

附件二 實驗動物疼痛評估、人道終點及安樂死方法指導原則

一、疼痛評估指導原則

在執行及設計動物實驗時，動物疼痛程度的評估對實驗者和動物福利保護者而言，一直是個最難以解決的問題。一般較為簡單而有意義的方法是評估實驗操作中動物疾病的發生率及死亡率，但是這樣的方法卻無法提供對於動物在進行實驗中所需承受疼痛的狀況。因此在1985年，由Moron & Griffiths建立了一套可作為依據的評估方法，此種方法用了5種資料來評估動物於實驗中所可能遭受的疼痛狀況，這5種資料包含有：體重、外觀、臨床症狀、先天性的行為及對刺激的反應等。

許多研究均顯示魚類就如同哺乳類一樣可以感覺疼痛，其疼痛的感覺由周邊到腦部主要是由spinothalamic tract(身體脊髓丘腦)傳達到trigeminal tract(腦部三叉神經)，而分子層面的研究顯示，當魚類接受各種的痛覺刺激後，不管是前、中、後腦的基因表現均有所改變，尤其以前腦的改變最多，這與哺乳類對疼痛感受的機制是很相似的。科學家甚至在魚類的腦中發現鴉片的受體(opiate and opioid receptors)。這一切均證明魚類有疼痛感受，而且這痛覺可以影響到牠們的腦部，而並不只是一種簡單反射(simple reflex)。魚類的疼痛可以由觀察牠們的行動改變及生理的反應來察覺，不同種的魚類對相同的疼痛刺激之反應也可能不同，以下的敘述及表格制定主要根據斑馬魚、鱒魚、鯉魚及鮭魚等的研究，其他魚種則依其特性評估。

(一)、動物疼痛症狀通則：

1.陸生動物疼痛常見症狀：

- 不清理皮毛（皮毛粗糙無光澤）。
- 食物及水分攝取量下降、尿液及糞便量減少。
- 對人類觸碰的物理性反應異常(退縮、跛行、異常攻擊性、尖叫、夾緊腹部、脈搏和呼吸次數上升)。
- 體重下降(原體重之20-25%)、生長停滯(增重遲緩)、或體質改變(惡病質cachexia)。
- 脫水。
- 體溫異常(上升或下降)。
- 脈搏和呼吸異常(上升或下降)。
- 磨牙(常見於兔子及大型經濟動物)、流汗(馬)。
- 自我攻擊、自我傷害疼痛部位。
- 疼痛部位之炎症反應。
- 懼光。
- 嘔吐或下痢。
- 器官衰竭之具體證據(血液生化、超音波、生檢、肉眼病變等)。

2. 魚類疼痛時常見之症狀：

- 游動/活動減慢(鱒魚、斑馬魚、鯉魚、鮭魚等大多數的魚類)。
- 拒食(鱒魚、鮭魚)。
- 鰓的通氣量上升許多、鰓蓋加速活動(鱒魚、斑馬魚)。
- 血液中 cortisol 量增加(鱒魚、斑馬魚)。
- 尾部異常擺動(tail beating) (斑馬魚)。
- 在底部來回滾動(鯉魚、彩虹鱒魚)。
- 摩擦疼痛部位(彩虹鱒魚、金魚)。
- 游動時出現各種保護性的動作如防禦、照護、摩擦或用嘴輕觸傷部等(鱒魚、斑馬魚、鯉魚、鮭魚、金魚等大多數的魚類)。

(二)、各種實驗可能造成的動物疼痛、緊迫及臨床症狀分類：

1. 陸生動物：

疼痛及緊迫分類	動物操作	臨床症狀
B. 不引起不適或緊迫	僅單純養於人為的飼育環境，無實驗進行	無不良反應
C. 極小的不適或緊迫，不需用藥緩解	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
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
D2. 中等至嚴重程度的緊迫或疼痛，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	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

	5.藥物或化學物損害動物體的生理系統	8.中等至嚴重程度的局部或全身性感染
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 及獸醫人員謹慎監督)	<ol style="list-style-type: none"> 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痺或肌肉鬆弛劑 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 	<ol style="list-style-type: none"> 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

