal anti-inflammatory Drug（NSAID）

- 酮洛芬（Ketoprofen）在多種物種中產生副作用的可能性最小，它以錠劑和注射劑形式（Actron，Ketofen，Orudis）提供，相關藥物包括布洛芬（Ibuprofen）、卡洛芬（Carprofen）、非諾洛芬（Fenoprofen）和萘普生（Naproxen），均具有鎮痛，解熱和抗炎作用。布洛芬（Ibuprofen（Advil、Nuprin、Motrim））在多種物種中對炎症起源的疼痛有效，但沒有研究評估其在嚙齒類動物中的功效或毒性；有口服型式可供選擇。Caprofen（Rimadyl）是一種良好的大鼠鎮痛藥，有口服和注射形式，具有抗發炎、解熱和鎮痛作用，適用於骨關節炎。
- 阿斯匹林（Aspirin）僅能緩解輕度至中度而非深層內臟疼痛，可提供注射形式，可能會導致胃腸道出血。
- 對乙醯氨基酚（Acetaminophen）在大鼠中是不適口的，並且沒有顯示出可檢測的鎮痛效力，效果類似阿斯匹林，但不具有抗發炎作用、胃腸道刺激較少、超劑量會導致肝毒性。它有錠劑、膠囊、栓劑、咀嚼片、膏狀、酏劑和溶液等多種形式，可與其他藥物聯合使用。
- 吲哚美辛（Indomethacin）具有解熱、鎮痛和抗炎作用，但毒性限制了其使用，可以作為錠劑使用。相關化合物是舒林酸（Sulindac），雙氯芬酸（Diclofenac），托美汀（Tolmetin）和酮咯酸（Ketorolac）。酮咯酸（Ketorolac） 的作用類似於阿斯匹林，但不會不可逆地干擾血小板功能，且其不良的胃腸作用可能更高，此藥有口服和注射劑型。
- 氟尼辛葡甲胺（Flunixin meglumine）對嚙齒類動物的鎮痛效果極小。使用類固醇時，胃腸道和腎臟毒性風險增加。皮下給藥會引起明顯的刺激，

每 12 小時投藥一次。

4.1.4 麻醉（Anesthesia）

麻醉是使動物全身或部分軀體喪失感受性的作用，良好的麻醉應當給予動物足夠的鎮痛效果。在正常的全身麻醉時，動物肌肉完全鬆弛，並且失去意識及麻醉時的記憶。

麻醉所需的劑量會受許多因素影響，例如體格、年齡、健康狀態、肥胖程度、術前禁食、環境溫度等。一般來說，體型小的物種能更快地代謝和排泄藥劑，因此，與體型較大的物種相比，他們往往需要使用較高劑量來誘導及維持麻醉。另一方面，患病、幼齡及老年動物，代謝麻醉劑的速度可能較慢，因此通常需要給予較低劑量。肥胖動物代謝率較低，代謝麻醉劑的速度也較慢，然而麻醉劑會累積在脂肪中，造成麻醉所需的總劑量增加，同時也拉長了麻醉的恢復期。麻醉前如有進食，會增加代謝率，導致需要較高麻醉劑量，同時也會增加嘔吐和併發症的風險。至於環境溫度，高溫會促進代謝，低溫會降低代謝，因此影響了所需的劑量。除上述之外，其他影響麻醉劑量的因素尚包括物種、品系、性別、生物節律、懷孕、哺乳和其他藥物的同時使用等。

4.1.4.1 麻醉階段 Stages of anesthesia

在全身麻醉誘導期間，動物各個麻醉階段如下：

- 第 1 階段 - 興奮，方向定向障礙（disorientation），發聲，排尿，排便。
- 第 2 階段 - 有或沒有掙扎的意識喪失，失去正常的反射，快速的不規則呼吸和僵硬。
- 第 3 階段 - 麻醉手術階段，反射消失，肌肉鬆弛，深而有節奏的呼吸，。
- 第 4 階段 - 伴有呼吸停止，低血壓和即將死亡的髓質麻痺。必須給予心肺復甦和逆轉麻醉的藥物，否則動物就會死亡。

（1）. 麻醉的跡象

足夠的全身麻醉伴隨著失去有目的運動所反映的肌肉張力喪失，然而，即使在深度外科手術麻醉中，倉鼠和沙鼠也可能保持“游泳”或無目的運動。有反射損失，例如角膜，耳廓和腳蹬。對厭惡刺激應該沒有反應，例如捏尾巴，用鑷子捏腹部皮膚和缺乏發聲。隨著從輕度到中度麻醉的進展，鬍鬚的抽搐消失。呼吸的深度和頻率以及心血管參數都會有變化。

（2）. 監測麻醉深度

A. 評估小鼠的腳趾反射。

B. 評估運動，刺激感知和反射 -[角膜，腳趾，尾巴或耳朵]。

C. 觀察胸壁運動。

D. 脈搏，心率，直接或間接血壓（袖帶或都普勒）。

E. 口鼻、腳、耳朵、舌頭上的粘液膜顏色。

F. 溫度。

G. 輔助設備，例如脈搏血氧儀，潮氣末二氧化碳（二氧化碳測定法）。

4.1.4.2 麻醉方法（Methods of anesthesia）

大多數針對嚙齒動物麻醉和鎮痛的方案都是基於臨床經驗和歷史經驗用法。對麻醉劑的反應可能存在顯著的差異，必須將其考慮在內。由於體積小，麻醉風險大和手術技巧要求，小鼠的手術時間往往很短。

（1）. 低溫（Hypothermia）

低溫是新生嚙齒動物幼仔的一種適當的麻醉和鎮痛形式，通常長達 5 天。低溫在臨床上用於人類神經外科和心內直視手術。進行冷水游泳的大鼠在從低溫中移除後表現出類似於嗎啡 10 mg / kg SC 的鎮痛效力直至 30 分鐘。

將新生仔鼠放在手套中放在碎冰上或用碎冰包裝的紙襯管中誘導低溫，直到仔鼠不再腳趾緊縮。幼仔不應直接接觸冷表面以避免凍傷。然而，恢復可以很快，避免積極的複溫（加熱墊或加熱燈，因為它可能導致組織損傷），可將幼仔置於 33℃的培養箱中 20-30 分鐘。

新生嚙齒動物是特別好的主體，因為是變溫的（poikilothermic）。它們體積小，體重小，可使表面冷卻實現快速核心冷卻；它們對大腦血液供應的阻力更強，並且耐受 1 ℃的長時間低溫而沒有已知的負面影響。風險包括心室顫動（ventricular fibrillation），組織缺氧和變暖時的代謝性酸中毒。

（2）. 吸入性麻醉劑（Inhalant anesthetics） 麻醉腔室（anesthetic chamber）

吸入性麻醉劑可提高操作員對麻醉深度和持續時間的控制，從而提高存活率。始終使用需要最少代謝、生物轉化或排泄的藥劑，以減少研究結果的變異性。吸入性麻醉劑通常需要專門的設備，例如精密揮發器、喉鏡、氣管內導管、面罩、清除劑、麻醉腔室和氧氣。麻醉劑廢氣會對人員產生不利影響，因此應使用清除

系統。天竺鼠盲腸可作為麻醉氣體的儲存處。

A. 氟烷（Halothane）（Fluothane）

氟烷（Halothane）是一種有效、不易燃和無刺激性麻醉劑。氟烷非常易揮發，可快速誘導和恢復，使用氟烷需要特定用於氟烷的精確揮發器。氟烷不易溶於組織，高達 20％的肝臟代謝。氟烷具有肝毒性，天竺鼠是急性氟烷誘導肝毒性的模型。儘管有這個缺點，氟烷仍然是天竺鼠中非常有用的麻醉劑。氟烷還干擾小鼠中干擾素刺激的自然殺手細胞活性。它在大鼠腦缺血模型中具有神經保護作用。

B. 異氟烷（isoflurane）（Forane）

異氟烷（isoflurane）非常易揮發，可快速誘導和恢復，需要特定用於異氟烷精密揮發器來安全使用。吸入少於 0.25％的異氟烷可被肝臟代謝，它可產生最小的心血管和呼吸抑制。對異氟烷的反應存在應變差異：高血壓大鼠（SHR，WKY）比正常血壓（SD）大鼠更敏感。在使用異氟醚後，小鼠和人存在短暫的術後免疫抑制。天竺鼠比其他嚙齒動物對異氟烷更敏感。

在沒有揮發器的情況下，應使用以下稀釋液用於氟烷或異氟烷，以避免過度麻醉和殺死動物。

- 每升容量 0.05 毫升等於 1％
- 每升容量 0.10 毫升等於 2％
- 每升容量 0.15 毫升等於 3％
- 每升容量 0.20 毫升等於 4％

C. 乙醚（Ether）

乙醚對呼吸道非常刺激，具有爆炸性。在接觸乙醚之前，一定要服用阿托品（Atropine）。在約翰霍普金斯大學要求任何設施中使用乙醚均需由生物安全辦公室管理，在經批准的防爆通風櫥中，可以使用乙醚。乙醚誘導需要 5-10 分鐘，對乙醚的敏感性存在應變差異：C3H> BALB / c> DBA / 2> ICR> C57B16。乙醚不會改變血液學值（例如填充細胞體積、紅細胞或白細胞計數或差異），但會增加肝微粒體酶，抑制下丘腦活動並改變血糖。它可引起肝臟壞死、過度流涎和呼吸道刺激。醚類是沙鼠中令人滿意的麻醉劑，但預計會出現緊急情況和死亡。它對天竺鼠不安全。

- 產生麻醉的乙醚的有效濃度為 1.9％。該濃度可以用每升體積容器 0.08

ml 產生。

- 乙醚和用於容納它的任何設備應存放在通風的 NFPA704 等級防火材料櫃中。
- 應按所需的最小體積訂購乙醚。
- 容器應在收到時註明日期，並在打開時再次註明日期。
- 乙醚應僅在功能正常的化學通風櫥或生物安全櫃中使用。在推薦濃度下，乙醚可以安全地於生物安全櫃使用。
- 開封後六個月的乙醚需清除處理掉。

D. 笑氣（Nitrous oxide）

一氧化二氮（Nitrous oxide）提供不完全麻醉，必須與其他藥劑聯合使用。使用這種藥劑會對人類健康造成危害。一氧化二氮已用於在大鼠和沙鼠中產生中風模型。

E. 二氧化碳（Carbon dioxide）

二氧化碳鎮靜可用於採集血液。二氧化碳容易獲得，價格低廉，可快速恢復並且對人員安全。誘導時間長，中度壓力後頻繁發生嚴重且可能致命的不良反應。

（3）. 非再呼吸系統（non-rebreathing system）

在非再呼吸系統中，呼出的麻醉劑混合物釋放到大氣中，而在再呼吸系統中，通過鹼石灰（soda lime）除去二氧化碳，並且剩餘的混合物加氧氣再循環，以減少麻醉劑和氧氣的使用。由於死區（dead space）效益，在嚙齒動物中再吸入系統是不實用的。為維持動物能有效被麻醉，故所使用之精密蒸發器（Precision vaporizers）應每年進行維修和校準。

（4）. 開放式滴注方法（open drop method）

開放式滴注方法不需要專門的設備，但是不能控制麻醉深度。當使用開放式滴注方法時，避免藥劑與動物和人的皮膚直接接觸是非常重要的。

（5）. 注射性麻醉劑（Injectable anesthetics）

當使用注射性麻醉劑於嚙齒動物時，因為所需藥物量少，重要的是稀釋藥物以便於施用正確的劑量。

藥物可以通過腹膜內、靜脈內或肌肉內給藥，給小鼠注射麻醉劑刺激性藥物應在多個部位給予小劑量。藥物可用推注、間歇或連續給藥，給藥方法將影響體

循環的吸收速率。

用吸入麻醉劑補充麻醉通常更安全、更有效和更方便，而不是用注射劑重新給藥。

A. 巴比妥類藥物（Barbiturates）

巴比妥鹽注射液的作用受應變、體重、年齡、營養狀況、性別、墊料類型、其他藥物的存在和晝夜節律的影響

- 戊巴比妥（Pentobarbital（Nembutal））起效快、無刺激性、易於腹腔注射，但鎮痛作用較差。至手術麻醉期所需的劑量伴隨著較差的鎮痛、血壓和心率的進行性下降、呼吸抑制、酸中毒、高碳酸血症和缺氧。麻醉通常持續 30-60 分鐘。食物匱乏時會增強麻醉、減少發作潛伏期和延長麻醉時間;在注射後 1 小時內進食的大鼠則難以到達手術麻醉期。不同品種小鼠對戊巴比妥的反應存在顯著的應變差異：DBA > C57BL/6 > CBA > BALB/c > NZW，而雄鼠比雌鼠對戊巴比妥更敏感。動物對戊巴比妥在應變中的差異有年齡、性別、劑量、產仔數、禁食、溫度和墊料種類等。
- 硫噴妥鈉（Thiopental（Pentothal））產生劑量依賴性低溫、高碳酸血症、酸中毒、缺氧和通氣不足。麻醉通常持續 10-20 分鐘，變化很大。在天竺鼠和倉鼠中使用這種藥物時，應給予阿托品，以減少唾液和支氣管分泌物。另一巴比妥類藥物 Methohexital（Brevital）作用持續時間短，恢復快，於大鼠使用 40 mg / kg 劑量 15-20 分鐘，可深度克制但鎮痛不足。

B. 解離劑（Dissociative agents）

解離劑會破壞大腦的輸入，因此不會感知到刺激，而動物肌肉張力隨著眼，咽和喉反射的增加而增加，但這些藥物提供的鎮痛效果非常小。肌肉注射時解離劑時，因此藥物為強酸性，故具刺激性，因此需深層肌肉注射或靜脈注射，且它們會增加動物唾液分泌物。

- 氯胺酮（愷他命，Ketamine（Ketaset））用於多種物種的保定和操作，並且相對安全。它可以產生鎮靜、呼吸抑制、長期恢復、鎮痛不良和肌肉鬆弛，並且通常會增加肌張力。單獨的氯胺酮不會產生手術麻醉狀態，需合併給安定鎮靜劑（乙酰丙嗪 acepromazine）或鎮靜劑（sedative）（甲苯噻嗪 xylazine）可使肌肉鬆弛，給予抗膽鹼能藥（anticholinergics）（阿

托品，格隆溴銨 glycopyrrolate）可減少流涎。

- 氯胺酮（Ketamine）和甲苯噻嗪（xylazine）（a2-促效劑）組合對於短至中等持續時間的程序是安全可靠的，但可能導致低血壓、呼吸抑制和體溫過低。該組合可以預先混合稀釋成混合物。它可以使用育亨賓（yohimbine），tolazoline 或 atipamazole（a2-拮抗劑）逆轉。較低的劑量會使小鼠產生聽覺障礙，這種組合在天竺鼠中導致不一致和不可靠的麻醉深度。補充局部利多卡因（Lidocaine）浸潤為懷孕的倉鼠提供安全可靠的麻醉。氯胺酮（Ketamine）和甲苯噻嗪（xylazine）混合物產生鎮靜和不動，但在沙鼠中很少會產生手術麻醉之經常“游泳”或“動脈炎”運動。
- 氯胺酮（Ketamine）和美托咪定（medetomidine）（a2-促效劑）在小鼠中可提供快速保定以利進行操作。雌鼠對此藥物比雄鼠更敏感。Atipamazole 用於逆轉美托咪定 medetomidine。
- 氯胺酮（Ketamine）和乙酰丙嗪（acetylpromazine c）組合可能無法達到手術麻醉期（三節）。
- Tiletamine 和 zolazepam（舒泰 Zoletil，Telazol）含有游離谷氨酰胺（tiletamine）和苯二氮卓（benzodiazepine）鎮靜劑佐拉西泮 zolazepam，可能無法在小鼠、天竺鼠和倉鼠中產生足夠的麻醉效果。此類藥物具有腎毒性，麻醉效果持續時間通常為 30-60 分鐘。在大鼠中仍有角膜、腳蹬和吞嚥反射。Telazol 在天竺鼠中產生鎮靜作用，但鎮痛作用較差，但其長時間的效果有利於保定。此藥在倉鼠中會產生不動、鎮痛不良和輕微的呼吸窘迫。Telazol 可與甲苯噻嗪 xylazine 合用，以達到放鬆、鎮痛效果和降低腎毒性。

C. 神經安定止痛劑（Neuroleptanalgesics）

神經安定止痛劑（Neuroleptanalgesics）由鴉片類促效劑或混合促效劑/拮抗劑與鎮靜劑的組合組成，可導致呼吸抑制、肌肉鬆弛、肌肉萎縮和心動過緩。納洛酮（Naloxone）或納布啡（nalbuphine）（μ-拮抗劑）可用於逆轉神經鎮痛藥的作用。加入苯二氮卓類（benzodiazepine）藥物例如咪達唑侖（midazolam）或地西泮（diazepam）可使神經鎮痛藥的劑量減少 50-70％並產生良好的骨骼肌鬆弛。

- 芬太尼（Fentanyl）和氟尼松（Fluanisone（Hyponorm））作為大鼠短時間麻醉劑，可止痛並可提供一些肌肉僵硬鎮靜作用。向咪莨菪鹼（hyponorm）中加入咪達唑侖（midazolam）可產生可靠且持久的麻醉劑，具有良好的肌肉鬆弛和鎮痛作用。此兩藥物預混合稀釋後具有 2 個月的藥物保存期限（shelf life）。
- Hyponorm 加地西泮（diazepam）可提供出色的麻醉和鎮痛效果，但恢復時間長達 12 小時。在施用於倉鼠、沙鼠和小鼠之前，應將 Hyponorm 稀釋 10 倍。腹膜內低劑量給予會引起小鼠抽搐、划槳和廣泛的聽覺過敏。
- 三溴乙醇（Tribromoethanol（Avertin））廣泛用於產製轉基因小鼠的操作程序，為短效型麻醉劑，屬於非藥品等級的化學藥物，必須仔細準備和避光儲存在 4ºC 以避免溶液變質。如果儲備溶液改變顏色則應丟棄，當暴露在光線下或儲存不當時，它會分解為二溴乙醛（dibromoacetaldehyde）和氫溴酸（hydrobromic acid），這是胃腸道刺激物，會導致纖維蛋白性腹膜炎、腸阻塞和死亡，故總是存在與其使用相關的化學性腹膜炎的風險;而重複使用後死亡率上升。在小鼠腹膜內注射 250　mg / kg，可產生快速誘導（induction）和恢復，良好的肌肉鬆弛；高劑量時會發生心血管和呼吸抑制。

（6）. 局部麻醉劑（Local anesthetic agents）

局部麻醉劑通過阻斷神經衝動（感覺和運動）的傳導來提供麻醉，其對運動神經元的影響促使肌肉鬆弛。大劑量時有毒性，若意外靜脈注射後，會產生神經毒性和心血管衰竭。沿著脊髓注射，它可以阻擋控制呼吸的肌肉，導致呼吸停止，並且可以影響導致血管張力的肌肉，導致低血壓。

- 安麻樂乳膏（EMLA cream）需要 30-45 分鐘才能有效，它對靜脈穿刺很有用。利多卡因（Lidocaine）和布比卡因（bupivacaine）有或沒有同時使用血管收縮劑（例如腎上腺素）時，會使神經阻滯，例如在開胸手術和整形外科手術後以及眼科手術中。

4.1.5 參考文獻

1. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Kohn DF, Wixson SK, White WJ, Benson GJ （eds.） Academic Press. San Diego. 1997

2. Laboratory animal anesthesia. Flecknell PF. Academic Press. London. 1996.
3. Formulary for laboratory animals. Hawk CT, Leary SL. Iowa State University Press, Ames. 1999.
4. Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia. Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ（eds.）. Williams & Wilkins, Baltimore. 1996.
5. Experimental and surgical techniques in the rat. 2nd edition. Waynworth HB, Flecknell PA. Academic Press, London. 1994.

第二節 常用手術技術概述：嚙齒類動物

本章課程安排時數：4 小時

本章學習目標：

1. 學習嚙齒類動物常用的手術技術，如動脈和靜脈導管插入術、膽管結紮與插管操作、肝部分切除、肝急性缺血及肝臟活體組織採樣、5/6 腎切除手術、卵巢切除術、氣管切開術與氣管插管術、腦部手術及立體定位注射、腸道埋管與給藥、睪丸切除術。
2. 手術技術的應用範圍與注意事項。

4.2.1 動脈和靜脈導管插入術

4.2.1.1 簡介

（1）. 大鼠的動脈和靜脈導管插入術長期以來被廣泛用於實驗研究中，導管可用於監測血流動力學參數，包括收縮壓、舒張壓、平均動脈壓（MAP）、心率（HR）和中心靜脈壓（CVP）。此外，這些導管使標準的臨床支持治療或潛在療法的輸液以及血液採樣更為便利，有助於進一步分析疾病或治療的潛在機轉。因此，在小動物模型中進行血管通路對於測量臨床表現和研究治療效果至關重要。

（2）. 研究疾病臨床模型的治療方法需要能夠準確地進行血液動力學監測，因此需要血管通路。在敗血症模型中，動脈導管插入術提供全身壓力監測，靜脈導管插入術有助於進行標準臨床治療。敗血症的標準療法包括輸注抗生素以治療細菌感染和輸注液體和血管加壓劑以將動脈壓維持在所需範圍內。兩個導管都可用於血液採樣。

（3）. 在 http://www.jove.com/video/51881 視頻中，詳細介紹了在麻醉大鼠中植入頸動脈和頸總靜脈導管的手術技術。

（4）. 在 72 小時的恢復期後，可將動物再次麻醉並連接繫繩和旋轉裝置，以利將植入的導管連接到血液動力學監測系統。該系統可設定輸液速率、輸注固定體積的流體，或者根據檢測到的平均動脈壓調整輸注速率以維持固定壓力範圍的自動系統。繫繩和旋轉裝置可在研究期間允許大鼠自由移動，同時監測壓力，輸注流體和血管加壓劑，並且在不必固定清醒動物的情況

下進行血液採樣。

（5）.在導管插入術後可能有些併發症，包括動脈和靜脈導管的部分閉塞，頸靜脈導管置入小分支，恢復後原因不明的猝死等。一旦達到手術熟練程度，每個程序應該能夠在不超過 15 分鐘內完成，動物健康恢復的成功率將超過 90%。一旦掌握此項技術，動脈和靜脈導管可以為各種需要血液動力學監測、血液採樣和輸液或治療的嚙齒類動物模型提供研究基礎，同時最大限度地減少儀器或處理過程中對動物造成的疼痛和痛苦。

4.2.1.2 小鼠頸靜脈插管步驟

（1）. 用#10 或#11 刀片，於肩胛部切一小切口，使導管能由頸部腹側皮下穿至肩胛側固定。將切口用紗布覆蓋，將老鼠翻轉至腹側面。

（2）. 用#10 或#11 刀片，於頸部腹正中線切創 0.5-1 cm，將皮下結締組織鈍剝，使右頸靜脈露出。

（3）. 用 4-0 or 5-0 的絲線打一個較鬆的結於分離出頸靜脈的尾端。

（4）. 第二個結位於頸靜脈的前端，將血管永久性結紮。

（5）. 於頸靜脈兩結之間刺一切口，導管由此切口插入頸靜脈，至第一個 bead 為止，使其前端直至右心房口

（6）. 將先前較鬆的結順著靜脈管繫緊，目的為了固定導管，防止血液回流出。

（7）. 將導管從頸部腹側面穿至肩胛部。

（8）. 將頸部腹側面切口以 wound clip 密合。

（9）. 導管上第二個 bead 固定在肩胛。

（10）.導管使用含生理食鹽水的針筒和鈍的針頭測試，一旦導管測試正常即用 lock solution 及金屬拴子塞住。

（11）.用鈍剝方式在皮下做一個口袋將多餘的管子置於口袋內。

（12）.將皮膚以 wound clip 密合，並確保金屬拴子也被固定住。

（13）.若使用 blended 導管時，省略步驟（12）和（13），一個 wound clip 將導管和切口一起固定。

4.2.1.3 大鼠頸靜脈插管步驟

（1）. 用#10 或#11 刀片，於肩胛部切一小切口，使導管能由頸部腹側皮下穿至肩胛側固定。將切口用紗布覆蓋，將老鼠翻轉至腹側面。

（2）. 用#10 或#11 刀片，於頸部腹正中線切創 1.5 cm，將 osmohyoid 肌肉鈍剝，使左頸靜脈露出。

（3）. 頸靜脈一部分靠近甲狀腺，可用一對鑷子鈍剝。

（4）. 用 4-0 or 5-0 的絲線打一個較鬆的結於分離出頸靜脈的尾端。

（5）. 第二個結位於頸靜脈的前端，將血管永久性結紮。

（6）. 於頸靜脈兩結之間刺一切口，導管由此切口插入頸靜脈，至第一個 bead 為止，使其前端直至上腔靜脈。

（7）. 將先前較鬆的結順著靜脈管繫緊，目的為了固定導管，防止血液回流出。

（8）. 將導管從頸部腹側面穿至肩胛部。

（9）. 將頸部腹側面切口以 wound clip 密合。

（10）. 導管上第二個 bead 固定在肩胛。

（11）. 導管使用含生理食鹽水的針筒和鈍的針頭測試，一旦導管測試正常即用 lock solution 及金屬拴子塞住。

（12）. 用鈍剝方式在皮下做一個口袋將多餘的管子置於口袋內。

（13）. 將皮膚以 wound clip 密合，並確保金屬拴子也被固定住。

（14）. 若使用 blended 導管時，省略步驟（12）和（13），一個 wound clip 將導管和切口一起固定。

4.2.1.4 大鼠股靜脈插管步驟

（1）. 用#10 或#11 刀片，於肩胛部切一小切口，使導管能由頸部腹側皮下穿至肩胛側固定。將切口用紗布覆蓋，將老鼠翻轉至腹側面。

（2）. 用#10 或#11 刀片，於鼠蹊部上方切創 1.5 cm，將皮下組織鈍剝，使左股靜脈露出。

（3）. 股靜脈一部分靠近股神經，可用一對鑷子鈍剝。

（4）. 用 4-0 or 5-0 的絲線打一個較鬆的結於分離出股靜脈的尾端。

（5）. 第二個節位於股靜脈的前端，將血管永久性結紮。

（6）. 於股靜脈兩結之間刺一切口，導管由此切口插入股靜脈，至第一個 bead 為止，使其前端直至下腔靜脈。

（7）. 將先前較鬆的結順著靜脈管繫緊，目的為了固定導管，防止血液回流出。

（8）. 將導管從頸部腹側面穿至肩胛部。

（9）. 將頸部腹側面切口以 wound clip 密合。

（10）. 導管上第二個 bead 固定在肩胛。

（11）. 導管使用含生理食鹽水的針筒和鈍的針頭測試，一旦導管測試正常即用 lock solution 及金屬拴子塞住。

（12）. 用鈍剝方式在皮下做一個口袋將多餘的管子置於口袋內。

（13）. 將皮膚以 wound clip 密合，並確保金屬拴子也被固定住。

（14）. 若使用 blended 導管時，省略步驟（12）和（13），一個 wound clip 將導管和切口一起固定。

4.2.1.5 參考文獻

1. Femoral arterial and venous catheterization for blood sampling, drug administration and conscious blood pressure and heart rate measurements. J. Vis Exp. 2012 Jan 24;（59）. pii: 3496. doi: 10.3791/3496
2. Catheterization of the carotid artery and jugular vein to perform hemodynamic measures, Infusions and blood sampling in a conscious rat model. J. Vis. Exp.（95）, e51881, doi:10.3791/51881 （2015）.
3. Laboratory Animal Medicine, 3rd Edition, 2015, Elsevier, ISBN:978-0-12-409527-4.
4. Jugular vein catheterization for repeated blood sampling in the unrestrained conscious rat. Brain Research Protocols 10 （2002） 84–94.

4.2.2 膽管結紮與插管操作（Bile Duct Manipulations）

有數種膽管操作方式可滿足不同的研究需求，例如將總膽管結紮可造成阻塞性黃疸，若不緊密結紮僅造成部分阻塞，則可模擬膽管狹窄、膽石病（cholelithiasis）、膽囊腫瘤或外源性壓迫膽管造成的疾病模式，也可以藉由在總膽管與靜脈回流之間插入導管，達到在無完全阻塞的病理效應下研究膽汁再循環等相關議題。

4.2.2.1 膽管結紮（ligation of the common bile duct）

阻塞性黃疸（obstructive jaundice）乃指排泄膽汁的膽道系統因機械性的阻塞，致使膽汁無法順暢排到腸道所引起的黃疸。因此可利用膽管結紮，引起阻塞部位以上膽管擴張、膽汁淤積、膽管內壓力增高，並可引發肝內膽小管擴張破裂，導致肝細胞缺血和壞死，最終發展成為膽汁性肝纖維化和肝硬化，來進行與肝外膽汁淤積引起的細胞凋亡和纖維化等黃疸或肝損傷的相關研究。

（1）. 成年大鼠，麻醉後於臍上腹中線切開，距肝門 1cm 處以 7-0 號絲線結紮膽總管，可使膽管完全阻塞，膽汁排泄受阻，淤積於膽內。手術後須觀察動物活力與各項表徵，術後 1-2 天，模型動物肝組織即開始逐漸出現散發性萎縮、變性、壞死和炎症細胞浸潤；1-2 週時，小膽管樣上皮細胞進一步增殖，逐漸從小葉周邊沿肝細胞索向小葉內發展延伸；3 週後，小膽管樣上皮細胞明顯分化、演變，其中多數似分化成小膽管；8-12 週時，呈典型的膠原纖維增生和肝細胞結節。

（2）. 本模型能模擬人因長期膽汁淤積引起的肝纖維化和肝硬化疾病的過程和結果，且方法簡單，週期適中，再現性及成功率高。目前，除大鼠外，兔、犬和猴等動物以總膽管結紮法誘發的膽汁性肝硬化模型均已被廣泛的應用。

4.2.2.2 膽管導管（bile duct cannulation，BDC）

常應用於大鼠進行新農藥和藥物的藥物動力學之吸收、分佈、代謝和排泄分析。膽管導管裝妥後，即可在給予藥物或化學品後，於無需麻醉的狀況下，定期從大鼠收集膽汁分析，以確定藥物或化學物質的代謝狀況，也可用於從膽管取樣或給藥的基礎生理學研究。

（1）. 大小鼠術前至少禁食 4 小時，將導管的一端插入膽管，而另一端插入十二指腸。導管在皮下環繞在肩胛區域的背部和外部。縫線則應用於肩胛骨出口部位以固定導管地點，另外一根縫合線位於中間位置肩胛骨切口將導管固定在皮膚上。也可以選用 T 型或 Y 型連結器，來滿足不同的動物及研究需求。

（2）. 在手術植入導管後，通常需將動物單獨飼養，避免同籠動物啃咬或拉扯導管。若導管堵塞導致膽汁收集不足，則可能需要重複實驗或增加動物使用量，因此為達動物減量之目的，可參考 NC3R 的研究（Burden N, Kendrick J, Knight L et al.（2017）. Maximizing the success of bile duct cannulation studies in rats: recommendations for best practice. Laboratory Animals, 51（5）: 457–464. doi:10.1177/0023677217698001）以提高成功率。

（3）. 在狗、豬或非人靈長類，也可以在超音波引導下，經由膽囊穿刺來吸取膽汁。

（4）. 在狗或豬，可以利用經內視鏡逆行性膽胰管攝影術（endoscopic retrograde cholangio-pancreatography，ERCP） 來放置 11 mm 的十二指腸鏡，以收集膽汁或評估膽管或胰管系統，還可以經此方法從事許多不同的介入治療。

4.2.2.3 參考文獻

1. Maximizing the success of bile duct cannulation studies in rats: recommendations for best practice, Laboratory Animals 2017, Vol.51（5） 457–464, DOI: 10.1177/0023677217698001
2. 人类疾病动物模型复制方法学，上海科学技术文献出版社，2008 年 1 月 1 日初版， ASIN: B0011Y2Z70， 作者：周光興
3. 人类疾病动物模型，ISBN：978-7-117-18828-9，劉恩岐主編
4. Laboratory Animal Medicine, 3rd Edition, 2015, Elsevier, ISBN: 978-0-12-409527-4.

4.2.3 肝部分切除（Partial Hepatectomy）、肝急性缺血及肝臟活體組織檢查（Liver Biopsy）

4.2.3.1 簡介

部分肝切除通常是為了取得足夠的肝組織進行研究，或是為了移除足夠的組織以引起伴隨某些基因活化的肝臟再生，也可以運用於誘發肝衰竭的動物模型。

4.2.3.2 技術說明

（1）.若只須少量的肝臟組織進行分析，最直接的方式是經由皮膚穿刺的採樣。應依據動物的體型大小，選用適當的採樣針。

（2）.若須較大量的肝臟組織，可能就需要開腹手術以利採樣。全葉移除是相對較快且出血量較少的方式；有效的止血則是開腹肝臟活體組織採樣時最重要的程序。

（3）.急性肝衰竭是由多種因素導致的瀰漫性肝細胞壞死和/或突發的肝功能嚴重損害的綜合症狀，致死率可高達 75％以上。 其病因主要由肝炎病毒引起，也可由一次性或反覆的外傷、過量的藥物或毒物所致。目前，急性肝衰竭動物模式主要有外科手術和藥物毒物肝損傷兩大類，其中，全肝或部分肝切除是最經典也是較常用的造模方法，而急性肝缺血模式則是目前比較理想的誘發方法。

（4）.全肝切除無疑可導致肝衰竭，但其表現的特徵與臨床急性肝衰竭的病理過程相差甚遠，如病程的不可逆，肝昏迷時間短，循環中不存在損傷或死亡的肝細胞和由此不斷釋放的毒性物質，肝功能的異常僅在模型動物死亡前 2-4 小時才會有所表現。 鑑於這些差異，學者研究並建立了部分肝切除的急性肝衰竭動物模式取而代之。 在正常情況下，當肝臟功能正常時，動物可以耐受 70％-75％以下的肝切除，若肝切除超過 75％將會發生致命性肝衰竭，當肝臟切除超過 85％以上時需加做門腔靜脈分流，而且動物近乎 100％在 48 小時內死亡。

（5）.部分肝切除相對全肝切除動物，其生理病理特徵更接近於臨床，且有逆轉的可能。如對於 90％肝切除大鼠，術前連續 3 天給予肝細胞脾內移植，40％模型的存活期可超過 28 天。切除 85-95%肝組織的大鼠，若術後不能甦醒翻身站起或 12 小時內死亡者，則判定為手術失敗。至今，學者已成功

建立了多種部分肝切除模式動物，如大鼠、兔、犬和豬。其中，小動物模式比較適用於研究急性肝衰竭的病理生理過程及藥物干擾對該過程的影響，而大動物模式較常用於評估人工肝技術的療效和安全性。

（6）.肝大部分切除導致肝衰竭動物模式具有其獨特的優點，包括複製週期短，肝臟切除可量化，剩餘肝組織無特異性病理改變，動物症狀及相關血液指標變化符合肝衰竭臨床表現，重複性和穩定性較好，成功率高。

（7）.急性肝缺血模式也可以誘發急性肝衰竭，其手術步驟包括門腔靜脈吻合及供肝動脈結紮兩道程序。其中，供肝動脈結紮又包括徹底結紮和暫時鉗夾兩種方式。前者指對門靜脈和肝動脈行徹底鉗夾或結紮阻斷術，為完全性血液阻斷模式；該模式動物死亡時間短，有類似肝臟切除模式的特點，屬不可逆型，故僅適用於體外生物人工肝支持系統的短期評估，或用於研究與急性肝衰竭有關的顱內壓和腦水腫的變化。後者在行門腔靜脈吻合術後，大鼠可直接用血管夾暫時性地夾閉肝動脈，實驗犬或豬可在門腔靜脈吻合 24 小時後行二次手術，暫時性地夾閉肝動脈 4-6 小時；待急性肝缺血導致肝功能出現衰竭後再鬆解，恢復肝臟的血液供應，屬暫時性肝缺血模型。由於吻合術與肝動脈結紮的間隔時間決定了側支循環出現的多寡，而後者與動物急性肝衰竭發生的程度及死亡的時間具有明顯的相關性，所以，吻合術與肝動脈結紮的時間間隔是該模型製備的關鍵。因這種模型具有潛在可逆性，故適合較長時間的生物人工肝支持實驗與觀察，是目前最為理想的動物模型。

4.2.3.3 參考文獻

1. 人类疾病动物模型复制方法学，上海科学技术文献出版社，2008 年 1 月 1 日初版， ASIN: B0011Y2Z70， 作者：周光興
2. 人类疾病动物模型，ISBN：978-7-117-18828-9，劉恩岐主編
3. Laboratory Animal Medicine, 3rd Edition, 2015, Elsevier, ISBN:978-0-12-409527-4.

