

補遺9 実験動物の安楽死処置法

(本内容は令和2年9月現在の科学的知見によるものであり、今後変更される可能性がありますのでご注意ください。)

安楽死とは、迅速かつ苦痛を伴わない安楽な死を意味する。一方、一般的に国際的に容認されている方法を考慮したうえで、安楽死後の試料採取や検索に障害とならないよう実験目的に沿うような方法を選択しなければならない。又、重要なのは死の確認である。呼吸停止及び心停止を確実に確かめなければならない。安楽死の方法としては、一般的には化学的方法あるいは物理的方法によるが、頸椎脱臼や断頭などの方法は、選択する順位としては下位に置き、麻酔下で実施することが推奨される。なお、げっ歯類胎児・新生児については、次の補遺10を参照されたい。

(1) 化学的方法

*バルビツール系麻酔薬の過剰量投与

これまで、不安・興奮を伴うことなく、速やかに意識を消失させることから、マウスからイヌ・ブタ・鳥類まで各種の実験動物の安楽死処置に用いられた医薬品のペントバルビタールは現在製造・販売中止となっており使用できない。その代用としてラボナール(チオペンタールナトリウム) 100～150mg/kg、アイオナール(セコバルビタールナトリウム) 150mg/kg、イソゾール(チアミラールナトリウム) 150～200mg/kgを静脈内又は腹腔内に投与方法が報告されている。バルビツール系麻酔薬は高いアルカリ性(pH10前後)等の理由から静脈投与以外の投与経路は条件付きの容認となる。

バルビツール系麻酔薬による安楽死に関する文献

・花井幸次, 岡村匡史, 黒澤努: 実験動物の安楽死の課題—安楽死処置に用いるバルビツール酸誘導体の国内における規制と倫理的問題—. LABIO21, 81, P17 - 21, 2020.

(<http://www.nichidokyo.or.jp/pdf/labio21/barubi.pdf>)

・赤木佐千子, 平山晴子, 樺木勝巳: 実験動物の安楽死の課題—安楽死処置におけるセコバルビタールの有用性—. LABIO21, 81, P22 - 26, 2020.

(<http://www.nichidokyo.or.jp/pdf/labio21/secobaru.pdf>)

・Veterinary Anaesthesia and Analgesia The Fifth Edition of Lumb and Jones (WILEY Blackwell)

もし、種々の理由からペントバルビタールを使用しなければならない場合には、安楽死処置の目的に限定して試薬からの調整が可能かもしれない。但し、煩雑な調整や保存など厳格な管理が求められる。

ペントバルビタールの試薬からの調整等に関する文献

・UCDAVIS office of research : Use of Non-Pharmaceutical Grade Sodium Pentobarbital for Anesthesia of Laboratory Animals.

(<https://research.ucdavis.edu/policiescompliance/animal-care-use/iacuc/use-of-non-pharmaceutical-grade-sodium-pentobarbital-for-anesthesia-of-laboratory-animals/>)

・University of MARYLAND School of Medicine : IACUC Guidelines on the use of Non-pharmaceutical Grade Sodium Pentobarbital in Animal Use Protocols.

(<https://www.medschool.umaryland.edu/media/SOM/Offices-of-the-Dean/OAWA/docs/non-usp-grade-pentobarbital-policy.pdf>)

・ROSALIND FRANKLI University : GUIDELINES FOR THE PREPARATION AND USE OF NON-PHARMACEUTICAL GRADE PENTOBARBITAL IN LABORATORY ANIMALS.

(<https://rfums-bigtree.s3.amazonaws.com/files/resources/non-pharmaceutical-grade-pentobarbital-use19.pdf>)

*二酸化炭素

二酸化炭素には麻酔作用があり、まず意識消失が起こり、ついで無意識下で酸素欠乏により死亡する。この時、チャンバー中の二酸化炭素濃度をどのような状態にすべきかについては、動物福祉の観点から多くの議論があり、完全な結論は得られていない。つまり、最初から高濃度（50～100%）にしておくと、動物を曝した時に、動物は意識が消失する前の少なくとも10から5秒間、苦痛を感じている可能性がある。一方、濃度を徐々に上げていくと意識喪失前に空気の濃度が減っていくにつれて呼吸困難をまねく。このため、二酸化炭素と同時に酸素を加えるなどの対策が考えられるが、この事により意識喪失までの時間が長引くなどの問題が起こり、十分な解決策は得られていない。

ここでは、暫定方法として安楽死処置専用容器内に動物を入れ、「ケージ（容器）の容積に対して毎分30-70%になるように二酸化炭素を注入する」方法を提案する。動物は安楽死処置専用容器にケージごとまたは直接収容し、圧縮ボンベ（100%二酸化炭素）から注入を開始し呼吸停止後少なくとも1分間は継続する。なお、十分な時間が経過した後、呼吸や心拍の確認により、動物の死亡を確認しなければならない。また、室内の換気と装置の取扱いには注意が必要である。

*イソフルラン等の吸入麻酔薬

過量投与により安楽死を行なう事ができる。

*硫酸マグネシウム (MgSO₄) 又は塩化カリウム (KCl)

高用量投与により完全な神経遮断と低酸素血漿により死亡する。これらの薬物は鎮痛・麻酔作用がないため、動物をあらかじめ全身麻酔を行う必要がある。

(2) 物理的方法

頸椎脱臼と断頭の方法があるが、これらの方法は熟練した実験者が行えばマウスやラット等の小型実験動物の安楽死法として有効である。万一失敗した時は、実験動物にとって耐えがたい苦痛となるので、細心の注意が必要である。さらに可能な限り前もって鎮痛薬や麻酔薬を投与する。