2.水生動物 - 魚類：

疼痛及緊迫分類	動物操作	臨床症狀
B.不引起不適或緊迫	僅單純養於人為的飼育環境，無實驗進行	無不良反應
C.不引起不適或緊迫	僅單純撈取及放回、飼育、交配、產蛋等及早期的胚胎研究(<7dpf)	無不良反應
D.極小的不適或緊迫，需事先用藥麻醉或緩解措施	<ol style="list-style-type: none"> 1.剪魚鰭 2.尾鰭植入標示用的 chip、tag、elastomer 或上色 3.人工取出魚卵/精子 4.各種手術包括(眼窩注射注射、腹腔注射、括取鱗片、皮膚及鰓做病理檢查等) 5.其他需要手術後恢復及暫時特殊照料的實驗步驟 	可能導致輕微出血，但無不良反應、半天內就能恢復的手術
E.中等至嚴重程度的緊迫或疼痛，需事先麻醉並給予適當的後續處理	<ol style="list-style-type: none"> 1.化學性誘變處理(如ENU處理) 2.切除/凍傷小部分心臟 	需要較長時間的恢復的手術並可能導致魚隻不適甚至死亡

中央主管機關對於動物在實驗進行中所需承受的疼痛、緊迫、持續性傷害等等作了一些規範，並希望實驗者可以在對動物最小的傷害之下得到所需的實驗數值，而實驗者亦需瞭解動物的疼痛狀況會由輕微逐漸變為中等，中等程度亦有可能會變為嚴重程度，因此制定一個依據來減低對實驗動物可能造成的傷害。附錄 1-1 列出常用實驗動物的疼痛程度評估資料，藉由臨床上動物觀察來判定動物所處的狀況，並搭配附錄 1-2 進行疼痛程度評估及止痛計畫。

二、人道終點評估指導原則

動物保護法第三章第十七條第一項：「科學應用後，應立即檢視實驗動物之狀況，如其已失去部分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。」。

動物實驗可能造成動物的疼痛及不適，如無法以藥物或其他方式解除動物的疼痛 (pain) 或緊迫 (distress) 時，應施予安樂死。在科學研究中，如動物的死亡是可預期或必然的實驗結果，則研究者應依據病理、生理或行為面詳加敘述動物實驗的終點 (end points)，除非安樂死確實影響實驗結果，並經過實驗動物照護及使用委員會或小組審核同意，否則應在動物呈現痛苦、垂死、死後組織自體溶解、或死後被籠內其他同類啃食前，以人道的方式解決。安樂死不但可以解決動物遭受嚴重疼痛，並可透過完整的屍體解剖更進一步瞭解動物的生理狀態，有助於實驗之進行。

動物安樂死的目的是以人道的方式使動物死亡，使動物在最低程度的疼痛、恐懼，並在最短的時間內失去知覺和痛覺。在科學應用、教學及試驗中，常因下列因素選擇讓實驗動物的安樂死：

- 實驗終結。
- 因研究所需提供血液或其他組織臟器。
- 當動物的疼痛與緊迫程度超過預期程度以上。
- 因動物健康及福祉考量。
- 不適合繼續繁殖（育種因素）。

(一)、動物實驗終點的評估項目

以下為常用來作為動物實驗終點的評估項目。除非有科學研究之必要性，並經過實驗動物照護及使用委員會或小組核准，否則建議給予動物安樂死，以解除其痛苦。不同的實驗類別有不同的參考準則，尤其是近 20 年以來，各種基因改良動物之產製與人類疾病模式之動物研發，往往使實驗動物呈現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舒緩動物的不適。各機構的實驗動物照護及使用委員會或小組(IACUC)、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 (Humane end points)、以及何時執行動物安樂死等方面共同擬定該機構之政策。

(二)、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(IACUC)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、評估及舒緩動物疼痛或恐懼的方法、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，以紓解操作人員可能的心理緊迫。

(三)、避免造成存活動物的恐懼感

緊迫的叫聲、恐懼的行為、驚嚇動物的費洛蒙氣味等，皆引起動物的焦慮和不安，這些因素會影響存活動物的身心平衡與福祉，干擾實驗結果。因此，動物安樂死時，最好選擇遠離存活動物的非公開場所來執行。

(四)、安樂死設備

執行安樂使用的藥品與器具，應隨時保持最佳使用狀態。依據動物品種、體重及數量，須先備好足量的藥劑設備及器具，並應定期維護，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。

(五)、執行安樂死

動物安樂死首要考量為解除動物的疼痛與緊迫，因此面對神經質或難以駕馭的動物，先給予鎮定劑或止痛劑等藥物，以便降低動物的緊迫與恐懼，之後再進行安樂死。另外，兔子、禽類、水生動物、爬蟲類等易憋氣，因此需做前處理後，再以二氧化碳進行安樂死。

(六)、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。在使用二氧化碳進行安樂死時動物往往先停止呼吸，數分鐘之後才停止心跳。停止呼吸的單一現象不能作為判斷動物是否死亡的依據，必要時應配合輔助安樂死方式確認動物死亡。肢體僵直是唯一可單獨判斷動物死亡之依據。

(七)、動物屍體處理

執行動物安樂死及處理屍體的人員必須瞭解該動物是否有人畜共同傳染病的疑慮、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 (Personnel Protective Equipments, PPE) 或設備。

三、安樂死方法指導原則：

(一)、選擇安樂死的藥物與方法

選擇動物安樂死的方法，應考慮動物品種、大小、溫馴度、對疼痛與緊迫的感受性、保定方法、實驗是否需組織採樣等。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。另外，人員的技術、動物的數量亦為安樂死程序是否順利完成的重要因素。動物死亡的機制有：（1）直接或間接的缺氧。（2）直接抑制腦部神經維生機能。（3）物理性崩解腦部活動並破壞腦神經。操作安樂死程序應在動物失去意識前儘量減低動物疼痛、焦慮及緊迫。

使用管制藥品要依管制藥品條例取得及管理。若使用非藥品級麻醉安樂死藥品時，為確保動物的健康安全與福祉，應確認藥品為無菌，並注意該物質的物理化學性質，包括：純度、等級、穩定性、酸鹼值、滲透壓、對於動物可能產生之副作用等。同時為維持製劑的品質，藥品配製流程與儲存方式應妥善考量，容器外應清楚標示內容物成分、濃度、配製日期與有效期限等資訊。

1.吸入性藥劑：

基本原則事及注意事項：

- 失去意識時間：考量氣體替換率，容器大小及氣體濃度。
- 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。
- 吸入性氣體必須品質純正，不能摻有污染物或添加物。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 兔、爬蟲類、禽類及水生動物易憋氣，也能進行無氧代謝。需要鎮定後再用吸入性氣體誘導。
- 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。
- 吸入性安樂死應在動物舒適狀態下進行，如齧齒類使用原飼養籠具，豬隻則分為小群組，避免擁擠撞擊。
- 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).常用藥劑如 halothane、isoflurane、enflurane、sevoflurane 等。

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。大部分的情況下，動物快速暴露於高濃度藥劑時可快速失去知覺。多數的吸入性藥劑對人體有害，如乙醚具有易爆性、halothane 易傷害肝臟、氮氣和一氧化碳易導致人體缺氧性、笑氣 (N₂O) 易導致成癮等，因此人員需在通風良好場所執行。剛出生的仔獸對缺氧環境的耐受性高，因此須較長的吸入時間。使用吸入性藥劑執行安樂死時，容器內裝入的動物勿過度擁擠，且勿同時混入不同品種的動物，以免造動物死亡前的緊迫。爬蟲類、兩棲類、水禽類及水中哺乳類善於憋氣，因此建議優先選擇其他方法。

優點：對於體重小於七公斤或難以施打針劑的動物具有高度價值。halothane、isoflurane、enflurane、sevoflurane，在一般環境條件下無易燃性且無易爆性。可以單獨作為安樂死藥劑或者作為兩階段安樂死中第一階段使動物失去知覺，再以輔助之第二種方法達成安樂死。

缺點：吸入性麻醉藥劑需用氣體驅動揮發器，因此動物死亡所需時間較久。笑氣 (N₂O) 不可單獨使用，因為會在動物失去意識前先造成缺氧的狀態。由於乙醚具有易燃、易爆的性質，不建議使用。

建議：使用 halothane、isoflurane、enflurane、sevoflurane 等藥劑於體重小於七公斤的動物為有條件接受之安樂死方法，且必須符合下列條件。以低濃度至高濃度逐步誘導麻醉，使動物失去意識。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。笑氣 (N₂O) 不應單獨使用，大型動物不建議使用吸入性氣體麻醉藥物進行安樂死，主要因為所需藥量大而昂貴及不容易施行麻醉及造成死亡。

(2).二氧化碳

空氣中含有 0.04% 二氧化碳，它較空氣重、無色、無味。吸入濃度於 7.5% 時動物的疼痛閥值上升，愈高的二氧化碳濃度有愈快的麻醉效果，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緊迫。因此二氧化碳安樂死對可降低厭惡及緊迫感動物而言是有條件接受的安樂死方法。

出生一天的雛雞使用二氧化碳安樂死效果良好，於鳥類則造成不同程度的緊迫，通常可於五分鐘內達到死亡。對於蛋而言，由於在胚胎發育即開始呼吸，未孵化的蛋內有 14% 的二氧化碳，因此對於雛雞和其他初生仔獸，對於二氧化碳具高耐受性，應適度延長安樂死時間。懷孕母獸二氧化碳安樂死後不需再將子宮內胚胎取出個別安樂死。齧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。兔子具憋氣現象，建議鎮定後再使用二氧化碳安樂死。

優點：快速鎮靜、止痛、麻醉效果明確。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，以二氧化碳安樂死食用動物時，組織內無二氧化碳囤積。在老鼠，使用二氧化碳安樂死不會改變 cholinergic marker 或 corticosterone 濃度。

缺點：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。有些品種的動物，如穴居的魚類、水中哺乳類、新生齧齒類動物，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，導致長時間操作才能完成安樂死。以低於 80% 的二氧化碳誘導動物失去知覺時，可能產生呼吸道的病灶，但是過高濃度的二氧化碳可能對部分動物造成緊迫。

建議：對於適當可降低厭惡及緊迫的動物品種，可使用二氧化碳進行安樂死。高壓桶裝二氧化碳為唯一建議使用的設備，不推薦使用乾冰或其他化學方法製造的二氧化碳。高壓桶應配備有減壓閥及流量控制器，或者有相關機械式或電子式控制流量裝置。動物裝入容器內時，勿過度擁擠，且勿同時混入不同品系的動物。使用時應計算容器容量及氣體流量，以達到每分鐘 10-30% 氣體置換率為必須之基本要求。當動物呈現死亡狀態後再持續灌注氣體至少一分鐘，未成年幼子必須延長氣體暴露時間，並且避免以二氧化碳混合純氧氣使用。不可將動物直接放入預灌注高濃度二氧化碳的容器中，但是在兩階段安樂死方式中可以將失去意識的動物直接放入預灌注 100% 二氧化碳的容器中。將動物從安樂死容器取出前務必確認動物的死亡，如不確定動物死亡，則應立刻使用其他輔助方法（如開胸）完成安樂死。

(3). 氮氣及氫氣

運用氮氣或氫氣造成缺氧死亡可用於禽類（雞、火雞）及豬隻之有條件接受之安樂死方法。對其他哺乳類動物為不可接受之安樂死方法。如欲搭配氧氣使用，氧氣濃度需低於 2%。

優點：對禽類及豬隻不易造成不愉悅或緊迫感。不易燃、不爆炸，有現成壓縮氣體，對操作人員傷害小，比空氣重較易沉浸於動物籠具中。

缺點：所造成缺氧狀態對齧齒類及貂類有厭惡不悅感，就算使用逐漸換氣率法還是會讓這些動物在失去意識之前產生缺氧的行為反應。在齧齒類使用氫氣會造成肺泡出血而窒息死亡。在豬隻使用必須大於 7 分鐘才能讓動物死亡。氫氣比氮氣昂貴三倍。

2. 非吸入性藥劑

多數為注射性藥物，此法能使動物迅速死亡，是非常可靠的動物安樂死方法，唯須注意的是操作中避免使動物遭受緊迫與恐懼，而人員亦須學習各種注射技術。注射性藥劑有多種投藥方法，其中靜脈注射是最佳選擇，藥物注射前人員須評估動物是否過度神經質或難以駕馭，必要時先給予鎮定劑或止痛劑等藥物，以便降低動物的緊迫與恐懼，或放入動物保定設備中，並保障操作人員的安全。如動物已呈現垂死、休克、或深度麻醉中，難以順利進行靜脈注射時，可給予心臟注射。如無法建立靜脈注射，腹腔及腔體注射非刺激性藥物為可接受之替代方式。腹腔注射需使用較高劑量的藥物，而且可能使動物延長死亡時間及死前掙扎，因此腹腔注射後，將動物移入小箱子或籠子內，置於安靜無干擾的場所，以減輕興奮程度或創傷的可能性。

在動物清醒狀態下肌肉注射、皮下注射、胸腔注射、肺臟注射、鞘膜注射及其他非血管注射皆為不可接受之安樂死藥物注射方式。

經骨髓注射會因藥物的黏稠度及化學刺激性引起疼痛，如欲經由現有骨髓注射管路給予安樂死藥物，應先給予止痛劑並減緩注射速度，以減少動物的不舒服。

無論經骨髓注射、心臟注射、肝臟注射、脾臟注射、腎臟注射等都必須在動物麻醉狀態或失去意識下進行，但非常溫動物在清醒下心臟注射為可接受之注射方式。實驗小鼠於麻醉狀態下後眼窩注射小於 200 微升麻醉藥(10 mg ketamine : 1mg xylazine) 或以 5 倍麻醉劑量腹腔注射為有條件接受之安樂死法。

(1).巴比妥鹽及其衍生物 (Barbiturates)

它是動物安樂死的首選藥物。靜脈給予可用於犬、貓、馬及其他中小型動物，它抑制中樞神經反應，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。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，但是其中 pentobarbital sodium 為最理想的動物安樂死藥劑，Beuthanasia-D (Burns-Biotec)、Sleepaway (Fort Dodge Laboratories)商品化藥劑亦同。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。只有在動物麻醉或失去意識狀態下才可經由心臟、脾臟、肝臟、腎臟等直接給予。

優點：效果迅速為最主要的優點，唯其效果依劑量、濃度、投藥方式而不同。此藥劑平穩地誘導並麻醉動物，也使動物的不適反應降到最低程度。

缺點：為達到最佳效果，須給予靜脈注射，操作人員須具備不同品種動物的靜脈投藥技術，且須每隻動物個別保定後投予。此藥亦可能造成人類濫用，因此需經管制藥品管理局申請核准後取得及使用。失去知覺的動物可能會出現喘氣反應，在中樞抑制出現前有可能出現短暫興奮現象，對於難以駕馭或過度神經質的動物，須先給予適當的藥物鎮定，但是經鎮定後的動物由於循環及心跳變慢，對

於藥劑注射後的死亡時間比未鎮定動物來的慢，需特別注意。藥物會殘留在動物屍體內，也會引起動物之脾臟腫大。

建議：對於狗、貓、其他小型動物及馬，須靜脈注射投藥，當靜脈注射對動物造成緊迫或危險時採用腹腔注射，心臟注射僅適用於深度麻醉或失去意識的動物。各物種使用 pentobarbital 進行靜脈注射及腹腔注射之安樂死劑量，請參閱附錄 3-1。

(2).Chloral hydrate

緩慢壓制大腦，動物必須在保定下給藥，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。有致癌性，腹腔注射會造成動物胃潰瘍、腹膜炎而死亡。美國 FDA 不再批准作為安樂死藥物。

建議：不建議作為安樂死之藥物。

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

商品化產品，粉末狀，溶於水中用來麻醉或安樂死兩棲類與魚類。它是 benzoic acid 衍生物，使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。以濃度 250~500mg/L 浸泡至少 10 分鐘的稀釋溶液進行安樂死。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，安樂死的濃度為 >250mg/L。

