

必須對實驗動物執行安樂死的時機，在我國動物保護法第三章第十七條即已明文規定：「科學應用後，應立即檢視實驗動物之狀況，如其已失去部份肢體器官或仍持續承受痛苦而足以影響其生存品質者，應立即以產生最少痛苦之方式宰殺之。」

更進一步以研究倫理的觀點來看，當動物實驗造成動物的疼痛及不適，而無法以藥物或其他方式解除動物的疼痛(pain)或困厄(distress)時，研究人員應在動物呈現痛苦、垂死、死後組織自體溶解、或死後被籠內其他同類啃食前，以人道的方式施予動物安樂死。如安樂死確實影響實驗結果，研究人員應在動物實驗申請表中敘述原因或舉出科學例證，並經過實驗動物照護及使用委員會或小組(IACUC)審核同意，否則安樂死不但可以避免動物承受嚴重痛苦，並可透過完整的屍體解剖更進一步了解動物的生理變化，減少實驗動物之無謂犧牲。

由於不同的實驗類別對實驗動物生理、病理或行為的變化程度有不同的要求，尤其是近 20 年來，各種基因改造動物之產製與人類疾病模式之動物研發，使得實驗動物呈現多種不同面貌的臨床表現，更因科學研究之目的，需採用各種不同的照護方法以舒緩動物的不適，進而達到研究的目的。因此，各機構的實驗動物照護及使用委員會或小組、研究人員、獸醫師、研究部門的主管應對實驗動物於科學應用之人道終點共同擬定該機構之政策並遵行，以盡到各方人員之職責。

以下為國外常用來作為動物實驗人道終點(Humane endpoints)的評估項目，可供 IACUC 及研究人員參考：

1. 體重下降：快速失去原體重的 15-20%、或成長期動物持續無增重、未監測體重但動物呈現惡病質及持續性肌肉消耗時。依據不同品種動物訂定適當的準則。
2. 食慾不振：小型齧齒類動物於 24-36 小時、大型動物於 5 天完全不進食時，或者小型齧齒類動物於 3 天、大型動物於 7 天僅攝食少量食物時（僅攝取部分之正常需求）。
3. 虛弱：無法自行攝食及飲水，人員需先排除是否為麻醉後動物甦醒期，再評估是否因疾病或實驗等因素導致動物虛弱。
4. 身體器官的感染：呈現物理性指標及異常的血檢值，對藥物治療無良好反應且持續演變為全身性疾病時。

5. 腫瘤：生長超過動物原體重的 10%，平均腫瘤直徑在小鼠超過 20mm、在大鼠超過 40mm，或者腫瘤轉移或快速增長至潰爛，造成感染或壞死時。
6. 其他：器官臟器的失能，對治療無反應，或由機構獸醫師評估為癒後極差者，如：
- (1) 呼吸道系統：嚴重呼吸道感染、呼吸困難、發疳。
  - (2) 循環系統：嚴重貧血、無法控制的出血現象、(PVC 低於 15%)、黃疸。
  - (3) 消化道系統：疾病或實驗造成嚴重持續性嘔吐或下痢、阻塞、腸套疊、腹膜炎、腹圍擴大。
  - (4) 泌尿生殖系統：腎衰竭、腹腔積尿。
  - (5) 肌肉骨骼系統：肌肉損傷、骨骼受損、四肢無法行走。
  - (6) 神經系統：異常的中樞神經反應 (抽搐、顫抖、癱瘓、歪頭等)、無法有效控制疼痛。
  - (7) 其他：持續性的自殘行為、不癒合的傷口、嚴重影響動物進食飲水的病症、傳染性疾病末期、持續性低溫、明顯的器官及五官功能損傷、動物遭受窘迫及疼痛時的行為及生理現象等(參考Morton and Griffiths 的五項評估)

針對不同種類的動物或實驗有許多不同的安樂死方法可供選擇，一般而言，選擇安樂死的藥物與方法有幾項準則與考量：

- 使動物在最低程度的疼痛、窘迫、焦慮與不安地失去知覺直到死亡。
- 使動物在最短的時間內失去知覺和痛覺直到死亡。
- 藥物與方法的經濟性、可靠性與不可逆性。
- 對操作人員的安全性。
- 動物需要被保定的程度。
- 動物對疼痛與窘迫的感受性
- 動物的死狀及死前反應，對操作和觀察人員情緒上的影響。
- 對不同種類、年齡與健康狀況動物的適合性。
- 對不同實驗目的和需求的適合性。
- 藥物、設備的取得及維護的便利性。
- 對環境的衝擊。
- 藥物被濫用的可能性。

