

동물실험에서의

고통 등급, 인도적 실험종료, 안락사

농림축산검역본부

목 차

1. 동물의 고통 정도에 따른 고통 등급의 분류
2. 설치류의 인도적 실험종료 기준
3. 설치류의 안락사 방법

1. 동물의 고통 정도에 따른 고통 등급의 분류 -

Category A

~~원생동물, 무척추동물을 사용하는 실험~~



죽은 생물체를 이용하는 실험 또는 식물, 세균, 원충 또는 무척추동물을 이용한 교육 또는 연구

실험대상

고통을 거의 느끼지 못한다고 판단되는 경우로 「동물보호법」 및 「실험동물에 관한 법률」에 따른 실험동물의 범위에 포함되지 않는 동물군을 이용한 실험에 해당되며, 법적으로 IACUC의 심의 및 승인절차를 거치지 않더라도 실험 수행이 가능

- ▶ 죽은 생물체 또는 동물의 조직 일부를 이용한 연구
 - 폐사체, 부검 또는 도축 등에 의해 얻어진 동물의 조직 등
 - 단, 연구자가 살아있는 동물의 안락사와 도축에 관여할 경우는 C등급 이상에 해당
- ▶ 발육단계의 배아 또는 계란을 이용한 연구
 - 개구리 알, 계란 등

실험방법 사례

- ▶ 폐사체를 이용한 부검, 병인분석, 해부학실습
- ▶ 미생물, 원충, 무척추동물군을 이용한 동물실험
- ▶ 이미 안락사 또는 도축된 동물에게서 얻은 조직, 장기 등을 이용한 ex vivo, in vitro 실험
 - 단, 조직 또는 세포를 얻기 위해 안락사 또는 도축이 실시되지 않아야 함
 - 도축장에서 얻어진 죽은 소의 안구를 이용한 독성실험
 - 죽은 동물의 조직세포 일차배양
- ▶ 조직 또는 세포를 적출하기 위해 안락사 또는 도축이 이루어질 경우 CategoryC 이상에 해당

1. 동물의 고통 정도에 따른 고통 등급의 분류 -

Category B

~~척추동물을 사용하지만, 거의 고통을 주지 않거나 실험 목적으로 사육, 적응, 유지되고 있는 경우~~

📌 **척추동물을 사용하지만 거의 스트레스를 주지 않는 교육 또는 연구**

실험대상

「동물보호법」 및 「실험동물에 관한 법률」에 따른 실험동물의 범위에 해당되는 척추동물을 대상으로 실험적 처치를 가하지 않고 사육, 적응, 유지되는 경우로 실험동물이 고통과 스트레스를 거의 느끼지 않는 상태에 해당

- ▶ 「동물보호법」 및 「실험동물에 관한 법률」에서 규정하는 척추동물
 - 동물보호법: 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류 중 척추동물
 - 실험동물에 관한 법률: 동물실험을 목적으로 사용 및 사육되는 척추동물

실험방법 사례

- ▶ 실험동물의 생산 또는 공급을 목적으로 사육하는 경우
 - 실험군 확보 및 계통 유지를 위한 실험동물의 번식, 사육
 - 색소도포
 - 3주령 이하 마우스와 랫드의 꼬리절단
- ▶ 외양, 행동관찰 및 검사를 목적으로 하며 억압정도가 낮은 단기간 보정
 - 표현형을 확인하기 위한 번식, 사육
 - 손으로 보정, 체중, 체온측정(무마취), 자발적 운동량 및 행동관찰(무마취)
 - 야생상태에서의 행동 관찰
 - 3주령 이하 마우스와 랫드의 꼬리 절단

1. 동물의 고통 정도에 따른 고통 등급의 분류 -

Category C

~~척추동물에게 약간의 스트레스 혹은 단기간의 적은 통증을 주는 실험, 고통 경감하는 약물 사용이 필요 없는 실험~~

📌 척추동물을 대상으로 단시간의 경미한 통증 또는 스트레스가 가해지는 교육 또는 연구

실험대상

「동물보호법」 및 「실험동물에 관한 법률」에 따른 실험동물의 범위에 해당되는 척추동물 중 비인간영장류(non-human primates)를 제외한 척추동물