3.物理性方法

包括頸椎脫臼、斷頭、放血、槍擊、電擊等。有些人員抗拒並排斥物理性安樂死方法，但是只要在良好的技巧與適當的工具配合下，它能迅速使動物解除疼痛並死亡。如未受過訓練的人貿然實施物理性方法，不僅易造成人員受傷，更可能使動物未完全死亡而導致極大的痛苦。有些物理性方法，如放血、擊昏、腦脊隨穿刺等，不建議作為動物安樂死的單一方法，配合其他方法共同使用較佳。所有操作人員需接受完整的技術訓練，並以屍體多次練習後才正式執行。

(1).頸椎脫臼法

常使用於齧齒類動物、禽類及仔兔。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；對於仔兔與禽類，一手抓頭，另一手抓後肢，將身體迅速拉長，使頸椎脫離頭顱；亦可利用頸椎脫臼專用之工具進行。

優點：能使動物快速失去意識，無化學藥劑污染體組織，迅速執行完畢。

缺點：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。

建議：使用於禽類、小鳥、小鼠、體重低於 200 公克的大鼠、體重低於 1 公斤的兔子，且由技術精湛的人員完成，執行前動物得先給予鎮定或麻醉，以減低動物的緊迫。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，則需由動物實驗管理小組評估，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，再經委員會核准後執行。

(2).斷頭

此方法用來執行小型齧齒類動物或仔兔的安樂死。此法可提供研究人員無化學藥劑污染的乾淨組織及體液，亦可提供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。商品化的斷頭台 (guillotine) 可提供大鼠與仔兔的斷頭，而銳利的斷頭台刀刃亦可作為仔鼠斷頭之用。

優點：能使動物快速失去意識，無化學藥劑污染體組織，執行完成度高。

缺點：抓取及保定動物至斷頭台前可能導致動物緊迫，動物斷頭後存留的腦部活性尚無法確實定論，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。

建議：配合正確的操作技術，有條件的使用。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。需注意隨時保持斷頭台刀刃的銳利度，並在每次使用後徹底清洗殘留的血跡和氣味。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。執行本方法前操作人員須接受完整的技術訓練。

(3).放血

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。由於大量失血時動物呈現焦慮，因此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。

(二)、適用之安樂死方法

1.陸生動物-齧齒類、兔、狗、貓、猿猴

安樂死方法	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	狗	貓	猿猴
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：1. ○：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)。

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。

2. 陸生動物-中大型（牛、羊、鹿、馬、豬等）

基於動物福祉及人員操作安全之考量，建議優先使用化學性方法。

安樂死方法	適用動物及建議之操作方法	備註
一、化學性方法		
惰性氣體(氫氣、氮氣)	○(豬)	
Barbiturate 注射液, 靜脈注射 (100mg/kg)	○	
Barbiturate 注射液, 腹腔注射 (100mg/kg)	△ (豬或極年幼或老弱動物可用)	濃度不可大於 60mg/ml，以免過度刺激。
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		
電昏後放血致死	○(豬、羊、鹿) 1.以電擊器置於動物頭部左右 2 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。	1.可應用於犧牲或病理解剖生病之實驗用經濟動物。 2.須於動物致昏後配合放血致死，避免動物甦醒。 3.操作人員要進行動物致昏或死亡之徵兆觀察。家畜有效致昏之判定基準：無眼瞼反應、無節律性呼吸、對擰耳刺鼻無反應、無平衡反應、無發出聲音或四肢先僵直後產生之無意識踢動。
電昏後電擊致死	○(豬、羊、鹿) 1.以電擊器置於動物頭部左右兩側，施以至少 220V 電壓電擊至少 3 秒，以利有效致昏。 2.於致昏後 15 秒內，再將電擊器分置頭及胸 2 部位，施以至少 220V 之電壓電擊至少 3-15 秒致死。	1.家畜有效致昏之判定基準：無眼瞼反應、無節律性呼吸、對擰耳刺鼻無反應、無平衡反應、無發出聲音或四肢先僵直後產生無意識踢動。 2.心臟電擊之通電時間，商用操作至少 3 秒，實驗室操作建議至少 15 秒。電擊心臟之頻率建議為 50~60Hz(一般電源即符合)才能有效停止心臟跳動。 3.電擊致死後須確認動物已為死亡狀態。
一次電擊致死	○(豬、羊、鹿) 以電擊器分置動物頭部及胸 2 部位，施以至少 220V 之電壓電擊至少 3-15 秒致死。	1.施以頭-胸同時電擊，須確保電流同時通過腦部及心臟，以確保動物在無意識下有效致死。 2.頭-胸同時電擊之通電時間，商用操作至少 3 秒，實驗室操作建議至少 15 秒。 3.電擊心臟之頻率建議為 50~60Hz(一般電源即符合)才能有效停止心臟跳動。 4.電擊致死後須確認動物已為死亡狀態。

