

中山醫學大學實驗動物照護及使用委員會

脊椎動物適用的安樂死方法

104.9.22 實驗動物照護及使用委員會 104 學年度第一次會議通過

108.12.12 實驗動物照護及使用委員會 108 學年度第二次會議修訂通過

一、目的：

動物安樂死的目的是以人道的方式使動物死亡，它以最低程度的疼痛、最短的時間使動物失去知覺和痛覺。

二、適用範圍：

進行試驗之脊椎動物。

三、執行安樂死的時機

一般而言選擇安樂死的考量因素有：動物體重下降、消瘦、成長期動物未增重、無法有效控制的疼痛、過度的腫瘤增長或腹水產生、持續性的自殘行為、疾病造成的全身性脫毛、因實驗因素無法治療的長期下痢、嚴重呼吸道感染、持續性的倦怠伴隨粗造的皮毛、拱背、腹圍擴大、四肢無法行走、嚴重貧血、黃疸、異常的中樞神經反應(抽搐、顫抖、癱瘓、歪頭等)、無法控制的出血現象、排尿異常(無尿、多尿等)、影響進食飲水的病症、傳染性疾病末期、嚴重低溫、明顯的功能損傷、動物遭受長期窘迫時的行為及生理現象等。

四、適用的安樂死方法

(一) 一般齧齒類動物

安樂死法	小於 200 g 齧齒動物	200 g~ 1 kg 齧齒動物/兔	1 kg~ 5 kg 齧齒動物/兔
二氧化碳	○	○	X
鎮定後二氧化碳	○	○	○

Barbiturat 注射液，靜脈注射 (麻醉劑量的 3 倍劑量)	○	○	○
Barbiturat 注射液，腹腔注射 (麻醉劑量的 3 倍劑量)	○	○	○
深度麻醉後採血(放血)致死	○	○	○
深度麻醉後靜脈注射 KCl (1-2 meq/kg)或神經肌肉阻斷劑	○	○	○
深度麻醉後斷頭	○	○	X
深度麻醉後頸椎脫臼	○	○	X
動物清醒中直接斷頭	△	△	X
動物清醒中直接頸椎脫臼	△	X	X
電昏後放血致死	X	X	X

說明：

1. ○：建議使用的方法； X：不得使用的方法； △：一般情況不推薦使用，除非實驗需要（需說明於動物實驗申請表，由 IACUC 審核通過並現場確認操作人員之技能）。
2. Barbiturate 巴比妥鹽類最常使用藥劑為 pentobarbital 注射劑，屬管制藥品，需事先洽行政院衛生福利部食品藥物管理署申請核可後購買使用。。
3. 出生仔鼠對二氧化碳（缺氧）耐受性高，建議安樂死方法為將仔鼠裝入塑膠袋，灌滿二氧化碳，綁緊塑膠袋，置入-15℃冰櫃內。

（二）魚類

安樂死法方法	操作方法注意事項
一、非吸入性藥劑浸泡法	
Benzocaine 或 benzocaine hydrochloride	buffered solution >250mg/l 浸泡至少 10 分鐘。
飽和的 CO ₂ 溶液	需要於通風處進行。
Ethanol	95% ethanol(不可使用 70%之 ethanol)。
Eugenol, isoeugenol clover oil	濃度 ≥ 17mg/L, 浸泡至少 10 分鐘, Isoeugenol 為可能的致癌物使用時要小心。

Isoflurane, sevoflurane	微溶於水，濃度>5mg/L~20mg/L，需要於通風處進行。
Quinaldine sulfate	buffered solution，濃度 $\geq 100\text{mg/L}$ 。
Tricainemethanesulfonate (MS-222, TMS)	buffered solution，濃度 250~500mg/L 浸泡至少 10 分鐘。
2-phenoxyethanol	濃度 $\geq 0.3\sim 0.4\text{mg/L}$ 。
二、非吸入性藥劑注射法	
Barbiturate 注射液	靜脈注射 60~100 mg/kg（麻醉劑量的 3 倍劑量）。
三、物理性方法	
斷頭	
脊髓穿刺	
captive bolt (捕捉栓)	用於大型魚。
急凍法(1 隻1 公斤以下者得採用冷凍法)	2 度C ~ 4 度C ice chilled water。 斑馬魚成魚浸泡至少10分鐘，4~7天大斑馬魚仔魚需至少20分鐘，應確實控制水溫，魚體絕不可碰觸冰塊，較適用於斑馬魚及其他小型熱帶魚，不適用殆中大型魚。

(三) 斑馬魚魚胚

安樂死法方法	操作方法注意事項
一、非吸入性藥劑浸泡法	
漂 白 水 (sodium hypochlorite)	浸泡 6.15% 稀釋 6 倍後之漂白水
Paraformaldehyde	$\leq 4\%$
二、物理性方法	
斷頭	
急凍法	快速置於-70°C 冷凍

(四) 巴比妥鹽類(pentobarbital)之安樂死劑量(mg/kg):

Species 種別	靜脈注射(mg/kg)	腹腔注射(mg/kg)
小鼠(Mouse)	100	150
大鼠(Rat)	100	150
兔(Rabbit)	100	150
天竺鼠(Guinea Pig)	100	150
倉鼠(Hamster)	100	150

五、啮齒類動物二氧化碳動物安樂死程序

- (1). 使用前確認動物實驗室室內空氣流通順暢。
- (2). 將動物置於壓克力容器內(動物數量以不堆疊為原則)。
- (3). 使用扳手逆時針開啟二氧化碳鋼瓶。
- (4). 按下白色按鈕將二氧化碳注入壓克力容器內，逐步增加二氧化碳濃度至壓克力容器內(二氧化碳之流量約為2公升/分鐘)，進氣會維持5分鐘。如動物仍未死亡，可重複按下白色按鈕直至動物死亡。
- (5). 為了確定動物是否死亡，可觸碰動物的胸腔，確定無心跳，可觸碰眼球，確定無眼瞼反射(眨眼)且瞳孔放大等狀況，最後觀察動物肢體僵直判定動物做為死亡依據，最後使用扳手順時針關閉二氧化碳鋼瓶。
- (6). 動物屍體以不透明感染性物質專用塑膠袋包裝，儲藏至冷凍櫃後依法焚燒處理。
- (7). 清理安樂死箱籠殘留的糞便和尿液，並去除殘留動物氣味。

六、魚類二氧化碳動物安樂死程序

(一)、Tricaine methane sulfonate (TMS、MS 222)安樂死之 SOP 流程如下：

- (1). 配置 Tricaine methane sulfonate (TMS、MS 222)溶液：利用碳酸氫鈉緩衝液製作酸鹼值 7.0-7.5 溶液，原液(stock solution)存於暗咖啡色容器冷凍保存。
- (2). 將原液稀釋配置成 Tricaine methane sulfonate 濃度為 250~500mg/L，將魚類浸泡至少 10 分鐘的稀釋溶液進行安樂死。
- (3). 魚類安樂死須待魚鰓靜止不動後，再繼續浸泡十分鐘。
- (4). 評估依據以下幾點確定魚隻死亡：
 - [1]停止游動/活動。
 - [2]對任何刺激均無反應。

[3]魚鰓靜止不動及無心跳。

[4]至少 10 分鐘無呼吸現象並且無眼珠轉動

(二)、降溫法安樂死之 SOP 流程如下：

(1). 利用 2°C~4°C ice chilled water。

(2). 確實控制水溫，魚體絕不可碰觸冰塊，斑馬魚成魚浸泡至少 10 分鐘。大斑馬魚仔(4~7 天)至少 20 分鐘。

(3). 評估依據以下幾點確定魚隻死亡：

[1]停止游動/活動。

[2]對任何刺激均無反應。

[3]魚鰓靜止不動及無心跳。

[4]至少 10 分鐘無呼吸現象並且無眼珠轉動