4.2.4 5/6 腎切除手術

4.2.4.1 手術目的

慢性腎衰竭（chronic renal failure，CRF）的病患除了會發生腎功能低下、貧血以及高血壓之外，也是心血管疾病的高風險因子。隨著病程進展，最終可導致尿毒性心肌病及死亡。由於腎臟血流受阻，左心室承受高壓，逐步產生心肌肥大、心室擴張、心臟收縮障礙等，此外也發生心肌纖維化，而造成心臟舒張障礙。如心肌纖維化嚴重，可能在尚未出現明顯心臟病症狀的狀況下引發猝死。

大小鼠 5/6 腎切除手術模式引發的腎傷害，在生理、生化及型態特性上皆與 CRF 病患接近，因此許多學者使用此模式探討 CRF 複雜的病理機轉，或研究各類藥物在 CRF 的狀況下如何代謝及作用，並藉此驗證或發掘新的治療方式。

4.2.4.2 手術方式

（1）. 將兩側腎臟分別進行 2/3 切除手術以及單側摘除手術，兩手術相隔約 1-2 週以提高動物存活率。依研究需求或術者習慣，可於腰背兩側開創或於腹部正中平行開創。一般於左腎行 2/3 切除，於右腎行摘除手術。2/3 切除手術的部分，可分為切除式、結紮式以及混合式。

（2）. 切除式 2/3 腎切除：將腎臟從周圍組織中游離出來後，切除腎臟兩端，體積約 50%。由於切除的比例與腎衰竭進展速度有關，因此切除時需仔細計算。此方式適用於大小鼠。

（3）. 結紮式 2/3 腎切除（大鼠）：將腎臟從周圍組織中游離出來後，在腎動脈上分枝及下分枝結紮，結紮血管數量為分枝總數的 2/3，使腎臟兩端缺血梗塞。此方式不適用小鼠，因為小鼠的腎動脈分枝較少。

（4）. 結紮式 2/3 腎切除（小鼠）：將腎臟從周圍組織中游離出來後，直接在腎臟兩端 1/3 處做結紮，使腎臟兩端缺血梗塞。進行時須小心勿綁到腎上腺、腎動脈或輸尿管，並於結紮後觀察約 2 分鐘，以確認沒有發生出血或腎臟內出血。如成功阻斷血流，約 1-2 分鐘後兩端會因缺血變色。此方式簡單迅速，但不易準確控制最後會留下多少具功能的腎臟組織。

（5）. 結紮式 2/3 腎切除會伴隨嚴重的高血壓以及比切除式更嚴重的蛋白尿症狀。

（6）. 混合式：先結紮部分腎動脈分枝後，再以燒灼法移除多餘的腎組織，來達到 2/3 切除的效果。

（7）.單側腎摘除手術部分，較為簡單，將腎臟從周圍組織中游離出來後，把腎動靜脈及輸尿管一同結紮，並摘除腎臟。也可用電燒方式替代結紮。

（8）.假手術組：與切除組進行相同操作，包括將腎臟從周圍組織中游離以暴露出腎臟，只是不對腎臟做結紮、電燒或摘除。

4.2.4.3 術後照護

動物術後宜單獨隔離飼養以利傷口癒合,術後2-3天會恢復正常飲食及活動,但仍宜單獨隔離飼養至傷口完全痊癒。術後可給予抗生素（如 penicillin）及止痛劑（如 buprenorphine）持續給予 3-7 天，以防止感染和止痛。

選用鼠種影響：與 C57BL/6 小鼠相比，129/Sv 以及 Swiss-Webster 小鼠產生的腎絲球硬化及蛋白尿症狀更明顯。

4.2.4.4 參考文獻

1. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5755318/
2. https://www.criver.com/sites/default/files/resources/56NephrectomyinMiceandRats.pdf
3. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3030258/

4.2.5 卵巢切除術（Ovariectomy）

4.2.5.1 簡介

原發性骨質疏鬆包括停經後骨質疏鬆和老年性骨質疏鬆，主要表現為骨量減少，骨強度下降而脆性增加，易發生骨折。其發病機制複雜，諸多因素影響其發病過程，內分泌功能紊亂是其確定發病因素之一。

4.2.5.2 技術說明

（1）. 切除雙側卵巢的大鼠是美國食品藥物管理局（FDA）和世界衛生組織（WHO）推薦的研究停經後骨質疏鬆症的動物模式，它正確地模擬了成年婦女雌激素缺乏的臨床特性及對激素替代療法的反應，大鼠鬆質骨的骨質疏鬆進程，對研究骨骼的生理學反應非常有利。未交配的 6-10 月齡雌性大鼠是預防研究的最佳選擇，而 10-11 月齡雌性大鼠對研究峰值骨量以後的骨質流失有重要價值。如果實驗目的是研究成年人骨病進程的特點，10 月齡的雌性卵巢切除大鼠造成的骨質流失是首選的動物模型，此時它已達骨峰值，且與成年女性骨質疏鬆有極相似的臨床表現。另外，由於體重與骨密度成正相關，雌激素水平下降可引起體重上升；體重增加時骨密度增高可以部分抵消雌激素缺乏引起的骨質流失，所以實驗中應適當控制動物的體重。

（2）. 卵巢切除手術途徑有兩種：一是由背側下刀，在大鼠背部中段部位，縱向切開 1-2 cm 的切口，以剪刀向二側鈍剝背部黏膜，找出左右二側肌肉層下方卵巢（呈粉紅色），分別剪開肌肉層，找到脂肪球，拉出脂肪球即見卵巢，以可吸收線(如鉻線)結紮輸卵管及血管後，切除雙側卵巢；二為由腹側下刀，由下腹部正中線切開約 1.5 cm，打開腹腔，將腹腔其他器官集中一側，找出卵巢，提起後，以可吸收線（如鉻線）結紮其蒂部，將其切除，然後再切另一側卵巢。卵巢為深粉紅色顆粒狀組織，多被其周圍脂肪組織所掩蓋，術中需撥開這些組織，方能將其顯露。術後正常飲食，12 週即可建立骨質疏鬆模式。

4.2.5.3 參考文獻

1. 人类疾病动物模型复制方法学，上海科学技术文献出版社，2008 年 1 月 1 日初版， ASIN: B0011Y2Z70， 作者：周光興
2. 人類疾病動物模型，ISBN13：9787117188289，劉恩岐主編

4.2.6 氣管切開術與氣管插管術

4.2.6.1 簡介

在許多研究中，進入實驗動物的呼吸道是非常重要的，如研究感染因子的作用、藥物的滴注，以及開胸腔手術時輔助動物呼吸的機械通氣等實驗模型。實務上可以通過不同的技術進入呼吸道通路，其各有優點和缺點。這些技術分為手術氣管切開/插管術（tracheotomy/tracheostomy）和非手術鼻內滴注和氣管插管（orotracheal intubation）兩類。手術技術由於其精確性而較常用，但因其具有侵入性而與各種併發症相關，例如氣道創傷、腫脹和出血。非手術技術使用較少，比外科手術的精確度較低，好處是其為非侵入性，快速且易於執行。

4.2.6.2 手術氣管切開/插管術

（1）. 氣管穿刺術

本法可用於感染實驗、藥物投予，以及氣管或支氣管灌洗。

A. 將動物麻醉並置於仰臥位，以延伸頸部區域，使氣管穿刺易於執行。

B. 去除下頜骨下方的毛髮，局部消毒，利於無菌操作。

C. 沿頸部正中線進行切創，將相鄰的皮下組織和唾液腺分開，使氣管露出。

D. 穿刺通常使用注射器進行，將針尖與氣管平行，並穿刺進入氣管。

E. 實驗操作結束後，以不可吸收線縫合皮膚。

（2）. 氣管切開/插管術

本法用於開胸腔手術時輔助動物呼吸的機械通氣等實驗模型，如小型嚙齒動物的心肌梗塞模式、心衰竭模式及支氣管肺泡灌洗等。

A. 將動物麻醉並置於仰臥位，將四肢固定（不可用大頭針等尖銳物插入動物四肢）在手術台上；以縫線繞過小鼠門齒，將縫線固定於手術板上，使頸部區域伸展，使氣管切開易於執行。

B. 去除下頜骨下方的毛髮，局部消毒，利於無菌操作。

C. 沿頸部正中線進行切創，將相鄰的皮下組織和唾液腺分開，使氣管露出。氣管周圍的肌肉可用縫線固定，以方便操作。

D. 在觀察到氣管後，進行切口以將插管插入第四和第五氣管環之間。再將插管連結到人工呼吸器上，調整呼吸器通氣量及頻率，觀察動物的呼吸

正常後，方可進行後續手術操作。

E. 實驗操作結束後，以不可吸收線縫合皮膚。

4.2.6.3 非手術鼻內途徑滴注和氣管插管

為促進 3Rs 及動物福祉，近年來多鼓勵使用非侵入式或微創手術，上述的插管手術也可以非侵入式程序進行。儘管，非手術技術具有多種變化和不同的操作方式，特別是氣管插管，然而透過詳細的操作程序描述以及練習，非侵入式插管技術仍是值得推廣的。

（1）. 鼻內途徑滴注

鼻內途徑滴注用於給予感染因子、藥物和對抗原的敏感性研究。與其他技術不同是，此一技術允許滴注的液體從鼻腔通向肺部。進行鼻腔滴注時，動物應處於深度麻醉下；並且通常需使用微定量吸管將要滴注的液體緩慢地注入鼻孔中。需注意的是，滴注小於 5 µl 的體積不足以到達肺部；滴注的效果與滴注的體積成比例增加，但是大於 60 µl 的體積應分成兩次滴注，間隔約 10 分鐘。身體姿勢不影響滴注，但在非麻醉的動物有大部分的液體會流入胃中，降低滴注成功率。

（2）. 氣管插管

小型實驗動物的氣管插管可以使用非手術方式進行，此技術可用於氣管內應用藥物、傳染因子或機械通氣。

A. 為進行氣管插管，可將嚙齒動物麻醉後放置於水平、垂直或傾斜的支撐物上，並以縫線勾住小鼠的門齒固定於支撐物上。

B. 提供良好局部照明，如喉鏡，使氣管插管能順利進行。

插管通常可使用適當大小的塑膠管，小鼠可使用 20G 的血管內留置針進行插管，好處是內有硬針做為導引，使插管更容易進行。可將留置針的導引針頭磨成鈍圓，以免傷害小鼠喉頭及氣管組織。將留置針插入氣管後，再將導引的硬針抽出，即完成插管；此時需確認插管是否成功，可使用小面鏡子置於插管口，如鏡面有霧氣，即表示插管成功；如無霧氣產生，表示可能誤插入食道中，此時應將插管拔出，重新插管。同時可觀察動物是否正常呼吸，粘膜顏色是否為正常之粉紅色，如有發紺現象，表示插管不成功，應重新執行。插管成功後，將插管連結到人工呼吸器上，調整呼吸器通氣量及頻率，觀察動物的呼吸正常後，即可進

行後續手術操作。

4.2.6.4 參考文獻

1. Ribeiro RSA, et al. （2015） Access to the tracheal pulmonary pathway in small rodents. Bras Patol Med Lab, v. 51, n. 3, p. 183-188
2. Ribeiro RSA, et al.（ 2012） Pulmonary infection of mice by orotracheal intubation of Paracoccidioides brasiliensis. Exp Pathol Health Sci. 6（1）: 7-10.
3. Spoelstra EM, et al. （2007） A novel and simple method for endotracheal intubation of mice. Lab Anim. 41（1）: 128-35.
4. Hamacher J, et al. （2008） Microscopic wire guide-based orotracheal mouse intubation: description, evaluation and comparison with transillumination. Lab Anim. 42（2）: 222-30.

4.2.7 腦部手術及立體定位注射

4.2.7.1 簡介

大、小鼠腦部手術，首先要學習如何使用立體定位儀。再參考大鼠腦立體定位圖譜或文獻注射部位的坐標，以頭骨（lambda）和頭蓋骨（bregma）縫合處為零點。

使用立體定位儀進行立體定向手術可用於將導管植入特定腦區域，研究局部操縱的神經傳導物質和信號通路在清醒行為動物中的作用。此外，亦可植入電極，進行電生理學刺激研究和記錄，有助於對行為動物的神經可塑性和腦網絡的理解。

4.2.7.2 技術說明

（1）. 材料：

- 立體定位儀
- #10 or #11 刀片
- 小螺絲起子
- 不鏽鋼螺絲
- 牙科用鑽孔機
- 牙粉及催化劑

（2）. 術前準備：

A. 將立體定位儀設置完成，保溫墊加熱準備。

B. 將動物麻醉後置於保溫墊上。使用電動剃刀或除毛膏將耳朵到眼睛之間的頭部區域的毛髮去除。

C. 檢查動物之麻醉狀態，如動物已無腳趾反射，即可將動物置於立體定位儀，準備手術。

D. 調整耳桿，使其兩側顯示相同的讀數，並通過鼻樑固定將空氣管再次放置在動物的前方。

E. 再次檢查動物，血氧濃度需高於 90%，如果沒有，調整管道，使其靠近鼻子，或增加氧氣流量。在整個手術過程中監測血氧水平和心率。

F. 手術前先給予給止痛藥，並清潔及消毒手術區域。

（3）. 手術操作

A. 用#10 或#11 刀片在頭皮中線從眼睛之間直到耳後做一個約 2.5 公分的前後切口。使用 4-6 個鬥牛犬鉗（bulldog clamps）夾住皮膚並保持切口張開。用刮刀和棉棒去除任何結膜組織並清潔該區域以暴露顱骨表面。

B. 檢查頭部是否水平：首先，找到顱骨的 lambda 位置，並將導管正好放在這個位置，接觸頭骨，記錄背腹坐標。接下來，將導管準確地放在前囟門（bregma）上，接觸頭骨，並記錄其背腹坐標。這兩個坐標應該相同。如果差值> 0.3 mm，請調整鼻樑以糾正它。

C. 使用無菌手鑽製作兩個小孔，用於固定顱骨螺釘（一個在頭骨一側插管位置前方約 5 mm 的，另一個在另一側插管位置後方 5 mm）。將兩個#0-80 無菌螺釘插入這些孔中，直到將其牢固固定，但不必完全插入頭骨中。

D. 將導引插管準確放置在前囟門，記錄前-後和側坐標。每個大腦區域的導引插管放置的正確位置可以藉由立體定位圖譜的幫助，從前囟門加或減來計算。

E. 將導引插管置於正確的位置，稍微接觸顱骨，記錄背腹坐標。雙側插管放置時，接下來找到頭骨另一側的插管位置，並再次記錄背腹側坐標。兩個坐標應相同（或差異<0.3 mm）。

F. 用無菌鉛筆在頭骨上標記插管位置，並用手鑽製作鑽孔，借助導引插管檢查尺寸和正確位置。當鑽孔完成後，使用無菌針小心的刺穿腦膜，以便無阻礙地插入導管。

G. 將導管放入第一個孔中，小心地將其放低，直到達到最終的腹側坐標。準備牙科粘固劑並在導管和螺釘周圍全面塗抹，以固定導管。等到粘固劑完全乾燥後，通過向上轉動背-腹桿小心地移除套管支架。

H. 將第二個導管放入支架並轉到另一側的插管位置。將插管放入孔中並重複上一步驟。用粘固劑覆蓋螺釘和套管的表面，在粘固劑乾燥之前，去除皮膚上的任何多餘部分。

I. 注入溫熱的（～37℃）無菌生理食鹽水（～10 ml / kg，s.c.），以確保動物不會脫水。

J. 在粘固劑完全乾燥後，取下導管支架並將無菌針放入每個導管中以防止阻塞。

K. 用無菌生理鹽水清潔傷口區域並縫合傷口的前部和後部。

L. 將動物從立體定位裝置中取出，繼續監測氧飽和度和體溫。

M. 將動物放入恢復籠中。為了避免體溫過低，將籠子放在 28℃的保溫箱中或放在加熱墊上。觀察動物至少一小時，待動物清醒後再將牠放回動物室，動物需單獨飼養。

（4）.術後照護：

A. 術後 4 天內應每日照顧動物，觀察其狀況是否良好。如表現出明顯疾病，傷口感染，體重減輕或其他健康狀況降低等跡象，動物必須接受特別護理，例如額外使用一定劑量的止痛藥以減少術後疼痛或抗生素以減少術後感染；如有脫水現象，可皮下注射生理鹽水以補充體液；也可使用粉狀飼料和水，使動物容易進食，並刺激其食慾。

B. 通常應該動物休養 7 日後，再開始進行後續行為實驗。

4.2.7.3 參考文獻

1. Fornari RV, et al. （2012） Rodent stereotaxic surgery and animal welfare outcome improvements for behavioral neuroscience. J Vis Exp, 10.3791/3528
2. Paxinos, G. & Watson, C. （2007） The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press/Elsevier.