*頸椎脱臼：マウスを平らな台上に置き、一方の手の親指と人差し指で頭の後ろ（頸背部）を下方に押しつけ、他方の手で尾のつけ根の近くを持って身体を伸ばし固定する。次いで、頭を固定している手を前方へ押し、尾を持っている手を後ろ上方に一気に強く引く。正しく頸椎が脱臼できれば、瞬間でマウスの身体の色が抜けてしまう。一時的に体動が残るが間もなく止まる。瞬時に意識消失、死亡するため動物の苦痛は少ない。実験に支障がなければ事前に軽麻酔を行っておくのもよい。ラット（200g以下）の場合も同様の方法で行うことが出来るが、かなりの熟練と力がある。

*断頭：マウスの場合にはよく切れる鋭利なハサミを用いる。ラットの場合には専用の断頭器が市販されているので利用する。この場合も実験に差し支えなければ事前に軽麻酔を施すことが望ましい。

(3) 容認されない方法

KClや神経筋遮断薬を単独で安楽死処置に用いることは容認されない。同様に、意識喪失前に神経筋遮断薬の作用が発現するようなバルビツール系麻酔薬との併用も容認されない。ジエチルエーテル、クロロホルム、シアン化合物、抱水クロラル、ストリキニーネ等の使用も不適切である。また、頭蓋打撲(多くの場合)や空気塞栓、無麻酔での放血も容認されない。

文献：安楽死処分法の国際的なガイドとして次の文献が有用である。

AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition

(米国獣医学会動物の安楽死処置に関する指針：2020年版)

これには実験動物はもとより、ウシ等の家畜、愛玩動物、野生動物、両生類や水生動物等、多くの動物種に関する安楽死処置法が記載されている。

(平成8年3月初版、平成23年4月第二版、令和4年4月第三版)

実験動物の安楽死処置法英語版

Euthanasia Procedures

When disposing of laboratory animals on completion of the experiment in accordance with the animal experiment protocol or due to the laboratory animals being subjected to severe pain and suffering during the course of the experiment when anesthetics and analgesics can not be used in the research, the researcher(s) should conduct euthanasia.

Selection of the agent and method used for the euthanasia procedure depends on the animal species and the objective of the experiment. In general, a chemical method (overdose of a barbiturate anesthetic, administration of a non-explosive inhalation of anesthetic or carbon dioxide gas) or a physical method (cervical dislocation, decapitation, exsanguination under anesthesia, etc.) is used. However, from the standpoint of animal welfare, the principal investigator should seek the advice and guidance of a laboratory animal specialist as required since there are slight international differences on what are judged to be appropriate methods of euthanasia for laboratory animals.

* Euthanasia procedures refer to procedures resulting in the rapid loss of consciousness and then death of a laboratory animal not associated with pain or suffering. In addition to Guidelines on Methods of Sacrificing Animals (Notice No.40 of the Prime Minister's Office, July 4, 1995), international guidelines should be taken into consideration.

* Euthanasia should be performed by methods that do not cause distress to other animals in the laboratory. This requires careful attention because until animals lose consciousness they can vocalize and release pheromones.

* A person who has acquired the skills required for handling a particular animal species should conduct euthanasia procedures, and the death of the animal should always be verified.

* Confirmation of death is very important. A mistake of dose is occasionally occurred.

A chemical method:

*Overdose administration of Barbituric acid derivatives is applicable to many species of animals such as mice, rats, rabbits, dogs, pigs, monkey so on when administered IV, intraperitoneal or intracoelomic. Sodium pentobarbital (100-150mg/kg) best fits a rapid onset of action, and loss of consciousness in minimal or transient pain associated with venipuncture. However, Pentobarbital is no longer manufactured or sold and cannot be used. As a substitute for Pentobarbital, Rabonal (sodium thiopental) 100-150 mg/kg, Ional (sodium secobarbital) 150 mg/kg, or Isosol (thiamylal sodium) 150-200 mg/kg might be administered intravenously or intraperitoneally. Due to the high alkalinity (pH around 10) of barbiturate anesthetics, routes other than intravenous

administration are conditionally acceptable.

* Overdose administration of a non-explosive inhalation of anesthetic gas can be carried out with isoflurane or sevoflurane. Carbon dioxide is also commonly used for euthanasia. An optimal flow rate for CO₂ euthanasia systems should displace 30% to 70% of the chamber or cage volume/min using a 100 % CO₂. Whenever gradual displacement methods are used, CO₂ flow should be maintained for at least 1 minute after respiratory arrest to ensure that they are dead.

Carbon dioxide has low anesthetic effect and animals finally die with suffocation in 100% CO₂. Direct exposure with 100% CO₂ suffocates animals with cruelty. Therefore, animals should be anesthetized with low dose of CO₂ at first stage and gradually raised to high dose, and finally reached 100% CO₂ for suffocation.

A physical method:

* Cervical dislocation is carried out by stretching the animal and rotating the neck. The spinal cord is disrupted and nerve impulses to the vital organs such as the respiratory system and the heart are no longer transmitted. This method is applicable in mice, rats, hamsters, gerbils, kittens and small birds, but not in larger animals. If it is done quickly and expertly it is a painless method.

* Decapitation can be performed by using scissors or a guillotine.

* Exsanguination from a cut through the carotid arteries under anesthesia is applicable to large animal such as dogs and pigs.

Reference: AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition