

实验动物的安乐死及其实施方法的伦理分析

李楠, 王天奇, 何嘉玲, 张长勇, 暴国, 孙德明*

(国家卫生计生委科学技术研究所, 北京 100081)

【摘要】 安乐死是实验动物的关键性福利,也是伦理审查的重点。随着人们动物保护意识的增强和国家实验动物福利伦理标准颁布和实施,安乐死问题也越来越受到广泛关注。本文结合国际上应用安乐死的现状,对实验动物实施安乐死面临的主要问题进行了阐述,并对国际上常用的几种安乐死方法的优缺点进行了比较及伦理分析,并提出了建议。

【关键词】 实验动物;动物福利;伦理审查;安乐死;动物实验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0128-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.022

Ethical analysis of euthanasia methods for experimental animals

LI Nan, WANG Tianqi, HE Jialing, ZHANG Changyong, BAO Guo, SUN Deming*

(National Research Institute for Health and Family Planning, Beijing 100081, China)

【Abstract】 Euthanasia is a key welfare issue and focus of ethical reviews in laboratory animal experiments. With increased awareness of the importance of animal protection and the promulgation and implementation of national standards of welfare ethics for laboratory animals, the issue of euthanasia has attracted increasing attention. Based on the current situation of the international application of euthanasia, this paper expounds the main problems associated with the implementation of euthanasia on laboratory animals, compares the advantages and disadvantages of several euthanasia methods commonly used globally, presents an ethical analysis, and proposes some suggestions.

【Keywords】 laboratory animal; animal welfare; ethical review; euthanasia; animal experiment

随着生物医学技术的快速发展,实验动物在多个领域多学科的应用日益广泛,每年有数千万的动物用于科学研究。人类对于实验动物福利伦理及保护意识的逐渐增强,安乐死的问题受到了广泛的关注。安乐死是实验动物的关键性福利。然而,如何科学的选用恰当的安乐死方法既能保证动物福利又符合伦理道德标准、方便易行又不影响实验结果的判定,是困扰很多科研工作者的一个难题。本文对国内外应用安乐死的现状,实验动物实施安乐死

的若干问题进行阐述,并对国际上常用的几种安乐死方法的优缺点进行了比较及伦理分析。

1 安乐死的实施背景

1.1 动物实验的目的

应用动物进行科学实验的目的很多,在有些实验中,所需要的组织或数据不能从活体动物获取,需对动物执行安乐死,才可进行后续的实验。如癌症研究需要对动物进行剖检,观察肿瘤是否转移;

【基金项目】 2018年度科技创新重点项目(2018GJ03)。

【作者简介】 李楠(1991—),女,博士,助研,研究方向:实验动物。E-mail:linann369@163.com

【通信作者】 孙德明(1958—),男,博士,研究员,研究方向:实验动物。E-mail:sundemingnet@163.com

神经学研究项目是以在实验动物体内注射神经解剖示踪剂或进行组织病理学检测,进而对病灶部位进行研究。在这些实验中,实验动物提供体外研究的细胞或组织。

1.2 实验动物痛苦程度超过预期

在动物实验中,不可避免的会对动物造成痛苦或伤害,有些伤害是可控的,但有些伤害是不可预期的,会对动物造成巨大痛苦。如动物持续处于应激状态时,其生理、病理均会发生较大的变化,此时获得的动物实验数据是不科学的、不准确的。因此,依据动物福利和动物保护的原则,实验者应在恰当的时机采取恰当的方法对动物进行安乐死,确保动物的痛苦降到最低。

1.3 动物实验失败或无法完成

动物实验中,经常出现意外的情况。当发现动物实验已经失败,继续实验已经无法得到有意义的结果时,应实施仁慈终点:立即停止动物实验。为尽早终止受试动物的实验痛苦,应实施安乐死。

