國立臺灣師範大學動物房實驗動物安樂死標準作業流程

114 年 3 月 13 日實驗動物照護及使用委員會會議通過
115 年 3 月 26 日實驗動物照護及使用委員會會議通過

一、 目的：

以人道安樂死方式進行動物犧牲，對動物引發最少疼痛、焦慮、不安和恐懼感與最短時間內喪失知覺。在 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia 中詳細介紹了動物安樂死的各種方法和優缺點，本文僅對脊椎動物於科學、教學及試驗應用範圍內提供建議之作業流程。

二、 適用範圍：

於動物房進行實驗動物安樂死之作業流程。

三、 執行安樂死的時機：

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，即需將動物進行安樂死。

1. 體重減輕：體重減輕達 20-25%、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。
2. 喪失食慾：嚙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。S
3. 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。
4. 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℃）時。
5. 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侯出現時。
6. 出現器官嚴重喪失功能的臨床症狀且治療無效，或經獸醫師判斷預後不佳時：
   6.1 呼吸系統：呼吸困難，發紺。
   6.2 心血管系統：大失血、已給予一次輸液治療後仍貧血低於 20%。
   6.3 消化系統：嚴重嘔吐或下痢、消化道阻塞、套疊、腹膜炎或內臟摘除手術。
   6.4 泌尿道系統：腎衰竭（BUN, creatinine, uroperitoneum 的提升）。
   6.5 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。
   6.6 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）。
   6.7 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）。
7. 腫瘤：
   7.1 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。
   7.2 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。
   7.3 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。
   7.4 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。
      7.4.1 動物身上的腫瘤發生潰瘍。
      7.4.2 腫瘤影響動物的正常活動。
      7.4.3 平均腫瘤任一方向直徑在小鼠超過 20mm、在大鼠超過 40mm，一般而言腫瘤的重量不應超過體重的 10%。

7.4.4 腹部皮膚呈現灰暗或綠色，或腹水量超過體重的 20%時。
7.4.5 昏睡、厭食、脫水或者其他明顯的緊迫或疼痛跡象。
7.4.6 腫瘤影響動物正常引水進食。
7.4.7 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。

7.5 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。

7.6 各種實驗可能造成的動物疼痛、緊迫及臨床症狀。

四、 作業流程：

1. 二氧化碳 (CO_2)

1.1 步驟：

1.1.1 開啟 CO_2 鋼瓶旋鈕，確認 CO_2 鋼瓶具有足量二氧化碳氣體。

1.1.2 調整 CO_2 流量計 (L/min) 流量。(根據實驗動物人道規定，施放 CO_2 氣體建議流速為箱體體積的 30%-70%/每分鐘)。

1.1.3 將實驗動物放入原飼育盒，確定 CO_2 管線與飼育盒連接，打開二氧化碳開關注入氣體，4 分鐘後關上二氧化碳開關，再等待 1 分鐘確認無呼吸生命現象後，即可取出。失去意識的時間通常在 2-3 分鐘之間。當失去意識後 CO_2 的流速至少需維持 1 分鐘，CO_2 釋放時間建議為 4 分鐘以上。

1.1.4 關閉 CO_2 開關，矽膠軟管整線放好，清潔自己使用過的空間，以方便其他使用者使用。

1.1.5 將實驗動物屍體裝入紅色感染性廢棄物塑膠袋，妥善打包並將袋口封好。

1.2 基本原則及注意事項：

1.2.1 失去意識時間：考量氣體替換率，容器大小及氣體濃度。

1.2.2 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。

1.2.3 吸入性氣體必須品質純正，不能摻有污染物或添加物。

1.2.4 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。

1.2.5 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。

1.2.6 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。

1.2.7 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。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。

1.2.8 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。

1.2.9 吸入性安樂死應在動物舒適狀態下進行，如囓齒類使用原飼養籠具。

1.2.10 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。

1.2.11 兔子不得使用 CO_2 安樂死麻醉。

2. 其他常用藥劑如 halothane、isoflurane、enflurane、sevoflurane 等操作時須符合下列條件：

2.1 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。

2.2 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。

2.3 以低濃度至高濃度逐步誘導麻醉，使動物失去意識。

3. 巴比妥鹽（Barbiturates）及其衍生物

3.1 從飼養室將實驗動物取出，使用推車運送至犧牲室。

3.2 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。

3.3 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。

3.4 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「適用之安樂死方法」。

4. 物理性方法（＊使用此方法前均需深度麻醉）

4.1 頸椎脫臼法

4.1.1 人員須接受完整的技術訓練才可使用此方法。

4.1.2 人員迅速將動物的頸椎與脊椎脫離，使動物死亡。對於小型嚙齒類動物，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。

4.1.3 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。

4.1.4 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。

5. 放血

5.1 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。

5.2 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。

6. 灌流

6.1 動物必須在深度麻醉後進行。

6.2 人員須接受完整的技術訓練才可使用此方法。

6.3 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、 適用之安樂死方法

1. 陸生動物-嚙齒類、兔

安樂死方法	小於 200 g 嚙齒動物	200 g~ 1 kg 嚙齒動物/兔	1 kg~ 5 kg 嚙齒動物/兔
一、化學性方法			
二氧化碳	○	○	╳
鎮定後二氧化碳	○	○	○
Barbiturate 注射液, 靜脈注射 （麻醉劑量的 3 倍劑量）	○	○	○
Barbiturate 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	○	○	○
二、物理性方法			
深度麻醉後斷頭	○	○	╳
深度麻醉後頸椎脫臼	○	○	╳
動物清醒中直接斷頭	★	★	╳
動物清醒中直接頸椎脫臼	★	╳	╳
電昏後放血致死	╳	╳	╳

說明：

a. ○：建議使用的方法；×：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）。

b. 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。

2. 水生動物-魚類安樂死

(1) 準備進行安樂死時前注意事項：

- 魚隻在進行安樂死之前應有 12~24 小時的禁食以減少魚便及含胺廢物的產生。
- 儘量在安靜、燈光溫和的環境中進行。
- 水質、水溫、水中溶氧量及魚隻數量要適中。
- 確定魚死亡後，魚屍體應收集並依生物廢棄物處理原則進行處置。
- 要進行大規量魚隻安樂死之前應先有執行少量安樂死的經驗。
- 需確認魚隻死亡才算完成安樂死，參考指標如下：
  - ✓ 停止游動/活動。
  - ✓ 對任何刺激均無反應。
  - ✓ 無腮動及心跳。
  - ✓ 至少 10 分鐘無呼吸現象並且無眼珠轉動。

(2) 常用的魚類安樂死方法：

安樂死方法	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浸泡致少10分鐘。
飽和的CO_2溶液	需要於通風處進行。
95% 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,，Isoeuge 為可能的致癌物使用時要小心。
Tricaine Methanesulfonate (MS-222, TMS)	過度麻醉(≧0.2%)。
2-phenoxyethanol	濃度≧0.3~0.4mg/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	
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℃～4℃ 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，不適用中大型魚。

(3) 絕對禁止使用的方法：

直接沖下水道、直接放入冰箱慢慢冷凍致死。

(4) 斑馬魚、鯖江魚魚胚的安樂死：

通則：目前美國 NIH 及歐盟將斑馬魚、鯖江魚自孵化後並開始接受餵食才視為活體動物，故斑馬魚 5dpf (days post fertilization)、鯖江魚 3dpf 之前的胚胎並不納入規範，而之後的仔魚已有疼痛知覺就需要使用以上敘述之人道安樂死方法。

≦5 dpf 之斑馬魚胚及 ≦3dpf 之鯖江魚胚，常用安樂死方法如下，

安樂死方法	操作方法注意事項
一、非吸入性藥劑浸泡法	
漂白水(bleach)	浸泡 6.15%稀釋 6 倍後之漂白水
Paraformaldehyde	≦4%
二、物理性方法	
急凍法	快速置於-70℃冷凍

3. 其他-陸生動物（禽類、野生動物）、水生動物（兩棲類、爬蟲類）：

安樂死方法	操作方法注意事項	禽類	野生動物	兩棲類	爬蟲類
一、化學性					
麻醉性藥品	部分兩棲類會憋氣，須注意	○	○	○	○
二氧化碳	需要於通風處進行。	適合陸禽	○	○	○
Benzocaine 或 benzocaine hydrochloride	buffered solution >250mg/l 浸泡致少 10 分鐘。			○	
Tricaine Methanesulfonate (MS-222, TMS)	buffered solution, 濃度 250~500mg/L 浸泡至少 10 分鐘。			○	
氮氣泡沫		○			
Barbiturate 靜脈注射	60~100 mg/kg（麻醉劑量的 3 倍劑量）。	○	○	○	○
Barbiturate 腹腔注射	60~100 mg/kg（麻醉劑量的 3 倍劑量）。	○	○	○	○
深度麻醉後靜脈注射KCl(1-2 meq/kg)或神經肌肉阻斷劑			○		
二、物理性方法					
斷頭				○	○
脊髓穿刺				○	
深度麻醉後頸椎脫臼		○			
動物清醒中直接頸椎脫臼	由 IACUC 審核通過並現場確認操作人員之技能	○			
腦部近距離射擊或使用撞擊槍破壞腦部	1.依動物種類選擇適當擊昏槍及撞擊部位進行擊昏作業。 2.擊昏動物後，應於 15 秒內切斷主要動脈，放血致死。 3.採用穿刺型擊昏槍撞擊致昏後，若不放血，可搭配腦組織穿刺破壞操作 (pithing) 致死。	○	○		○