另外，執行動物安樂死亦應注意以下幾點：

#### 一、人員訓練

動物能否安詳地死亡，操作人員是關鍵因素之一。各機構的實驗動物照護及使用委員會或小組與獸醫師應建立完善的操作人員訓練計畫，包括動物安樂死的目的、各項安樂死的技術、動物抓取方法、評估與舒緩動物的疼痛或恐懼的方法、死亡的確認等，必要時亦須安排人員間的相互討論與心理輔導，以抒解操作人員可能的心理壓力。

## 二、避免造成存活動物的恐懼感

動物面臨危險或刺激時產生的窘迫及恐懼的叫聲、掙扎、攻擊的行為、驚嚇動物的費洛蒙氣味等，都會引起其他動物的焦慮和不安，進而影響存活動物的身心平衡與福祉，干擾實驗結果。因此，執行動物安樂死時，應該選擇遠離存活動物的非公開場所來執行。

## 三、安樂死設備

執行安樂死使用的藥品與器具，應依據動物種類、體重及數量，先備好足量的藥劑及器具，並應定期更換或維護，隨時保持良好的使用狀態。動物安樂死時被血液、糞尿等沾染的器具應立刻清洗，以免造成其他安樂死前動物的焦慮。

## 四、輔助執行安樂死

動物安樂死首要考量為解除動物的疼痛與窘迫，適當的物理性保定不僅可減低動物的恐懼、焦慮及疼痛，並可保障操作人員的安全。面對神經質或難以駕御的動物，可先給予鎮定劑或止痛劑等藥物，以降低動物的緊迫與恐懼，之後再進行安樂死。

## 五、確認動物死亡

所有動物的安樂死，最終步驟需確認動物是否已經死亡。人員需檢查動物的心跳是否完全停止、瞳孔是否放大。停止呼吸的單一現象不能作為判斷動物是否死亡的依據，因為動物往往先停止呼吸，數分鐘之後才停止心跳，在使用二氧化碳進行安樂死時尤其明顯。另外，兔子與雞會憋氣，因此需延長吸入二氧化碳的時間。

## 六、動物屍體處理

執行動物安樂死及處理屍體的人員必須了解該動物是否有人畜共通傳

染病的疑慮、是否曾進行放射性物質或有毒化學物質的試驗，必要時機構須提供適當的人員防護裝置或設備。

其他關於一些常見的安樂死方法之優缺點，請參閱本「實驗動物管理與使用指南」第十六章之詳細介紹，本章僅就近年來在動物福祉面向所引起的一些討論，或該文章中未提及的方法作介紹及補充，供研究人員參考：

## 1. 二氧化碳

由於高壓桶裝二氧化碳易於取得，容易使用，價格便宜，無易燃易爆性，無異味，在通風良好的場所配合適當的設備使用時，較其他藥劑安全，在實驗用啮齒類動物使用二氧化碳安樂死不會改變鼠類膽鹼激素標記(murine cholinergic marker)或腎上腺皮質酮(corticosterone)濃度，因此最廣為使用。但是也有研究顯示動物快速暴露於高濃度二氧化碳時對部分動物造成窘迫與呼吸道刺激，而引起一些爭議，在 2006 年英國紐卡斯爾大學舉辦的研討會、2006 年 American College of Laboratory Animal Medicine(ACLAM)報告及 2010 年加拿大動物照顧委員會中，提出目前較被接受的作法是，以每分鐘填充 20-30% 氣室體積的速度逐漸將二氧化碳充滿安樂死容器，或是在投與二氧化碳之前，使用揮發性麻醉等作法，降低二氧化碳的負面作用。

