

高雄醫學大學 實驗動物中心

Center for Laboratory Animals, Kaohsiung Medical University



大鼠及小鼠 繁殖指引

GUIDELINE FOR BREEDING RATS AND MICE

初版 2020 年 3 月

曾中柏獸醫師 撰寫
謝翠娟主任 審核

PREFACE

為協助本校各級研究人員以正確、科學、符合研究需求及兼顧動物福祉的方式繁殖大鼠或小鼠，特編寫本指引以作為教育訓練之準則。

此指引亦包含與本中心大小鼠繁殖有關之規定，請各位研究人員務必閱讀「配種系統」、「離乳」、及「繁殖記錄卡」此三章節，此外也務必閱讀本中心「SOP 206-大鼠及小鼠繁殖管理」。

有鑒於國內對於大小鼠繁殖配種相關資訊不多，對於初次踏入繁殖領域的使用者在找資料也不好找。在查詢外國動物中心 SOP 時看到許多有用的資料，與主任討論後也因此萌生將資料彙整成冊供各位研究人員參考的念頭。此指引目前為初版，可能尚有不足、或不夠完善的部分，若各位研究人員有其他想瞭解的部分但沒有寫在此指引內、或覺得此指引有可以改善的部分，都歡迎各位研究人員告知，日後做版本修改時會採納各位的意見做修改，期望此指引可幫助做繁殖的研究人員。

獸醫師 曾中柏

高雄醫學大學實驗動物中心主任 謝翠娟

ACKNOWLEDGEMENT

感謝以下本校研究人員熱心提供動物或協助拍攝
(依姓氏筆畫排序)

林俊光
(李景欽教授實驗室)

陳威承
(謝翠娟副教授實驗室)

莊雯鈞
(李香君副教授實驗室)

鄭雁如
(王聖帆副教授實驗室)

蘇湘涵
(孫昭玲副教授實驗室)

CONTENTS

Preface	i
Acknowledgement	ii
CHAPTER 01 動物福祉的維護原則 PRINCIPLES OF MAINTAINING ANIMAL WELFARE	1
CHAPTER 02 小鼠繁殖資訊 REPRODUCTIVE DATA OF MICE	2
CHAPTER 03 大鼠繁殖資訊 REPRODUCTIVE DATA OF RATS	6
CHAPTER 04 動情週期 ESTROUS CYCLE	8
CHAPTER 05 動情週期鑑定 STAGING ESTROUS CYCLE	13
CHAPTER 06 配種系統 MATING SYSTEMS/SCHEMES	24
CHAPTER 07 保母鼠 FOSTER MOTHER	27
CHAPTER 08 離乳 WEANING	30
CHAPTER 09 性別鑑定 GENDER DETERMINATION	33
CHAPTER 10 繁殖小鼠換籠 CAGE CHANGING FOR BREEDING MICE	36
CHAPTER 11 繁殖記錄卡 BREEDING RECORD CARD	37
CHAPTER 12 動物中心人員例行性作業 ROUTINE WORK OF CLA STAFF	38
CHAPTER 13 其他注意事項 OTHER NOTICE	39
參考文獻 REFERENCE	40
APPENDIX A 常用小鼠品系離乳週齡	42

動物福祉的維護原則

PRINCIPLES OF MAINTAINING ANIMAL WELFARE

- 1.1 所有進行動物繁殖之各級研究人員，包括計畫主持人、實驗人員、或動物照護者，皆須遵守本中心「大鼠及小鼠繁殖管理作業流程」之規定，以確保繁殖之動物可獲得妥善動物福祉。
- 1.2 研究人員必須善盡動物照護之責任，動物配種後須自行估算預產期，於預產期間經常來觀察動物是否分娩、母鼠是否會照顧仔鼠或有吃仔鼠之行為、並且主動將應離乳之仔鼠做離乳分籠。
- 1.3 確實填寫繁殖紀錄卡是基本要求，研究人員同時應做詳盡之實驗紀錄以備追蹤或查核。
- 1.4 雖本中心人員於例行性巡房或換籠時發現新生仔鼠、或仔鼠需離乳分籠，皆會通知研究人員，但觀察動物是研究者自身之責任；倘若研究者不常來觀察動物，只是把動物丟在本中心讓動物不停繁殖、或經常是由本中心人員告知才來填寫繁殖記錄卡或離乳分籠，本中心仍會視情節嚴重程度給予違規記點或禁止其繁殖動物。
- 1.5 研究者應遵照 IACUC 核准之動物實驗申請表內容及繁殖計畫，適度繁殖足夠研究達到統計意義之動物數量，切勿違反動物福祉過度繁殖動物，造成不必要的無辜生命犧牲。

小鼠繁殖資訊

REPRODUCTIVE DATA OF MICE

- 2.1 小鼠平均壽命為 2.5 年，繁殖生命期(Reproductive Lifespan)約 7–12 個月。
- 2.2 小鼠為多次發情(Polyestrous)動物，整年都可以發情(Non-seasonal Breeders)，動情週期(Estrus Cycle)約 4–5 天；自發性排卵(Spontaneous Ovulation)。母小鼠只有在發情期(Estrus)才會與公小鼠配種。配種行為通常發生在晚上(Nocturnal)。當進入發情期，在 8–12 小時內會排卵。

註：相較於自發性排卵，貓、兔、及駱駝的排卵是由「交配」這個行為所誘導。
註：整年都可發情的動物：牛和豬；季節性發情的動物：馬、綿羊、山羊、及貓。
註：一年只發情一次的動物(Mono-Estrus)：狗。
- 2.3 一般而言，小鼠平均在 6 週齡可達性成熟。
 - 2.3.1 有些公小鼠在第 5 週齡就可配種。當未配種過的公小鼠(Virgin Male)達到 2.5 月齡，其配種能力會開始下降。當達到 3 月齡，該 Virgin Male 配種能力會很差，不建議拿來配種。
 - 2.3.2 部分品系母小鼠在 4–5 週齡就會有第一次發情期，但若母小鼠在 6 週齡前懷孕，因其生理上尚未發育足夠，因此會有較小的胎仔數(Litter)、且有很大的機率會將仔鼠吃掉。因此最好是等到母小鼠 6 週齡才讓她配種(註：Jackson Lab 建議在母小鼠 8 週齡時開始配種可以增加懷孕機率)。未配種過的母小鼠(Virgin Female)在 6 月齡後排卵數會下降，特別是 C57BL/6J (註：Jackson Lab 建議避免使用超過 15 週齡的 Virgin Female 做配種)。
- 2.4 有些母小鼠在第一胎時母性較不好，因此仔鼠死亡率較高。
- 2.5 小鼠懷孕期通常是 19–21 天(不同品系間可能會有些許差異)。
- 2.6 離乳日齡為 21–28 日齡(依不同品系而有差異)。
- 2.7 小鼠分娩可能會持續 1–3 個小時，且通常發生在晚上。母小鼠在分娩後 24 小時內會進入發情期(分娩後發情，Postpartum Estrus)。
- 2.8 不同品系間胎仔數(Litter Size)不同，平均是 4–12 隻仔鼠。近親品系(Inbred Strain)小

鼠會有較小的胎仔數，約 4–8 隻；遠親品系(Outbred)則會有較大胎仔數，約 10–16 隻。

2.9 生育能力跟每胎仔鼠數量會依據不同品系而有差異，此外，種鼠的年齡也會造成影響，當年紀逐漸達到繁殖生命期的終點時，胎仔數會逐漸下降。

2.10 仔鼠體重約 1–1.5 公克。仔鼠在第 11–12 日齡會開始吃飼料。

註：小鼠仔鼠 0–14 日齡外觀特徵可下載 The Jackson Laboratory 的 Mice Pup Appearance by Age

(http://jackson.jax.org/rs/444-BUH-304/images/LT0001_Mouse_Pup_Appearance.pdf)

2.11 提升繁殖效能

2.11.1 建議小鼠達 6 週齡才開始配種。

2.11.2 建議將母小鼠放到公小鼠的籠內配種。

2.11.3 公鼠配種後會需要時間讓精子數量恢復，雖然大部分品系可以在 2 日內恢復，但在某些品系，如 C57BL/6 則可能需要 4 日。公鼠配種後，若將其隔離至少 1 週，可以增加配種成功率。若可以，建議使用有經驗、且成功配種過的公鼠進行配種；若無，則建議選用 3–4 月齡的公小鼠，而不要用其他更年輕的公小鼠。

註：通常公小鼠一天只會射精一次，不過品系不同可能也會有差異，有的公小鼠一個晚上可和兩隻母小鼠配種。

2.11.4 建議更換種鼠(Breeders)的時機：

2.11.4.1 通常在小鼠大於 8 月齡，其配種成功率就會逐漸下降。

2.11.4.2 若在配種後 60 天內無分娩、或者是最後一胎離乳後 60 天內無分娩且母小鼠未懷孕。

2.11.4.3 若分娩多次，但都沒有仔鼠順利存活到離乳。

2.11.4.4 生產的仔鼠數量顯著下降，譬如先前每一胎生 8–9 隻仔數，結果變成 1–2 隻仔鼠。

2.11.5 不要同時將全部繁殖的動物(Breeding Animals)都更換，最好是有不同年齡層的動物在繁殖。

2.11.6 提供適當的環境豐富化，譬如巢料。

2.11.7 在分娩前 2–3 天至分娩後 3–5 天應避免打擾母小鼠，這段時間應減少該籠之作業。

2.11.8 提供高脂肪飼料或繁殖專用飼料，以利母小鼠泌乳。

2.11.9 盡量減少光週期、溫濕度的變動。

2.11.10 噪音、粗魯的操作、高飼養密度、以及其他形式的緊迫(Stress)都會提升仔鼠死亡

率。

2.11.11 許多因素都可能造成母鼠食仔或拒絕照顧仔鼠，譬如，經驗不足之母鼠、過度擁擠、環境過於單調(未提供環境豐富化)、人員干擾、或籠內其他動物所造成的緊迫。

2.12 費洛蒙效應 Pheromones

2.12.1 Lee-Boot Effect：將母小鼠群飼且與公鼠隔離，會使得母小鼠們不發情。若配合 Whitten effect，則可使母小鼠發情一致。

2.12.2 Whitten Effect：公小鼠尿液中的費洛蒙可誘導前述不發情母小鼠於 3 日內進入發情期。

2.12.3 Bruce Effect，亦稱做 Pregnancy Block：當著床前期(Preimplantation Period)的母小鼠聞到不熟悉的公小鼠的尿液，會造成母小鼠懷孕終止。因此在懷孕的前 5 日，應避免讓母小鼠接觸到不熟悉的公小鼠或其墊料。

2.12.4 若研究人員有需要讓動物發情期一致，則可利用費洛蒙效應。先將母小鼠群飼 10-14 日，再將公小鼠放入籠中、或讓母小鼠們暴露於含有公小鼠尿液的髒墊料，則在暴露後的第三個晚上會大約有 50%母小鼠會進入發情期(Estrus)、且可接受配種。

2.13 陰道栓 Vaginal Plug

2.13.1 交配後，公小鼠的 Coagulating & Vesicular Gland 的分泌物會在母小鼠陰道凝固，外觀為白色或奶油色臘狀物。陰道栓通常會維持 8-24 小時，若過了這段時間，陰道栓會自行脫落或溶解。

2.13.2 陰道栓的功用是避免其他公小鼠和該母小鼠交配、促進精子到達卵子、提供足夠的物理性刺激以維持 Luteal (黃體)的形成。

2.13.3 建議在早上 9 點到中午 12 點檢查是否有陰道栓。若過早檢查陰道栓可能會干擾到可能的配種行為；若未在中午 12 點前檢查，則陰道栓可能會自行脫落或溶解。

註：有些品系，如 C57BL/6，其陰道栓比較細小且很快就會溶解

2.13.4 有見到陰道栓只代表有配種行為，並不能保證一定會懷孕。

註：有些品系的公小鼠，如 BALB/cJ，會在母小鼠在非發情期時也會有配種行為，因此也要確定母小鼠是否處在發情期。

2.13.5 若未見到陰道栓，也並不代表沒有配種，可能只是陰道栓提早脫落。

2.13.6 若未見到陰道栓，則建議繼續讓母小鼠和公小鼠留在同一籠，並且每天早上檢查直到見到陰道栓。若過了 14 天仍未見陰道栓，則建議更換種鼠(Breeders)。

