

弘光科技大學 實驗動物中心

實驗動物人道終止標準作業流程

SOP 編號	A-013	管理單位	實驗動物中心	管理人	曾雅莉
分機	#5079(N607)、#5811(N608) #7186(實驗動物中心)		管理單位主管	陳俊暉	

一、目的：

當實驗動物以失去部分之體器官或無法以藥物或其他方法解除疼痛或窘迫，足以影響其生活品質時，為減輕實驗動物之不適以符合人道終止應施予安樂死。

二、適用範圍：

進行動物科學研究之實驗大鼠與小鼠

三、作業流程：

除了實驗動物照護及使用委員會已審查同意之情形(如:實驗引起之預期症狀且能使動物痛苦程度減至最低)所有實驗中或實驗的動物只要符合下列情況時，即需將動物安樂死。

- (一) 體重減輕:體重減輕達 20-25% ，或是動物出現惡病質或消耗性症候群；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。
- (二) 喪失食慾: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。
- (三) 虛弱(無法進食或飲水):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。
- (四) 垂死/頻死: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。
- (五) 感染: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候出現時。
- (六) 出現器官嚴重喪失功能的臨床症候且治療無效或經獸醫師判斷預後不佳時:
 - (1) 呼吸系統:呼吸困難，發紺。
 - (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%)。
 - (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。
 - (4) 泌尿道系統:腎衰竭(BUN,creatinine,uropéritoneum 的提升)。
 - (5) 神經系統:中樞神經抑制、震顛、癱瘓(其中任一肢或以上)、對止痛劑治療無效之疼痛。
 - (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)。
 - (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。(淺二級:紅、水泡，深二級:淺紅或白大水泡。)
- (七) 腫瘤:

- (1) 以動物進行腫瘤實驗時，必須慎重訂定人道的實驗終結點，以減少動物的痛苦、緊迫與不適。
 - (2) 接種腫瘤的實驗鼠必須至少每週觀察三次以上，以確保動物的生理狀況。觀察的項目包括：動物的外觀、姿態、行為、生理反應、食物飲水消耗、體重變化以及腫瘤的大小與外觀。
 - (3) 腹膜植入融合瘤細胞：目前已有許多體外的替代方式來製造單株抗體，因此在採用活體製造抗體的方法之前，應先評估是否有其他的替代方案。
 - (4) 接種腫瘤動物之安樂死準則：除了一般對動物執行安樂死的時機之外，接種腫瘤動物如有下列情形，也應進行安樂死。
 - 4.1 動物身上的腫瘤發生潰瘍。
 - 4.2 腫瘤影響動物的正常活動。
 - 4.3 目前對腫瘤的可接受大小並沒有準確的量化指標，一般而言腫瘤的重量不應超過體重的10%。
 - 4.4 腹部皮膚呈現灰暗或綠色時或腹水量超過體重的20%時。
 - 4.5 昏睡、厭食、脫水或者其他明顯的緊迫或疼痛跡象。
 - 4.6 腫瘤影響動物正常引水進食。
 - (5) 如腫瘤在達到預期的大小前即潰瘍破裂，請重新檢討實驗策略並將動物安樂死，而非期望潰瘍破裂的腫瘤成長到預期的大小。
- (八) 無法控制之疼痛與痛苦:動物呈現出疼痛與痛苦並對止痛劑無反應，或經獸醫師評估不適合繼續進行實驗。
- (九) 各種實驗可能造成的動物疼痛、緊迫及臨床症狀

疼痛及緊迫分級	動物操作	臨床症狀
Category B： 不引起動物的不適或緊迫	僅單純養於人為的飼育環境，無實驗進行	無不良反應
Category C： 極小的不適或緊迫進行，不需使用藥物緩解。	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
Category 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
Category D2： 中等致嚴重動的緊迫或疼痛，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及全身性感染
Category 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 及獸醫人員謹慎評估進行的必要性並嚴格監督)	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醉或肌肉鬆弛劑 4.燒燙傷或大規模皮膚創傷 5.任何會造成接近疼痛閾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

啮齒類使用安樂死方式說明

一、 使用二氧化碳必須滿足以下條件：

- 必須使用商用的高壓桶裝二氧化碳、氣槽做為二氧化碳來源。
- 必須使用合適的減壓調節與流量計，以便精確地調節氣體流入安樂死箱中
- 使用二氧化碳安樂死時，二氧化碳的最佳流速應為每分鐘置換安樂死箱 10%到 30%之體積 (cage volume / min)。
- 不可預先灌注二氧化碳，不可將動物直接放入 100 %二氧化碳中。
- 如果安樂死不能在原飼養籠內進行，安樂死箱在每次使用前應排空並清潔。
- 務必要確認動物死亡。