對於適當的動物種類使用二氧化碳進行安樂死時，高壓桶裝二氧化碳為唯一建議使用的設備，不建議使用乾冰或其他化學方法製造的二氧化碳。動物裝入容器內時，勿過度擁擠，且勿同時混入不同種類的動物。以低濃度誘導後轉入高濃度，使動物迅速失去意識。當動物呈現死亡狀態後再持續灌注氣體至少數分鐘，將動物從安樂死容器取出前務必確認動物的死亡，如動物未死亡，則立刻使用其他方法(如開胸或斷頭)完成安樂死。

啮齒類動物於其原飼養籠內吸入二氧化碳安樂死時較少緊迫或焦慮現象。如動物過度緊張，可給予適量鎮定劑後執行，唯需注意鎮靜後動物呼吸變慢，必要時需延長吸入時間。對於初生 72 小時內的雛雞和 7-14 日齡的大小鼠，需延長二氧化碳的吸入時間 10-20 分鐘。由於兔子易憋氣，需延長吸入時間，如兔子接觸空氣開始呼吸，則立刻繼續灌注二氧化碳至少 10 分鐘，或者迅速用剪刀剪開胸腔或斷頭(執行過程中須確定動物無意識)，體重較重的兔子，於吸入初期可能出現緊迫焦慮反應，較不建議使用，而且兔子耐低溫環境，如僅靠呼吸停止或不完整的放血後，立刻將兔子置入冰櫃，數十分鐘後動物可能甦醒，需注意避免類似情況發生。

由於二氧化碳較空氣重，容器內未灌滿時動物往往將頭部抬高而難以迅速死亡。有些種類的動物，如魚類、穴棲性哺乳類及新生啮齒類動物，對二氧化

碳的耐受性非常高，而兩棲類和爬蟲類動物的呼吸頻率較低，往往無法有效吸入足量的二氧化碳，導致需長時間操作才能完成安樂死。

## 2. 水化氯醛(Chloral hydrate)

緩慢抑制大腦，逐步壓迫呼吸中樞導致缺氧而使動物死亡，過程中可能會使動物喘息、肌肉痙攣、吠叫。由於副作用大，不可使用於貓狗及其他小型哺乳動物。大型動物使用前，須先以藥物鎮靜後，才可靜脈注射本藥劑。

## 3. Tricaine methane sulfonate(TMS，MS 222)

商品化產品，粉末狀，是 benzoic acid 衍生物，使用碳酸氫鈉緩衝液製作 pH 7.0-7.5 溶液，原液(stock solution)儲存於暗咖啡色容器冷凍保存。濃度高於 250mg/L 的 TMS 可用來麻醉或安樂死兩棲類與魚類。魚類安樂死須待魚鰓靜止不動後，再繼續浸泡十分鐘。

## 4. Benzocaine HCl

類似 TMS 的成分，加入水中用來安樂死兩棲類與魚類。Benzocaine 不溶於水，使用丙酮或乙醇製作原液(stock solution)，而 Benzocaine HCl 溶於水，可直接使用於麻醉或安樂死，安樂死的濃度需大於 250mg/L。

## 5. 頸椎脫臼法

透過正確的訓練技巧，人員可迅速將動物的頸椎與脊椎脫離，使動物快速失去意識而死亡，無化學藥劑污染生體組織。但可能造成執行者的不愉快感，如操作技術不佳，恐無法使動物迅速死亡，而導致動物的極大痛苦。

適用於禽類、小鳥、小鼠、體重低於 100 公克的大鼠、體重低於 1 公斤的兔子，並且需由技術精湛的人員完成，執行前動物得先給予鎮靜或麻醉，以減低動物的窘迫。如需對體重較重的動物、或者未經鎮靜或麻醉直接採取本法進行安樂死時，則需由實驗動物照護及使用委員會或小組評估，僅在具備科學研究之必要性並確認無其他替代方案可使用時，再經委員會核准後執行。

對於小型齧齒類動物，利用硬桿或拇指、食指壓住頭頸部，用另一隻手抓住尾巴或後肢，迅速用力向後拉扯後驅，使頸椎脫離頭顱；對於禽類，雙手抓

取脖子扭斷；對於仔兔，一手抓頭，另一手抓後肢，將身體迅速拉長，使頸椎脫離頭顱。

## 6. 斷頭

此法可用來執行小型齧齒類動物或仔兔的安樂死，並可提供研究人員無化學藥劑污染的乾淨組織、體液及完整的腦部組織供研究。斷頭後動物雖呈現約 13-14 秒的腦部活性，但是研究顯示此時無疼痛反應的傳遞，動物迅速失去意識。使用本方法進行動物安樂死時，須具備科學研究的必要性，並經機構的實驗動物照護及使用委員會或小組核准後執行。

商品化的斷頭台(guillotine)可提供大鼠與仔兔的斷頭，而銳利的斷頭台刀刀亦可作為仔鼠斷頭之用。需注意隨時保持斷頭台刀刀的銳利度，並在每次使用後徹底清洗殘留的血跡和氣味。

抓取及保定動物至斷頭台前可能導致動物緊迫，人員需溫柔穩固的保定動物，快速地利用斷頭台將頭頸連接處砍斷。使用錐形塑膠保定袋(decapicone)保定動物後斷頭，有助於降低動物的緊迫，並減少人員在操作中受傷的機會。實施此法易造成人員的不適，亦較具危險性，因此需接受完整的技術訓練。

## 7. 放血

已經失去意識或擊昏後的動物，再配合放血方法，可確保動物的死亡。由於大量失血時動物呈現焦慮，因此放血不得作為動物安樂死的單一方法。如因研究所須採取動物血液，則必須先麻醉動物後執行，並避免不完整放血，以免動物甦醒。

# 實驗動物安樂死時機及準則

## 背景 Background

(摘自國家實驗動物中心)

實驗中動物安樂死時機及準則由IACUC制訂，主要在規範尚未完成實驗之動物發生實驗所引起或非預期症狀，而必須將動物安樂死之狀況。

These criteria have been established by the Institutional Animal Care and Use Committee, which recognizes that euthanasia is sometimes necessary prior to the scheduled end of a study, either because of unanticipated complications, or because of the protocol itself.

## 準則 Criteria

此準則適用於所有實驗中或未實驗之動物。除了IACUC已審查同意之情形（如：實驗引起之預期中症狀且能使動物痛苦程度減至最低），否則只要符合下列任一項情況即需將動物安樂死。

These criteria apply to all animals on experimental protocols, whether manipulated or not. Fulfillment of one criterion can constitute grounds for euthanasia. Exceptions are permitted only if approved by the Committee as part of the protocol review process (i.e. the clinical signs listed below are expected as part of the experiment and appropriate measures are taken to minimize pain or discomfort in the animals).

### 1. 體重減輕 Weight loss:

體重減輕達20-25%，或是動物出現惡病質或消耗性症候時。

\*非生長期動物體重減輕可依據動物剛進動物房之體重或平均年齡體重為依據。

生長期之動物體重或許不會下降，但若無法正常增重，仍應判為體重減輕。

Weight loss of 20-25% (depending on attitude, weight recorded at time of arrival, and age: growing animals may not lose weight, but may not gain normally) or if not measured, characterized by cachexia and wasting syndrome.

### 2. 喪失食慾 Inappetance:

小型齧齒類動物完全喪失食慾達24小時或食慾不佳（低於正常量之50%）達3天時。

大動物完全喪失食慾達5天或食慾不佳（低於正常量之50%）達7天時。

Complete anorexia for 24 hours in small rodents, up to 5 days in large animals; partial anorexia (less than 50% of caloric requirement) for 3 days in small rodents, 7 days in large animals.

### 3. 虛弱（無法進食或飲水） Weakness/inability to obtain feed or water:

動物在沒有麻醉或鎮靜的狀態下，長達24小時無法站立或極度勉強才可站立時。

Inability or extreme reluctance to stand, that persists for 24 hours, assuming that the animal has

recovered from anesthesia.

#### 4. 垂死/瀕死Moribund state:

動物在沒有麻醉或鎮靜的狀態下，表現精神抑鬱伴隨體溫過低（低於37°C）時。

Depression coupled with body temperature below 37°C,

#### 5. 感染Infection:

無論是明顯可知或因體溫升高白血球數目增加而判斷為感染所致，且在抗生素治療無效並伴隨動物全身性不適症狀出現時。

Infection involving any organ system (either overt, or indicated by increased body temperature or WBC parameters), which fails to respond to antibiotic therapy within an appropriate period of time and is accompanied by systemic signs of illness.