4.2.8 腸道插管手術

4.2.8.1 簡介

大、小鼠腸道插管手術，提供臨床前或研究時，可以容易及重覆藥物投予，動物不需要在麻醉狀態，可應用在藥物動力學或是一些基礎生理的研究，一般操作消化道手術，最好能禁食，減少腸內容物流出，降低汙染機率。。

4.2.8.2 技術說明

（1）.材料：

- 4” 顯微手術剪
- 4” 顯微手術鑷子
- 顯微杜蒙特鑷子（micro Dumont tweezers）
- #10 or #11 刀片
- 4-0 or 5-0 絲線
- 4-0 可吸收線
- 預製導管

（2）.動物準備：

至少禁食 12 小時，但不要超過 24 小時。

（3）.手術步驟：

A. 腹側與背側肩胛剃毛，以消毒液消毒。

B. 用#10 或#11 刀片，於肩胛部切一小切口，使導管能由腹側皮下穿至肩胛側固定。將切口用紗布覆蓋，將老鼠翻轉至腹側面。

C. 用#10 或#11 刀片，腹部中線切創 2.5 cm（大鼠）或 1.5 cm（小鼠）。

D. 確認腸道相關位置(胃-非腺體部；十二指腸-胃幽門括約肌後 1.5-2 公分；空腸-十二指腸後 5-6 公分；迴腸-盲腸前 5-6 公分)，於目標位置血管較少的地方，以 5-0 絲線施以荷包縫。

E. 荷包縫合做一個小切口，將導管通過切口進入腸道，直到第一個結沒入，將荷包縫結紮於第一個結與第二個結之間。

F. 於腹部肌肉開一個小創口，使導管通過創口至皮下，腹部肌肉創口以 5-0 可吸收線縫線間斷縫合封閉，以絲線封閉小創口與固定第三個結。

G. 導管穿過皮下到背側切口，以皮釘關閉腹部皮膚創口。

H. 以縫線固定第四個結於背部肌肉。

I. 導管使用含生理食鹽水的針筒和鈍的針頭測試，測試正常即用金屬栓子塞住。

J. 以鈍剝方式於皮下做一個口袋，將多餘的管子置於口袋內。

K. 將皮膚以皮釘或不可吸收縫線密合，並確保金屬栓子也被固定住。

4.2.8.3 導管操作說明：

所有操作過程均需無菌操作。

（1）. **材料：**

- 針筒
- 22 G 或 23 G 針頭
- 生理食鹽水

（2）. **操作流程：**

A. 整個過程最好由兩個人一起，一人負責保定動物，一人負責操作。

B. 術區消毒方式同外科手術。

C. 以剪刀尖端撐開固定金屬栓之皮釘，將金屬栓與導管從皮下拉出。

D. 以酒精棉確實清潔拉出之導管與金屬栓。

E. 以手指緊捏導管，使用止血鉗夾住金屬栓之頂端，導管與金屬栓交接處以鑷子固定，將金屬栓拉出，並確實以酒精棉消毒後，並放置於消毒過之容器內。

F. 打入生理食鹽水可疏通管路，確認疏通後可注射試驗所需藥物。

G. 使用完畢以無菌針筒注入約 0.2 ml 生理食鹽水沖洗導管。

H. 整個操作過程中若沒用針筒塞住導管，其頂端都必須捏緊，以免消化道內容物回流。最後把金屬栓塞回到導管，長度約二分之一。

I. 用酒精棉擦拭導管後，將導管從開創口塞回皮下，金屬栓用皮釘安全的固定在開創區後，再放動物回籠子。

（3）. **導管維護保持**

A. 動物必須單獨隔離飼養。

B. 導管必須術後 5-7 天內依上述步驟以生理食鹽水沖洗一次，且整個實驗過程中也必須 5-7 天沖洗一次，以維持導管暢通。手術日期會列於手術出貨單上。

C. 從術後開始每 7-10 天需更換固定在金屬栓上的皮釘。

4.2.8.4 參考文獻

1. Alfredo Rigalli, et al.（2009）Experimental surgical models in the laboratory rat. CRC press.

4.2.9 輸精管切除術（Vasectomy）

4.2.9.1 簡介

將受精後的胚胎移植到代理孕母是生產基因改造動物或動物淨化所必需的步驟，而代理孕母的假孕狀態，則需依賴健康雌性動物與切除部分輸精管但仍有交配能力的不孕雄性動物自然交配後才能達成。以小鼠為例，交配成功的雌性小鼠陰道會留有一團來自雄性精液的凝固蛋白質，稱為陰道栓塞（plug），由於交配通常發生在午夜，因此發現陰道栓塞之日被認為是 0.5 dpc（days post coitum）。原核期的受精卵通常植入成功交配後 0.5 天（dpc）的假孕母輸卵管，而發育至囊胚期的受精卵通常植入成功交配後 2.5 天（dpc）的假孕母子宮。

4.2.9.2 技術說明

輸精管切除術是一種相對簡單的外科手術技術，可以經由陰囊或腹部來進行，也可以從一些供應商處購買輸精管切除的雄性動物。由陰囊進行的傷口相對較小，但因涉及解剖和撕裂組織以暴露輸精管，因此仍然可能出現明顯的術後疼痛。由腹部切開可提供更清晰的手術操作視野，可防止新手操作者截斷兩次同側輸精管而留下功能性輸精管。若採用腹部切開，建議採用中線縱切，因為不切斷任何腹部肌肉纖維，可避免腹部疝氣的發生。

4.2.9.3 操作流程

（1）. 將有交配能力的雄鼠麻醉、剃毛、消毒之後，腹部朝上，尾巴朝向操作者，並用無菌布覆蓋，露出下腹部。

（2）. 在陰莖上方約 1 cm 處進行 10-15 mm 的縱向皮膚切口。

（3）. 在腹膜白線上進行 5-10 mm 的縱向肌肉切口。

（4）. 用鑷子夾住一側的睾丸脂肪墊並拉動它以暴露睾丸、輸精管和副睾。輸精管位於睾丸內側，它是一個清晰可辨的自由管（不像副睾那樣附著在睾丸壁上）。

（5）. 用鑷子夾住輸精管成為倒 U 型（圖 4.2.9-1），用另一把燒紅的鑷子或高溫燒灼器燒灼輸精管（圖 4.2.9-2），移除約 5 mm 輸精管（圖 4.2.9-3）並留下兩個明顯分開的燒灼末端。

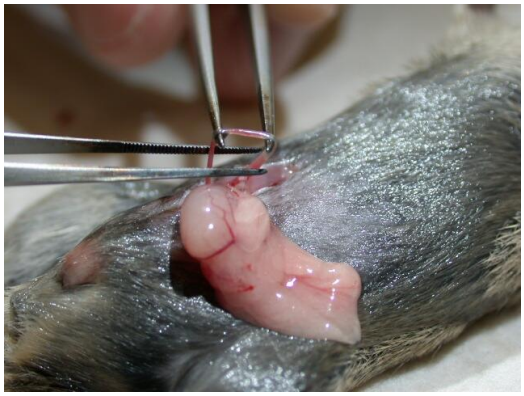
（6）. 將睾丸、副睾和輸精管放回腹腔。

（7）. 再由步驟 4 開始進行另一側的輸精管切除。

（8）. 用 5/0 可吸收縫線縫合肌肉層（圖 4.2.9-4）。

（9）. 用 1-2 個傷口夾縫合皮膚（圖 4.2.9-5），術後 10 天可移除傷口夾。

（10）. 輸精管切除的雄鼠可在手術後 2 週和雌鼠進行交配，來測試是否已無生育能力。

<table>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>圖 4.2.9-1
用鑷子夾住輸精管成為倒 U 型</td><td>圖 4.2.9-2
用另一把燒紅的鑷子或高溫燒灼器燒灼輸精管</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>圖 4.2.9-3 移除約 5 毫米輸精管</td><td>圖 4.2.9-4 縫合肌肉層</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>圖 4.2.9-5 用傷口夾縫合皮膚</td><td></td></tr>
</table>

4.2.9.4 参考文献

1. Utero-tubal Embryo Transfer and Vasectomy in the Mouse Model URL: http://www.jove.com/video/51214 DOI: doi:10.3791/51214

第三節 常用手術技術：水生、兩棲動物

本章課程安排時數：0.5 小時

本章學習目標：

1. 學習水生、兩棲動物常用的手術技術，如斑馬魚小部分肝臟切除手術、活組織檢查與兩棲動物等。
2. 手術技術的應用範圍與注意事項。

4.3.1 切除小部分肝臟手術-以斑馬魚為例 （Zebrafish Liver Hepatoectomy）

4.3.1.1 簡介

肝臟是斑馬魚體內一個較大型的器官，由於與人類的肝臟在發育、分化及致病機轉上有許多相似性，故斑馬魚經常被用來當作肝臟疾病如脂肪肝、肝硬化及肝癌等之模式動物。斑馬魚的肝臟共有三葉，利用精巧的手術可以將其中一葉由斑馬魚活體切除，以作為研究之用。由於斑馬魚肝臟的再生能力強，一部分肝臟切除後不會影響魚隻的存活。這項技術可以應用的範圍很廣，主要是可以容許我們對同一隻魚的肝臟有持續性的觀察與研究。

4.3.1.2 試驗內容

（1）. 將受測之斑馬魚進行麻醉（斑馬魚放入含有 3-胺基苯甲酸（tricaine）濃度為 168 mg/L 的養殖水缸中靜置約 5-10 分鐘，待魚隻完全麻醉）。

（2）. 待魚隻靜止不動後，以過酒精燈消毒後的小剪刀於腹部剪開一個非常小的洞，用鑷子挑取出約一葉肝臟，並放置含有 50 ml 的保存液中。

（3）. 剪取肝臟後的魚隻放入含有甲基藍（1 μg /ml）的 400 ml 養殖水缸中，等待魚隻自然恢復後，再放回原來的飼養缸。

（4）. 取出之一葉肝臟最好立即進行實驗，有需要時也可以於保存液中放置在 -20℃ 冰箱裡保存，待需要時再取出進行後續之實驗。

（5）. 整個測試過程需要嚴格控制以下幾項因子：

- 所有使用之器具需要事先消毒，操作實驗過程中需全程配戴手套，以減少魚隻感染的機會。
- 配置麻醉劑 tricaine 的濃度需固定，濃度過重會導致魚隻死亡，過輕則無法達到減痛之目的，所以麻醉的適當劑量需要事先測得。

圖示實驗步驟

A：所有手術用器皿需要事先以酒精消毒，並在使用前以酒精燈再次消毒。

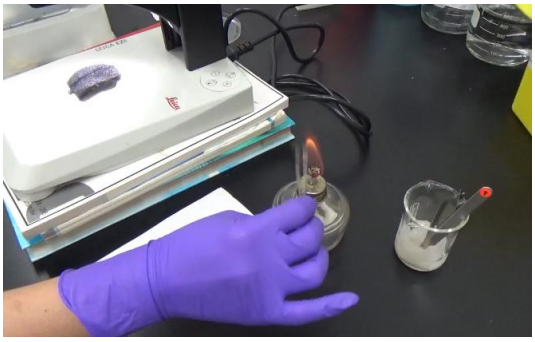
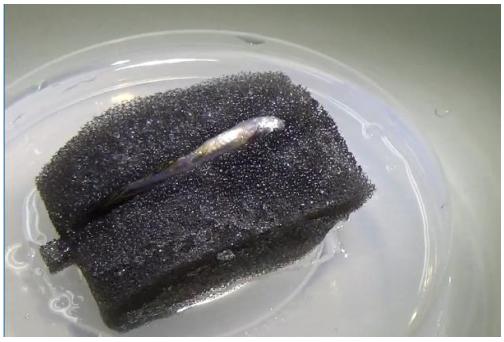
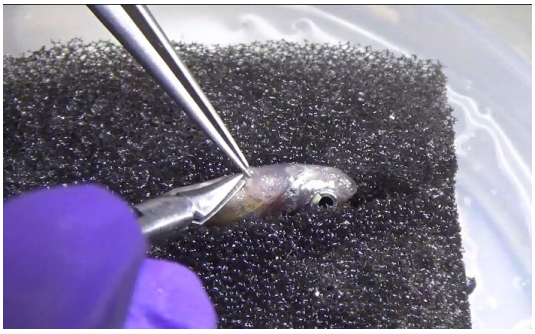
B：將麻醉後之魚隻安置魚手術台上。

C-D：將腹部相對於肝臟的地方剪開一個非常小的洞。

E-F：用尖端非常細小的鑷子小心將一葉肝臟拉出魚隻體外。

G：小心剪取拉出之一葉肝臟。

H：剛被剪下之一葉新鮮肝臟，血管清晰可見。

A	B
	
C	D
	
E	F
	

G	H
	

4.3.1.3 應用範圍

對同一隻魚的肝臟需要有持續性的觀察與研究的實驗，如藥物處理後的反應，肝病（癌）的發展進程等實驗。

4.3.1.4 參考文獻

1. Kirsten C. Sadler, Katherine N. Krahn, Naseem A. Gaur, and Chinweike Ukomadu. Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, uhrf1. *PNAS* , January 30, 2007 vol. 104 no. 5, 1570–1575.
2. Guohui Feng, Yong Long, Jinrong Peng, Qing Li and Zongbin Cui.Transcriptomic characterization of the dorsal lobes after hepatectomy of theventral lobe in Zebrafish. Genomics （2015） 16:979.

4.3.2 魚類的活組織檢查-以斑馬魚的魚鰓為例 （Zebrafish Gills Biopsy）

4.3.2.1 簡介

魚類的活組織檢查常被應用在魚類的疾病偵測上，尤其配合分子生物學的方法，可以很快的檢測出魚類受感染的病原。魚鰓抹片（swab）及剪尾鰭是最常被用來進行魚病偵測的組織檢查，這是一種非傷害性的快速檢查，魚類只要經過輕微的麻醉後即可施行。

4.3.2.2 試驗內容

（1）. 將受測之斑馬魚進行麻醉（斑馬魚放入含有 3-胺基苯甲酸（tricaine）濃度 168 mg/L 的養殖水缸中靜置約 5-10 分鐘，待魚隻完全麻醉）。

（2）. 待魚隻靜止不動後，用手輕輕將魚的鰓蓋打開，以乾淨的載玻片輕輕刮取一小片魚鰓（或以消毒過之小剪刀剪取一小段魚鰓的尖端，放置於載玻片上），小心蓋上蓋玻片後，添加一滴養殖水於玻片上，並於顯微鏡下進行觀察。

（3）. 觀察後之魚鰓可以用保存液輕輕由載玻片上冲下後，收集於 Eppendorf 小管中，以利後續實驗之進行。

（4）. 整個測試過程需要嚴格控制以下幾項因子：

- 所有使用之器具需要經過消毒，操作實驗過程中需全程配戴手套，以減少魚隻感染的機會。
- 配置麻醉劑 tricaine 的濃度需固定，濃度過重會導致魚隻死亡，過輕則無法達到減痛之目的，所以麻醉的適當劑量需要事先測得。

圖示實驗步驟

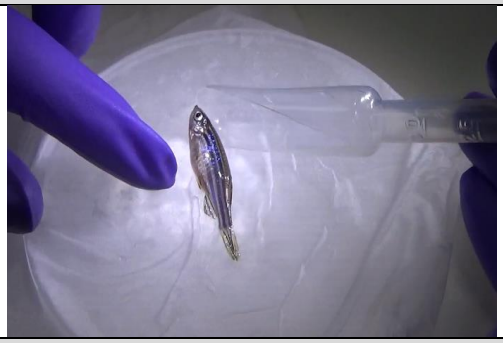
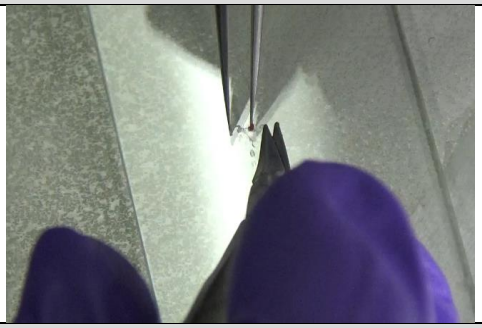
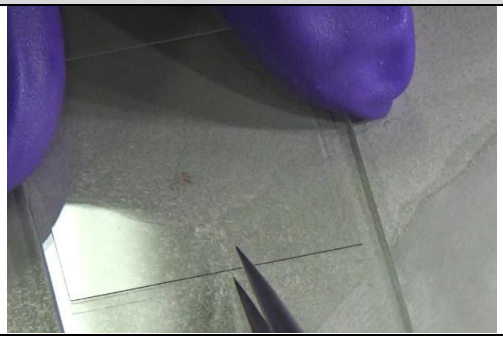
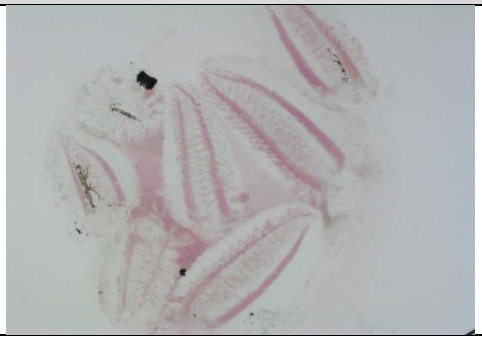
A：將麻醉後之魚隻安置於用潮濕紙巾包裹之含有碎冰的培養皿上，保持低溫。

B：用消毒過的小剪刀及鑷子稍微掀開鰓蓋，剪取一小片的魚鰓尖端，器皿需要事先以酒精消毒，並在使用前以酒精燈再次消毒，以避免魚隻感染。

C-D：將剪取的一小部分鰓尖，平放於載玻片上。

E：輕輕地蓋上蓋玻片，即可於顯微鏡下進行觀察。

F：正常、新鮮的魚鰓，形狀對稱，色澤呈淡粉紅 （50X 顯微鏡下）。

A	B
	
C	D
	
E	F
	

4.3.2.3 應用範圍

需要對魚隻進行健康檢查，或想要對於魚隻的致病原進行偵測時常會使用。

4.3.2.4 參考文獻

1. Emily R. Cornwell,1 Chelsea A. Bellmund, Geoffrey H. Groocock, Po Ting Wong, Katherine L. Hambury, Rodman G. Getchell, Paul R. Bowser. Fin and gill biopsies are effective nonlethal samples for detection of *Viral hemorrhagic septicemia virus* genotype IVb. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2013, 25（2） 203–209.
2. Manuel Gesto, Juan Hernández, Marcos A.López-Patiño, José L, Soengas, Jesús M.Míguez. Is gill cortisol concentration a good acute stress indicator in fish? A study in rainbow trout and zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, October 2015, Volume 188, Pages 65-69

4.3.3 兩棲類常用手術

4.3.3.1 常用手術簡介

目前應用在兩棲類的手術，主要針對成體時期的個體，手術流程主要應用於爬行動物（特別是蜥蜴），常用的手術包括傷口清創和修復、皮膚活體組織切片檢查（skin biopsy）、膿瘍、腫瘤和寄生蟲移除和脫垂（prolapse）替代或修復。

手術項目包括皮膚手術（包括組織取樣、組織消腫、皮膚外傷手術、寄生蟲或皮膚腫塊摘除）、手術切開（surgical celiotomy）（探查內部器官或活體組織切片檢查（biopsy）的基本手術）、眼科手術（不普遍）、消化道造口（胃造口術（gastotomy）、腸造口術（enterotomy）與腸科手術（不普遍）、膀胱造廔管（cystotomy））、生殖系統手術（如卵巢切除術，應用於取得卵子，用於胚胎研究；睪丸活體組織切片，用於胚胎與生殖研究），以及骨科手術（以截肢手術最常見）（Chai, 2016）。

若手術只是為了檢查，要降低侵入式手術，可使用內視鏡檢查。本文主要把重點放在兩棲類手術前以及術後的注意事項，關於各項手術執行方式，建議參考臨床上的文獻報導，而關於兩棲類內部解剖構造的基本瞭解，可參閱 O'Malley（2005）（國內已有中文版，書名為野生動物臨床解剖生理學）。