실험방법 사례

➤ 외형, 행동관찰, 임상검사

- 통증이 적고 기형을 유발하지 않는 개체식별 과정: Ear punch, 마이크로칩 삽입, 피부 tattoo 등
- 보정틀을 이용한 단시간의 보정
- 큰 스트레스 없이 할 수 있는 단시간의 행동시험(미로찾기, 운동부하가 적은 단계의 Rota-Rod), 비침습적 방사선 촬영, 혈압측정 (tail cuffing)
- 단시간(8시간 이내)의 식이 및 음수제한

➤ 일회성의 투여 및 채혈

- 부작용이 없으며, 비자극성의 물질을 경구, 위내, 복강, 피내, 피하 및 근육투여를 실시하는 경우
- 통증이 경미한 경로를 이용한 채혈 또는 카테터 삽입
- 주요 채혈 부위: 노쪽피부정맥 (cephalic vein), 목정맥(jugular vein), 두렁정맥(saphenous vein), 꼬리 정맥(tail vein)
- 채혈 또는 투여를 위한 단시간의 보정틀을 이용한 보정 포함

➤ 감염실험 후 임상증상 발현 전에 안락사 실시

- 감염실험에서 감염 후 증상이 발현되지 않는 실험
- 면역증강제를 사용하지 않는 항체 생산 실험
- 특정질환을 유발하더라도 증상이 매우 경미하고, 초기에 종료되는 실험(임상증상이 발현되기 전에 인도적인 안락사 방법을 이용하여 안락사를 실시하는 경우)

➤ 교육 및 실습

- 실험동물의 생존기간 동안 행해지는 비숙련자에 의한 Category C에 해당하는 실습실험으로 실험의 방법과 내용이 이미 확립되어 있으며, 조작이 간단한 경우에 한함 (정규 교육과정에 의한 실험동물 실습과정으로 동물실험기법 숙련자에 의해 교육 및 감독이 이루어져야 함)

➤ 안락사 실시 후 실시하는 비생존실험

- Category B의 조건으로 사육했지만, 실험이나 연구에 더 이상 사용할 필요가 없어 안락사 시켜야 하는 경우
- 채뇨, 피부생검(조직채취), 심마취 상태에서 실시하는 비생존 실험(사후 체액 또는 조직 채취)

1. 동물의 고통 정도에 따른 고통 등급의 분류 -

Category D

~~척추동물에게 피할 수 없는 상당한 억압이나 고통을 주지만, 적절한 마취제나 진통제 등 고통 경감의 수단을 강구하여 고통을 줄여주는 실험~~



척추동물을 대상으로 중등도 이상의 고통이나 억압을 동반하는 교육 또는 연구

실험대상

「동물보호법」 및 「실험동물에 관한 법률」에 따른 실험동물의 범위에 해당되는 척추동물

실험방법 사례

▶ 고통을 유발하는 약물의 투여

- 고통을 유발하는 물질(화학물질, 독성물질)을 투여하는 실험으로 동물에게 중등도의 염증 또는 통증이 유발될 경우
- 면역억제제를 사용하는 항체생산 실험
- 천식, 위염, 대장염 및 아토피성 피부염과 같은 의도적인 통증 또는 염증유발 실험

▶ 감염, 만성질환, 약리독성 실험

- 의도적인 감염 또는 특정질환을 유발하여 외형적 증상은 경미하나 대사적, 생리적 변화로 인한 고통이 예상되는 경우
- 결핵, 폐렴, 신부전, 대장염, 당뇨, 지방간, 방광염 등의 초기질병 단계
- 감염 후 사망개체가 발생하지 않으나 중등도의 발열, 체중감소 등의 임상증상이 발현되는 경우
- 면역억제 유발을 위한 방사선 조사, 심근경색, 뇌경색, 허혈, 척추손상, 신경손상, 파킨슨병, 자가면역질환, 당뇨, 고혈압, 근위축증 모델, 비만, 고지혈증 모델, 항암모델 등과 같이 극심한 고통과 스트레스를 야기하는 질병의 유발시험
- 예비실험을 통하여 사망개체가 발생하지 않을 것으로 예상되는 생식독성 실험, 단회/반복투여 독성 실험, 약리독성실험 (단, 사망개체 발생 시 Category E로의 변경승인 필요)
- 식욕저하, 피부 외상, 종기, 절뚝거림, 결막염, 각막부종, 광선공포증 등과 같은 임상증상을 유발하는 처치
- 양성종양 또는 전이단계 전에 종료되는 악성종양의 유발. 단, 종양의 부피가 1cm³ 이하인 경우
- 전이단계 전의 종양이라도 실험동물의 행동에 큰 장애를 주지 않아야 함

▶ 외과적 처치의 실시

- 훈련받은 숙련자에 의해 수행되는 외과적 처치를 의미하며, 처치 후 심각한 기형이나 신체기능의 변화를 유발하지 않는 경우
- 일반적인 외과적 수술, 치과수술 포함

▶ 반복적인 채혈 및 침습적 검사

- 반복적인 투여 및 채혈을 위한 장시간 보정틀을 사용한 보정. 8시간 이상의 음수 및 사료급여의 제한
- 꼬리조직 절단, 침습성 혈압측정, 안와정맥혈기체혈, 심장채혈, 반복적인 정맥채혈

▶ 물리적인 스트레스의 유발

- 심한 스트레스가 유발되며, 장기간 물리적 억압이 유지되는 실험
- 반영구적인 두부 카테터 장착으로 인하여 행동장애가 유발되는 경우
- 중등도의 운동부하(예, treadmill)를 유발하는 행동실험
- 반복적인 전기자극을 포함하는 행동실험

▶ 마취 상태의 진단 검사

- 뇌파 측정, 초음파 검사, 심전도 검사 등

▶ 비인간 영장류의 생산 또는 공급을 목적으로 사육하는 경우

1. 동물의 고통 정도에 따른 고통 등급의 분류 -

Category E

~~척추동물에게 무마취하에서 허용 한계에 가깝거나 그 이상의 통증을 주는 실험~~
(*원칙적으로 불허하며, 실험의 필요성에 대하여 별첨자료로 설명하여야 함)

 **척추동물을 대상으로 극심한 고통이나 억압 또는 회피할 수 없는 스트레스를 동반하는 교육 또는 연구**

실험대상

「동물보호법」 및 「실험동물에 관한 법률」에 따른 실험동물의 범위에 해당되는 척추동물

실험방법 사례

▶ 고통을 유발하는 약물의 투여

- 고통을 유발하는 약물, 화학물질, 독성물질 또는 유기물질 등을 투여하는 실험으로 고도의 염증이나 통증이 유발될 경우
- 마취제 투여나 장기적(수일~수주)으로 보정을 하지 않고 약물 투여로 마비시키거나 운동성을 없앴으로써 인위적인 장애유발 실험
- 골수기능의 완전파괴를 목적으로 하는 방사선 조사
- 고통완화 없이 눈이나 피부를 자극하는 실험이나 극한 환경에 노출시키는 실험

▶ 감염, 만성질환, 약리독성실험

- 감염실험에서 증상의 발현과 함께 폐사 개체가 발생하는 경우
- 의도적 감염 또는 특정 질환의 유도로 대사적, 생리적 변화 및 외적 변화가 유도되어 정상적인 생활이 불가능한 경우
- 실험동물의 죽음이 실험종료시점이 되는 경우
- 전이단계의 악성 종양, 말기 암(종양의 부피가 1cm³를 초과하여 행동에 큰 장애를 야기할 경우, 동물실험의 종료시점으로 설정하고 안락사 시켜야 함)
- 병원성시험 또는 약리독성시험으로 실험동물의 죽음이 실험의 종료시점이 되는 경우
- 결핵, 천식, 폐렴, 신부전, 대장염, 당뇨, 지방간, 간경화, 방광염 등의 중증 및 말기질환 또는 면역거부반응을 수반하는 이식실험

▶ 외과적 처치의 실시

- 훈련받은 숙련자에 의해 수행되더라도, 수술 후유증으로 고통이 심하거나, 결손 등으로 인하여 영구적 장애를 유발하는 실험
- 수술 후 정상적인 생활이 어려운 수술
- 신체의 마비, 감각소실 또는 기능 장애를 유발하는 정형외과 수술
- 반영구적인 손상을 야기하는 뇌허혈, 뇌졸중 등을 유발하는 수술