#### 6. 出現器官嚴重喪失功能的臨床症狀且治療無效，或經動物中心獸醫師判斷預後不佳時。如： Signs of severe organ system dysfunction and non-responsive to treatment, or with a poor prognosis as determined by an veterinarian:

(1) 呼吸系統：呼吸困難、發紺

Respiratory system: dyspnea, cyanosis.

(2) 心血管系統：大失血、已給予一次輸液治療後仍貧血（低於20%）

Cardiovascular system: blood loss or anemia.

(3) 消化系統：嚴重嘔吐或下痢，消化道阻塞，套疊，腹膜炎，內臟摘除手術

Gastrointestinal system: severe vomiting or diarrhea, obstruction, intussusception; peritonitis, evisceration(immediate euthanasia required).

(4) 泌尿道系統：腎衰竭（BUN, creatinine, uroperitoneum的提升）

Urogenital system: renal failure characterized by elevated BUN, creatinine or uroperitoneum.

(5) 神經系統：中樞神經抑制、震顫、癱瘓（其中任一肢或以上）、對止痛劑治療無效之疼痛

Nervous system: CNS depression, seizures, paralysis of one or more extremities; pain unresponsive to analgesic therapy.

(6) 肌肉骨骼系統：肌肉受損或骨折使肢體喪失功能（實驗預期發生並通過IACUC審核除外）

Musculoskeletal system: muscle damage or fracture resulting in inability to use the limb, unless anticipated as part of the study.

(7) 皮膚：無法治癒之傷口、重複性自殘或二級以上之保溫墊燙傷

Integumentary system: Non-healing wounds, repeated self-trauma, second or third degree heating pad burns.

## 7. 腫瘤生成終點評估 Tumorigenesis Endpoints Assessment

無論自發性或是實驗接種的腫瘤，均應進行實驗終點評估。當動物身上發現腫瘤，每週應至少檢查兩次腫瘤生長情形，兩次檢查的間隔不可超過四天。只要符合下列任一項情況即需將動物安樂死。

Tumors may occur spontaneously, or be experimentally induced through transplantation or administration of carcinogens. Animals in which tumors are growing should be checked at least two times weekly, at intervals no greater than four days apart. The clinical signs listed below are expected as part of the experiment and appropriate measures are taken to minimize pain or discomfort in the animals.

- 1) 單一腫瘤的重量超過動物體重的 10%，或是成年小鼠腫瘤平均直徑超過 20mm，或是成年大鼠腫瘤平均直徑超過 40mm。

A tumor burden greater than 10% body weight, and in an adult mouse, a mean tumor diameter exceeding 20 mm or in an adult rat, a mean tumor diameter exceeding 40 mm.

- 2) 體表腫瘤：腫瘤表面出現潰瘍、壞死或是感染。

Superficial tumors : Tumors that ulcerate, become necrotic or infected.

- 3) 腹腔腫瘤：腹腔異常擴張、呼吸困難。

Ascitic tumors - abdominal distension, dyspnea.

- 4) 顱內腫瘤：神經症狀。

Intracranial tumors - neurological signs.

## 動物安樂死方法 Method of euthanasia of animals at the end of study

表 1. 啮齒動物安樂死方法

| 方法                                                                    | 懷孕>13<br>日胚胎 | 01-06<br>日齡 | 07-14<br>日齡 | <200g | >200g | 備註                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|-------------|-------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 二氧化碳                                                                  | Ø            | Ø           | V           | V     | V     | 1. 使用高壓桶裝二氧化碳<br>2. 執行時，儘可能在遠離動物飼養房的非公開場所進行<br>3. 14 日齡以下動物，不建議單獨使用二氧化碳安樂死，需配合斷頭            |
| Halothane<br>Methoxyflurane<br>Isoflurane<br>Enflurane<br>Sevoflurane | Ø            | Ø           | V           | V     | V     | 1. 須具備汽化器等專用設備，並設計合適的可透視性密閉容器以易於觀察動物<br>2. 大部分的吸入性藥劑對人體有害，需在通風良好場所執行<br>3. 麻醉誘導期動物可能出現掙扎及焦慮 |

|                                          |   |   |   |   |   |                                                              |
|------------------------------------------|---|---|---|---|---|--------------------------------------------------------------|
| Desflurane                               |   |   |   |   |   | 4. 7 公斤以上不建議使用此方法。                                           |
| Pentobarbital<br>100-150mg/kg.<br>IP, IV | Ø | Ø | V | V | V | 1. 屬於第三級管制藥品，人員須先向衛生署申請使用許可<br>2. 人員須備有保定動物及注射的技術            |
| 麻醉後放血                                    | Ø | Ø | Ø | V | V | 1. 放血不完整或心臟採血不完整時，動物可能會甦醒<br>2. 人員須備有相關技術                    |
| 麻醉後斷頭                                    | V | V | V | V | V | 1. 人員須備有相關技術<br>2. 仔鼠需以銳利的外科剪刀斷頭，其他則使用斷頭台                    |
| 低溫麻醉後斷頭                                  | V | V | Ø | Ø | Ø | 將仔鼠放置標本杯（非 petri dish），浸入冰漿中約二十分鐘，以減少腦部活性及流血                 |
| 麻醉後頸椎脫臼                                  | Ø | Ø | Ø | V | □ | 人員須備有相關技術                                                    |
| 麻醉後注射<br>KCl.<br>2meq/kg, IV             | Ø | Ø | Ø | V | V | 人員須備有靜脈注射的技術                                                 |
| 清醒中動物斷頭                                  | V | V | □ | □ | □ | 1. 人員須備有相關技術<br>2. 仔鼠需以銳利的外科剪刀斷頭，其他使用斷頭台                     |
| 清醒中動物頸椎脫臼                                | Ø | Ø | Ø | □ | □ | 人員須備有相關技術                                                    |
| 乙醚                                       | Ø | Ø | □ | □ | □ | 乙醚具有易燃、易爆的性質，對呼吸到黏膜刺激性強，如因實驗需求而使用乙醚，則需全程在抽氣櫃內操作，動物屍體需置於防爆冰櫃內 |

V：推薦使用的方法。Ø：不推薦使用的方法。□：經機構內動物實驗管理委員會同意後使用的方法。IP：腹腔注射。IV：靜脈注射。

表.2 100% CO<sub>2</sub> 安樂死時間參考標準

| Age of mice | CO <sub>2</sub> exposure Time | Remark       |
|-------------|-------------------------------|--------------|
| 0-6 days    | 60 mins                       | 一般需配合斷頸法合併使用 |
| 7-13 days   | 20 mins                       | 一般需配合斷頸法合併使用 |
| 14-20 days  | 10 mins                       |              |
| ≥21 days    | 5 mins                        |              |

來源：Comp Med 55(3), 275-281, 2005

## 參考資料

1. 國防醫學院動物實驗申請表附件 H:實驗中動物安樂死時機及準則
2. AVMA Guidelines on Euthanasia.2007.American Veterinary medical Association.

3. Euthanasia of Reptiles in New Zealand: Current Issues and Methods. B.D.(Brett) Gartrell, E.J.(Ted) Kirk. *kokako* (2005) 12(1), 12-15.
4. Guidelines for tumor inoculation in rodents. ( [http://orsp.rutgers.edu/animals/downloads/SOPs/Tumor\\_Endpoints\\_Guidelines.pdf](http://orsp.rutgers.edu/animals/downloads/SOPs/Tumor_Endpoints_Guidelines.pdf))
5. [Http://oacu.od.nih.gov/ARAC/endpoints.pdf](http://oacu.od.nih.gov/ARAC/endpoints.pdf). Guidelines for endpoints in animal study proposals.
6. [Http://www.ahc.umn.edu/rar/euthanasia.html](http://www.ahc.umn.edu/rar/euthanasia.html)
7. Institutional Animal Care and Use Committee 2nd Edition 2002, provided by the OLAW office of NIH.
8. NIH Intramural Research Program's Guideline on Fetal and Neonatal Mouse and Rat Euthanasia.
9. Recommendation for Euthanasia of Experimental Animals: Part 1. Working Party Report. *Laboratory Animals* (1996) 30, 293-316.
10. Recommendation for Euthanasia of Experimental Animals: Part 2. Working Party Report. *Laboratory Animals* (1997) 31, 1-32.
11. Review of Schedule 1 of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Appropriate methods of Humane Killing. Animal Procedure Committee. 2006.