2.13.7 有看到陰道栓則通常會視為懷孕第 0 天，亦稱做 Days Post Coitum (dpc 0)。



Figure 2.1 無陰道栓(左)與有陰道栓(左)之母小鼠對照圖。



Figure 2.2 有陰道栓(左)與無陰道栓(右)之母小鼠對照圖。

2.14 懷孕

2.14.1 每日幫母鼠秤重可幫助確認是否懷孕。通常在懷孕第 8 天，母小鼠體重會比配種當天重大約 2 克或以上，不過還是要依據胎數多寡而定。

2.14.2 若有順利受精，約在懷孕第 12 天即可於腹部觸摸到胎兒，但主要還是依據胎數的多寡，若胎數較少可能要晚幾天才行。

2.14.3 越接近分娩，乳頭會越來越明顯。

大鼠繁殖資訊

REPRODUCTIVE DATA OF RATS

- 3.1 大鼠平均壽命為 2.5–3 年，繁殖生命期(Reproductive Lifespan)約 12–15 個月。
- 3.2 大鼠為多次發情(Polyestrous)動物，整年都可發情(Non-Seasonal Breeders)，動情週期(Estrus Cycle)約 4–5 天；自發性排卵(Spontaneous Ovulation)。配種行為通常發生在晚上(Nocturnal)。
- 3.3 一般而言，大鼠約在 10–12 週齡達性成熟，雖然母大鼠最早可能在 8–9 週齡就會有第一次的發情。
- 3.4 懷孕期約 21–23 日。
- 3.5 離乳日齡約 20–21 日齡。
- 3.6 產後發情(Postpartum Estrus)：母大鼠分娩後 48 小時內會發情。若未在分娩後發情時讓母大鼠配種，則母大鼠在仔鼠離乳後 2–4 天才會開始發情週期。
- 3.7 生育能力跟每胎仔鼠數量會依據不同品系而有差異，此外，種鼠的年齡也會影響。
- 3.8 在懷孕後第 12 天可經由腹部觸診確認懷孕。
- 3.9 大鼠於配種後可於母大鼠陰道內見到陰道栓(Vaginal Plug)。
- 3.10 提升繁殖效能
 - 3.10.1 建議等到母大鼠至少 90 日齡、或體重達 200–275 公克重才配種；公大鼠則建議等到至少 3 月齡、或直到體重達 275–350 克重。
 - 3.10.2 建議更換種鼠時機：
 - 3.10.2.1 當年紀達 9 月齡，繁殖能力會逐漸下降。
 - 3.10.2.2 若母大鼠在兩個月內都未分娩，且未懷孕(除非已知該品系本身受孕能力就很低)。
 - 3.10.2.3 若有分娩多次，但都無仔鼠順利存活到離乳。
 - 3.10.2.4 若生產的仔鼠數量顯著下降，譬如，先前每一胎都生 8–9 隻仔鼠，結果變成 1–2 隻仔鼠。
 - 3.10.3 不要同時將全部繁殖的動物(Breeding Animals)都更換，最好是有不同年齡層的

動物在繁殖。

3.10.4 提供適當環境豐富化，譬如巢料。

3.10.5 在分娩前 2–3 天至分娩後 3–5 天應避免打擾母大鼠，且這段時間應減少該籠之作業。

3.10.6 大鼠食仔現象較少見。

3.11 母大鼠在發情期時會有一些行為上的變化：

3.11.1 撫摸頭部或背部時，耳朵會顫抖(quiver)。

3.11.2 若骨盆區被刺激，會出現 Lordosis (脊柱腹凸)之交配姿勢 (亦稱做 Sway Back Posture)。

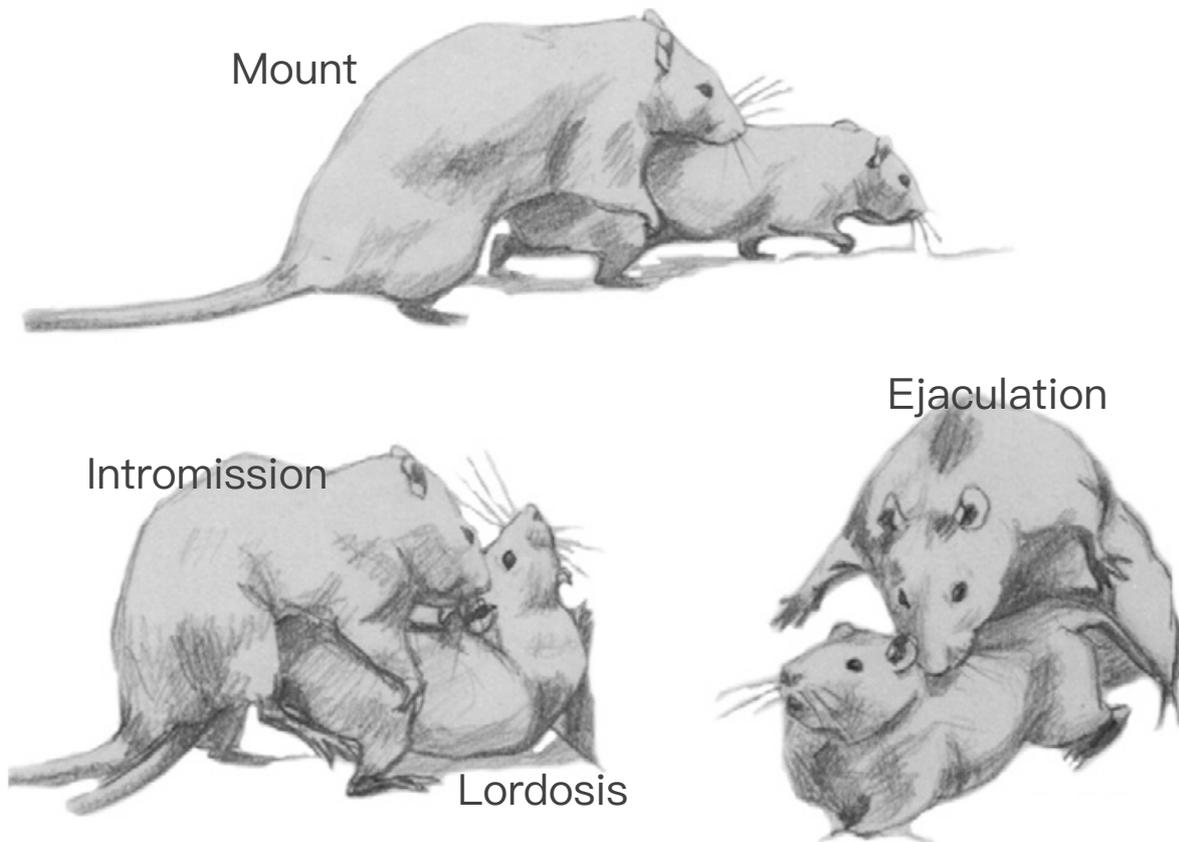


Figure 3.1 左下圖母大鼠之姿勢即為 Lordosis。

(Reference: Serotonin 1A Receptors and Sexual Behavior in Male Rats: Review)

動情週期

ESTROUS CYCLE

- 動情週期可分為四個階段：
 - Proestrus (發情前期)：此階段較短，在大鼠平均是 14 小時，在小鼠則是少於 24 小時。
 - Estrus (發情期)：此階段在大鼠平均是 24–48 小時，在小鼠則是 12–48 小時。
 - Metestrus (發情後期)：在大鼠平均是 6–8 小時，在小鼠則較長，可長達 24 小時。
 - Diestrus (發情間期)：為動情週期中最長的一個階段，在大鼠跟小鼠平均是 48–72 小時。
- 一個動情週期平均是 4–5 日，但偶爾會有長達 6 日的情況。
- 動情週期在大、小鼠是持續的一個動態過程，除非是懷孕或假性懷孕等情形才會中斷。
- 處在發情期時，母鼠會自發性排卵(Spontaneous Ovulation)，通常是在晚上排卵，也只有在這時候配種才會懷孕。
- 母鼠只有在發情前期(Proestrus)和發情期(Estrus)會接受(receptive)公鼠的騎乘。

註：有文獻將發情週期分成 13 個階段，但在此就不多加贅述。

註：除了前述四個階段，尚有不發情期(Anestrus)，即指處在非繁殖季節的動物。由於小鼠的繁殖主要是受到光週期所調控，因此在野外的情況下，主要的繁殖季節是夏季與秋季；但在實驗室的環境下，經由人工光照週期(12 小時亮/12 小時暗)，使得小鼠一整年都可繁殖，不會有不發情期。

賀爾蒙與動情週期

- 動情週期的推動主要是受到 Hypothalamus–Pituitary–Gonadal Axis (下視丘–腦下垂體–性腺軸)所調控。
- Hypothalamus 分泌 Gonadotropin–Releasing Hormone, GnRH (促性腺釋放激素)，並經由 Portal Blood Vessel (門脈血管)送達 Anterior Pituitary。
- GnRH 會促進腦下垂體前葉分泌 2 種促性腺激素(Gonadotropin)，亦即濾泡刺激素 (Follicle–Stimulating Hormone, FSH)和黃體成長激素(Luteinizing Hormone, LH)。當 FSH 和 LH 達到卵巢，FSH 會促進濾泡的生長、將 Androgen 轉換成 Estrogen、以及促進 LH 受體的表現；LH 對於濾泡的生長也是必須，特別是在濾泡生長的末期(late stage)，此外 LH 也會誘導排卵的發生。

Proestrus 發情前期

- 卵巢的濾泡因 FSH 的影響而大幅度的生長。濾泡的成熟，一開始是由 FSH 所驅動，之後才是由 LH 影響濾泡的成熟。
- 此時，Estrogen 濃度開始上升：
 - Estrogen 會刺激子宮的細胞增殖，並且造成液體堆積於輸卵管和子宮。
 - 陰道上皮細胞(Epithelial Cells)因 Estrogen 而開始角質化(Cornification)。
- 當 Estrogen 濃度達到最高，會對下視丘有正回饋作用，使得 LH 的分泌達到高峰(LH Surge)，並且造成排卵(約在 LH Surge 後的 12–14 小時排卵)

Estrus 發情期

- 由於 Estrogen 濃度上升，使得母鼠願意接受公鼠的騎乘。
- 排卵發生在 Estrus，也就是大約在 LH Surge 後的 12–14 小時發生。
- 此時期，子宮和陰道的細胞持續增殖，且液體持續堆積。
- 陰道的上皮細胞由於因角質化達到了最大的厚度，而開始有角質化的無核上皮細胞 (Keratinized/Cornified Anucleated Epithelial Cells)開始脫落。

Metestrus 發情後期

- 排卵後，黃體(Corpora Lutea)形成，使得主要的賀爾蒙分泌由 Estrogen 轉變 Progesterone。
- 由於 Estrogen 濃度降低，子宮的生長停止，且陰道上皮細胞不再角質化。

- 在 Metestrus 和 Diestrus，Progesterone 會抑制 LH 分泌，因此避免其他濾泡排卵。
- 在 Metestrus 末期，黃體的消退會造成 Progesterone 的合成減少，因為 Progesterone 被轉換成效力較弱的另一個型態 20 α -OH-Progesterone。

Diestrus 發情間期

- 此階段是動情週期的靜止期(Quiescent Phase)。
- Estrogen 濃度還是很低。
- 若沒有交配的行為出現，黃體會製造少量的 Progesterone
- 由於 Progesterone 濃度減少，LH 的分泌再度增加，濾泡再度成長，準備進入下一個 Proestrus。因此，沒有交配的小鼠，黃體的退化是發生在 Diestrus 末期。

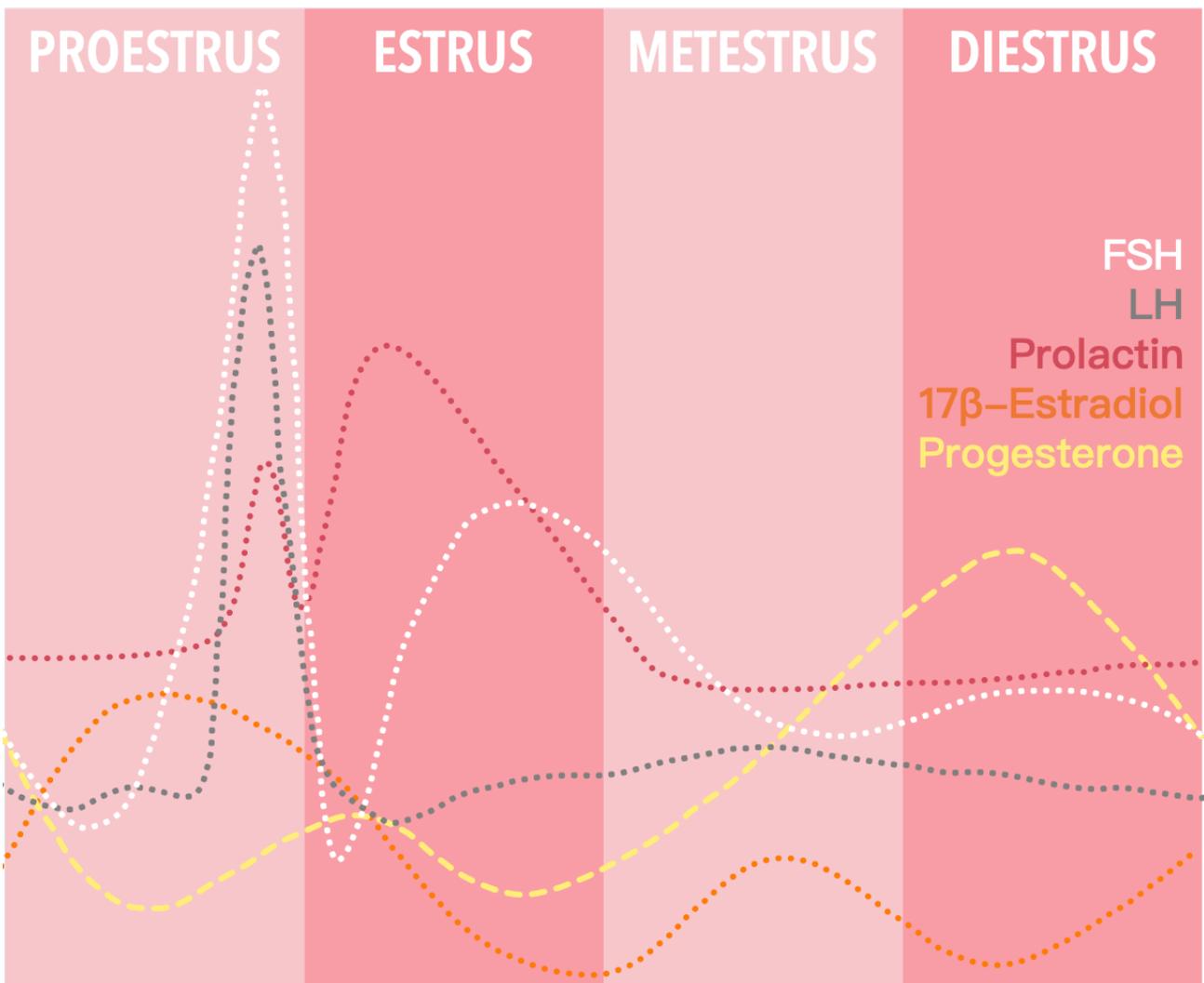


Figure 4.1 動情週期各階段的血液中賀爾蒙的量。

(Reference: The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy，曾中柏重繪)

賀爾蒙與其他和繁殖有關的生理作用

Pregnancy 懷孕

- 黃體的形成是懷孕能不能維持下去的主因。在許多其他哺乳動物，排卵後黃體會自然形成，但在小鼠卻不是。
- 小鼠在交配時，對陰道產生的機械性刺激會引起神經反應，造成 Pituitary 分泌 Prolactin (泌乳素/催乳素)達到高峰，且會持續到懷孕中期(約 8-10 日)。黃體有 Prolactin 的受體，而 Prolactin 可以作為 Antiapoptotic (抗細胞凋亡) Agent、促進黃體的存活。此外，Prolactin 是一種 Luteotropin (促黃體素)，會促進黃體細胞分化以及增加 LH 受體的表現。但維持懷孕最重要的因子還是要仰賴黃體分泌的 Progesterone。
- 此外 Prolactin 會抑制 20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase，也因此避免了 Progesterone 被轉變成 20 α -OH-Progesterone。

Parturition 分娩

- 分娩的發生主要是由胎兒所引起的。研究指出，胎兒肺部所分泌的 Surfactant (肺表面張力素)進入 Amniotic Fluid (羊水)後會引起一連串的事件而導致分娩。首先，Amniotic Fluid 內的巨噬細胞因 Surfactant 而活化，活化後的巨噬細胞遷移至媽媽的子宮，並且在子宮製造可以引起類似發炎反應的細胞激素。因此，Progesterone 受體的表現開始減少，子宮的收縮增加，且 Prostaglandin 的合成增加。這個過程最關鍵的因素是 Prostaglandin F₂ α (PGF₂ α)的合成增加，PGF₂ α 有 Luteolytic (黃體溶解性)的作用，會引起黃體的退化。
- 雖然 Prolactin 和 Oxytocin 被認為與分娩的機制有關，但有研究指出缺乏 Oxytocin 的小鼠也是可以分娩的，雖然這個過程會比較久。

Postpartum Estrus 分娩後發情

- 大鼠跟小鼠在分娩後的 24-48 小時內會進入發情期，若這時籠內有公鼠，則會有交配的行為，若受孕成功，則母鼠會一邊哺乳一邊懷孕，也因此可以增加母鼠分娩的次數。不過若是在分娩後發情配種時懷孕，則懷孕期可能會延長 3-10 日，在某些近親品系小鼠更可能延長至 13 日。懷孕期之所以會延長是因為「哺乳」這個刺激使得受精卵延後著床。

- Estrogen 對於受精卵的著床扮演不可或缺的角色，它會使得 Blastocyst (胚胎發育的一個階段)活化、使子宮做好著床的準備、並且啟動著床的過程。
- 一般的情況下，在交配後的第 4 天，Estrogen 濃度會上升，子宮 Stromal (基質)細胞因為高濃度的 Estrogen 和 Progesterone 的影響而增生，使得受精卵得以著床。
- 產後發情配種之所以會延後著床是因為，哺乳中的母鼠的 FSH 的分泌被抑制了，所以 Estrogen 的濃度很低，而胚胎就發育至 Blastocyst 階段，並且停留在休眠狀態；當「哺乳」這個刺激消失了，Estrogen 濃度開始增加，受精卵就可以正常著床。

Pseudopregnancy 假性懷孕

- 小鼠若是經歷了 Sterile Mating (不育的配種)(譬如在採集陰道抹片樣本時對子宮頸過度刺激)，則會造成假性懷孕。
- 假性懷孕和懷孕的時候一樣，Prolactin 的分泌達到高峰，黃體活化且開始分泌 Progesterone，且子宮開始變化使其準備著床。
- 但由於沒有胚胎，子宮分泌的 PGF2 α 的量開始增加，使得黃體開始退化。在 Sterile Mating 後的第 8 天，Progesterone 濃度開始下降。
- 在 Sterile Mating 後的第 10-13 天，假性懷孕結束，動物重返動情週期。
- 此外，當母鼠群體飼養時，假性懷孕也會自發性地發生(Lee-Boot Effect)，但這情形跟費洛蒙比較有相關

動情週期鑑定

STAGING ESTROUS CYCLE

- 由於 Estrogen 會造成母鼠外生殖器外觀的變化、以及造成陰道細胞型態的變化(譬如 Estrogen 會造成上皮細胞角質化(Cornification of Epithelial Cells)，因此若要檢查母鼠處在動情週期何階段，最常用的兩個方法就是肉眼觀察母鼠外生殖器、以及進行陰道抹片(Vaginal Smear)觀察細胞型態。
- 肉眼觀察適合用在只需要辨識 Proestrus 和 Estrus；但若是需要準確辨識出動情週期每個階段，則建議進行陰道抹片。

註：除了前述 2 方法，尚可測量電阻抗(Electrical Impedance)或進行尿液生化分析，但較少用，在此不多加贅述。

肉眼觀察 Visual Method

(以下主要是針對小鼠的資料，但大鼠應該差異不大)

ESTROUS STAGE	APPEARANCE
Proestrus	陰道開口較開，顏色粉紅、潮濕、腫脹、陰道開口處可見皺摺。
Estrus	陰道外觀類似發情前期，陰道開口更開，但顏色呈較淡粉紅色、較不潮濕、較不腫脹，皺摺很明顯。
Metestrus	陰道開口較小、不腫脹、顏色較白。
Diestrus	陰道開口緊閉、不腫脹。

Table 5.1 動情週期各階段之母小鼠外生殖器外觀變化。

(Reference: 1. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. 2. Mouse estrous cycle identification tool and images.)

- 陰道和外生殖器的外觀變化都是因為 Estrogen 所造成。
- 肉眼觀察的優點是不會造成假性懷孕(Pseudopregnancy)或傷害陰道上皮細胞。

- 一般而言，若在下午的時候觀察到母小鼠陰道口打開、腫脹、粉紅、且潮濕，則該母小鼠在當天晚上有很高的機會會和公小鼠有配種的行為。

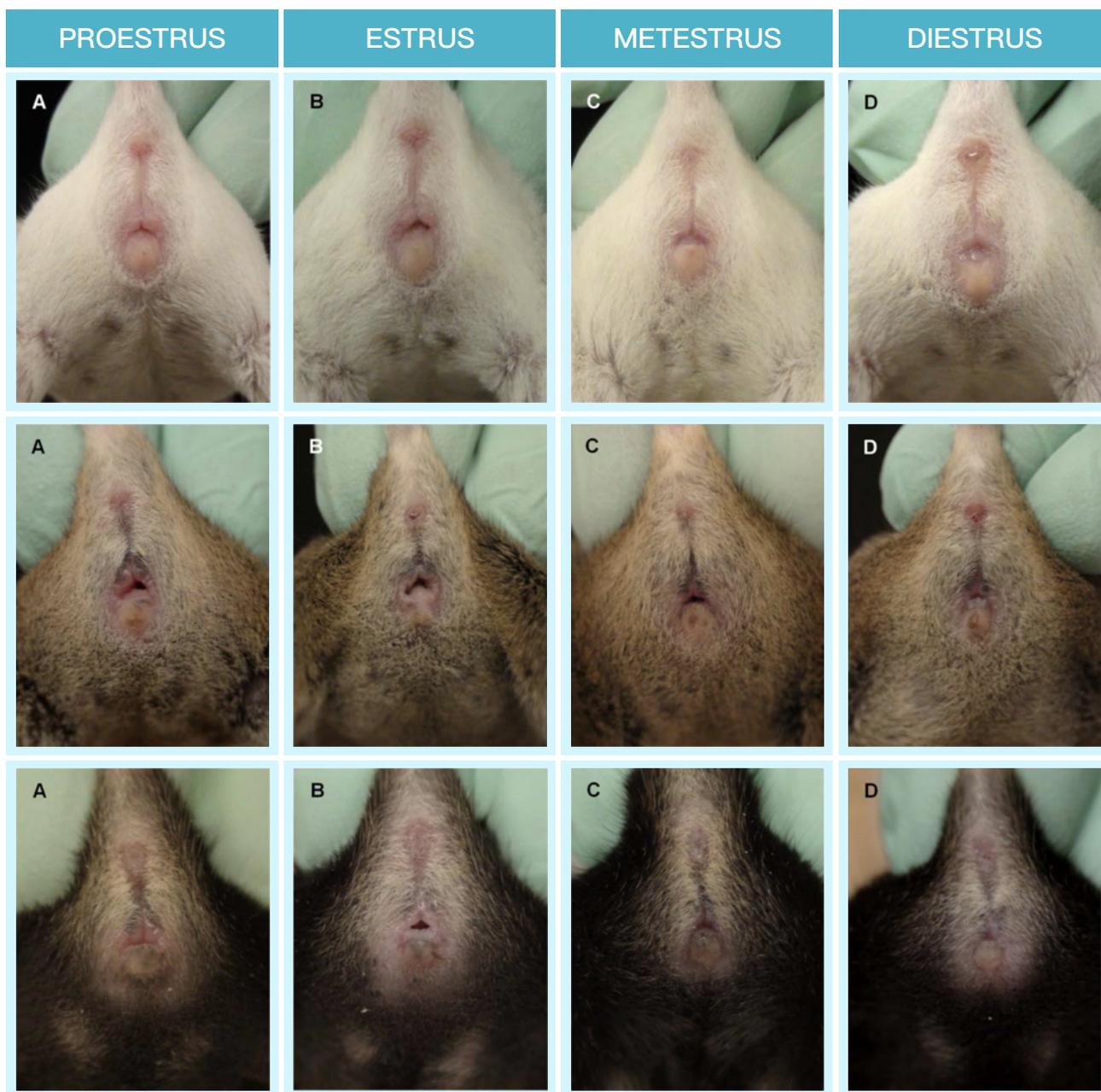


Table 5.2 不同毛色小鼠在各發情週期階段之外生殖器外觀
 (Reference: Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images)