▶ 물리적인 스트레스의 유발

- 충격 등의 유해한 자극을 주거나 사람이 통증을 느낄 정도(1mA 이상)의 전기 자극을 가하는 경우
- 중등도 이상의 공포감, 스트레스를 줄 수 있는 행동테스트: 장시간의 수영, 수중미로 테스트 등
- 통증을 목적으로 하는 실험: 발바닥 통각 확인 실험

▶ 체중 또는 체온의 변화

- 체중의 20% 이상 감소를 유발시키는 식이제한 및 질병
- 체온이 5도 이상 떨어지는 경우

▶ 비인간 영장류를 이용한 실험

- 번식 또는 공급 목적 연구를 제외한 비인간 영장류 실험 등
- 포유기의 동물을 어미와 격리시키는 행위

▶ 고통이 수반되는 행동실험

- Water maze

2. 설치류의 인도적 실험종료 기준

정의

인도적 실험종료 기준은 실험동물의 통증(pain) 및 고통(distress)을 종료하거나 최소화 또는 경감시키는 시점이며, 안락사를 수행하는 시점

종료시점의 적용을 위한 일반적 고려사항

- ▶ 동물실험 원칙에 맞게 종료시점을 설정
 - 동물실험에서 통증, 고통 또는 불편 (uncomfortable)을 최소화 시키거나, 과학적 목적에 적합한 종료시점을 미리 설정하여 적용하는 것이 바람직함
- ▶ 연구자는 종료시점 선택 시 수의사나 IACUC와의 협의사항을 반영해야 함
- ▶ 빈사상태에 이르기 전에 주의 깊은 관찰로 초기 종료시점을 선정함
 - ※ 빈사상태 (moribund): 자극에 대한 반응이 없고, 호흡곤란, 저체온증, 웅크림 등을 동반
빈사상태의 동물은 실제로 혼수상태로 사망에 임박
- ▶ 동물의 죽음이 종료시점이 되는 실험의 경우는 지양해야 함
 - 독성시험, 감염실험, 백신 효능시험, 종양 연구, 항암제 시험 등

2. 설치류의 인도적 실험종료 기준

올바른 종료시점 선정 방법

- ▶ 종료시점 선정 시 미리 고려할 사항
 - 적절한 동물관찰(행동, 생리상태 등)로 정상상태 사전 숙지
 - 관찰의 목표치 설정
 - 해당 실험환경에서 통증, 고통의 가장 중요한 지표 결정
 - 가장 중요한 전구증상을 결정하여 초기 종료시점의 증상을 구분
 - 실험의 목적과 예상되는 결과를 명확하게 숙지해야 함

- ▶ 동물관찰 빈도 결정
 - 정상동물은 하루에 1회 관찰이 필요함
 - 실험의 특정 기간이나 부작용이 시작되는 기간에는 하루에 2~3회 관찰이 필요함
 - 잠재적 통증, 고통이 증가하면 관찰 빈도도 증가시켜야 함
 - 일부 감염 실험 및 독성 평가의 경우, 높은 빈도의 관찰이 요구됨
 - 동물관찰은 일반적으로 주간(실내 등이 켜져 있을 때)에 이루어져야 함
 - 관찰 일정은 수의사와의 협의를 거쳐 IACUC의 승인을 얻어 연구자가 결정함
 - ※ 예비실험을 통한 초기 종료시점 결정에 필요한 관찰의 빈도 결정
 - 본 실험의 정확성을 위한 그룹 크기 결정에 도움이 됨
 - 본 실험수행자의 훈련과 경험에 도움이 됨

- ▶ 동물관찰 포인트
 - 체중 변화
 - 사료 및 음수 섭취 변화
 - 외형 변화
 - 임상 증상: 심박수, 호흡수 등
 - 자극하지 않았을 때 행동 변화(통증 및 고통의 유의한 행동지표)
 - 감소: 털 고르기, 헛바퀴 달리기, 사료섭취, 음수섭취, 기어오르기 등
 - 증가: 휴식, 행동정지, 굶기(만성 통증 시)
 - 외부 자극(소음, 빛 자극, 물리적 자극 등)시 행동 반응
 - 감염실험 등에서 저체온증
 - 저체온증은 동물상태 악화의 중요한 지표임
 - 세균감염 마우스는 34℃ 이하 시 치명적임