1.4 其他不适合继续繁殖或饲养的原因

安乐死是实验中不需要的健康动物的默认选择。如果动物因性别、年龄或基因型、或在某些科学研究中动物已经进行了一些实验,导致其无法用于其他实验时,研究人员会从实验中去掉这些动物。但安乐死剥夺了健康动物的未来,目前国外正在尝试寻找可靠的家庭来收养健康但不被需要的实验室动物,使得这些动物除了安乐死外,还有其他的命运可以选择。对于目前使用数以万计的大小鼠和鱼来说,采用此办法是个不错的选择,但是转基因动物由于其特殊性,不能采用此种方法^[1-2]。

2 安乐死的执行标准

当实验动物的身体出现以下状况,应立即执行安乐死:①体重减轻:当实验动物体重减轻达原体重的 20% ~ 25%,或动物出现恶病质或消耗性病征。②食欲丧失:小型啮齿类动物完全丧失食欲达到 24 小时或食欲不佳(低于正常食量 50% 达到 3 天。大动物完全丧失食欲达 5 天或食欲不佳(低于正常量之 50%) 达 7 天。③虚弱或濒死:无法进食或饮水,动物在没有麻醉或镇静的状态下,长达 24 h 无法站立或极度勉强才可站立,或表现精神抑郁伴随体温过低(常温动物低于 37℃)。④严重感染:体温升高白细胞数目增加,且抗生素已经无效并伴随动物全身性的不适症状。⑤肿瘤:自发性或实验性

肿瘤,均需仁慈终点评估。肿瘤生长超过动物原体重的 10%,肿瘤平均直径在成年小鼠超过 20 mm、成年大鼠超过 40 mm;体表肿瘤表面出现溃疡、坏死或感染;腹腔异常扩张、呼吸困难;出现神经精神症状。⑥动物预后不佳:出现器官严重丧失功能的临床症状且治疗无效,或经实验动物医师判断预后不佳:如呼吸困难、发绀、内脏摘除手术;肾衰竭、中枢神经抑制、肢体功能丧失、皮肤伤口无法愈合、重复性自残或严重烫伤等^[1]。

世界各地研究机构可接受的小鼠肿瘤大小的标准也不同,争议较大。Nature 规定癌症研究论文,肿瘤大小不应超过 15 mm;麻省总医院 IACUC 动物福利指南中的限制规定也是 15 mm。但这些并不具有广泛的代表性;2010 年一个癌症研究小组发布的指南推荐的直径不应该超过 12 mm。美国机构指南通常推荐最大为 20 mm,具有广泛的代表性。按照中国动物福利的伦理审查国家标准规定的审查原则,即必要性原则来分析,当模型小鼠肿瘤超过 20 mm,肿瘤疫病模型已经完全形成,已不再具有可逆性,因此,没有必要继续生长,使动物遭受更大的和不必要伤害。

安乐死的伦理判定,应遵循国家标准有关安乐死的原则性要求^[3]。并应该让熟悉动物的兽医、实验人员和伦理审查人员从专业的角度来共同决定安乐死执行的最佳时机,最大程度的减少动物痛苦。

3 安乐死前的动物福利

在动物执行安乐死前,必须确保实验动物享有其本应享有的福利待遇。一旦动物被确定执行安乐死,研究人员必须准备迅速的采取行动,因其他事由导致的延迟会增加实验动物的痛苦。在安乐死执行之前,房间里的动物越多,它们相处的时间越长,群体间压力和潜在侵略性就越大。动物生命的最后时刻,不应使其再经历生疏环境与其他动物和人类操作的惊扰和产生的紧张及惊吓^[34]。在安乐死实施过程中,应予以温和的处理方法,遵循恰当使用镇定剂或麻醉剂的原则。

4 现行安乐死方法比较及伦理分析

如何判断一种安乐死方法是否人道?这是一个独一无二的难题,由于动物无法说出它们的感受,人类很难解读动物行为。但人类在了解动物福利的影响方面取得了重大进展。

目前采用安乐死的方法主要分为三种,非吸入性麻醉法、吸入法和物理法。非吸入性麻醉法即为过量用药,如应用巴比妥类药物过量麻醉;吸入法为应用二氧化碳、一氧化碳或氮气等气体替换氧气,或用吸入性麻醉药,如异氟醚、乙醚等;物理方法包括颈椎脱位、断头术、窒息、冰冻、微波辐照等,