二氧化碳氣流(CO₂ flow)在動物停止呼吸後應維持至少一分鐘。動物死亡可經由理學檢查來確認；或是使用物理性輔助安樂死方式來確保動物死亡；亦可藉由設置安樂死箱與操作程序來校準。若動物沒有死亡，二氧化碳麻醉必須搭配另一種安樂死法。目前認為二氧化碳添加氧氣一起給予並沒有優點，將會延長死亡的時間，並可能使知覺的判斷複雜化。

參考 AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals p.49

二、 吸入性藥劑

1. 基本原則及注意事項:

- (1) 失去意識時間：考量氣體替換率，容器大小及氣體濃度。
- (2) 雖然高濃度氣體可縮短失去意識時間，但是也造成動物厭惡感及緊迫。逐漸增加氣體暴露濃度較為人道。
- (3) 吸入性氣體必須品質純正，不能摻有污染物或添加物。
- (4) 給予並維持吸入性氣體濃度之設備必須依相關規定保養維持在良好工作狀態。
- (5) 幾乎所有吸入性氣體對人員是有害的，應注意操作環境之通風。
- (6) 生病或抑鬱動物因呼吸量降低，導致肺泡氣體濃度延遲上升，容易於誘導期出現激動反應。
- (7) 仔獸對低氧耐受性較高，因此要比成年動物死亡耗時更久。吸入性氣體可以單獨使用於未離乳動物使其進入缺氧狀態，但是需比一般動物要更長時間或搭配輔助方法來達成動物之安樂死。
- (8) 需要鎮定後再用吸入性氣體誘導。
- (9) 氣體流速過快會產生噪音及冷氣流，易使動物緊迫，故應在適當之氣體置換率下注意進氣孔徑。
- (10) 吸入性安樂死應在動物舒適狀態下進行，如啮齒類使用原飼養籠具。
- (11) 應考慮吸入性氣體比重，避免在底層或上層形成氣體層流或流失氣體，導致誘導效果不佳務必確認動物死亡。

2. 吸入性藥劑請參閱附錄一「弘光科技大學實驗動物照護與使用委員會實驗動物適用之安樂死方法」。常用藥劑如 halothane、isoflurane、enflurane、sevoflurane 等操作時須符合下列條件：
 - (1) 吸入性麻醉藥可單獨當作安樂死藥物，或是作為兩階段安樂死中第一階段使動物失去意識。
 - (2) 吸入性藥劑藉由汽化器或密閉容器，將藥物投入動物體內，因此使用者須具備相關設備，並設計合適的可透視性密閉容器，以易於觀察動物。
 - (3) 以低濃度至高濃度逐步誘導麻醉，使動物失去意識。

三、巴比妥鹽(Barbiturates)及其衍生物

1. 從飼養室將實驗動物取出，使用推車運送至犧牲室。
2. 靜脈給予實驗動物，它可抑制中樞神經反應，使動物失去知覺進入麻醉狀態，過量的藥劑使動物停止呼吸，接著停止心跳。
3. 當動物體型太小導致靜脈注射不易時才考慮使用腹腔注射。
4. 巴比妥鹽及其衍生物如經靜脈注射投藥，則皆可作為動物安樂死藥劑。各物種使用 pentobarbital 進行靜脈注射及腹腔注射之安樂死，請參閱附錄一「弘光科技大學實驗動物照護與使用委員會實驗動物適用之安樂死方法」。

四、物理性方法

1. 頸椎脫臼法

- (1) 人員須接受完整的技術訓練才可使用此方法。
- (2) 從飼養室將實驗動物取出，使用推車運送至犧牲室。
- (3) 人員迅速將動物的頸椎與脊椎脫離，使動物死亡。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。
- (4) 使用於小鼠、體重低於 200 公克的大鼠，執行前動物得先給予鎮定或麻醉，以減低動物的緊迫。
- (5) 如需對體重較重的動物、或者未經鎮定或麻醉直接採取本法進行安樂死時，僅能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，則需由實驗動物照護及使用委員會(IACUC)評估核准後才可執行。

2. 放血

- (1) 用於已經失去意識或致昏後的動物，再配合放血方法，可確保動物的死亡。
- (2) 放血不得作為安樂死的單一方法。如因研究所須採放血取得動物血液，則必須先致昏或麻醉動物後執行，並避免不完整放血，以免動物甦醒。

3. 灌流

- (1) 動物必須在深度麻醉後進行。
- (2) 人員須接受完整的技術訓練才可使用此方法。
- (3) 當動物被深度麻醉且立即灌流導致死亡時，灌流為安樂死的方法之一。

附錄一、 弘光科技大學實驗動物照護與使用委員會
實驗動物適用之安樂死方法

安樂死法	齧齒動物(<200g)	齧齒動物(200g~1kg)
二氧化碳(CO ₂)	○	○
Barbiturate 注射液,靜脈注射 (> 100 mg/kg) IV	○	○
Barbiturate 注射液,腹腔注射(> 100 mg/kg) IP	○	○
麻醉後採血(放血)致死	○	○
麻醉後靜脈注射 KCl(2meq/kg) 或神經肌肉阻斷劑	○	○
先麻醉,之後頸椎脫臼	○	○
動物深度麻醉中灌流	○	○
<p>○建議使用之方法</p> <p>說明：</p> <p>1. 建議使用的方式，人員可選擇一項或合併多項使用，放血、擊暈、斷頭、腦脊隨穿刺等，不建議做為動物安樂死的單一方法，應配合其他建議方法共同使用。</p> <p>2. Barbiturate 巴比妥鹽最常用藥劑為 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</p>		

附錄二

不可做為安樂死之主要方式的物質與方法

不可做為安樂死之主要方式的誤植與方法	
Some angets and method that are unacceptable as primary method of euthanasia	
方法	說明
空氣注射 Air embolism	此法導致動物痙攣、角弓反張和哀叫，只能在麻醉下的動物使用。
打爛頭部* Blow to the head	不宜使用
燒死 Buring	化學式或加熱燒死，不宜使用。
水合氯醛 Chloral hydrate	所有動物不得使用、不限於狗、貓以及小型哺乳類。
氯仿 Chloroform	具有肝毒性且可能有致癌性，有害於人
氰化物 Cyanide	極有害於人類健康
減壓法 Decompression	(1) 導致動物痛苦、垂死時間拉長 (2) 年幼動物耐缺氧狀態，因此需較長時間才能達呼吸停止 (3) 偶發動物甦醒的意外狀況 (4) 會導致動物出血、嘔吐、痙攣、排尿或排便等現象
乙醚 Diethyl ether	乙醚具有刺激性、易燃性與爆炸性物質。若用於動物安樂死時、動物屍體裝袋冷藏冷凍沒有儲存於防爆冰箱中或是屍體焚化時均有燃燒爆炸的危險。
溺斃 Drowning	溺斃不是安樂死的方法，亦不人道
放血(採血)致死 Exsanguination	大量失血導致動物焦慮及暴躁，放血(採血)致死僅適用於動物已失去意識時。
福馬林 Formaldehyde	直接將動物浸泡於福馬林，是不人道的方法，除了多孔動物(海綿動物)例外。
家庭用產品或溶劑 Household products and solvents	丙酮類(如去光水), 清潔用品四級元素(如CCl4)、瀉劑、丁香油、四級胺類產品、胃藥、或其他任何非設計給治療或安樂死用之毒物，皆不得使用
低溫致死 Hypothermia	此法不適用於動物安樂死

硫酸鎂，氯化鉀和神經肌肉阻斷劑 Magnesium sulfate, potassium chloride, and neuromuscular blocking agents	不被接受用於清醒脊椎動物，非安樂死物質
神經肌肉阻斷劑（如尼古丁、硫酸鎂、氯化鉀、以及其他類南美箭毒製劑）	此類藥物單獨使用時，皆造成動物呼吸抑制（暫停）後才失去意識，因此動物在無法動彈後亦遭受一段時間的痛苦和壓迫。
快速冷凍 Raoud freezing	單獨快速冷凍此法不人道，除了爬蟲類與兩棲類及五日齡以下的嚙齒類；其他動物都應確認死亡或昏迷才能冷凍。（魚類快速降溫不視為快速冷凍）
窒息（悶死） Smothering	將小雞或幼禽裝在袋或容器中窒息不被接受
馬錢子素（番木鱈鹼） Strychnine	此藥劑造成動物的劇烈痙攣和痛苦的肌肉抽續
打暈 Stunning	不宜使用
Tricaine(MS222)	methane sulfonate (TMS, MS 222)，食用動物勿用此藥劑
手動對頭部鈍擊造成創傷 manually applied blunt force trauma to the head	一般不接受此種動物安樂死法，除了仔豬與小型實驗動物，儘可能使用其他方式取代。
非穿透型撞擊致昏器 Nonpenetrating captive bolt	不能接受的方式，除非是為了特殊目的地設計的氣動型非穿透式撞擊致昏器，特別用於離乳小豬、新生反芻獸或火雞。
胸椎壓迫 Thoracic compression	不接受使用於清醒動物

參考資料：

1. 農委會公布之「脊椎動物適用及禁用之麻醉及安樂死方法」：脊椎動物禁止使用之死亡方法
2. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition Appendix 3 Some agents and methods that are unacceptable as primary methods of euthanasia