

中原大學實驗動物疼痛評估、人道終點及安樂死方法

一、動物疼痛評估:

(一)、動物疼痛症狀:

1. 啮齒類動物疼痛常見之症狀:

- 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. 啮齒類動物:

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	無不良反應

疼痛及緊迫分類	動物操作	臨床症狀
	5.被核准的安樂死方法	
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 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）	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	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	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	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
----------------------------------	-------------------------------------	----------------------------

(三) 齧齒類動物疼痛評估標準

評估項目			疼痛程度		
分類		評估細項	輕微程度(Mild, M)	中等程度(Intermediate, I)	嚴重程度(Severe, S)
體重 (不包含暫時性減輕)	A1	體重	體重減少原體重的10%以下	體重減少原體重的10%-25%	體重減少原體重的25%以上
	A2	食物/飲水消耗	72 小時內僅攝食正常量的 40-75%	72 小時內攝食低於正常量的 40%以下	7 天內攝食低於正常量的 40%或食慾不振超過 72 小時
外觀	B1	身體姿勢	短暫的拱背，特別是在投藥後	間歇性拱背	持續性拱背
	B2	毛髮豎起情形	部分毛髮豎起	明顯皮毛粗糙	明顯皮毛粗糙，並伴隨其他症狀如拱背、遲鈍反應及行為
臨床症狀	C1	呼吸	正常	間歇性的呼吸異常	持續性呼吸困難
	C2	流涎	短暫的	間歇性的弄濕下顎附近的皮毛	持續性的弄濕下顎附近的皮毛
	C3	震顫	短暫的	間歇性	持續性
	C4	痙攣	無	間歇性（每次 10 分鐘以下）	持續性（若每次超過 10 分鐘以上，則建議安樂死）
	C5	沉鬱.臥倒	無	短暫的（1 小時以下）	持續 1 小時以上（若每次超過 3 小時以上，則建議安樂死）
無刺激時一般行為	D	社會化行為	與群體有對等的互動	與群體的互動較少	沒有任何的互動行為
對刺激的反應	E	受刺激時行為反應	變化不太	受刺激時會有較少行為反應	對刺激或外部行為無任何反應

二、人道終點評估標準

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)動物實驗人道終點的評估項目：

- 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，人員須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，或由獸醫師評估為愈後極差者，如:
 - (1)呼吸道系統:嚴重呼吸道感染、呼吸困難、發疴。
 - (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:異常的中區神經反應(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。

(二)達以下條件進行動物安樂死，以人道終止試驗：

- 1.一般實驗:嚴重程度(S)
- 2.腫瘤生長相關實驗:除達上述嚴重程度(S)外，若有以下情況亦須提前人道終止試驗
 - (1)腫瘤重量超過動物原體重之 10%
 - (2)小鼠(大鼠)腫瘤平均直徑超過 20mm(40mm)
 - (3)體表腫瘤出現潰爛、壞死或感染
 - (4)腫瘤生長阻礙動物呼吸、攝食、飲水或活動力
 - (5)出現嚴重痛苦並對止痛劑毫無反應

三、安樂死方法

(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。

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)
- (2).Chloral hydrate -不建議作為安樂死之藥物。
- (3).Tricaine methane sulfonate (TMS, MS 222)
- (4).Benzocaine HCl

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
- (2).斷頭
- (3).放血

(二)、適用之安樂死方法

1.陸生動物-啮齒類、兔、狗

安樂死法	小於 200 g 啮齒動物	200 g~ 1 kg 啮齒動物/ 兔	1 kg~ 5 kg 啮齒動物/ 兔	狗
一、化學性方法				
二氧化碳 CO2	○	○	×	×
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，之後採血(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	○	○	×	×

安樂死法	小於 200 g 啮齒動物	200 g~ 1 kg 啮齒動物/ 兔	1 kg~ 5 kg 啮齒動物/ 兔	狗
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（豬）

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	建議之操作方法	備註
一、化學性方法		
惰性氣體(氫氣、氮氣)	○	
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	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 臉反應、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	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 臉反 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

安樂死方法	建議之操作方法	備註
		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	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	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。	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。
<p>說明：</p> <p>1.○：建議使用的方法； △(豬或極年幼或老弱動物可用)。</p> <p>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。</p>		

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。
- 要進行大規模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：
 - A.停止游動/活動。
 - B.對任何刺激均無反應。
 - C.無腮動及心跳。

D.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 ≥ 17mg/L，浸泡至少 10 分鐘, Isoeuge 為可能的致癌物使用時要小心。
Isoflurane, sevoflurane	微溶於水，濃度 >5mg/L~20mg/L，需要於通風處進行。
Quinaldine sulfate	buffered solution，濃度 ≥ 100mg/L。
Tricainemethanesulfonate (MS-222, TMS)	buffered solution, 濃度 250~500mg/L 浸泡至少 10 分鐘。
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	
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°C ~ 4°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、魚胚的安樂死：

將斑馬魚自孵化後(並開始接受餵食)才視為活體動物，故斑馬魚 5dpf(days post fertilization)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。≤5dpf 之斑馬魚胚，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	

安樂死方法	操作方法注意事項
斷頭	
急凍法	快速置於-70。C 冷凍

(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 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 CCl4)、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)

方法	說明
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