2. 설치류의 인도적 실험종료 기준

올바른 종료시점 선정 방법

➢ 관찰 결과의 채점

- 각 카테고리 별로 채점한 후 점수를 누적하여 통증 및 고통 정도를 판단: 0 (정상 또는 경도) ~ 3 (심각)

- 체중 변화

0	정상
1	< 10% 체중 감소
2	10 ~ 15% 체중 감소
3	> 20% 체중 감소

- 외모변화

0	정상
1	털 고르기 감소
2	거친 털, 콧물, 눈물
3	매우 거친 털, 비정상 자세

- 행동변화

0	정상
1	미세한 변화: 절뚝거림, 투여부위에 관심
2	비정상: 행동 감소, 활성 저하
3	발성, 자해, 매우 불안해하거나 움직이지 않음

- 상기 카테고리 별 점수의 합계가 3점 이상이면 수의사에게 즉시 알린 후 인도적 실험 종료 여부에 대해 자문을 받아야 함

2. 설치류의 인도적 실험종료 기준

올바른 종료시점 선정 방법

- 동물관찰의 책임과 관찰자의 훈련
 - 동물관찰 책임
 - 명확한 개인별 책임과 보고체계가 필요함
 - 이상 관찰시 즉시 수의사와 연구책임자에게 보고해야 함
 - 안락사의 결정은 일차적으로 IACUC의 권한을 위임받은 수의사에게 있음
 - 적절한 훈련을 받아 숙련된 경험을 보유한 사람이 수의사의 안락사 지시를 수행할 수 있음
 - 침습적 연구의 경우, 예상하지 못한 부작용이 발생할 수 있으므로 이에 대한 대책 마련이 사전에 필요함
 - 동물관찰자 훈련
 - 연구책임자에게 동물관찰자 훈련의 책임이 있음
 - 관찰을 통해 정상 생리수치, 행동 및 상태를 평가하는 훈련이 필요함
- 종료시점 선정에 있어서 IACUC의 역할
 - 종료시점 확립에 결정적 역할을 수행함
 - IACUC는 올바른 종료시점 선정을 위한 정보를 확인해야 함
 - 제안된 종료시점의 과학적 근거
 - 해당연구에 사용되는 특정 모델의 사전 정보에 근거하여, 통증 및 고통의 최초 증상과 예상되는 임상증상
 - 예상되는 가장 심각한 영향
 - 질병의 진행과 부작용의 정보가 부족할 경우, 연구자와 수의사가 참여한 pilot study 가능여부
 - 동물관찰 리스트 확립 여부
 - 동물 관찰자와 기록 담당자의 확인
 - 관찰 결과의 명확한 보고체계 확립여부
 - 동물관찰 빈도의 확인
 - 동물관찰자의 적절한 훈련 여부
 - 동물이 예상치 못한 심각한 증상을 보일 때 대책 수립 여부
 - 독성 연구의 경우 현존하는 독성학적 자료의 유무 확인

2. 설치류의 인도적 실험종료 기준

연구주제별 가이드라인

▶ 단일클론항체 생산

- 복수 또는 종양에 따른 체중 증가로 인한 동물의 통증 및 고통이 없어야 함
- 복수 추출은 2회까지 허용
 - 두 번째 복수 추출은 전신 마취 상태에서 수행
- Hybridoma 세포 주입 후 첫 주(복수 차기 전)에는 매일 1회 관찰
 - 복부 부종이 보이면, 매일 최소 2회 관찰
- 고통의 지표: 움직임 감소, 웅크림, 거친 털, 힘든 호흡, 체중 감소 등

▶ 종양연구

- 동물모델을 활용한 모든 종양 연구에서 동물의 잠재적 통증 및 고통이 최소화 될 수 있게 종료시점을 선정함
- 일반적 종양 실험 시, 종양의 무게가 체중의 5%를 초과하면 안 됨
 - 예: 25g 마우스에서 17mm, 250g 랫드에서 35mm 정도 피하 종양까지 허용
 - 효능평가의 경우 체중의 10% 정도까지 가능함
- 종료시점
 - 종양이 정상 신체 기능을 방해하거나 종양 부위에 통증 및 고통을 유발하는 경우
 - 정상동물 체중과 비교하여 20% 체중 감소한 경우(종양의 무게 고려 필요)
 - 종양 부위의 궤양 및 감염
 - 종양 주위 조직 침윤
 - 영구적 상처 유발