陰道抹片細胞學檢查 Vaginal Cytology

- 因卵巢濾泡分泌的 Estrogen 會造成陰道上皮細胞角質化(Cornification)，因此在動期週期不同階段可觀察到不同的細胞形態變化，也因此可藉由觀察陰道細胞而得知母鼠處在動情週期哪個階段。
- 評估方式主要是藉由觀察 Neutrophils (嗜中性球)、Cornified Anucleated Epithelial Cells (角質化無核上皮細胞)、和 Nucleated Epithelial Cells (有核上皮細胞)的有無、以及其出現的密度和分佈來做判斷。
- 採樣的方式包含 Vaginal Lavage 和 Swabbing。Vaginal Lavage 通常可以採集到較多的細胞樣本，較好判斷，是比較建議的方法。

註：由於動物對於人為的操作一開始都會較緊迫，因此有可能進行陰道細胞學檢查的頭三天會比較不好判讀細胞抹片。但一旦過了這段時間，動物習慣了操作，就會比較好判斷。

註：排尿與排便是常見的緊迫反應，因此在採樣時要確認有將陰道周圍清潔乾淨，以免在採樣時被污染而造成判讀不易。

Vaginal Swab

- 用無菌 Saline 將無菌棉棒末端沾濕，將棉棒插入小鼠的陰道內，在陰道內輕柔地轉動棉棒、讓棉棒與陰道壁充分接觸、摩擦，再將棉棒取出。
- 將棉棒塗抹在乾的載玻片上、待其自然乾燥，將其染色後再以顯微鏡觀察(染色的部分請看 Vaginal Lavage 的部分)。

Vaginal Lavage

- 實驗材料
 - 無菌 Pipette 或 Eyedropper
 - 無菌 Phosphate-Buffered Saline (PBS 1x)
Phosphate-Buffered Saline 或 Normal Saline 是比較建議用來做 Vaginal Lavage 的液體。由於 Saline 是等張液體(Isotonic)，水是低張溶液(Hypotonic)。若是用水做陰道灌洗的話，容易造成上皮細胞型態變形、以及嗜中性球破裂，使得判讀不準確。
 - 光學顯微鏡
 - 玻璃載玻片
- 樣本採集

- 用 Pipette 或 Dropper 吸取 Saline。
註：目前查到的幾篇文獻，不管是大鼠還是小鼠，都是建議抽 10 μ L (=0.01 mL)；
僅有一篇文獻建議小鼠 0.1 mL、大鼠 0.2 mL。
- 將 Pipette 或 Dropper 末端輕柔地插入陰道，小鼠深度約 1–2mm、大鼠深度約 5–10 mm，用 Saline 灌洗陰道 3–5 次。
註：小心不要插太深，插太深可能會因過度刺激而造成假性懷孕，且可能會造成長達 14 天的發情間期(Diestrus)。
註：注意不要一次就灌太多液體進入陰道。

– 樣本採集後的處理，有以下幾種不同的方式：

- Dry Fixed Slide：將採集到的陰道液體樣本抹在玻璃載玻片，待其風乾後染色。
註：Dry fixed slide 在染色前不需要 Spray fixative (如 Spray-Cyte™)。
註：若染色的方法是必須在樣本風乾前就給予 spray fixative，則稱為 Wet fixation，如 Papanicolaou Stain。
- Wet Smear：將採集到的陰道樣本滴在載玻片上後，蓋上蓋玻片，可以染色也可不染色就直接觀察。
- 染色：
 - Romanowsky-Type Stains (如 Modified Wright's 和 Wright's Giemsa)和 Toluidine blue O 是最常用且建議用來做陰道抹片染色。
 - Papanicolaou Stain 也可用來做陰道細胞學染色，可得到更細節的資訊。

– 觀察&判讀

- 用 10 \times 和 40 \times 物鏡觀察，10 \times 用來觀察各種型態細胞出現的比例，40 \times 則可觀察細胞型態特徵等細節。
- 一開始觀察抹片時，可先檢查是否有嗜中性球的出現？數量是否很多？還是偶爾才會看到一顆嗜中性球？若嗜中性球數量多且可持續觀察到，則可能是處在發情後期或發情間期；若嗜中性球很罕見或無，則可能是處在發情前期或發情期。
- Proestrus
 - 此時期細胞抹片最顯著的特徵就是出現小又圓的有核上皮細胞(Nucleated Epithelial Cells)，外觀跟大小都是相對一致的，染色是嗜鹼性染色 (Basophilic)。
 - 典型來講，此階段應該不會看到嗜中性球，若有看到少數或極少量嗜中性球，則可能是剛從 Diestrus 進入 Proestrus。

- 可能會看到少量大的上皮細胞和角質化的無核上皮細胞(Keratinized/Cornified Anucleated Epithelial Cells)。當動情週期逐漸來到發情期，角質化的無核上皮細胞數量會越來越多。
- Estrus
 - 此時期細胞抹片最主要的細胞族群是角質化的無核上皮細胞 (Keratinized/Cornified Anucleated Epithelial Cells)。
 - 偶爾在整個發情期階段也會出現一些有核上皮細胞(Nucleated Epithelial Cells)。
 - 在發情期末期偶爾可見到嗜中性球。
 - 大鼠的發情期末期會出現數量相對較多的有核上皮細胞(Nucleated Epithelial Cells)。
- Metestrus
 - 此時期在細胞抹片可見到由角質化無核上皮細胞和嗜中性球混合在一起的細胞型態。
 - 在小鼠，此階段偶爾可見有核上皮細胞；在大鼠，整個 Metestrus 應都可見有核上皮細胞。
 - 隨著時間過去，嗜中性球的數目會越來越多，甚至超過上皮細胞 10 倍；此外，細胞結構非常緻密。但是當達到發情後期的末期，嗜中性球和上皮細胞的數目則會逐漸減少。
- Diestrus
 - 此時期的特徵是角質化無核上皮細胞的數量大量減少。整體細胞結構主要是由嗜中性球、以及有核上皮細胞組成，外加非常少量的無核上皮細胞。
 - 嗜中性球的數量通常都是高於上皮細胞的。
 - 在 Diestrus，有可能會觀察到細胞結構是由少量的嗜中性球和上皮細胞組成的。
 - 在 Diestrus 末期，上皮細胞會變得越來越圓，且數量逐漸變多，代表逐漸步入發情前期。

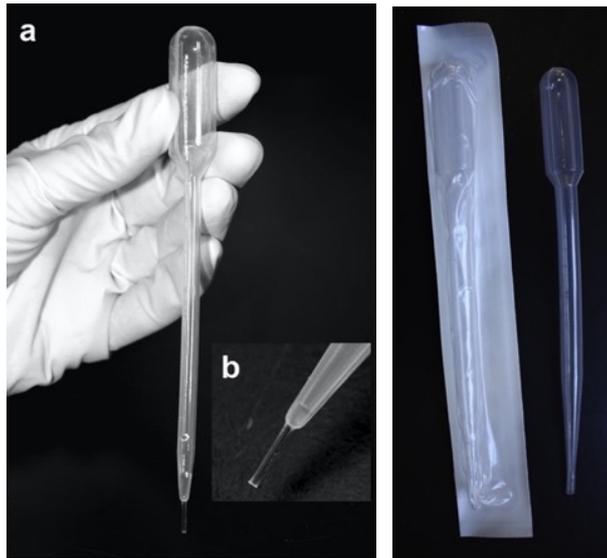


Figure 5.1 建議用來做陰道抹片採樣的 Dropper (也可使用 Pipette)。

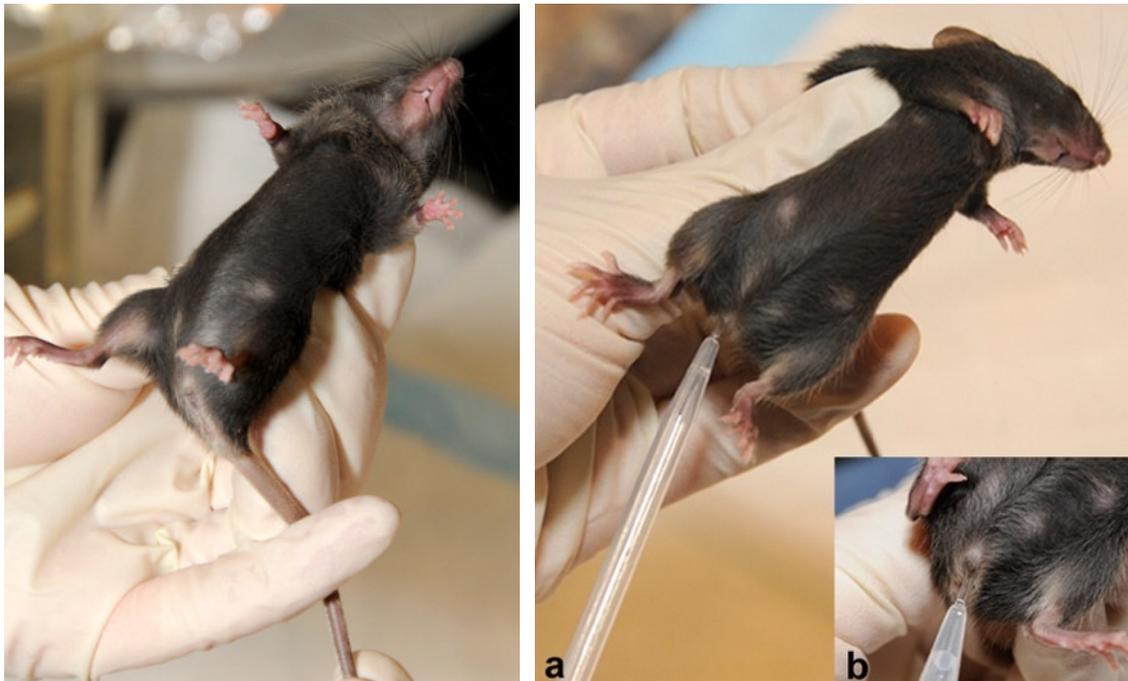


Figure 5.2 小鼠不同保定方式的陰道抹片採樣。
(Reference: Assessing Reproductive Status/Stages in Mice)



Figure 5.3 小鼠不同保定方式的陰道抹片採樣。
(Reference: The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy)

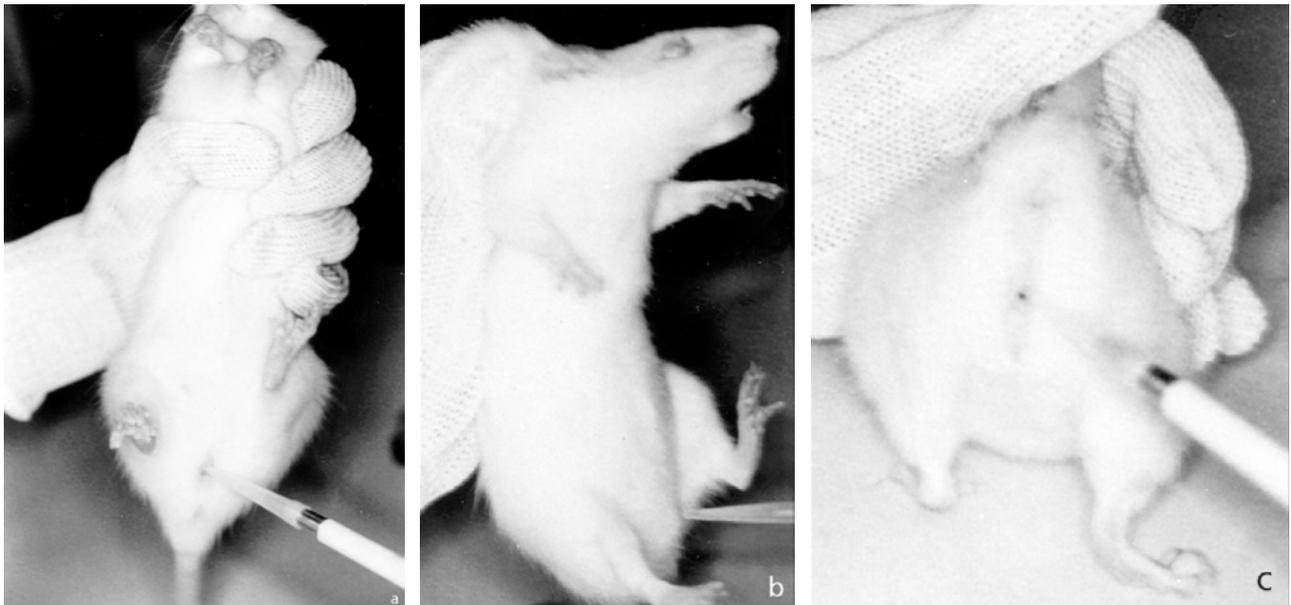


Figure 5.4 大鼠不同保定方式的陰道抹片採樣。
(Reference: Determination of the Estrous Cycle Phase of Rats: Some Helpful Considerations)