電昏後放血	1.以電擊器置於動物頭部左右側，施以至少 220V 之電壓電擊至少 3 秒，以利有效致昏。 2.於致昏後 15 秒內切斷主要動脈放血致死。	○			
一次電擊致死	以電擊器分置動物頭部及胸部位，施以至少 220V 之電壓電擊至少 3-15 秒致死。	○			

附錄二、不可做為安樂死之主要方式的物質與方法

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
燒死 Buring	化學式或加熱燒死大多數動物皆不被接受
水合氯醛 Chloral hydrate	所有動物不得使用
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
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鎮靜、暈倒或麻醉
福馬林 Formaldehyde	直接將動物浸泡於福馬林，是非常不人道的方法
家庭用產品或溶劑 Household products and solvents	丙酮類(如去光水), 四級元素(如 CCl_4)、瀉劑、丁香油、四級胺類產品、胃藥等，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) Neuromuscular blocking agents(nicotime, magnesium sulfate, potassium chloride, and all curariform agents)	如尼古丁、硫酸鎂、KCl、以及其他 curariform 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	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(番木鼈鹼) Strychnine	此藥劑造成動物的劇烈痙攣和痛苦的肌肉抽續

附錄三、pentobarbital 之安樂死劑量

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
綿羊(Sheep)	100	
山羊(Goat)	100	
家禽(Chicken)	150	150
貓(Cat)	100	100
狗(Dog)	100	100

註：一般動物以麻醉劑量的 3-5 倍劑量為安樂死劑量，並依各別動物狀況做後續增加。

附錄四、實驗動物適用之安樂死方法

安樂死法	嚙齒動物（＜200g）	嚙齒動物（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	○	○

建議使用之方法

說明：

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。
2. Barbiturate 巴比妥鹽最常使用藥劑為 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

參考資料

1. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals： 2020 Edition
2. 弘光科技大學實驗動物中心-實驗動物安樂死標準作業流程
3. 國立中央大學-實驗動物安樂死之標準作業流程
4. 農業部- 2018 實驗動物照護與使用指引
5. 中原大學實驗動物疼痛評估、人道終點及安樂死方法

附錄五、爬蟲類之安樂死方法

一、說明：本附錄內容適用於所有參與爬蟲類動物處理、麻醉及安樂死之研究人員，於本機構之動物研究設施內執行。僅有經訓練並授權之人員得執行安樂死操作。所有程序應在獸醫監督下(或由獸醫師執行)，並經 IACUC 核准的計畫內容中進行。

二、可接受的安樂死方法

爬蟲類的安樂死方法應確保能迅速喪失意識並隨後死亡，且無痛苦與壓力。由於爬蟲類代謝緩慢且心跳可持續較久，必須以輔助(二次)方法確認死亡。

1. 化學方法

1.1 在深麻醉狀態下給予 Sodium Pentobarbital (≥200 mg/kg)經靜脈（IV）、心內（IC）或體腔內（ICe）注射。

1.2 吸入性麻醉劑（isoflurane、sevoflurane）可用於誘導麻醉，隨後需採用輔助(二次)物理方法以確保動物死亡。

1.3 氯化鉀（KCl）可在手術級麻醉或確認無意識後使用作為輔助(二次)方法。

2. 物理方法

2.1 脊髓穿刺(pithing）破壞腦幹後立即斷頭（decapitation），以確保不可逆死亡。

2.2 使用撞擊槍(穿顱螺栓)或槍擊（適用於大型爬蟲如鱷魚）以立即致昏，隨後進行脊髓穿刺（pithing）。

2.3 小型蜥蜴或蛇（<200 g）可於麻醉狀態下採頸椎脫臼法，須經由受過訓練人員執行。

三、不可接受的方法

1. 僅使用二氧化碳（CO_2）：爬蟲類能長時間閉氣，故幾乎無效。
2. 對體重超過 4 克的個體使用低溫或冷凍：會造成痛苦與延遲死亡。
3. 在清醒狀態下使用肌肉鬆弛劑或氯化鉀：不人道。
4. 溺斃或窒息：嚴禁使用。

四、死亡確認

必須確認無心跳與呼吸、角膜與反射消失，並以脊髓穿刺或斷頭等破壞腦幹方式確認。最終程序後須持續監測至少 10 分鐘，確認動物已死亡。

五、文件紀錄

所有安樂死執行應記錄於動物使用記錄表，包括日期、方法、執行人員及死亡確認。任何偏離本附錄之操作須經獸醫師與 IACUC 核准。

六、參考文獻

1. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. American Veterinary Medical Association.
2. WOAH（OIE）– Killing of Reptiles for Purposes Other Than Slaughter, Terrestrial Animal Health Code, 2023.
3. NIH OLAW Position on Use of Hypothermia/Freezing in Amphibians and Reptiles, 2020.
4. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission（FWC）: Humanitarian Euthanasia of Nonnative Reptiles, 2021.
5. TAMU IACUC: Euthanasia of Fish, Amphibians, and Reptiles SOP, 2022.