▶ 급성독성시험

- 허가 심사를 위한 경우
 - 연구책임자는 심사기관으로부터 해당시험이 필요함을 명시한 서류를 제공받아 IACUC에 제출해야 함
 - 연구책임자는 in vitro 대체시험법이 심사기관에서 인정되지 않았고, 동일한 동물시험이 사전에 수행된 적이 없다는 것을 IACUC에 보여줘야 함
- MFDS, OECD, ICH, FDA, HC 등 해당 가이드라인에 근거하여 시험을 진행함
- 효능이 알려지지 않은 화합물 시험의 경우, 종료시점을 결정하는 pilot study가 효과적임
- 적은 수의 실험동물을 이용하여 이환율(morbidity), 시간 경과에 따른 영향, 관찰빈도를 결정함 (초기 종료시점 결정)

2. 설치류의 인도적 실험종료 기준

연구주제별 가이드라인

- ▶ 만성독성시험, 발암성시험, 노화관련 연구
 - 해당 실험동물 생존율의 중간값 또는 그 이상 실험하는 경우 반드시 수의사와 협의하여, 안락사를 위한 종료시점 범위를 확립
 - 발암성시험의 경우 시험 전 미리 안락사 기준을 수의사와 결정
- ▶ 통증연구
 - 실험동물은 실험 목적에 부합하는 최소한의 고통에만 노출시킴
 - 실험기간과 실험동물 수를 최소화함
 - 통증 유발을 위해 역치 (threshold)가 적용함
 - 급성모델의 경우, 결과를 얻은 후 가능한 빨리 통증을 종료시킴
 - 회피시험 외 다른 시험은 권장하지 않음
 - 만성 통증 시험시 적절한 진통제를 계속 투여함
 - ※ 예외: 연구책임자가 진통제가 시험에 영향을 준다는 증거를 제출하고 이를 IACUC가 승인한 경우
 - 근이완제에 의해 마비된 동물을 통증시험에 사용하는 경우 반드시 전신마취 또는 신경의 감각기능을 제거하는 외과적 수술을 수행함
- ▶ 감염연구, 백신시험
 - 감염 실험에서 동물의 통증 및 고통의 가능성을 최소화할 수 있는 종료시점을 결정함
 - PD₅₀(Protective Dose 50) 시험은 항감염 연구 후 진행함
 - 감염 실험의 경우 20% 체중감소, 4°C 이상 체온 저하로 종료시점을 결정함

3. 설치류의 안락사 방법

정의

안락사는 "good death"를 의미하며, 안락사는 동물이 의식이 없는 상태로 고통이나 스트레스 없이 신속하게 죽음에 이르게 해야 한다.

요약

허용	바비튜레이트계 및 바비튜레이트계 유도체 주사용 바비튜레이트 합제 해리성마취제 합제
조건부 허용	흡입마취제 이산화탄소 일산화탄소 트리브로모에탄올 에탄올 경추탈구 단두 안락사용 전자레인지
허용 안됨	질소와 아르곤 염화칼륨 마약류 우레탄

3. 설치류의 안락사 방법

허용되는 안락사 방법

허용되는 안락사 방법은 단독적으로 사용하더라도 인도적인 안락사가 유도되는 방법임

- ▶ 바비튜레이트계 및 바비튜레이트계 유도체 (barbiturate/barbituric acid derivatives)
 - 작용 속도가 빠르며, 최소한의 고통으로 평온한 안락사가 유도됨
 - IV(정맥투여)가 더 효과적임
 - 마취용량의 3배를 투여하면 안락사가 유도됨

- ▶ 주사용 바비튜레이트 합제 (injectable barbiturate combination)
: 항경련제, 국소마취제, 바비튜레이트를 병용하여 사용 가능함

- ▶ 해리성 마취제 합제 (dissociative agent combination)
※ 해리성 마취제인 ketamine의 경우에는 α 2-adrenergic receptor agonist(예: xylazine 또는 benzodiazepine)와 병용 투여해야 함.

3. 설치류의 안락사 방법

조건부로 허용되는 안락사 방법

조건부로 허용되는 안락사 방법을 수행할 경우, IACUC에 승인을 받아야 함

▶ 흡입마취제

- Halothane, isoflurane, sevoflurane, desflurane(N₂O와 병용 또는 미병용)
- N₂O는 단독으로 사용되면 안 됨
- 동물의 사망여부를 반드시 확인해야 함 (신체검사)
- 단, 확실하게 안락사가 되지 않았을 경우 기타 안락사 방법을 병행함

▶ 이산화탄소(CO₂)

- 전마취의 유무와 관계없이 사용 가능함
- 압축 CO₂ 가스의 사용을 권장함
- 안락사 챔버를 분당 10 ~ 30% 채우는 속도로 교체하는 것을 권장함
- 사전에 CO₂가 채워진 챔버의 사용은 허용 안 됨 (고통 유발)
- 신체검사로 동물의 사망 여부를 확인해야 함
- 설치류에 대한 CO₂ 안락사를 수행하는 모든 사람은 적합한 교육을 이수해야 함
- 가능하다면 안락사는 설치류가 사육되고 있던 케이지에서 수행되는 것이 권장되며, 다른 케이지에 시육되었던 실험동물들을 모아서 하나의 챔버에서 안락사를 수행하는 것은 금지됨
- CO₂의 마취효과는 가역적이므로 확실한 안락사를 위해서는 방혈, 경추탈구, 100% CO₂가 있는 챔버에 추가 50%의 시간동안 노출 등의 방법으로 확실한 사망을 유도함

Age	100% CO ₂ 노출시간	
	마우스	랫드
0~6 일령	60분	40분
7~13 일령	20분	20분
14~20 일령	10분	10분
21 일령 이상	5분	5분

▶ 일산화탄소(CO)

- 일반적으로 사용되지 않음
- 안전한 환경조건에서 수행 가능함

3. 설치류의 안락사 방법

조건부로 허용되는 안락사 방법

- 트리브로모에탄올(Tribromoethanol)
 - 시판용 의약품으로 구매할 수 없으며 원료의약품으로 구입 가능함
 - 복막염을 유발함
 - 안락사 목적으로 사용해야 하는 근거와 약품의 제조, 보관, 적절한 투여에 대해 IACUC의 조건부 승인을 얻은 경우에 허용됨
- 에탄올
 - 70%의 에탄올을 복강으로 주입함
 - 마우스에 0.5ml 의 에탄올을 투여하는 경우 점진적으로 운동조절 능력이 상실되며 혼수상태를 거쳐 2~4분 후 사망함
 - 마우스의 경우 항체생산 연구에 선호됨
- 경추탈구(cervical dislocation)
 - 실험실에서 많이 사용되는 방법으로 마취제에 의한 조직내 잔류가 발생되지 않음
 - 빠르고 5~10초 내에 작업이 완료됨
 - 마우스와 200g 이내의 랫드에서 허용됨
 - 수행자는 반드시 적합한 교육을 받아야 함
- 단두(decapitation)
 - 마취제의 조직내 잔류가 없으며, 뇌 조직의 손상이 없음
 - 의식 소실이 5~30초 내에 발생함
 - 설치류용 단두대(guillotine)가 필요하며, 잘 관리되어야 함
 - 마우스와 랫드에서 사용 가능함
 - 수행자는 반드시 적합한 교육을 받아야 함
- 안락사용 전자레인지 (focused beam microwave irradiation)
 - 마취된 마우스와 랫드에서 사용 가능함
 - 뇌 대사산물의 신속한 고정이 필요한 경우, 연구목적으로 활용이 가능함
 - 가정용, 주방용 전자레인지는 사용 불가함
- 저체온증 유발(hypothermia)
 - 신생자에서만 허용됨
 - 차가운 물체, 얼음 등에 동물이 직접 접촉되지 않도록 해야 함
 - 7일령 이상의 동물에서는 권장되지 않음
 - 5일령 이하의 동물은 신경계가 충분히 발달되어 있지 않으므로 액체질소를 활용하여 안락사를 유발시킬 수도 있음

3. 설치류의 안락사 방법

허용 안 되는 안락사 방법

비윤리적 인 안락사 방법 또는 안락사를 수행하는 수행자에 위해가 될 수 있는 안락사 방법임

- 질소
- 아르곤
- 염화칼륨(potassium chloride)
- 근이완제(neuromuscular blocking agent)
- 마약류(opioid)
- 우레탄(urethane)
- α -chloralose