4.3.3.2 手術麻醉

兩棲類較能容忍失血、手術癒合快、術後併發症較其他高等脊椎動物低（Chai, 2016），手術時首要考量與注意的就是合適的麻醉處理以及手術期間必須確保其皮膚潮濕（Chai, 2016; Gentz, 2007）。執行手術時，執行者需戴上沾濕無粉的手套可避免來自執行手術者的微生物或化學物質影響接受手術的動物，一方面也保護執行者不受動物分泌毒液（有些兩棲類皮膚具有毒性）的影響。麻醉時，一般最建議使用的還是 MS-222 溶液，水棲性兩棲類成體建議安全濃度是 0.25-0.5 g / L，陸棲性兩棲類成體建議安全濃度是 1 g / L，若是墨西哥鈍口螈（axolotl），更建議使用的是 Alfaxalone 溶液，建議安全濃度是 5 mg / L （Chai, 2016; Gentz, 2007）；雖然丁香油（clove oil）（eugenol）也被用於某些兩棲類麻醉，但有副作用報導，較不建議使用（Gentz, 2007）。麻醉時，用沾溼紙巾蓋住眼睛有助於穩定動物與麻醉效果（Chai, 2016）。用來評估手術的麻醉深度方式包括：缺乏逃開行為、肌肉張力遲緩或缺乏、缺乏心跳、翻正反的（righting reflex）反應完全喪失、淺和

深度疼痛反應緩慢（Chai, 2016）。

4.3.3.2 皮膚潤濕

由於兩棲類的皮膚通透性高，因此潤濕的步驟很重要。手術前的準備包括將動物置入淺水盤潤濕，此步驟是手術是否成功的關鍵之一，一般建議要泡在曝氣水（dechlorinated water）約一個小時（Chai, 2016；Gentz, 2007）。另外，要確保其能快速檢查或用藥，可使用濕紙巾包裹。手術時，手術區域蓋上乾淨的塑膠布。乾淨的塑膠布是手術時，用來隔離手術區域與維持皮膚潮濕，減少水分散失之用。各類手術時所需的相關器械、工具或設備可參考 Chai（2016），基本切開皮膚所用的解剖刀，建議可使用 11 或 15 號手術刀片（Gentz, 2007）.。手術前，手術區域需要先進行皮膚表面消毒。消毒時可用無菌生理鹽水稀釋的碘液（povidone-iodine solution）（1:10）浸泡消毒的棉布（或紗布）覆蓋 10-15 秒或使用浸泡 0.75% 的氯己定（chlorhexidine）溶液的紗布鋪在手術位置至少 10 分鐘（Chai, 2016）。

4.3.3.3 術後照顧

手術結束後，就是讓動物進行術後復原。術後復原時，須將動物擺入曝氣水讓其從麻醉中甦醒，擺入水中時，須注意頭必須露出水面。若種類是水棲性種類，可透過打氣縮短甦醒所需時間（Chai, 2016）。術後復原期間用的浸泡液由生理食鹽水（9 ppt）與 5% 葡萄糖液（1:2 比例）混合而成，術後需注意的事項包括止痛、水分、養分和衛生狀況。可適當使用鴉片類止痛藥物與非固醇類抗發炎藥使用（Chai, 2016）。

4.3.3.4 參考文獻

1. Chai, Norin. （2016）. Surgery in amphibians. Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice, 19（1）, 77-95.
2. Gentz, Edward J. （2007）. Medicine and surgery of amphibians. Ilar Journal, 48（3）, 255-259.
3. O'Malley, Bairbre. （2005）. Clinical anatomy and physiology of exotic species: structure and function of mammals, birds, reptiles, and amphibians: Elsevier.

附件一 實驗動物國內外資源

一、實驗動物供應資源體系

（一）、國內實驗動物供應

1.嚙齒類動物

（1）.大、小鼠

a.財團法人國家實驗研究院實驗動物中心
http://www.nlac.org.tw/

b.樂斯科生物科技股份有限公司
http://www.biolasco.com.tw/

（2）.倉鼠、天竺鼠

財團法人國家實驗研究院實驗動物中心
http://www.nlac.org.tw/

（3）. 其他嚙齒類

國家實驗鼠種原庫 （Rodent Model Resource Center, RMRC）
http://www.nlac.org.tw/RMRC/webc/html/about/index.aspx

2.中大動物（含反芻類）

（1）.兔

a.行政院農業委員會畜產試驗所
https://www.tlri.gov.tw/

b.行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所
https://www.nvri.gov.tw/main.aspx?pid=Qt%2FUkxZJXGA%3D

c.財團法人國家實驗研究院實驗動物中心
http://www.nlac.org.tw/

（2）.豬

a.行政院農業委員會畜產試驗所臺東種畜繁殖場（蘭嶼豬）
https://minipigs.angrin.tlri.gov.tw/

b.國立臺灣大學動物科動物科學技術學系（李宋豬）
https://leesung.atri.org.tw/

c.財團法人農業科技研究院動物科技研究所（SPF 李宋豬、SPF 洋種豬）

https://www.atri.org.tw/introduction_04

（3）.其他

a.牛-行政院農業委員會畜產試驗所 （總所、新竹分所）
https://www.tlri.gov.tw

b.羊-行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所
https://www.tlri.gov.tw/page.aspx?path=20

c.馬-國家免疫馬匹畜牧場（屏東科技大學-動物製劑研究中心）
http://rcab.npust.edu.tw/bin/home.php?Lang=zh-tw

d.雞、雞胚蛋-行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所
https://www.nvri.gov.tw

e.鴨、鴨胚蛋-行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所
https://www.tlri.gov.tw/page.aspx?path=13

f.鵝、鵝胚蛋-行政院農業委員會畜產試驗所彰化種畜繁殖場
https://www.tlri.gov.tw/page.aspx?path=21

3.水生、兩棲動物

（1）.斑馬魚

a.台灣斑馬魚中心-中研院分支
http://icob.sinica.edu.tw/tzcas/

b.台灣斑馬魚中心-國衛院分支
http://www.tzcf-tzenh.org/

（2）.鯉魚, 羅漢魚

嘉義大學淡水生物資源中心
http://www.ncyu.edu.tw/fbc/gradation.aspx?site_content_sn=43864

(二)、國外實驗動物供應體系

1.大、小鼠--傑克森實驗室（Jackson Laboratory）
https://www.jax.org/

2.兔-查理斯河實驗室（Charles River Laboratories）
https://www.criver.com/

3.兔-日本東方酵母有限公司（ORIENTAL YEAST CO., LTD）
https://www.oyc.co.jp

4.犬-美國馬歇爾公司（Marshall Bioresources）
https://www.marshallbio.com

5.小型豬-歐洲丹麥哥廷根小型豬（Ellegaard Göttingen Minipigs）
https://minipigs.dk/

6.SPF 雞蛋-查理斯河實驗室（Charles River Laboratories）
https://www.criver.com/

7.水生魚類國外供應機構 （斑馬魚）

（1）.斑馬魚國際資源中心 Zebrafish international Resourse Center（ZIRC），
https://zebrafish.org/home/guide.php

（2）.歐洲斑馬魚資源中心 European Zebrafish Resource Center（ EZRC），
http://www.ezrc.kit.edu/,

（3）.中國斑馬魚資源中心 China Zebrafish Resouce Center（CZRC），
http://en.zfish.cn/

二、實驗動物研究資源

（一）、國內實驗動物研究資源

1.行政院農業委員會（動物保護資訊網-實驗動物管理）
https://animal.coa.gov.tw/html/

2.中華實驗動物學會
http://cslas.org:8000/Entry?Command=GuestWeb_PrintWeb&sFunctionId=00&sFunctionSubId=00

3.行政院農業委員會畜產試驗所
https://www.tlri.gov.tw

4. 行政院農業委員會家畜衛生試驗所
https://www.nvri.gov.tw

5.行政院農業委員會動植物防疫檢疫局
https://www.baphiq.gov.tw

6.行政院農業委員會林務局
https://www.forest.gov.tw

7.行政院農委會水產試驗所
https://www.tfrin.gov.tw

8.中央研究院
https://www.sinica.edu.tw

9.財團法人生物技術開發中心
https://www.dcb.org.tw

10.財團法人國家實驗研究院實驗動物中心
http://www.nlac.org.tw/

11.財團法人國家衛生研究院實驗動物中心
https://lac.nhri.org.tw

12.財團法人農業科技研究院動物科技研究所
https://www.atri.org.tw › introduction_04

13.國家實驗鼠種原庫 （Rodent Model Resource Center，RMRC）
http://www.nlac.org.tw/RMRC/webc/html/about/index.aspx

（二）、國外實驗動物研究資源

1. 國際實驗動物管理評鑑及認證協會（Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International，AAALAC International）
https://www.aaalac.org/

2.美國實驗動物協會（American Association for Laboratory Animal Science，AALAS）
https://www.aalas.org

3.美國獸醫協會（American Veterinary Medical Association，AVMA）
https://www.avma.org

4.美國實驗動物醫學學院（American College of Laboratory Animal Medicine，ACLAM）
https://www.aclam.org

5.英國防止虐待動物協會（Royal Society for the Prevention of Cruelty Animals，RSPCA）
https://www.rspca.org.uk

6.英國國家動物 3R 研究中心（The National Centre for the Replacement，Refinement, and Reduction of Animals in Research，NC3Rs）
https://www.nc3rs.org.uk

7.國際實驗動物委員會（International Council for Laboratory Animal Science，ICLAS）
https://iclas.org

8.國際實驗動物專科學院協會（The International Association of Colleges of Laboratory Animal Medicine，IACLAM）
http://www.iaclam.org

9.亞洲實驗動物科學聯合會（Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations，AFLAS）
http://www.aflas-office.org

10.歐洲實驗動物科學學會聯盟（Federation of European Laboratory Animal Science Associations，FELASA）
http://www.felasa.eu

11.歐洲實驗動物醫學院（The European College of Laboratory Animal Medicine，ECLAM）
http://eslav-eclam.org

12.國際人道教育聯網（InterNICHE）
http://www.interniche.org

13.英國動物福利大學聯盟（The Universities Federation for Animal Welfare，UFAW）
https://www.ufaw.org.uk

14.英國動物醫學試驗替代基金會（Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments，FRAME）
https://frame.org.uk

15.實驗動物管理使用委員會資料中心（IACUC.ORG）
https://www.aalas.org/iacuc

16.動物福祉資料中心（Animal Welfare Information Center，AWIC）
https://www.nal.usda.gov/awic

附件二 各物種麻醉、止痛、鎮靜劑量表

附件表 2-1 小鼠（MOUSE）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表

藥　劑		劑　量	投藥方式	備　　註
動物保定/鎮靜/麻醉前給藥：進行注射、投藥、引起動物焦慮、低疼痛的實驗步驟或短時間保定時使用				
1	Atropine	0.02-0.05mg/kg	IM	
2	Diazepam（Valium™）	5mg/kg	IP	
3	Acepromazine	2-5mg/kg	IP	
4	Ketamine	20-44mg/kg	IM	
5	Terazol™,Zoletil™	80-160mg/kg	IM,IP	
6	CO_2+ 10-50%O_2 混合氣體	To effect	IH	1.作用時間短 2.CO_2+ 10-50%O_2 混合氣體其作用時間較短，且因兩種氣體密度不同，易造成 O_2 在鋼瓶上層、CO_2 在底部，導致氣體混合不均，需注意
動物麻醉：進行侵入性實驗、外科手術、或其他引起動物疼痛的步驟時使用。如需進行外科手術，動物必須進入手術期麻醉之深度，研究人員需確認動物已進入適當的麻醉深度（眼瞼反射、喉頭反射、腳趾反射），再進行手術。				
1	Pentobarbital	50-90mg/kg	IP	1.品系差異性大，需注意 2.建議稀釋後使用 3.存活性手術不建議使用
2	Thiopental	30-50mg/kg	IP	
3	Ketamine	50-200mg/kg 40-60mg/kg	IP IM	建議使用於 minor surgery
4	Ketamine/Acepromazine	100mg/kg K+ 5mg/kg A	IP	
5	Ketamine/Xylazine	40-85mg/kg K + 5-21mg/kg X 90-120mg/kg K+5-10mg/kg X	IM,IP IM,IP	1.Yohimbine （1-2mg/kg IP），Tolazoline（20mg/kg IP），Atipamezol（1mg/kgSC）為 Xylazine 拮抗劑 2.如需追加劑量，使用 1/3 ketamine 劑量
6	Ketamine/Xylazine	1.0ml K （100mg/ kg）＋ 0.5ml X （20mg/ml） ＋ 8.5ml 注射用水混合，0.1ml/10g	IP	同上

附件表 2-1 小鼠（MOUSE）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表（續）

藥　劑		劑　量	投藥方式	備　註
7	Ketamine/Medetomidine	0.38ml K （100mg/ kg） +0.5ml M（1mg/ml） + 4.12ml 注射用水混合, 0.1ml/10g	IP	Atipamezol （1mg/kgSC） 為 Medetomidine 拮抗劑
8	Fentanyl/Fluanisone （Hypnorm™）/ Midazolam	Fentanyl/Fluanisone :1 注射用水:2Midazolam:1 混合,0.1ml/10g	IP	Buprenorphine, Butorphanol tartrate 為拮抗劑
9	Tribromoethanol（Avertin） - 等量混合 Tribromoethyl alcohol 和 Tertiary amyl alcohol 配置 100% stock solution, 使用前再稀釋成 working solution（1.25% dilutent）	250mg/kg （0.2ml/10g）	IP	1.建議經實驗動物管理委員會審查同意,確定有其科學研究之需求與依據,才得以使用本藥劑 2.此藥劑對腹腔刺激性強,重複使用於同一隻動物時易造成腹膜炎
10	Isoflurane	誘導 4-5%, 維持麻醉 1-3%	IH	於抽氣櫃內或通風良好處使用
11	Sevoflurane	誘導 5-8%, 維持麻醉 2.5-4%	IH	於抽氣櫃內或通風良好處使用
	初生仔鼠（尚未長毛者）麻醉： ▪ Pentobarbital 5mg/kg, IP ▪ isoflurane ▪ 低溫麻醉			
止痛藥: 品系差異性大，需注意				
1	Morphine	2-5mg/kg, q4h	SC,IP	
2	Oxymorphine	0.15mg/kg, q4h	IM	
3	Butorphanol tartrate （Torbugesic™）	2.5-5mg/kg, q1-2h	SC	
4	Buprenorphine（Buprenex™）	2.0mg/kg, q12h	SC,IP	注射劑不得作為口服藥劑使用
5	Ketorolac	0.7-10mg/kg, q24h	PO	
6	Carprofen	5mg/kg, q24h	SC	
7	Meloxicam	1-2mg/kg,	SC	

IV:靜脈注射，IM:肌肉注射，SC:皮下注射，IP:腹腔注射，PO:口服，IH:吸入性，qXh:每 X 小時投藥

附件表 2-2 大鼠（RAT）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表

藥　劑		劑　量	投藥方式	備　註
動物保定/鎮靜/麻醉前給藥：進行注射、投藥、引起動物焦慮、低疼痛的實驗步驟或短時間保定時使用				
1	Atropine	0.04-0.1mg/kg	SC	
2	Diazepam（Valium™）	0.5-15mg/kg	IP	
3	Ketamine	22-50mg/kg	IM	
4	CO_2 + 10-50%O_2	To effect	IH	1.作用時間短 2.CO_2+ 10-50%O_2 混合氣體其作用時間較 短，且因兩種氣體密度不同，易造成 O_2 在鋼瓶上層、CO_2 在底部，導致氣體混合不均，需注意
動物麻醉：進行侵入性實驗步驟、外科手術、或其他引起動物疼痛的步驟時使用				
1	Pentobarbital	30-40mg/kg 30-60mg/kg	IV IP	1. 以低卡路里飼料飼養的公鼠需使用較高劑量 2. 重複注射時，會產生抗藥性 3. 存活性手術不建議使用
2	Thiopental （2.5%）	30-100mg/kg 30mg/kg	IP IV	
3	Ketamine	100-200mg/kg 50-100mg/kg	IM IP	建議使用於 minor surgery
4	Ketamine/Xylazine	50-100mg/kgK+10mg/kgX	IM,IP	1. Yohimbine（1-2mg/kgIP）,Tolazoline（20mg/k gIP）, Atipamezol（1mg/kgSC）為 Xylazine 拮抗劑 2. 如需追加劑量，使用 1/3 ketamine 劑量
5	Terazol™,Zoletil™	40mg/kg 20mg/kg	IP IM	測量麻醉深度之檢查如眼瞼反應、腳趾、喉頭反射等，在使用此藥劑時不適用
6	Zoletil/Xylazine	20-40mg/kgZ+5-10mg/kgX	IP	測量麻醉深度之檢查如腳趾反射，在使用此劑量時不適用，需注意
7	Ketamine/Medetomidine	60-75mg/kgK +0.25-0.5mg/kgM	IP	
8	Fentanyl/Fluanisone（Hypnorm™）/ Midazolam	Fentanyl/Fluanisone :1 注射用水:2Midazolam:1 混合,2.7-4.0ml/kg	IP	Buprenorphine, Butorphanol tartrate 為拮抗劑

附件表 2-2 大鼠（RAT）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表（續）

藥　劑		劑　量	投藥方式	備　註
9	Chloral hydrate（5%）	300-500mg/kg	IP	1. 建議經動物實驗管理委員會審查同意,確定有其科學研究之需求與依據,才得以使用本藥劑 2. 此藥劑對腹腔刺激性強,易造成腹膜炎及胃腸道異常蠕動,需注意
10	Isoflurane,	誘導 4-5%, 維持麻醉 1-3%	IH	於抽氣櫃內或通風良好處使用
	Sevoflurane	誘導 5-8%, 維持麻醉 2.5-4%	IH	於抽氣櫃內或通風良好處使用
11	初生仔鼠（尚未長毛者）麻醉： ▪ Pentobarbital 5mg/kg, IP ▪ isoflurane ▪ 低溫麻醉			
止痛藥				
1	Morphin	1.5-6mg/kg, q2-4h	SC	
2	Butorphanol tartrate（Torbugesic™）	2.5-5mg/kg, q1-2h	SC	
3	Buprenorphine（Buprenex™）	0.01-0.05mg/kg	SC,IP	注射劑不得作為口服藥劑使用
4	Ketorolac	3-5mg/kg, q12-24h 1 mg/kg, q12-24h	PO IM	
5	Carprofen	5mg/kg, q12h	SC	
6	Meloxicam	1 mg/kg,q24h	SC,PO	

IV:靜脈注射，IM:肌肉注射，SC:皮下注射，IP:腹腔注射，PO:口服，IH:吸入性，qXh:每 X 小時投藥

附件表 2-3 天竺鼠（GUINEA PIG）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表

藥　劑		劑　量	投藥方式	備　註
動物保定/鎮靜/麻醉前給藥：進行注射、投藥、引起動物焦慮、低疼痛的實驗步驟或短時間保定時使用				
1	Atropine	0.05mg/kg	SC	
2	Ketamine	22-30mg/kg	IM	肌肉注射後易出現自殘行為及肌肉潰爛，需注意
3	Diazepam	2.5-5.0mg/kg	IM	
4	Acetylpromazine	5-10mg/kg	IM,SC,IV	
5	Terazol™,Zoletil™	10-80mg/kg	IM,IP	鎮靜時間長
動物麻醉：進行侵入性實驗步驟、外科手術、或其他引起動物疼痛的步驟時使用				
1	Pentobarbital	15-40mg/kg	IP	存活性手術不建議使用
2	Thiopental	20mg/kg	IV	
3	Ketamine/Xylazine	44mg/kg K+5-13mg/kgX 27mg/kgK+0.6mg/kgX，配合局部投予 0.5ml 1% lidocaine+1:200,000 epinephrine	IM IM	1. Yohimbine（1-2mg/kgIP）,Tolazoline（20mg/k gIP）為 Xylazine 拮抗劑 2. 如需追加劑量，使用 1/3 ketamine 劑量
4	Fentanyl/Fluanisone（Hypnorm™）/ Midazolam	Fentanyl/Fluanisone :1 注射用水:2Midazolam:1 混合,8ml/kg	IP	Buprenorphine, Butorphanol tartrate 為拮抗劑
5	Terazol™,Zoletil™	60mg/kg, 配合局部投予 0.5ml 1% lidocaine + 1:200,000 epinephrine	IM,IP	建議使用於 minor surgery
6	Isoflurane,	誘導 4-5%, 維持麻醉 1-3%	IH	1. 剛吸入藥劑時天竺鼠易憋氣，需注意 2. 於抽氣櫃內或通風良好處使用
7	Sevoflurane	誘導 5-8%, 維持麻醉 2.5-4%	IH	1. 剛吸入藥劑時天竺鼠易憋氣，需注意 2. 於抽氣櫃內或通風良好處使用
止痛藥				
1	Butorphanol tartrate（Torbugesic™）	0.25-0.4mg/kg	SC,IV	
2	Morphine	2-10mg/kg, q4h	SC,IM	
3	Buprenorphine（Buprenex™）	0.05mg/kg, q8-12h	SC	
4	Aspirin	86mg/kg, q4h	PO	
5	Carprofen	2.5mg/kg, q24h	PO	

IV:靜脈注射，IM:肌肉注射，SC:皮下注射，IP:腹腔注射，PO:口服，IH:吸入性，qXh:每 X 小時投藥

註: 天竺鼠的盲腸可能影麻醉響藥物的吸收及效應

附件表 2-4 兔子（RABBIT）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表

藥劑		劑量	投藥方式	備註
動物保定/鎮靜/麻醉前給藥：進行注射、投藥、引起動物焦慮、低疼痛的實驗步驟或短時間保定時使用				
1	Glycopyrrolate	0.005-0.011mg/kg	IM	兔子有 atropine 水解脢，因此替代使用另一種 anticholinergics
2	Ketamine	15-50mg/kg	IM	肌肉注射後易出現自殘行為及肌肉潰爛
3	Ketamine/Acetylpromazine（10:1）	15-50mg/kg	IM	以 Ketamine 劑量計算之
4	Diazepam	5-10mg/kg	IM,IV	
5	Acetylpromazine	1.0-10mg/kg	IM,SC,IV	
6	Xylazine	5-10mg/kg	IM	
7	Butorphanol & Acetylpromazine	1mg/kg B 1mg/kg A	SC SC	
動物麻醉：進行侵入性實驗步驟、外科手術、或其他引起動物疼痛的步驟時使用				
1	Thiopental （2.5%）	15-30mg/kg	IV	需緩慢注射
2	Pentobarbital （3%）	15-40mg/kg	IV	需緩慢注射 存活性手術不建議使用
3	Pentobarbital/Chlorpromazine	先注射 2mg/kg C, 5-10 分鐘後注射 20-30mg/kg P	IM,IV	
4	Pentobarbital/Xylazine	先注射 5mg/kg X, 5-10 分鐘後注射 11.8-28.4mg/kg P	SC,IM IV	
5	Ketamine/Xylazine	35-50mg/kgK+5-10mg/kgX 10mg/kgK+3mg/kgX	IM IV	1. Yohimbine（0.2mg/kgIV）為 Xylazine 拮抗劑 2. 如需追加劑量，使用 3ketamine/Xylazine 劑量
6	Ketamine/Xylazine/Acetylpromazine	先注射 5-10mg/kgX,0.75mg/kg A , 5-10 分鐘後注射 35-50mg/kg K	IM	
7	Ketamine/Midazolam	先注射 1mg/kg M, 5-10 分鐘後注射 25mg/kg K	IM	
8	Ketamine/Diazepam	先注射 5-10mg/kg D, 5-10 分鐘後注射 15-50mg/kg K	IM	
9	Ketamine/Acetylpromazine Butorphanol	先注射 0.75mg/kg A, 0.1mg/kg B,5-10 分鐘後注射 35mg/kg K	IM	

附件表 2-4 兔子（RABBIT）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表（續）

藥劑		劑量	投藥方式	備註
10	Fentanyl/Fluanisone（Hypnorm™）/ Midazolam	先注射 0.3mg/kg Fentanyl/Fluanisone, 再注射 0.5-2mg/kg M	IM	Naloxone（0.005,0.01,0.1mg/kgIV）,Doxapram（5mg/kg） 皆可刺激呼吸反應
11	Isoflurane	誘導 4-5%, 維持麻醉 1-3%	IH	1. 剛吸入藥劑時兔子易憋氣，需注意 2. 抽氣櫃內或通風良好處使用
12	Ketamine/Xylazine/Isoflurane	先肌肉注射 35mg/kg K +5mg/kgX, 再以 Isoflurane 維持麻醉	IM IH	
止痛藥				
1	Morphine	2-5mg/kg, q2-4h	SC,IM	
2	Butorphanol tartrate（Torbugesic™）	0.1-0.5mg/kg, q4h 1.0-7.5mg/kg, q4h	IV SC,IM	
3	Buprenorphine（Buprenex™）	0.01-0.1mg/kg, q8-12h	SC,IM	
4	Flunixin meglumine（Banamine™）	1.1mg/kg, q12h	SC,IM	
5	Ketoprofen	3mg/kg, q12h	SC,IM	
6	Carprofen	1.5mg/kg, q12h 4mg/kg, q24h	PO SC	
7	Aspirin	100-500mg/kg	PO	
8	Meloxicam	0.2mg/kg, q24h	SC	

IV:靜脈注射，IM:肌肉注射，SC:皮下注射，IP:腹腔注射，PO:口服，IH:吸入性，qXh:每 X 小時投藥

註 ：1.兔子的盲腸可能影響麻醉藥物的吸收及效應。

2.兔子在恐懼或緊張時會停止動彈，呈現假死現象，需與藥物反應區別之。

附件表 2-5 狗（DOG）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表

藥　劑		劑　量	投藥方式	備　註
動物保定/鎮靜/麻醉前給藥：進行注射、投藥、引起動物焦慮、低疼痛的實驗步驟或短時間保定時使用				
1	Atropine	0.02-0.05mg/kg	SC,IM	
2	Diazepam（Valium™）	1-5mg/kg 0.2-0.6mg/kg	IM IV	
3	Acetylpromazine	0.055-0.11mg/kg	IM,SC,IV	
4	Xylazine	1-2mg/kg	IM,SC	
5	Medetomidine	0.1-0.8mg/kg	SC,IM,IV	
6	Terazol™,Zoletil™	6-12mg/kg	IM	
動物麻醉：進行侵入性實驗步驟、外科手術、或其他引起動物疼痛的步驟時使用				
1	Thiopental	10-35mg/kg	IV	1. 前 1/2 劑量迅速注射, 後 1/2 劑量緩慢注射 2. 存活性手術不建議使用
2	Pentobarbital	20-30mg/kg	IV	前 1/2 劑量迅速注射, 後 1/2 劑量緩慢注射
3	Ketamine/Xylazine	先注射 1-2mg/kgX , 5-10 分鐘後注射 10-25mg/kgK	IM	1. Yohimbine（0.2mg/kgIV）為 Xylazine 拮抗劑 2. 如需追加劑量, 使用 1-2mg/kg ketamineIV, 或 1/3-1/4 原劑量 Ketamine IM
4	Ketamine/Midazolam	先注射 0.5mg/kg M, 5-10 分鐘後注射 10mg/kg K	IV	短時間麻醉
5	Ketamine/Diazepam	先注射 0.5mg/kg D, 5-10 分鐘後注射 10mg/kg K	IV	短時間麻醉
6	Ketamine/ Acetlypromazine	先注射 0.1mg/kg A, 5-10 分鐘後注射 2-4mg/kg K	IV	短時間麻醉
7	Terazol™,Zoletil™/Xylazine	8mg/kg Zoletil+0.5mg/kg X	IM	
8	Terazol™,Zoletil™	6-10mg/kg 3-7mg/kg	IM IV	2-3mg/kg IV 追加麻醉
9	Propofol/ Isoflurane	先靜脈注射 6mg/kg P , 再以 Isoflurane 維持麻醉	IV IH	可長時間麻醉
10	Thiopental 或 Thiamylal/ Isoflurane	先靜脈注射 8-12mg/kg T , 再以 Isoflurane 維持麻醉	IV IH	可長時間麻醉
11	Isoflurane	誘導 4-5%, 維持麻醉 1-3%	IH	1. 可長時間麻醉 2. 於通風良好處使用

附件表 2-5 狗（DOG）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表（續）

藥　劑		劑　量	投藥方式	備　註
止痛藥				
1	Morphine	0.1-1mg/kg, q4h	SC,IM	
2	Butorphanol tartrate（Torbugesic™）	0.2-0.4mg/kg, q4h	SC,IM	
3	Buprenorphine（Buprenex™）	0.005-0.02mg/kg, q8h	SC,IM	
4	Flunixin meglumine（Banamine™）	0.5-2.2mg/kg	IM,IV	
5	Carprofen（Rimadyl™）	4mg/kg, q24h, 1-2mg/kg, q12h	IV,SC, PO	
6	Aspirin	10-20mg/kg, q8h	PO	
7	Meloxicam	0.2mg/kg, 之後維持 0.1mg/kg, q24h	IV,SC,PO PO	
8	Paracetamol（Acetaminophen）	15mg/kg, q6-8h	PO	
9	Fentanly	0.001-0.005mg/kg, q0.5h, 0.003-0.01mg/kg/hr, 3-10kg:25　g/hr; 10-20kg:50　g/hr; 20-30kg:75　g/hr; 30kg:100　g/hr;	IV bolus, 持續輸液皮下貼片	

IV:靜脈注射，IM:肌肉注射，SC:皮下注射，IP:腹腔注射，PO:口服，IH:吸入性，qXh:每 X 小時投藥

附件表 2-6 豬（SWINE）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表

藥　劑		劑　量	投藥方式	備　註
動物保定/鎮靜/麻醉前給藥：進行注射、投藥、引起動物焦慮、低疼痛的實驗步驟或短時間保定時使用				
1	Atropine	0.05mg/kg	SC,IM	
2	Diazepam（ValiumTM）	0.5-10mg/kg 0.44-2mg/kg	IM IV	
3	Acetylpromazine	1.1-2.2mg/kg	IM	
4	Xylazine	2mg/kg	IM	
5	Midazolam	0.1-0.5mg/kg	IM,IV	
6	Terazol™,Zoletil™	2-4mg/kg	IM	
動物麻醉：進行侵入性實驗步驟、外科手術、或其他引起動物疼痛的步驟時使用				
1	Thiopental	6.6-30mg/kg	IV	前 1/2 劑量迅速注射, 後 1/2 劑量緩慢注射
2	Pentobarbital	20-40mg/kg	IV	前 1/2 劑量迅速注射, 後 1/2 劑量緩慢注射 存活性手術不建議使用
3	Ketamine/Xylazine	先注射 2mg/kg X, 5-10 分鐘後注射 20mg/kg K	IV IM	1. Yohimbine（1mg/kgIV）為 Xylazine 拮抗劑 2. 如需追加劑量，使用 1-2mg/kg ketamine IV，或 1/3-1/4 原劑量 Ketamine IM
4	Ketamine/Medetomidine	先注射 0.2mg/kg M, 5-10 分鐘後注射 10mg/kg K	IM	Atipamezole（1mg/kgIV） 為 Medetomidine 拮抗劑
5	Ketamine/Diazepam	先注射 2mg/kg D, 5-10 分鐘後注射 15mg/kg K	IM	
6	Ketamine/ Midazolam	先注射 0.5mg/kg M, 5-10 分鐘後注射 33mg/kg K	IM	
7	Ketamine/ Acetlypromazine	先注射 11mg/kg A, 5-10 分鐘後注射 33mg/kg K	IM	
8	Terazol™,Zoletil™	6-8.8mg/kg	IM	1-2mg/kg IV 追加麻醉
9	Terazol™,Zoletil™/Xylazine	先注射 2mg/kg X, 5-10 分鐘後注射 4.4mg/kg Zoletil		適合吸入性麻醉前之誘導麻醉
10	Isoflurane	誘導 4-5%, 維持麻醉 1-3%	IH	1. 誘導麻醉後使用 2. 可長時間麻醉

附件表 2-6 豬（SWINE）鎮靜、麻醉及止痛藥物參考劑量表（續）

藥　劑		劑　量	投藥方式	備　註
12	非存活手術用組合	麻醉前給藥：Atropine0.5mg/kg IM, Ketamine 33mg/kg IM, Acepromazine 1.1mg/kg IM 誘導：Pentobarbital 20-40mg/kg IV 或 Thiopental 6.6-25mg/kg IV 麻醉維持：Pentobarbital 5-15mg/kg/hr IV 或 Thiopental 3.0-6.0mg/kg/hr IV		
13	存活手術用組合	麻醉前給藥：Atropine0.05mg/kg IM, Ketamine 33mg/kg IM, Acepromazine 1.1mg/kg IM 誘導：Isoflurane（4-5% ）面罩 麻醉維持：Isoflurane （0.5-20.% ）/ Nitrous Oxide （50%O_2+50%N_2O）		
14	Cardiopulmonary Bypass 用組合	麻醉前給藥：Fentanyl 30-50μg/kg IV 或 Sufentanyl 7-15μg/kg IV 誘導：Fentanyl 50-100μg/kg/hr IV 或 Sufentanyl 10-30μg/kg/hr IV 麻醉維持：Isoflurane（0.25-0.5% ）		
止痛藥				
1	Butorphanol tartrate（Torbugesic™）	0.1-0.3mg/kg, q4-6h	IM,SC	
2	Meperidine	2-10mg/kg, q4h	IM	
3	Buprenorphine（Buprenex™）	0.05-0.1mg/kg, q8-12h	IM	
4	Oxymorphine	0.15mg/kg, q4h	IM	
5	Aspirin	10mg/kg, q4-6h	PO	
6	Carprofen	2-4mg/kg, q24h	IM ,IV,SC	
7	Ketoprofen	3mg/kg, q24h	IM,SC	

IV:靜脈注射，IM:肌肉注射，SC:皮下注射，IP:腹腔注射，PO:口服，IH:吸入性，qXh:每 X 小時投藥

附件二 參考資料

1. BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. 2003. Lab Animals. 37 （Suppl.1）
2. Terrance Hawk et. al., 2005. Formulary for Laboratory Animals. 3rd edition. Blackwell Publishing.
3. Dennis F. Kohn. et.al., 1997. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. Academic Press.
4. National Health and Medical Research Council. Australian Government.2008. Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes. Assessment and Alleviation of Pain and Distress in Research Animals. Available at: www.nhmrc.gov.au.
5. NIH Anesthesia and Analgesia Formulary. 2005. NIH

附件三 中英名詞對照表

1-10

1,1,1-Trichloro-2-methyl-2-propanol hemihydrate 2-三氯甲基-乙-丙醇 P.219
2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) 2,4-二硝基氯苯 P.31
3-aminobenzoic acid ethyl ester 3-氨基苯甲酸乙酯 P.219
5/6th partial nephrectomy（5/6th PNx）5/6 部分腎臟切除術 P.83,87

A

Aorta ascendens constriction （AAC）上行主動脈綁紮 P.85
Abdominal Aortic Aneurysms（AAA）腹腔動脈瘤 P.89-91
Acepromazine 乙酰丙嗪 P.249,250,287,297
Acetaminophen 乙醯氨基酚 P.243,244,295
Acetate 乙酸酯 P.34
Acetic acid-induced writhing test 醋酸誘導腹壁扭曲測試 P.68
Acetic acid 醋酸 P.64,68
ACLT 前十字韌帶橫切術 P.107
A critical size defect 受損缺陷大小 P.142
Acute respiratory distress syndrome（ARDS）急性呼吸窘迫症 P.38
Acute toxic unit（TUa）急毒性單位 P.155
Acute Toxicity Test 急毒性試驗模式 P.155
Adrenergic receptor 腎上腺素受體 P.84
Adverse effect test 副作用測試 P.73
Aldehydes 醛類 P.234,237
Alfentanil 阿芬太尼 P.243
Allodynia 異常性疼痛 62,63
Aluminum 鋁 P.140
Alumium oxide 氧化鋁 P.138
Amaranthus inamoenus 白莧（杏）菜 P.166
American Association for Laboratory Animal Science（AALAS）美國實驗動物學會 P.285
American College of Laboratory Animal Medicine（ACLAM）美國實驗動物醫學學院 P.286
American Veterinary Medical Association（AVMA） 美國獸醫師協會 P.19,286
Ammonia 氨 P.186
Amputation 截肢，切除身體部位、切斷術 P.222,232
Amyloid plaque 類澱粉蛋白斑塊 P.45,48,49
amyloid precursor protein（APP）前類澱粉蛋白質 P.45
Analgeometer 疼痛測試儀 P.64
Analgesics 止痛藥 P.8,13,15-19,62,65,141,234-243,267,269,282,287-297
Analogy 相似功能 P.24
Anesthesia 麻醉 P.245,246
Anesthetic Agents 麻醉劑 P.12,207-208,217,219,221,224,228,230,231,233,245-249,251,276,280

Anesthetic chamber 麻醉腔室 P.246
Angiotensin II 血管收縮素 II P.79,90
Animal models of Respiratory Inflammation Diseases 呼吸道發炎動物模式 P.36
Animal use protocol 動物實驗計畫書 P.6.22,231
Animal Welfare Information Center（AWIC） 動物福祉資料中心 P.286
Anorexia 厭食症 P.242
Anterior cruciate ligament 前十字韌帶 P.72
Anthracycline 蒽環黴素 P.87,88
Anticholinergics 抗膽鹼能藥 P.249,292
Anura 無尾類 P.165,166,169,219
Aortic arch 主動脈弓 P.79,131
Aortic polyethylene catheter 主動脈埋置聚乙烯導管 P.131
ApoB 載脂蛋白 B P.78
ApoE -/- 小鼠 載脂蛋白 E 缺陷小鼠 P.46,77-80,90
Apoptosis 凋亡細胞 P.131
Apyrogenicity 無發熱性 P.117
Aqueous deficient 分泌不足型 P.133
Arachidonic acid 花生四烯酸 P.33
Areas at risk 風險區域 P.84
Asia Pacific Society of Infection Control（APSIC）泛太平洋感染控制學會 P.9
Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations（AFLAS）亞洲實驗動物科學聯合會 P.286
Aspirin 阿斯匹林 P.244,291,293,295,297
Assessing harms and benefits 損害及效益分析 P.11
Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International（AAALAC International）國際實驗動物管理評鑑及認證協會 P.285
Asthma 氣喘 P.36,37
ASTM 美國測試與材料學會 P.142
Atherosclerosis 動脈粥樣硬化 P.26,76-82,89,90,130-132,150,152
Atherosclerotic plaque 動脈粥樣硬化斑塊 P.77,81,82,89,130,131
Atopic dermatitis 異位性皮膚炎 P.31
Atopic-like dermatitis 類異位性皮膚炎 P.31,32
Atropine sulfate 硫酸阿托品 P.207
Autoimmune disease 自體免疫疾病 P.51,52,133
Auto-reactive T cells 自體反應 T 細胞 P.29
Avoidance of evoked Stimuli 避免誘發刺激 P.65
Axolotl（*Ambystoma mexicanum*）墨西哥鈍口螈 P.165,167,168,281

B

Bacterial spore 細菌孢子 P.236
Balloon angioplasty 氣球擴張血管成形術 P.82,131
Barbiturates 巴比妥類藥物 P.249
Benzodiazepine 苯二氮卓類 P.250
Bile duct cannulation（BDC） 膽管導管 P.257,258

Bioactive materials 生物活性材料 P.139
Biocompatibility 生物相容性 P.138,139
Bioinert 生物鈍性 P.138,139
Biopsy 活組織檢查 P.232,289
Biotolerant material 生物可忍受性材料 P.138,139
Blood Collection 抽血 P.225
Bone marrow aspirate 骨髓抽吸 P.232
Bowman's layer 鮑曼層 P.134,
Blood pressure （BP） 血壓 P.101
Bregma 前囟門 P.267,268
Bronchoalveolar lavage fluid（BALF） 支氣管肺泡沖洗液 P.36
BSE 牛海綿樣腦病 P.24
Bufo arenarum 沙棲蟾蜍 P.165
Bulldog clamps 鬥牛犬鉗 P.268
Bupivacaine 布比卡因 P.251
Buprenorphine 丁基原啡因、丁丙諾啡 P.243,262,288-291,293,295,297
Butorphanol tartrate 酒石酸布托啡諾 P.244,289-291,293,295,297

C

Calibrated forceps 校準鑷子 P.64
Canine Model in Cartilage Repair 關節軟骨受損修復實驗犬模式 P.141
Capsaicin 辣椒素 P.33,64
Carbon dioxide 二氧化碳 P.186,208,246,248,
Carcinogen-induced tumor models 致癌物誘發腫瘤模式 P.42
Carprofen 卡洛芬 P.244,288,290,291,293,295,297
Carrageenan-induced 卡拉膠誘導 P.68
Casting 包紮/上石膏 P.231
Cathepsins 組織蛋白酶 P.90
Catwalk 伸展台 P.64
Cauterizing 燒灼 P.240,270,281,282
CDX/PDX + Humanized immune system mice 腫瘤移植免疫擬人鼠模式 P.41
Ceiling effect 天花板效應 P.243
Cell line-derived xenograft（CDX） 細胞株異種移植模式 P.41
Central ear artery 耳中央動脈 P.194
Cephalic vein 頭靜脈 P.179,200
CETP 膽固醇酯轉運蛋白 P.80
CFA-induced 完全弗氏佐劑誘導 P.68
Charles River Laboratories 查理斯河實驗室 P.284
Chemical disinfectants 化學消毒劑 P.236
Chemically induced tumor models 化學藥品誘導腫瘤模式 P.145
Chemotaxis 趨化性 P.130
Chitosan 甲聚醣 P.143
Chlorhexidine 氯己定、克羅希西定 P.128,235,237,239,282
Chlorine dioxide 二氧化氯 P.235-237

Cholelithiasis 膽石病 P.257
Choline-Deficient L-Amino Acid-defined Diet（CDAA） 膽鹼缺乏性左旋氨基酸飲食 P.59
Chondrogenic cells 軟骨胚胎細胞 P.143
Chronic obstructive pulmonary disease（COPD） 慢性阻塞性肺病 P.36-38
Chronic Renal Failure（CRF） 慢性腎衰竭 P.261
Chymopapain 乳糜蛋白酶 P.107
CKD 慢性腎功能衰竭 P.87
Closed fracture 閉合性骨折 P.107
Clove oil 丁香油 P.219,281
Cobalt-chromium-molydenum 鈷鉻鉬合金 P.139
Codeine 可待因 P.243
COL2A1 第二型膠原蛋白 P.106
COL9A1 第九型膠原蛋白 P.106
Collagen fibrils 膠原蛋白纖維 P.135
Collagenase 膠原酶 P.91,107
Columnar cells 柱狀細胞 P.134
Complex life cycle 複雜生活史 P.165
Condition 調適 P.118
Contact dermatitis 接觸性皮膚炎 P.31-35
Contact lens use 使用隱形眼鏡 P.133
Corneal reflex 角膜反射 P.186
Coronary arteries 冠狀動脈 P.26,76,79,81-84,89,94,115,131,150
Corticosteroid 皮質類固醇 P.107
Crohn's disease（CD）克隆氏症 P.28
Croton oil 巴豆油 P.33
Cut-off time 終止時間 P.63
CVA 尾側內側動脈、尾部尾側動脈 P.102,103
CVP 中心靜脈壓 P.253
Cyprinus carpio 鯉魚 P.155

D

Danio rerio 斑馬魚 P,154-159,161-163,165,167,222,227,229,230,232,235,237,238,284,287,292
DCM 擴張性心肌病 P.26,83,86,87
Dead space 死區 P.248
Deoxycorticosterone acetate salt 去氧皮質酮醋酸鹽 P.97
Dermatitis 皮膚炎 P.31
Dermatophagoides farinae（DF）塵蟎過敏原 P.31,32
DerP 塵蟎蛋白 P.36
Descemet membrane 戴氏膜 P.134,135
Descending thoracic aorta 胸降主動脈 P.131
Destabilization of the medial meniscus（DMM）內側半月板切除術 P.107
Dextran sulfate sodium（DSS）葡聚糖硫酸 P.29

Diabetes Mellitus（DM）糖尿病 P.51,152
Dibromoacetaldehyde 二溴乙醛 P.251
Diclofenac 雙氯芬酸 P.244
Dihydrocodeine 二氫可待因 P.243
Disinfectants 消毒劑 P.234-236
Disorientation 方向定向障礙 P.245
Dissociative agents 解離劑 P.249
Desoxycorticosterone（DOCA）去氧皮質酮 P.97,98
Dolorimeter 測痛計 P.64
Dominant negative 顯性抑制 P.106
Dorsal aorta 背主動脈 P.225
Dorsal recumbency 背側躺 P.186
Doxorubicin，Adriamycin（DOX）艾黴素 P.87,88
Draize Test 德萊茲測試 P.123
Dystrophin 肌營養不良蛋白 P.86,88

E

Ear vein 耳靜脈 P.118,210,218
Efferocytosis 胞葬作用 P.131
Ejection Fraction（EF）收縮分率 P.76
Elastase 彈性蛋白酶 P.37,89-91
Ellegaard Göttingen Minipigs 丹麥哥廷根小型豬 P.292
EMLA cream 安麻樂乳膏 P.260
Endochondral ossification 軟骨內成骨 P.143
Endothelium 內皮 P.134,135
Endoscopic Retrograde Cholangio-Pancreatography（ERCP）內視鏡逆行性膽胰管攝影術 P.266
Engineering standards 技術規範 P.6
Enucleation 眼球摘除 P.240
Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）酵素免疫分析法 P.120
Epithelium 上皮 P.134
Epitope 或 antigenic determinant 抗原決定 P.126,127
Epon 環氧樹脂 P.80
Erythema 皮膚紅斑 P.30,122-124
Eschar 痂皮 P.122,123
ESRD 終末期腎病 P.87
Estrogens 雌性素 P.159
Ethylene oxide gas（EO）環氧乙烷氣體 P.243
European Center for the Validation of Alternative Methods （ECVAM） 歐洲替代方法驗證中心 P.120
Evans blue dye 伊文思藍染料 P.84
Evaporative 過度揮發型 P.133
Extracellular matrix（ECM）細胞外基質 P.90,91,106
Eye Irritation Test 眼刺激試驗 P.123

F

Failure with reduced ejection fraction（HFrEF）低收縮分率心衰竭 P.76
Familial hypercholesterolemia 家族性高膽固醇血症 P.77,82,132
FDA 美國食品藥物管理局 P.120,122,124,224,271
Federation of European Laboratory Animal Science Associations（FELASA） 歐洲實驗動物科學學會聯盟 P.294
Femoral condyle 股骨髁 P.72,142
Fenoprofen 非諾洛芬 P.252
Fentanyl 芬太尼 P.251,252,259,296,297,299,302,306
Fibromyalgia 纖維肌痛 P.63
Filaments 纖維絲 P.62,62,66,67,69-73
Fluanisone 氟尼松 P.259,296,297,299,302
Flunixin meglumine 氟尼辛葡甲胺 P.253,302,304
Fluorescein Staining on Ocular Surface 螢光染液滴入眼球表面 P.136
Foam-cell 泡沫細胞 P.78,152
Formaldehyde 甲醛 P.244
Formalin 福馬林 P.59,63,66,67,139
Frontal temporal dementia 額顳葉型失智症 P.45
Full-thickness chondral defects 全厚度的軟骨缺損 P.143
Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments（FRAME） 英國動物醫學試驗替代基金會 P.294
Fungi 真菌 P.117,244

G

Gangliosidosis 神經節苷脂沉積症 P.22
Gastrointestinal motility 胃腸道蠕動能力 P.73
Gene knock-in 基因嵌入 P.27
Gene transgenic 基因轉殖 P.27
Genetic knock-out（KO） 基因剔除 P.6,20,22,27,84,86,100,101
Genetic manipulations 基因改造 P.131
Genetically engineered mice 基改小鼠 P.146
Germ Free（GF）無菌 P.27
Glial cell 神經膠細胞 P.44,46
Glucocorticoids 醣皮質激素 P.97.111
Glucose tolerance test 葡萄糖耐量測定 P.54
Glutaraldehyde 戊二醛 P.242,244
Gluteal muscle 臀肌 P.179
Glycopyrrolate 格隆溴銨 P.258,301
Goblet cells 杯狀細胞 P.35,36,133,134
Green fluorescent protein（GFP）綠螢光蛋白 P.159,165
Growth factor 生長因子 P.41,106,143

H

Haematoxylin-eosin stain（H&E stain） 蘇木紫－伊紅染色 P.59,60
Halothane、Fluothane 氟烷 P.213,255
Heart failure with preserved ejection fraction（HFpEF）正常收縮分率心衰竭 P.76
Hemangiosarcoma 血管肉瘤 P.146
Heterogeneity 異質性 P.41,78,94,117,146
Heterozygous 異型合子 P.106
High-cholesterol diet（HCD） 高膽固醇飲食 P.58,59,78,89
High-fat diet（HFD） 高脂飲食 P.54,56-58
Histamine 組織胺 P.36,243
Homology 同質性 P,24
Homozygous 同型合子 P.106
Hormonal changes 荷爾蒙代謝變化 P.133
Horseshoe crabs 馬蹄蟹 P.119
Hot plate test 熱板測試 P.63,65,66
House dust mite extract-induced allergic asthma 塵蟎萃取物誘發氣喘動物模式 P.37
HR 心率 P.102,103,246,249,253,267
Human tumor-immune cell xenografts 人體腫瘤免疫細胞之異種移植宿主 P.146
Humanized mice 擬人化小鼠 P.146
Hybridoma 融合瘤 P.127
Hydrobromic acid 氫溴酸 P.251
Hydrogen peroxides 過氧化氫 P.236
Hynobius fuca 觀霧山椒魚 P.169,219,220
Hyperalgesia 痛覺過敏 P.62,63
Hyperleptinemia 高瘦素血症 P.54
Hypertensive Animal Model 高血壓動物模式 P.94
Hypothermia 低溫 P.246

I

IACUC.ORG 實驗動物管理使用委員會資料中心 P.286
Ibuprofen 布洛芬 P.244
Imiquimod 咪喹莫特 P.34,35
Immunizing antigen 免疫抗原 P.127
Immunocompromised mice 免疫功能不全的小鼠 P.146
Implantation of central devices 植入中央裝置 P.232
In vitro test 體外試驗 P.124
In vivo test 活體試驗 P.124
Inbred 近交品 P.111,145,146
Indomethacin 吲哚美辛 P.244
Induction 誘導 P.251
Inflammatory Bowel Disease Models 發炎性腸道疾病動物模式 P.28
Inflammatory bowel disease（IBD） 發炎性腸道疾病 P.28
Inflammatory pain model 炎症性疼痛模式 P.67
Inflammatory pain 炎症性疼痛 P.62,67
Inhalant anesthetics 吸入麻醉劑 P.246

Initial temperature 初始溫度 P.118
Injectable anesthetics 注射麻醉劑 P.248
Innocuous stimuli 無害的刺激 P.62
Institutional Animal Care and Use Committee（IACUC）實驗動物照護及使用委員會或小組 P.4,6,7,10,,11,22,127,173,231,234,242
Instrument preparation 器械準備 P.235
Insulin resistance 胰島素抗性 P.51
Integrin receptors 整合素受體 P.91
Interagency Coordinating Committee on Validation of Alternative Methods（ICCVAM）機構間替代方法驗證協調委員會 P.120
Interleukin-6 白血球介素-6 P.120
International Council for Laboratory Animal Science（ICLAS） 國際實驗動物委員會 P.286
InterNICHE 國際人道教育聯網 P.286
Intracoelomic injection 腔內注射 P.220
Intracutaneous Irritation Test 皮內刺激試驗 P.123
Intra-operative procedures 術中程序 P.8,234,241
Intraperitoneal Injection into Adult Zebrafish 斑馬魚腹腔注射試驗 P.223
Intrathecal 鞘內 P.72,243
Invasive blood pressure（IBP）侵入式血壓 P.101
Iodophors 碘伏膏 P.239
Isoflurane 異氟烷 P.205,207,208,247,288,290,291,293,294,296,297
Isopropyl alcohol 異丙醇 P.234,237
Isoproterenol 異丙腎上腺素 P.83,84
Isotonic fluids 等張溶液 P.240

J

Jackson Laboratory 傑克森實驗室 P.284
Jugular groove 頸溝 P.20
Jugular vein 頸靜脈 P.101,200,205,206,207,210,262,263
Juvenile 亞成體 P.165

K

Ketamine、Ketaset 氯胺酮、K 他命 P.249,250,287-297
Ketoprofen 酮洛芬 P.244,293,297
Ketorolac 酮咯酸 P.244,288,290
Knock-out 基因剔除 P.28,42,132

L

Lacrimal gland 淚腺 P.133,134,136
Lancet 刺胳針 P.190
Laparoscopy 腹腔鏡檢查 P.232
Larva 幼體 P.165
Latency 所需的時間 P160

Lateral saphenous vein 外隱靜脈 P.179,194,200
Lateral tail vein 側尾靜脈 P.179
LDL receptors 低密度脂蛋白受體 P.77,78,132
LDLR -/- apoE -/-雙缺陷小鼠 P.78
Low-density lipoprotein（LDL）低密度脂蛋白 P.77,78,82,153
Leptin resistance 瘦素抗性 P.54
Leptin 瘦素 P.53,58,78
Leucine repeat kinase 2（LRRK2）P.47
Lewy-Bodies 路易氏體 P.47
Lichenification 苔蘚化 P.31
Lidocaine 利多卡因 P.250,251,291
Ligation of the common bile duct 膽管結紮 P.8,253,257
Light scattering 光散射 P.134
Lipopolysaccharide（LPS） 脂多醣 P.37,117
Lipoteichoic Acid（LTA） 革蘭氏陽性細菌的脂磷壁酸 P.117
Liver Biopsy 肝臟活體組織檢查 P.259
L-NAME L-精氨酸甲酯 P.97
Local anesthetic agents 局部麻醉劑 P.251
Localized non-specific inflammatory response 局部非特異性炎症反應 P.122
Locomotor activity 活動能力 P.65,73
Low back pain 下背部疼痛 P.73
Lung carcinoma 肺癌 P.42,146
Lysol 來舒 P.235

M

Macrophage 巨噬細胞 P.66,81,82,90,107,126
Macrovesicular hepatic steatosis 肝臟大囊泡性脂肪變性 P.58
Main test 主試 P.118
Major Surgery 重大手術 P.8,15,231,233
Major survival Surgery 重大存活性手術 P.231,232,234
Malignant hyperthermia 惡性高熱 P.208
Malignant mast cell tumors 惡性肥大細胞瘤 P.146
Mammary carcinoma 乳腺癌 P.146
MAP 平均動脈壓 P.91,102,103,253
Marek's disease 馬立克病 P.24
Marfan syndrome（MFS） 馬凡綜合症 P.91
Marginal ear vein 耳緣靜脈 P.179,194
Marshall Bioresources 美國馬歇爾公司 P.284
Mast cells 肥大細胞 P.90
Matrix metalloproteinases（MMPs）基質金屬蛋白酶 P.90,91,106
Mechanical allodynia 機械性異常性疼痛 P.67-73
Medetomidine 美托咪定 P.250,288,289,294,296
Medial femoral condyle 股骨內髁 P.143
Medial forebrain bundle 前腦內側神經束 P.48

Melanoma 黑色素瘤 P.42,146
Meperidine 配西汀、哌替啶 P.243,297
Mesenchymal stem cells 間葉幹細胞 P.143
Methacholine 甲膽鹼 P.36
Methanol 甲醇 P.158,164,221
Methionine and choline deficient （MCD） 甲硫氨酸和膽鹼缺乏 P.58-60
Methods of anesthesia 麻醉方法 P.101,231,246
Micro Dumont tweezers 顯微杜蒙特鑷子 P.270
Microglia cells 微膠細胞 P.45,46
Microhyla fissipes 小雨蛙 P.165,166
Microplate 微量多孔盤 P.120
Midazolam 咪達唑侖 P.250,251,288,289,291-296
Migraine Model 偏頭痛模式 P.72
Minor Surgery 次要手術或小型手術 P.8,231,287,289,291
Minor survival Surgery 小型存活手術 P.231,234,238
Moderate 中度 P.124
Mono Sodium Iodoacetate（MIA）碘醋酸單鈉 P.71
Monoclonal antibody 單株抗體 P.127
Monocyte Activation Test（MAT）單核細胞活化測試 P.119
Monoiodoacetate 單碘乙酸鹽 P.107
Monogenic 單基因的 P.53
MRI 核磁共振 P.49,77,80,82,143
Multivalent antigen 多價抗原 P.127
Muscle tone 肌肉張力 P.207,245,249,281
Mycobacterium tuberculosis 結核分枝桿菌 P.236
Myofascial pain 肌筋膜疼痛 P.64

N

Nalbuphine 納布啡 P.243,250
Naloxone 納洛酮 P.244,250,293
Naproxen 萘普生 P.244
Necrosis 壞死 P.123
Negative or non-reactive models 負模式 P.24
Neointima 新生內膜 P.80,81
Neurofibrillary tangle 神經纖維糾結 P.45,46,48,49
Neuroleptanalgesics 神經安定止痛劑 P.250
Neuron 神經元細胞 P.45
Neuropathic pain model 神經性疼痛模型 P.69
Neutrophilia model 嗜中性球增多模式 P.38
Nitrogen exposure 氮暴露 P.82,131
Nitrous oxide 笑氣、一氧化二氮 P.248,297
Nociceptive pain model 感受性疼痛模式 P.65
Nociceptors 感受器 P.65
Non-alcoholic fatty liver disease（NAFLD） 非酒精性脂肪性肝病 P.57,58

Non-alcoholic steatohepatitis（NASH） 非酒精性脂肪性肝炎 P.57,58,59
Non-Hodgkin's lymphoma（NHL）非霍奇金淋巴瘤 P.146
Non-Human Primate（NHP） 非人類靈長類動物 P.132,146
Non-invasive blood pressure（NIBP）非侵入式血壓 P.101
Non-keratinized stratified epithelium 非角化複層細胞 P.134
Non-obese diabetic（NOD） 非肥胖糖尿病 P.42,52
Non-rebreathing system 非再呼吸系統 P.248
Non-steroidal anti-inflammatory Drug（NSAID）非類固醇抗發炎藥 P.67,110,244
Non-survival or terminal surgery 非存活性手術 P.15,172,233
Noxious stimuli（hyperalgesia）有害的刺激 P.62
Nitric oxide（NO）一氧化氮 P.97,101
New Zealand White（NZW）紐西蘭大白兔 P.114,131,249

O

Obstructive jaundice 阻塞性黃疸 P.257
Occlusive pressure 阻塞壓力 P.102
OECD Guidelines 經合組織準則 P.124
Oedema 水腫 P.33-35,86,96,107,122-124,135,260
Oligomer 寡聚物 P.46
Open drop method 開放式滴注方法 P.248,249
Open fracture 開放性骨折 P.107
Opioids 鴉片類藥物 P.67,243
Oral irritation test 口腔刺激試驗 P.123
Organization for Economic Cooperation and Development（OECD）經濟合作暨發展組織 P.155,156
ORIENTAL YEAST CO., LTD 日本東方酵母有限公司 P.284
Orotracheal intubation 氣管插管 P.253,264,265
Orphan models 孤兒模式 P.24
Oryctolagus cuniculus 穴兔 P.114
Osseointegration 骨整合 P.138,139
Osteoarthritis Pain 骨關節疼痛 P.71,72
Osteoarthritis（OA）骨關節炎 P.64,71,105,107,244
Osteosarcoma 骨肉瘤 P.146
Outbred 雜交品系 P.111,146
Ovalbumin-induced allergic asthma 卵蛋白素誘發氣喘動物模式 P.36
Ovalbumin 卵蛋白素 P.36,37
Ovariectomy 卵巢切除術 P.263
Oxazolone 噁唑酮 P.30,34
OxLDL 氧化低密度脂蛋白 P.130
Oxycodone 羥二氫可待因酮、羥考酮、羥可酮 P.243
Oxymorphone 羥嗎啡酮 P.243

P

Paclitaxel 紫杉醇 P.71

Pain management 疼痛管理 P.19,242
Palpebral reflex 眼瞼反射 P.18,207,287
Papain 木瓜蛋白酶 P.107
Partial Hepatectomy 肝部分切除 P.59
Partial thickness and full thickness chondral repair 部分及全厚度軟骨修復 P.144
Patient-derived xenograft（PDX）病患腫瘤異種移植模式 P.41
Patient-derived xenografts 病患之異種移植 P.146
Paw guarding 腳掌防護 P.64
Pentobarbital（Nembutal）戊巴比妥 P.101,249
Pentozocine 潘他唑新 P.243
Peracetic acid 過乙酸 P.236
Performance standards 效能標準 P.6
Peripheral vessel cannulation 周邊血管插管 P.232
Phenolics 苯酚類 P.235
Phenotype 表現型 P.62
Phenylquinone（PQ）-induced writhing test 苯醌誘導腹壁扭曲測試 P.69
Phenylquinone 苯醌 P.64
Phorbol 12-myristate 13-acetate 佛波醇 12-肉荳蔻酸酯 13-乙酸酯 P.34
Pilot Study 先期實驗 P.12
PKC-β2 蛋白激酶 C-β2 P.86
Plantar test 腳底熱刺激測試 P.63
Plantaris muscle 蹠肌 P.67
Plasma cells 漿細胞 P.126,127
PLGA 聚乳酸-甘醇酸 P.143
Plug 栓塞 P.273
Poikilothermic 變溫的 P.246
Polyclonal antibody 多株抗體 P.126-127
Polygene 多基因 P.25
Polymethylmethacrylate（PMMA） 聚甲基丙烯酸甲酯 P.138
Polypedates megacephalus 斑腿樹蛙 P.220
Porcine pancreatic elastase （PPE） 豬胰臟彈性蛋白酶 P.38
Positive-control substance 正控制組 P.124
Post-operative management 術後管理 P.241
Post-operative pain 術後疼痛 P.64
PPAR 過氧化物酶體增殖物激活受體 P.78,90
Precision vaporizers 精密蒸發器 P.248
Preemptive analgesia 先發性止痛 P.238
Preliminary test 或 Sham test 虛擬測試 P.118
Preparation and injection of the product 產品的製備和注射 P.118
Pre-screen 先行方法 P.163
Primary hyperalgesia 原發性痛覺過敏 P.63
Proliferation rates 增殖率 P.130
Prostate carcinoma 前列腺癌 P.146
Proteoglycan 蛋白聚糖 P.106

Proteolytic enzyme 蛋白水解酵素 P.107
Protocol 計畫 P.22,231
Pseudorasbora parva 羅漢魚 P.155
PTEN-induced putative kinase 1（PINK1） P.47
Pupil aperture 瞳孔大小 P.207
Pure titanium 純鈦金屬 P.139
Purity 純度 P.29
Pyrogen test 熱原試驗 P.117,119
Pyrogen 熱原 P.117

Q

Quadriceps muscle group 股四頭肌群 P.177,178

R

RAAS 腎素-血管收縮素-醛固酮系統 P.85,97,101
Rabbit Irritation test 刺激性試驗兔模式 P.122
Rabbit Pyrogen Test 兔熱原試驗 P.117,119
Radial glial cell（RGC）（neuronal precursor）神經膠質細胞 P.157
Radiation induced tumor models 輻射誘導腫瘤模式 P.145
Rana catesbeiana 美洲牛蛙 P.165
Rana esculenta 食用蛙 P.165
Rana pipiens 豹蛙 P.165
Rana temporaria 林蛙 P.165
Rash 皮疹 P.31,32
RAS 血管收縮素 P.90,91
Rearing behavior 站立行為 P.65
Redness 紅斑 P.123
Reflexive 反射性 P.62
Regulatory T cells 調節型 T 細胞 P.29
Remodeling 重塑 P.36
Replacement 替代、Reduction 減量、Refinement 精緻化 3R 原則 P.4,8,10,115
Rest（spontaneous）pain 休息時自發疼痛 P.62
Retro-Orbital Injection in Zebrafish 斑馬魚眼窩注射技術 P.229
Retro-orbital 眼窩後血管 P.225
Rhinella marinus 海蟾蜍 P.165
Roccal，Quatricide 四級氨化合物 P.234
Rodent surgery board 嚙齒動物手術板 P.235
Rotarod 旋轉桿 P.49,73
Royal Society for the Prevention of Cruelty Animals（RSPCA）英國防止虐待動物協會 P.286

S

Sarcolemmic reticulum 肌纖維網 P.89
SBH 以色列高血壓大鼠 P.98

SBN 以色列正常血壓大鼠 P.98
SBP / DBP 收縮壓和舒張壓 P.94
Scaffold 載體 P.143
Seborrheic dermatitis 脂漏性皮膚炎 P.31
Secondary hyperalgesia 繼發性痛覺過敏 P.63
Sedative 鎮靜劑 P.249
Semimembranosus–semitendinosus muscle group 半膜肌及半腱肌群 P.177-178
Specific pathogen free（SPF）無特定病原 P.28.146.283.284
Severe 嚴重 P.124
Shelf life 保存期限 P.251
SHRSP 自發性易中風高血壓大鼠 P.100
Sjögren syndrome 乾眼乾嘴症 P.136
Skin Irritation Test 皮膚刺激試驗 P.123-124
Slight 輕微 P.124
Slit lamp microscope 裂隙燈顯微鏡 P.136
Small leucine-rich proteoglycans（SLRPs）具有小分子白胺酸重複序列的蛋白聚糖 P.106-107
Soda lime 鹼石灰 P.248
Sodium bicarbonate 碳酸氫鈉 P.219
Sodium hypochlorite 次氯酸鈉 P.235-237
Soft tissue sarcoma 軟組織肉瘤 P.146
Somatosensory system 中樞體感系統 P.69
Spasmolytic 解痙藥 P.243
Spinacia oleracea 菠菜 P.166
Spontaneous hypertension rat（SHR）高血壓鼠 P.25,99,100,247
Spontaneous or natural models 自發模式 P.23
Spontaneous pain behavior 自發性疼痛行為 P.64
Spontaneous tumor models 自發性腫瘤模式 P.42,145
Sporocides 殺芽孢劑 P.236
SR/Jr 鹽抵抗性高血壓大鼠 P.100
Statins 史他汀類藥物 P.79
Steatosis 脂肪變性 P.57,58
Stereotypical 刻板 P.65
Sterilants 滅菌劑 P.235,236
Sterility 無菌 P.117
Streptozotocin（STZ）鏈脲佐菌素 P.52,70,80,152
Stroma 基質層 P.134
Substantia nigra pars compacta（SNpc）黑質緻密部 P.47
Succinylcholine 琥珀膽鹼（去極化肌肉鬆弛劑）P.208
Sufentanil 舒芬太尼 P.243
Sulindac 舒林酸 P.244
Supraspinal 神經索 P.62
Surface cells 表面細胞 P.134
Surgery location 手術位置 P.234

Survival surgery 存活手術 P.8,15,231
Swab 魚鰓抹片 P.279
Syngeneic tumor models 同種移植腫瘤模式 P.40

T

Thoracic aortic aneurysm（TAA）胸主動脈瘤 P.91
Thoracic aorta constriction（TAC）橫向主動脈段綁紮 P.85
Tail flick test 甩尾測試 P.63,66
Tear film 淚膜 P.133-136
Tensile Strength 機械強度 P.139
Tenting of the skin 皮膚隆起 P.242
Test substance 待測物質 P.66,71
Tests for irritation and skin sensitization 刺激試驗 P.122-124
The European College of Laboratory Animal Medicine（ECLAM）歐洲實驗動物醫學院 P.286
The European Pharmacopoeia 歐洲藥典 P.124
The International Association of Colleges of Laboratory Animal Medicine（IACLAM）國際實驗動物專科學院協會 P.286
The Limulus Amebocyte Lysate test（LAL）鱟血測試 P.119
The National Centre for the Replacement, Refinement,and Reduction of Animals in Research（NC3Rs） 英國國家動物 3R 研究中心 P.286
The Universities Federation for Animal Welfare（UFAW）英國動物福利大學聯盟 P.286
Thermal escape test 熱逃逸測試 P.65
Thermal pain 熱痛覺 P.63
Thermal 熱源 P.63
Thioglycolate 巰基乙酸鹽 P.90
Thiopental(Pentothal)硫噴妥鈉 P.249
Threshold 閾值 P.63,64
Tiletamine 谷氨酰胺 P.250
Titanium-aluminum-vanadium alloy 鈦合金 P.139
Titanium 鈦金屬 P.138
TNF-α 腫瘤壞死因子-α P.59.86
Toe pinch 趾間痛覺反射 P.186
Tolmetin 托美汀 P.244
Total movement 總游動量 P.160
Tracheotomy/tracheostomy 氣管切開/插管術 P.264
Transitional pain model 過渡疼痛模式 P.70
Translation 轉譯 P.22,47,144,147,156,159
Transplantable tumor models 移植腫瘤模式 P.145
Transverse plane of the head 橫切面 P.135
Tribromoethanol，Avertin 三溴乙醇 P.243,251
Tricaine 3-胺基苯甲酸 P.219-230,276,279
Triceps muscle group 肱三頭肌群 P.177,178

Triphenyltetrazolium chloride 氯化三苯基四唑 P.84
Triton cristatus 北冠水螈 P.165
T. taeniatus 南冠水螈 P.165
Tumor Murine Models 腫瘤動物模式 P.40
Tumor mutation burden（TMB）腫瘤突變負荷量 P.41
Tunica media 血管中層 P.130
Type 2 DM 第二型糖尿病 P.51

U

Ulcerative colitis（UC）潰瘍性結腸炎 P.28
Urodela 有尾類 P.165
U.S. Pharmacopoeia 美國藥典 P.117,120,124
UV 紫外線 P.145

V

Validation 確效 P.235
Vanadium 釩 P.139,140
Vaporized hydrogen peroxide 汽化過氧化氫 P.235
Vascular endothelial growth factor（VEGF）血管內皮生長因子 P.106
Vasectomy 輸精管切除術 P.273
Vegetative organisms 增殖生物 P.235
Velocity 速度 P.160
Ventricular fibrillation 心室顫動 P.246
Virus induced tumor models 病毒誘發腫瘤模式 P.145
VLDL 極低密度脂蛋白 P.58,78

W

Watanabe heritable hyperlipidemic 渡邊可遺傳的高脂血症 P.83,89,132
Weight bearing 負載 P.65
World Health Organization（WHO）世界衛生組織 P.9,110,121,263
Wild-type 野生型 P.77
Wing cells 翼狀細胞 P.134

X

Xenograft tumor models 異種移植腫瘤模式 P.40
Xenopus laevis 非洲爪蟾 P.165,167
Xiphoid process 劍突 P.181,186
Xylazine 甲苯噻嗪（鎮靜劑） P.109,110 ,249-250,291-294,296

Y

Yeasts 酵母 P.117
Yohimbine 育亨賓 P.250,287,289,291,292,294,296

Z

Zebrafish Behavior Test 斑馬魚之行為試驗 P.159
Zebrafish Gavage 斑馬魚強制餵食 P.227
Zebrafish Genotyping Test-with Fin Clipping 斑馬魚基因檢測實驗-剪尾鰭 P.221
Zebrafish Gills Biopsy 斑馬魚的魚鰓活組織檢查 P.279
Zebrafish Liver Hepatoectomy 斑馬魚肝臟小部分切除的手術 P.276
Zero response 零回應 P.118
Zircionum 鋯 P.139.140

實驗動物科學（技術篇）編審小組

單位	姓名
中央研究院生物醫學科學研究所	陳燕輝主任
元培醫事科技大學護理系	王耀宏助理教授
中國文化大學生命科學系	巫奇勳副教授
行政院農業委員會畜牧處動物保護科	鄭祝菁科長、翁瑋琤技正
汎球藥理科技（股）公司	沈建璋總監
花蓮慈濟醫院醫學研究部	戴元基部長（**總編召集人**）
昌達生化科技（股）公司	趙志勳組長、蘇南伃獸醫師 鄭乃銓獸醫師
高雄長庚紀念醫院醫學研究部/實驗動物中心/實驗動物型態鑑定暨病原診斷核心實驗室	王逢興教授/主任 連韋雄博士/助理研究員 郭仲文博士/博士後研究員 柯惠菁研究助理技術師 陳于珊研究助理技術師
國立中興大學獸醫教學醫院	陳文英院長
國立台灣大學醫學院動物中心	柯世禎技正
國防醫學院動物中心	方美佐主任、李珈毓獸醫師
國家實驗研究院實驗動物中心	蘇裕家組長、吳建男獸醫師 黃純芳博士、王瑞鈴博士
國家衛生研究院分子與基因醫學研究所	游美淑博士
國家衛生研究院生技與藥物研究所	陳炯東研究員兼所長（**編審小組主席**）
樂斯科生物科技（股）公司	蔡寧遠副總經理
輔仁大學實驗動物中心	葉錦鴻獸醫師

國家圖書館出版品預行編目(CIP)資料

實驗動物科學(技術篇) / 實驗動物科學(技術篇)審查小組, 行政院農業委員會畜牧處著. -- 初版. -- 臺北市 : 農委會, 民109.05
面 ; 公分
ISBN 978-986-5449-03-2(平裝)

1.實驗動物學 2.動物實驗醫學

380.32 109006950

實驗動物科學(技術篇)

書　　名：實驗動物科學(技術篇)
發　　行：行政院農業委員會
發 行 人：陳吉仲
地　　址：100 臺北市中正區南海路 37 號
電　　話：02-2381-2991
網　　址：https://www.coa.gov.tw/
出 版 日 期：中華民國 109 年 5 月
版　　次：初版
編 輯 單 位：中華實驗動物學會
著　　者：實驗動物科學（技術篇）編審小組
　　行政院農業委員會畜牧處
定　　價：新台幣1,000 元
展 售 地 點：五南文化廣場 400 臺中市中區中山路6號（04）2226-0330
　　國家書店 104 臺北市中山區松江路209 號1 樓（02）2518-0207

本書全文同步上傳至動物保護資訊網：https://animal.coa.gov.tw
GPN ：1010900668
ISBN：978-986-5449-03-2