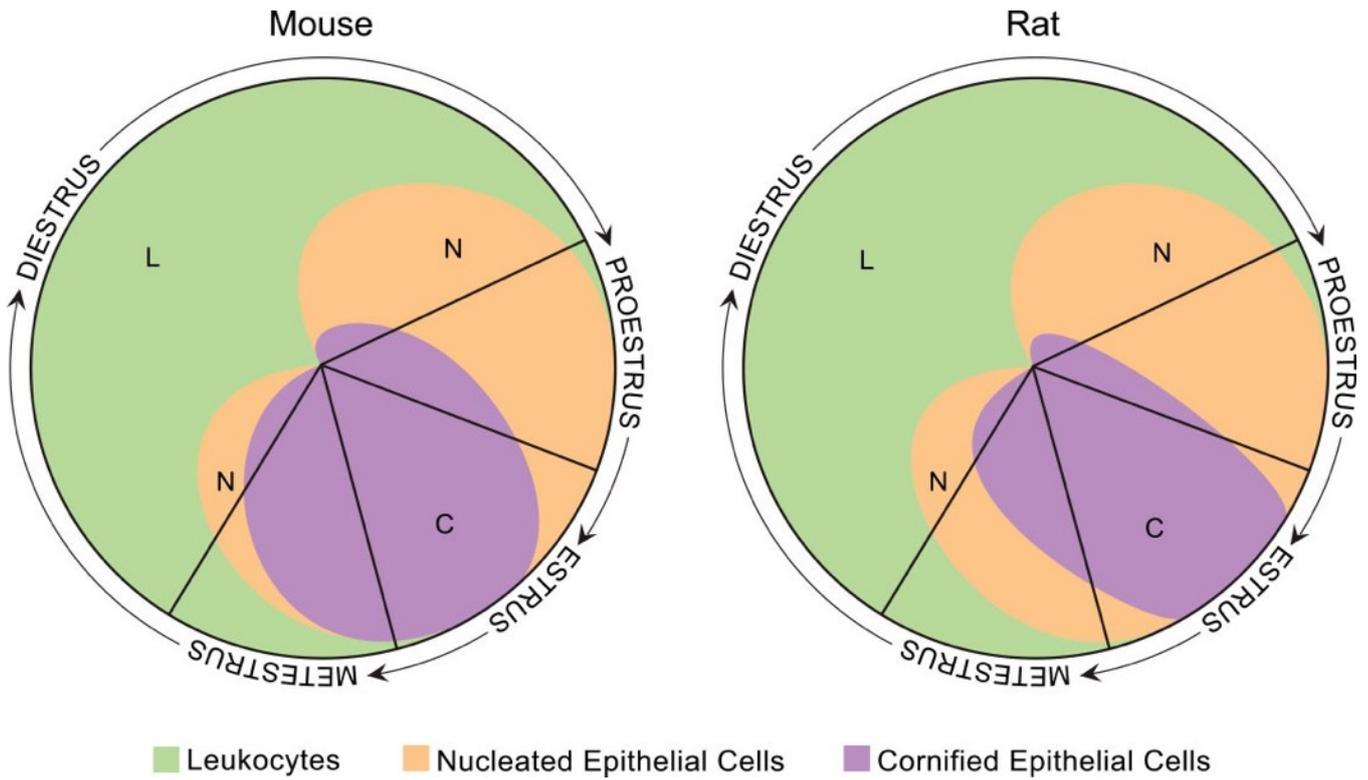


Figure 5.5 小鼠跟大鼠在動情週期各階段之細胞比例圖。

(小鼠 Reference: Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images

大鼠 Reference: Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse)

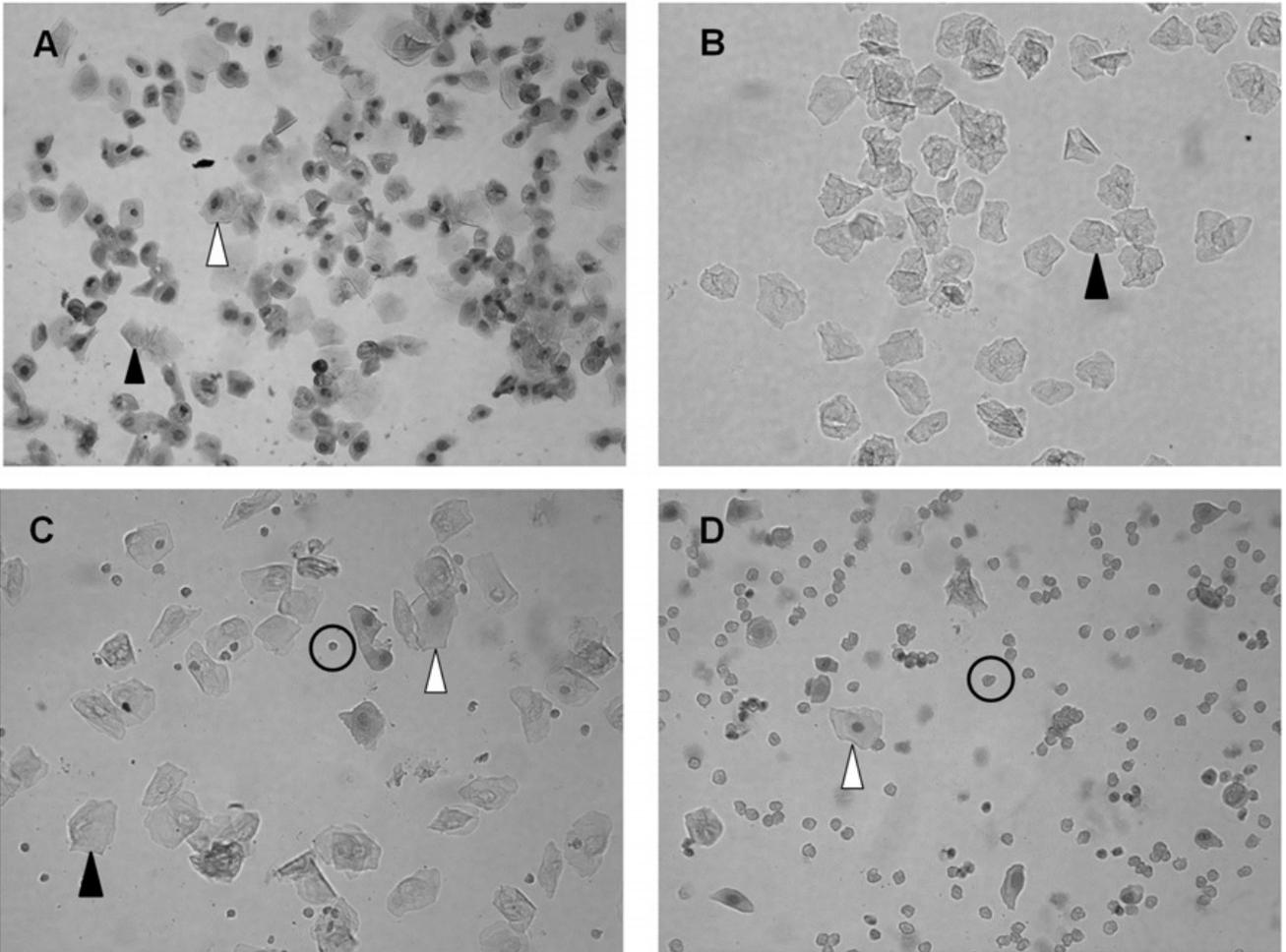


Figure 5.6 動情週期各階段的陰道抹片結果。圓圈是嗜中性球、黑色箭頭是角質化無核上皮細胞、白色箭頭是有核上皮細胞。圖 A 是 Proestrus、圖 B 是 Estrus、圖 C 是 Metestrus、圖 D 是 Diestrus。

(Reference: Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images)

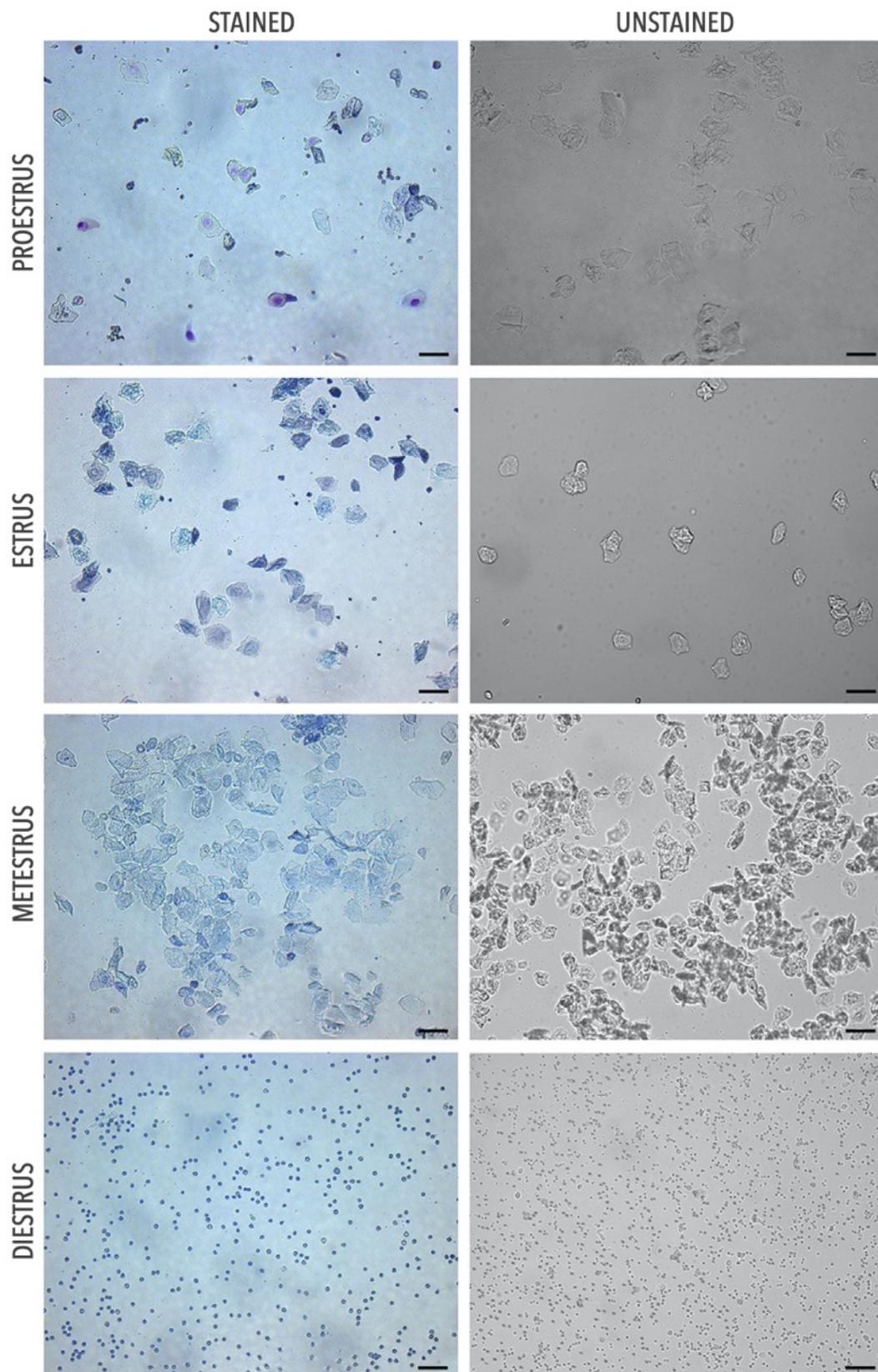


Figure 5.7 經染色與未經染色之小鼠各動情週期之陰道抹片。有染色的抹片的處理方式是待其自然風乾後用 May-Grünwald Giemsa 染色。

(Reference: The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy)

動情週期	Cell Type			細胞密度
	嗜中性球	有核上皮細胞	角質化無核上皮細胞	
Diestrus/Proestrus	+ to ++ (Predominant)	+ Well-formed	0 to +	Thin
Proestrus	0 to +	+ to +++ Well-formed (Predominant)	0 to +	Medium
Proestrus/Estrus	0	+ to ++	++ to +++ (Predominant)	Medium
Estrus	0	0	++ to +++ Relatively small cells (Predominant)	Medium to heavy
Metestrus 1	0 to ++	0	++ to +++ Larger, more flat and clumped than in estrus (Predominant)	Medium to heavy
Metestrus 2	++ to +++ (Predominant)	+ to ++ Often irregularly shaped and vacuolated	+ to ++	Medium to heavy
Diestrus	+ to +++ (Predominant)	+ Often irregularly shaped and vacuolated	0	Thin

表 5.2 發情週期各階段之陰道抹片之細胞型態。細胞密度：0: none； +: few； ++: moderate； +++: heavy。

(Reference: A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology)

配種系統

MATING SYSTEMS/SCHEMES

6.1 一公一母(Monogamous: Pair Breeding)

6.1.1 一隻公鼠與一隻母鼠一起置於籠內配種。

6.1.2 優點：

6.1.2.1 可準確紀錄親代子代資訊。

6.1.2.2 公小鼠可與母小鼠一直待在同一籠，或者是將懷孕母小鼠單獨隔離，由使用者視狀況決定(註：繁殖大鼠者，須將懷孕母大鼠單獨隔離，請見 6.1.7)。

6.1.2.3 減少公鼠因過度配種而 burnout。

6.1.3 缺點：

6.1.3.1 所需公鼠數量較多。已經配種過的公鼠不可和其他公鼠放在同一籠，因為會打架(曾經看過幾次本中心有使用者用兩公一母的方式配種，結果兩隻公鼠打架打的很嚴重)。

6.1.3.2 需使用較多籠子。

6.1.3.3 若公小鼠攻擊性較強，可能會攻擊仔鼠。

6.1.4 若將懷孕母鼠單獨隔離，仔鼠可得到母鼠較完善照顧，以增加存活率，也可做較準確紀錄；若未將懷孕母鼠單獨隔離，則可利用分娩後發情，讓母鼠和公鼠配種，增加母鼠產量(或者也可在分娩後第一次換籠時將公鼠移出)。

6.1.4.1 公小鼠是否會一起照顧仔鼠端視該公小鼠性格，因此需仰賴使用者觀察，倘若公小鼠攻擊性較強，建議將懷孕母小鼠單獨隔離。

6.1.5 分娩後發情(Postpartum Estrus)：由於母小鼠在分娩後 24 小時內會發情，若籠內有公小鼠，則母小鼠和公小鼠會在這段時間交配，使得母小鼠一邊哺乳一邊懷孕。利用產後發情配種可增加母小鼠生產胎數。

6.1.5.1 若母小鼠一邊哺乳一邊懷孕，必須在母小鼠分娩前將仔鼠離乳分籠，詳情請見 8.10 之規定。

6.1.5.2 若利用產後發情配種，由於泌乳會造成受精卵延後著床，因此會延長懷孕期約 3–5 日，在某些近親品系懷孕期可能會延長 12–13 日。即使懷孕期可能會延長，**使用者還是必須在該離乳時讓前一胎仔鼠離乳，以免 8.10 之情事發生。**

6.1.5.3 由於本中心 9 樓小鼠 IVC 之小型鼠籠尺寸較小，未達到農委會之標準，因此仍必須將懷孕母小鼠單獨隔離一籠，並且給予巢料，以利其築巢照顧仔鼠；若使用 9 樓小鼠 IVC 之大型鼠籠則不受此限制。

6.1.6 請確實提供巢料給懷孕母鼠，以利其築巢照顧仔鼠。

6.1.7 **繁殖大鼠者，依據農委會之標準，由於本中心大鼠籠之尺寸，仍必須將懷孕母大鼠單獨隔離一籠，並且給予巢料，以利其築巢照顧仔鼠。**

6.2 一公多母(Polygamous: Trio Breeding & Harem Breeding)

6.2.1 一隻公鼠與兩隻、或兩隻以上母鼠配種，此配種系統可快速取得大量子代，可分成 Trio Breeding (一公配兩母)和 Harem Breeding (一公配三至四母)

註：Harem Breeding 在繁殖場其實是一隻公的和多隻母的放在一起讓他們繁殖，母畜懷孕也不會將其單獨隔離，讓母畜彼此照顧彼此的仔畜。但由於本中心鼠籠尺寸之限制，不可能用真正的 Harem Breeding，因此母鼠懷孕務必要將其單獨隔離一籠。

6.2.2 優點：

6.2.2.1 所需要的公鼠數量較少。再提醒一次，若公鼠已配種過，則不可和其他公鼠放在同一籠，因為他們會打架。

6.2.2.2 所需籠數較少。

6.2.2.3 可較快取得大量子代。

6.2.3 缺點：

6.2.3.1 較不易準確記錄資訊。

6.2.3.2 本中心嚴禁籠內有兩胎仔鼠。

6.2.3.3 較無法利用分娩後發情的優勢，因此每隻母鼠所能分娩的次數較少。

6.2.3.4 公鼠較可能因過度配種而 burnout。

6.2.4 **配種籠內大、小鼠總數量必須遵守本中心飼養密度之規定。**

6.2.5 **一旦發現母鼠懷孕就必須將其單獨隔離一籠，並且給予巢料，以利其築巢照顧仔鼠。**

6.2.6 **嚴禁一公配多母之配種籠內同時有新生仔鼠，若本中心發現此情形，將給予違規**

記點 1 點，且研究人員須在 24 小時內完成分籠改善。同一人員第二次累犯將違規記 2 點，第三次累犯將禁止其操作動物繁殖實驗。

6.2.7 本中心嚴禁兩隻母鼠與兩胎仔鼠於同一籠內。若本中心發現此情形，將給予違規記點 1 點，並由獸醫師通知研究者於 24 小時內完成分籠。若研究者無法於時限內完成改善，將連續違規記點。同一人員第二次累犯將違規記 2 點，第三次累犯將禁止其操作動物繁殖實驗。

6.3 若需使用保母鼠協同照顧仔鼠，則允許籠內 1 隻保母鼠、1 隻母小鼠、及 1 胎仔鼠。

6.3.1 請注意該保母鼠不可為懷孕狀態。

6.3.2 本中心僅允許小鼠使用保母鼠，大鼠因鼠籠尺寸限制，不可使用保母鼠。

6.4 若需變更使用之繁殖策略，請向本中心做變更申請。

6.5 配種時，是將母鼠放入公鼠籠內。因為若是將公鼠放入母鼠鼠籠，公鼠會先花時間標定地盤才交配，因此為了縮短時間，是將母鼠放入公鼠籠內做配種。

保母鼠

FOSTER MOTHER

7.1 以下情況需要保母照顧仔鼠才得以存活：

- 7.1.1 部分品系母鼠母性較差，如 NZB/BINJ。
- 7.1.2 生第一胎時母性較不好、不會照顧、甚至攻擊仔鼠。
- 7.1.3 母鼠死亡。
- 7.1.4 母鼠無法哺乳。
- 7.1.5 有些突變會使得母鼠乳汁對仔鼠有傷害，如 Atp7btx 所造成的 Toxic Milk、或 Slc30a4lm 所造成的 Lethal Milk。

7.2 母鼠是否有照顧仔鼠可由以下幾點辨別：

- 7.2.1 母鼠是否有築巢、並且將仔鼠置於巢的中央？若仔鼠四散在籠內各處，則可能該母鼠母性較差。
- 7.2.2 仔鼠是否可見 Milk Spot？Milk Spot 是位於胃內的乳汁，由於新生仔鼠皮膚薄，因此可於仔鼠左後腹側見到白色斑點，此即為 Milk Spot。有見到 Milk Spot 代表母小鼠有哺乳仔鼠，正常情況應在第一日齡就可見 Milk Spot。



Figure 7.1 仔鼠左腹側可見白色斑點，即為 Milk Spot。

(JAX[®]. Mice Pup Appearance by Age)

7.3 保母鼠的選擇

- 7.3.1 越早將仔鼠給保母照顧，則有越高的仔鼠存活率。理想的保母鼠必須要已生產過

兩、三胎，且仔鼠都順利離乳。

7.3.2 建議保母鼠自己的仔鼠(Natural Litter)與欲被照顧之仔鼠(Foster Litter)毛色不同，對於日後辨識仔鼠會比較有幫助。

7.3.3 由於乳汁的分泌量跟母鼠自身仔鼠的年紀呈相關，因此 Natural Litter 與 Foster Litter 日齡不可相差太多，最多相差兩日齡以內。

7.3.4 總仔鼠數量應盡量維持原本的數量；保母鼠分泌的乳汁最多足以供應其原本生產仔鼠數再多加兩隻，因此將 Foster Litter 給保母鼠照顧時，可能會需要將些許 Natural Litter 剔除掉。

7.4 將 Foster Litter 轉移給保母鼠之流程：

7.4.1 穿戴乾淨手套。

7.4.2 先將保母鼠及公鼠(若籠內有公鼠的話)暫時移至另一籠。

7.4.3 將保母鼠的味道轉移到 Foster Litter 是能否轉移成功很重要的因素。

7.4.3.1 讓保母鼠尿在手套，或者是 Foster Litter 身上。

7.4.3.2 也可用保母鼠鼠籠內的髒墊料輕柔地搓揉 Foster Litter，讓 Foster Litter 身上有味道。

7.4.4 將 Foster Litter 與保母鼠的仔鼠放在一起，過了 15 分鐘後再將保母鼠與公鼠(若籠內有公鼠的話)放回籠子。

7.4.5 此外，讓保母鼠接觸 Foster Litter 時，可以提供一些東西讓保母鼠分心。

7.4.5.1 像是給予味道強烈的液體，譬如給予一滴 Wintergreen Alcohol 或 Povidone-Iodine 液體。

註：查到的資料並未明確指示說液體是要滴在哪裡。

7.4.5.2 或是在籠子的底層放置一些 Food Treats。

7.4.6 將鼠籠置於可輕易觀察而不用移動籠子的地方。

7.5 保母鼠是否接受 Foster Litter

7.5.1 若保母鼠接受 Foster Litter，應該會在 1 小時內就哺乳並清潔 Foster Litter。

7.5.2 若未在 6 小時內觀察到前述行為，則需要再尋找另一隻保母鼠；若可以的話，最好是在 2-3 小時內檢查寶母鼠是否有照顧仔鼠。

7.6 Communal Mothering：此為另一種方式，也就是將兩隻懷孕母鼠放在同一籠，當他們分娩後會彼此照顧仔鼠。惟有鑒於農委會之規定，本中心鼠籠尺寸不允許兩胎仔鼠出現在籠內，因此本中心嚴禁使用此法。此外，亦有文獻指出若母鼠不熟悉彼此(除非該母鼠為同一胎出生之姐妹)，此法可能會造成母鼠彼此有攻擊性、偷彼此仔鼠、甚至傷害

仔鼠、造成仔鼠死亡。且，若兩隻母鼠分娩時間不一樣，較早出生之仔鼠勢必會比較強勢，使得較晚出生之仔鼠較無法獲得良好照顧。

7.7 讓已分娩過、較有經驗且母性好之母鼠協同照顧：

- 7.7.1 此法為使用者提供之方法，有經驗之母鼠會教導新手媽媽如何哺乳及照顧仔鼠。
- 7.7.2 讓另一母性較好、具有生產哺乳經驗之母鼠協同照顧仔鼠。
- 7.7.3 前提是須在分娩前就讓懷孕母小鼠與該母小鼠(保母)放在同一籠，讓他們彼此互相熟悉，研究者需密切觀察他們是否有打架的情形出現。
- 7.7.4 該母小鼠(保母)不可是懷孕狀態，以免籠內出現兩胎仔鼠。

離乳

WEANING

- 8.1 離乳是指將仔鼠從原本的鼠籠移出，並不是指仔鼠停止喝奶而開始食用飼料之時機。
- 8.2 日齡之計算，以分娩當日為第 0 日齡。
- 8.3 離乳後之大、小鼠開始納入本中心動物隻數計算，請使用者將離乳後之動物隻數填寫於使用者飼養管理記錄表。
- 8.4 當小鼠仔鼠達 21 日齡且體重超過 10 公克，或大鼠仔鼠達 21 日齡，則需將其與母親分離，並依性別及體重做分籠。公小鼠只有在離乳分籠時，能與其他同樣在同一週離乳分籠的公小鼠放在同一籠；日後若將不同籠公小鼠置於同一籠，或是將已配種過的公小鼠與其他公小鼠放在同一籠，會容易有打架的情形發生。
- 8.5 遠親品系仔鼠生長情形通常較好，大多都可在第 21 日齡離乳；惟對於一些基因轉殖品系、近親品系、或一些特殊品系之大、小鼠，可能因體型較小或體重過輕，需較長哺乳期，則可申請延後離乳，但請使用者提出相關之說明，經 IACUC 核准後才可延後離乳，惟最遲仍需於第 28 日齡離乳，且前提是該母鼠尚未生產下一胎仔鼠，因此建議需延後離乳者將懷孕母鼠單獨隔離一籠、勿利用產後發情讓母鼠與公鼠配種。
- 8.6 若本中心發現有仔鼠超過應離乳日齡卻未離乳分籠，將由獸醫師通知研究人員改善，倘若使用者未於 24 小時內改善，將給予違規記點 1 點，並且由獸醫師逕行分籠，分籠所造成之後果由使用者自行承擔。
- 8.7 若有特殊情形無法將仔鼠離乳，請告知獸醫師。
- 8.8 若該批仔鼠僅有 1 隻是特定性別，由於剛離乳分籠之仔鼠不建議單獨飼養，因此可有以下之選擇：
 - 8.8.1 若是單一母仔鼠則可和母親留在同一籠。
 - 8.8.2 若是單一公仔鼠則可和其他相近日齡但不同籠之公仔鼠放在同一籠(建議是將公仔鼠們一起放到新的籠子，以避免因地盤而打架)。
 - 8.8.3 若是單一母仔鼠則可和其他相近日齡但不同籠之母仔鼠放在同一籠(建議是將母仔鼠們一起放到新的籠子，以避免因地盤而打架)。

- 8.8.4 若是使用一公一母配種方式，且母鼠在哺乳仔鼠時公鼠也在籠內，則單一公仔鼠可和父親一起放到新的鼠籠內。
- 8.9 為確保仔鼠分籠後可自行進食，研究者可於仔鼠出生後第 12 日齡時開始放些許飼料於籠內底層，讓仔鼠有機會接觸飼料、並練習食用飼料；此外，於離乳分籠後的 7 日內，也可放些許飼料於籠內底層。
- 8.10 嚴禁前一胎仔鼠尚未離乳分籠，又讓母鼠生產下一胎仔鼠。此為嚴重違反動物福祉之情事，因新生仔鼠易被踐踏受傷、或競爭不過前一批仔鼠而無法得到母鼠良好照顧而死亡。此為嚴重違反動物福祉之情事，因此情形之新生仔鼠存活率很低、會造成動物生命不必要的浪費，違反實驗動物 3R 原則的減量(Reduction)和精緻化(Refinement)。若本中心發現此情形，將給予違規記點 1 點，並由獸醫師通知研究者於 24 小時內完成分籠。若研究者無法於時限內完成改善，將連續違規記點。同一人員第二次累犯將違規記 2 點，第三次累犯將禁止其操作動物繁殖實驗。



Figure 8.1 使用者未依規定將懷孕母鼠單獨隔離，使得前一胎仔鼠尚未離乳，又新生仔鼠。左圖之情形，隔天僅剩一兩隻新生仔鼠存活；右圖則是發現時 10 隻新生仔鼠已全數死亡。此情形嚴重違反動物福祉，嚴禁此情形出現於本中心。



Figure 8.2 與前兩張圖同一位使用者，籠內可見不同胎出生的小鼠。左圖可見籠內生了 3 胎小鼠，第二胎僅剩 1 隻存活，第三胎僅剩 2 隻存活；右圖則是第二胎僅剩 2 隻存活。這種情形，較晚出生的仔鼠存活率很低，會造成動物無謂的犧牲，請各位研究人員務必善盡動物照護責任，不要只是把動物丟在本中心讓他們不停繁殖。**此情形嚴重違反動物福祉，嚴禁此情形出現於本中心。**

性別鑑定

GENDER DETERMINATION

- 9.1 大鼠與小鼠性別鑑定主要是觀察肛門與生殖器之間之距離(Anogenital Distance)。公鼠 Anogenital Distance 會大於母鼠。
- 9.2 Genital Papilla (生殖器乳突)：在某些哺乳動物，其外生殖器是乳突樣，小鼠就是一個例子。
- 9.3 其他性別鑑定方法：
 - 9.3.1 母鼠：小鼠有 5 對乳頭、大鼠有 6 對乳頭；乳頭在懷孕期會越來越明顯。
 - 9.3.2 公鼠：公大鼠陰囊明顯。
- 9.4 在成鼠，性別可以很簡單地分辨出來。
- 9.5 在離乳日齡之仔鼠，性別鑑定可能會稍困難，建議要同時比較數隻仔鼠才好判斷。
- 9.6 新生仔鼠的性別鑑定更困難，建議也是要同時多隻一起比較才好判斷。

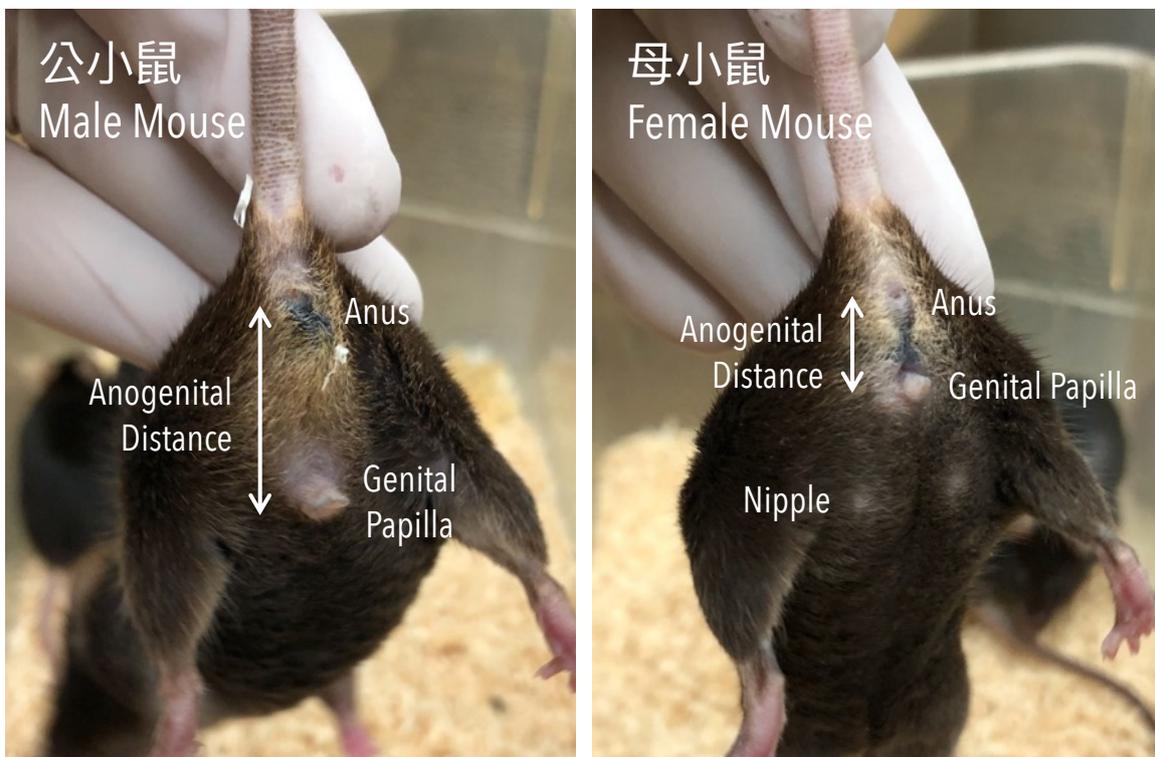


Figure 9.1 左圖為公小鼠，右圖為母小鼠。可見公小鼠肛門與生殖器之距離較母鼠長。



Figure 9.2 在鑑定離乳日齡仔鼠之性別時，建議是同時多隻一起比較才好判斷。

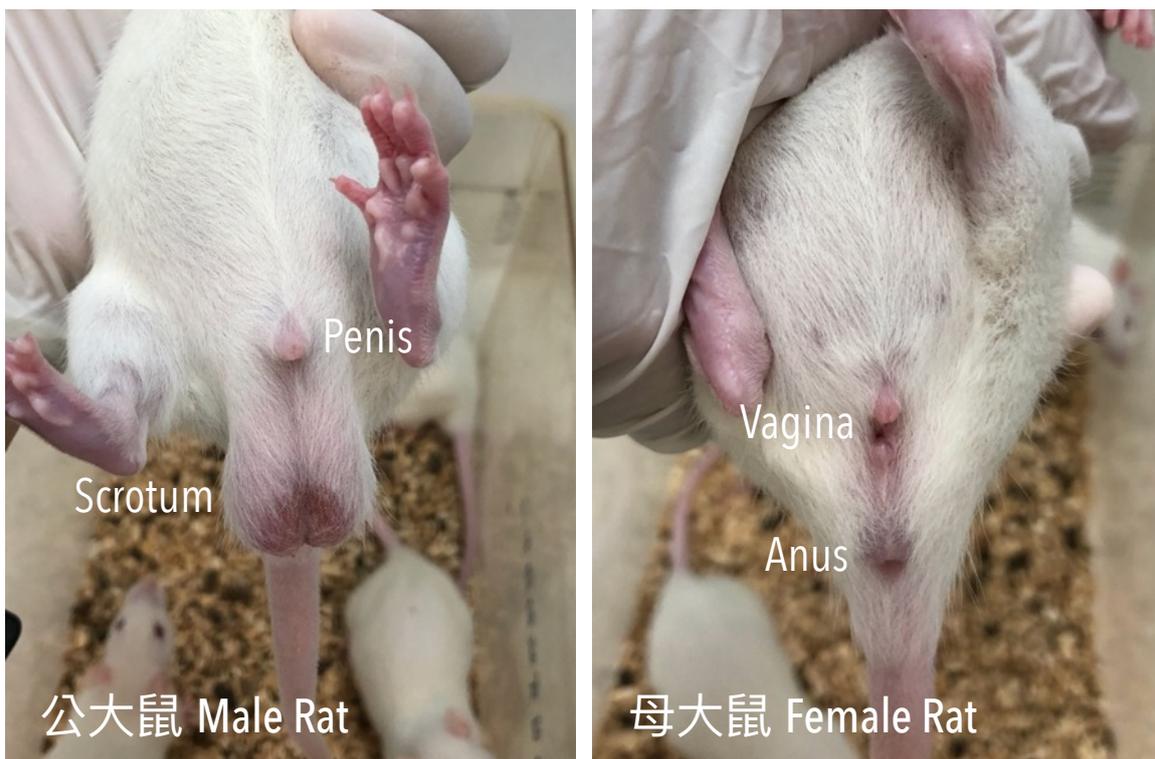


Figure 9.3 大鼠性別鑑定。

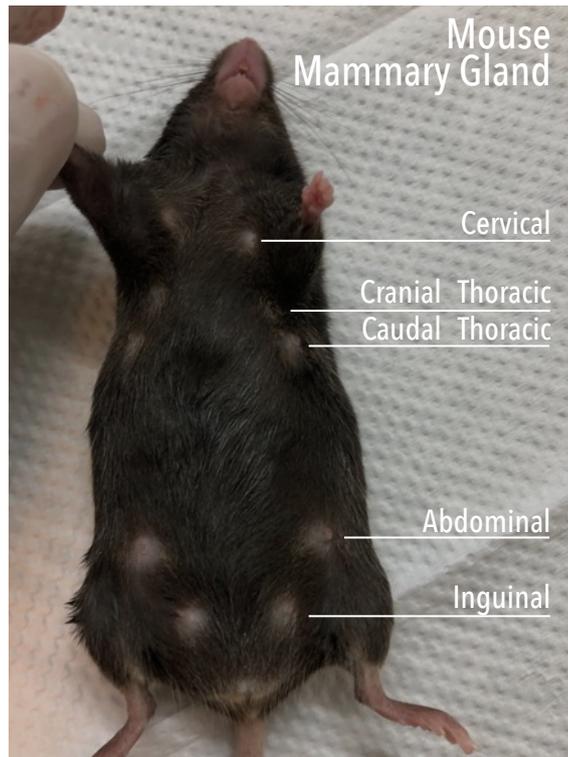


Figure 9.4 母小鼠乳頭，總共有 5 對。

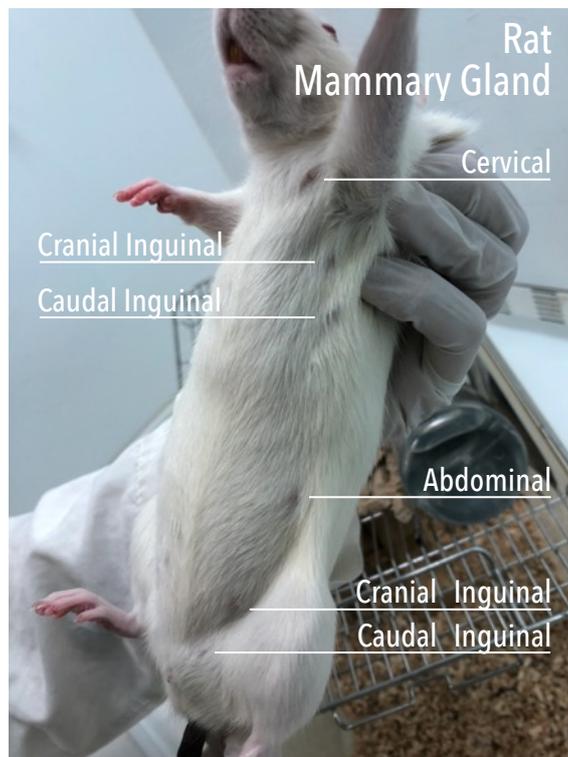


Figure 9.5 母大鼠乳頭，總共有 6 對。

繁殖小鼠換籠

CAGE CHANGING FOR BREEDING MICE

- 10.1 雖然母鼠分娩後的 3–5 天應避免干擾，但若籠內過度骯髒、Ammonia 濃度過高，對仔鼠也會有負面影響，因此仍需視情況提供乾淨鼠籠。
- 10.2 依據墊料髒污程度決定鼠籠更換時機：
 - 10.2.1 若墊料髒污程度已達需更換標準，則於仔鼠出生後第四日更換鼠籠。
 - 10.2.2 若墊料髒污程度未達需更換標準，則於仔鼠出生後第七日更換鼠籠。
 - 10.2.3 若因水瓶漏水導致籠內淹水，則為了避免母鼠與仔鼠因失溫死亡，本中心將逕行換籠再通知使用者。
 - 10.2.4 仔鼠出生七日後之鼠籠更換作業即依據本中心飼育人員例行性更換鼠籠之排程進行。
 - 10.2.5 於本中心飼育人員例行更換鼠籠以外之時間，仍須視墊料髒污之程度更換鼠籠。
- 10.3 為減輕更換鼠籠對仔鼠育成所造成的負面影響，進行前項鼠籠更換作業請遵守以下之步驟：
 - 10.3.1 穿戴乾淨手套，並且抓捏舊墊料三、四下，使手部沾染舊墊料之氣味。
 - 10.3.2 先將母鼠移入新籠，再用雙手將仔鼠、巢料、及巢穴下方墊料捧著一同搬入新鼠籠。
 - 10.3.3 可將些許舊墊料灑在新鼠籠內。
 - 10.3.4 進行下一鼠籠更換時，換穿新手套、或噴灑酒精於手部，將前一籠之氣味消除。
 - 10.3.5 此鼠籠更換之作法持續進行至該批仔鼠離乳。
- 10.4 若使用者對於鼠籠更換作業有疑慮，可填寫「自行處理飼養管理申請書」、並掛置「特殊飼養需求卡」於籠上，以自行更換鼠籠及墊料。
 - 10.4.1 使用者自行更換鼠籠及墊料仍須遵守動物中心之鼠籠更換標準程序進行作業，當墊料髒污程度達到標準，仍須換籠。
 - 10.4.2 若使用者有自行訂定之更換鼠籠程序，請洽詢獸醫師，經獸醫師同意後才可執行，並且需告知本中心飼育人員。

繁殖記錄卡

BREEDING RECORD CARD

11.1 繁殖動物之使用者務必確實填寫繁殖紀錄卡。

高醫動物繁殖記錄卡				IACUC #:		
	編號	品系	出生日期	親代		
♂						
♀						
配種日期	分娩		離乳			備註
	日期	仔鼠隻數	日期	♂	♀	

Figure 11.1 本中心現行使用之動物繁殖記錄卡(2020年二月更新)

11.2 上排表格為親代資訊，非強制要求填寫，視使用者是否有需要自行填寫。

11.3 下排表格為強制要求填寫，請使用者確實紀錄配種日期、分娩日期、仔鼠隻數、離乳日期、離乳時公仔鼠及母仔鼠隻數。

11.3.1 為避免驚擾母鼠，分娩當日只須填寫日期，不要求立即填寫仔鼠隻數，但最晚需在仔鼠出生後 7 日內登記仔鼠隻數。

11.3.2 若於分娩後 7 日內仔鼠全數死亡，則不必填寫仔鼠隻數。

11.3.3 若於分娩後 7 日內部分仔鼠死亡，但仍有存活，則記錄當下觀察到的隻數即可。

本中心例行性作業

ROUTINE WORK OF CLA STAFF

- 12.1 請使用者確實填寫出生日期於繁殖紀錄卡，本中心人員於例行性巡房或鼠籠更換作業時，若見到分娩後 7 日內之鼠籠，原則上皆不會對該鼠籠做任何操作，惟若墊料骯髒程度達需更換標準，或有顯著異常情形，如水瓶漏水導致鼠籠淹水，本中心將視緊急程度先行處理或通知使用者前來處理。

其他注意事項

OTHER NOTICE

- 13.1 3-4 週齡小鼠較活潑、好奇心強，易在籠內四處爬行。巡房時常見該週齡小鼠腳被鐵架卡住而動彈不得，若未及時發現小鼠會因無法進食而死亡，請使用者多加留意是否有此情形。
- 13.2 本中心巡房時曾見過，使用者在操作有仔鼠的鼠籠時，未留意而將仔鼠留在飼料層，此情況仔鼠因無法被母鼠哺乳，也無法喝到水，若未及時發現也會因無法進食而死亡，也請使用者多加留意此情形。



Figure 13.1 位於離乳日齡之仔鼠腳被夾住無法動彈。



Figure 13.2 使用者未注意而將仔鼠遺留於飼料層。

參考文獻 REFERENCE

1. 行政院農業委員會。2018。實驗動物照護及使用指引。
2. National Research Council. (2011). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition.
3. Pritcheet, K.R. & Taft, R.A. (2007). The Mouse in Biomedical Research, Volume 3 Normative Biology, Husbandry, and Models, 2nd Edition: Chapter 3, Reproductive Biology of the Laboratory Mouse.
4. Suckow, M.A., Danneman, P.J. & Brayton, C.F. (2013). The Laboratory Mouse, 2nd Edition.
5. Fox, J.G., Anderson, L.C., Otto, G.M., Pritchett–Corning, K.R. & Whary M.T. (2015). Laboratory Animal Medicine, 3rd Edition.
6. Byers, S.L., Wiles, M.V., Dunn, S.L. & Taft, R.A. (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images.
7. Caligioni C. (2009). Assessing Reproductive Status/Stages in Mice.
8. Bertolin, K. & Murphy, B.D. (2014). The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy: Chapter 7, Reproductive Tract Changes During the Mouse Estrous Cycle.
9. Bertolin, K. & Murphy, B.D. (2014). The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy: Chapter 39, Monitoring Mouse Estrous Cycles.
10. Cora, M.C., Kooistra L., & Travlos G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears.
11. Champlin, A.K. & Dorr, D.L. (1972). Determining the Stage of the Estrous Cycle in the Mouse by the Appearance of the Vagina.
12. Nelson, J.F., Felicio, L.S., Randall, P.K., Sims, C. & Finch, C.E. (1982). A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology
13. Marcondes, F.K., Bianchi, F.J. & Tanno, A.P. (2002). Determination of the Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations.
14. Snoeren, E.M., Veening, J.G., Olivier, B. & Oosting, R.S. (2014). Serotonin 1A

Receptors and Sexual Behavior in Male Rats: A Review.

15. Perret–Gentil, M. Tips for Successfully Breeding Your Mice.
16. 2018 ALAT Training Manual Course series. Chapter 17– Heredity and Breeding.
17. 2018 ALAT Training Manual Course series. Chapter 18– Mice.
18. 2018 ALAT Training Manual Course series. Chapter 19– Rats.
19. 2012 LAT Training Manual Course series. Chapter 08– Genetics and Breeding Colony Management.
20. University of California, Davis. SC–31–103 Mouse Breeding Colonies.
21. University of California, Berkeley. Animal Care and Use Program– Overcrowded Mouse Cage Guidelines.
22. University of California, San Francisco. Mouse Cage Density.
23. University of California, San Francisco. Standardized Care for Weanling Mice.
24. McGill University. SOP #608 Rat Breeding Colony Management.
25. McGill University. SOP #609. Mouse Breeding Colony Management.
26. Purdue University. Mouse Breeding Colony Management.
27. Boston University. Rodent Breeding: Mice.
28. Aurora’s Guide to Mouse Colony Management at MIT.
29. JAX[®]. (2009). The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice, 6th Edition.
30. JAX[®]. Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice: A Jackson Laboratory Resource Manual, 2007 Edition.
31. JAX[®]. Mice Pup Appearance by Age.
32. Yeadon, J. JAX[®]. 6 Steps for Setting Up Timed Pregnant Mice.
(<https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2014/september/six-steps-for-setting-up-timed-pregnant-mice>)

Appendix A 常用小鼠品系離乳週齡

STRAIN NAME	GROUP	離乳週齡
B10.RIII-H2 ^r H2-T18 ^b /(71NS)SnJ	Congenic	4
B10.D2-Hc ^o H2 ^d H2-T18 ^c /oSnJ	Congenic	4
B10.D2-Hc ¹ H2 ^d H2-T18 ^c /nSnJ	Congenic	4
B10.BR-H2 ^{k2} H2-T18 ^a /SgSnJ	Congenic	4
C57BL/10ScSn	Inbred	3
MRL/MpJ	Inbred	3
C3H/HeOuJ	Inbred	3
A/HeJ	Inbred	3
A/J	Inbred	3
A/WySnJ	Inbred	3
AKR/J	Inbred	3
BALB/cJ	Inbred	3
BUB/BnJ	Inbred	4
CBA/CaJ	Inbred	3
CBA/J	Inbred	3
CE/J	Inbred	4
C3HeB/FeJ	Inbred	3
C3H/HeJ	Inbred	3
C3H/HeSnJ	Inbred	3
C57BLKS/J	Inbred	4
C57BL/6J	Inbred	4
C57BL/10J	Inbred	4
C57BL/10SnJ	Inbred	4
C57BR/CdJ	Inbred	3
C57L/J	Inbred	4
C58/J	Inbred	4

DBA/1J	Inbred	3
DBA/2J	Inbred	3
I/LnJ	Inbred	4
LP/J	Inbred	3
P/J	Inbred	3
PL/J	Inbred	3
RF/J	Inbred	3
RIIS/J	Inbred	3
NZB/B1NJ	Inbred	4
SJL/J	Inbred	3
SM/J	Inbred	4
SWR/J	Inbred	3
129P3/J	Inbred	3
129X1/SvJ	Inbred	3
RBF/DnJ	Inbred	3
CAST/Ei	Inbred	4
CBA/CaHN-Btk ^{xid} /J	Inbred	3
BALB/cByJ	Inbred	3
NZW/LacJ	Inbred	4
B6.C-H2-K ^{bm1} /ByJ	Congenic	4
129P1/ReJ	Inbred	4
C57BL/6ByJ	Inbred	4
DBA/1LacJ	Inbred	3
CBA/CaGnLe	Inbred	3
B6(C)-H2-Ab1 ^{bm12} /KhEgJ	Congenic	3
BALB/c-H2 ^{dm2} /KhEgJ	Inbred	3
B6.Cg-Gpi1 ^a Thy1 ^a Igh ^a /J	Congenic	3
FVB/NJ	Inbred	3
NOD/LTJ	Inbred	3

B6.SJL-Ptprc ^a Pepc ^b /BoyJ	Congenic	3
B10.D1-H2 ^q /SgJ	Congenic	4
NOR/LtJ	Inbred	3
129T2 /SvEmsJ	Inbred	3
NZO /HIJ	Inbred	3
KK /HIJ	Inbred	4
NON/LtJ	Inbred	3
129S1 / SvImJ	Inbred	3
NOD.NON-Thy1 ^a /1LtJ	Congenic	3

Reference: The Jackson Laboratory