人道擊昏槍+放血或腦破壞致死	<p>○(豬、羊、鹿、牛、馬)</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.家畜有效擊昏之判定基準：無眼瞼反應、無節律性呼吸、對擰耳刺鼻無反應、無平衡反應、無發出聲音或四肢先僵直後產生無意識踢動。 2.人員須經過操作訓練後方可執行。 3.擊昏槍可分為穿刺類及非穿刺 2 類。應注意撞擊力道與配合動物種類選擇撞擊部位。 4.擊昏得搭配保定設備以利瞄準，對於不易瞄準之動物，建議優先使用注射藥物法或電擊法。 5.不得以人力使用棍、棒等原始工具進行敲擊。 6.操作人員須確認動物為已死亡狀態。
----------------	---	--

說明： 1.○：建議使用的方法； △(豬或極年幼或老弱動物可用)。

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.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。
- 依據以下幾點確定魚隻死亡：
 - ✓ 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。

Ethanol	95% ethanol(不可使用 70%之 ethanol)。
Eugenol, isoeugenol clover oil	濃度 $\geq 17\text{mg/L}$ ，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 $>5\text{mg/L}\sim 20\text{mg/L}$ ，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

(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。 $\leq 5\text{dpf}$ 之斑馬魚胚及 $\leq 3\text{dpf}$ 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(sodium hypochlorite)	浸泡 6.15% 稀釋 6 倍後之漂白水

Paraformaldehyde	≤4%
二、物理性方法	
斷頭	
急凍法	快速置於-70。C 冷凍

4.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。			○	
Tricainemethanesulfonate (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	1.依動物種類選擇適當擊昏槍	○	○		○

或使用撞擊槍破壞腦部	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 2 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 2 部位，施以至少 220V 之電壓電擊至少 3-15 秒致死。	○			

(三)、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 Burning	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	大量失血導致動物焦慮及暴躁，放血(採血)致死僅適用於動

Exsanguination	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(番木鱉鹼) Strychnine	此藥劑造成動物的劇烈痙攣和痛苦的肌肉抽續
Tricaine 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

四、參考文獻：

1. Pritchard D.G.廖震元、陳書儀。2015。家禽疾病控制人道致昏與撲殺技術之新發展。2015年家禽流行性感冒預防與控制國際研討會。財團法人農業科技研究院、行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。
2. American Association of Swine Veterinarians (2008) On-Farm Euthanasia of Swine Recommendations for the Producer. National Pork Board. USA. 18 pages.
3. AVMA. (2013). AVMA Guidelines on Euthanasia. Schaumburg, IL: AVMA.
4. Grandin T (1997) Cardiac Arrest Stunning Of Livestock And Poultry. <http://www.grandin.com/humane/cardiac.arrest.html>.
5. Grandin T (2015) Electric Stunning of Pigs and Sheep. <http://www.grandin.com/humane/elec.stun.html>.
6. Humane Slaughter Association. Practical Slaughter of Poultry-Neck Dislocation. <http://www.hsa.org.uk/neck-dislocation/neck-dislocation>
7. Meat & Livestock Australia (2016) Veterinary Handbook for Cattle, Sheep & Goats - 8.4.2.1 Pithing Following The Use Of A Captive Bolt. <http://www.veterinaryhandbook.com.au/ContentSection.aspx?id=111>
8. OIE(2016)Terrestrial Animal Health Code-CHAPTER 7. 5. http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.7.5.htm.