4.1 非吸入性麻醉剂

通过注射过量的药物,使动物迅速死亡,是非常可靠的动物安乐死方法。注射性麻醉剂有多种给药方式,静脉注射是最佳选择。目前在药物选择中,应用过量的巴比妥类及其衍生物的药物是对动物执行安乐死的优选方法,适宜的动物种类包括啮齿类动物、兔、犬、猫、非人灵长类动物、猪、牛、马、两栖动物、爬行动物、家禽,应用范围较广,巴比妥类药物会导致意识快速丧失继而呼吸停止,但有些个体注射时会诱发持续的兴奋期继而丧失意识。由于小动物(如大鼠、小鼠等)静脉注射比较困难,通常会采用腹腔注射巴比妥。但腹腔注射巴比妥会因其碱性而导致动物腹部扭曲造成疼痛,因此会在麻醉剂中加入局麻药(利多卡因)显著缓解因巴比妥注射而引发的伤害^[1]。对于大动物,较为公认的最好的方法是:首先给予安定剂,待动物进入安静状态时,再行静脉注射过量的巴比妥酸盐,该法可最大限度地减少动物的紧张和挣扎。

注射巴比妥药物的优点在于可以平稳的诱导并麻醉动物,因为其效果依剂量、浓度和投药方式而不同,可使动物的不适反应降到最低,失败的可能性低于物理方法,可以保留完整的身体结构。

注射巴比妥类药物的缺点在于要提高对于获取、存储、使用及记录相关药品的要求,与物理方法相比较慢,一次仅能杀死一只动物;药物会对组织造成污染;如果安乐死的动物被其他动物所吃掉,有药物残留的风险,并会对某些研究项目中的肝脏或其他生理功能产生影响。目前美国允许将氯胺酮及三溴乙醇单独或共同用药执行动物安乐死,但阿片类药物作用比较缓慢,不是真正的麻醉药。因此,不推荐过量应用阿片类药物作为安乐死的方法。

使用巴比妥类会引起一些动物福利问题,包括抓取动物进行注射而导致的应激;在血管周围注射溶液后潜在的疼痛;剂量没有掌控好,没有进行死亡的验证,有潜在复苏的可能。这种安乐死方法需要采用辅助的方法确认动物是否死亡;需要对人员开展准确实施腹腔注射或静脉注射的相关培训。

4.2 吸入性麻醉剂

4.2.1 二氧化碳法

动物暴露于二氧化碳中,二氧化碳会从环境中进入肺泡,然后是血液,当大脑中二氧化碳含量到达一定浓度,会导致意识丧失继而死亡。这是处死实验啮齿动物最广泛使用的方法。出生一天雏鸡使用二氧化碳的安乐死效果良好,在农业上,也广泛用于处死家禽和猪。该方法简单、安全、有效、廉价、不污染组织。但由于二氧化碳与水发生反应,在湿润组织中生成酸,酸会产生刺痛的感觉,使动物在丧失意志前感受到痛苦。二氧化碳的浓度越高,动物失去意识的时间就越短,反之,当二氧化碳浓度增长缓慢时,也会延长动物失去意识的时间。

目前没有科学研究表明动物短暂的明显疼痛与长时间慢性疼痛相比是更好还是更差。有研究表明二氧化碳浓度超过 50% 会引发人类的疼痛,在啮齿类动物的鼻、眼的上皮细胞中,存在相似密度的类似伤害感受器,伤害感受器会对类似浓度的二氧化碳作出厌恶反应。有科学家研究表明安乐死前预先填充 10% ~ 30% 的二氧化碳效果较好。在加拿大管理动物安乐死中,建议每分钟填充 20% ~ 30% 的二氧化碳。在缓慢充气过程中,二氧化碳达到可能引发疼痛的浓度前,动物已经被麻醉了。在预充或快充过程中,动物在暴露于 50% 浓度之前,已经丧失意识了^[5-6]。

应用二氧化碳是一种安全的、低成本的技术,要求不高,可同时杀死多只动物。在通风良好的场所配合适当的设备使用时,比其他药剂安全;操作者能以最低的风险对动物进行安乐死,不破坏身体结构(且二氧化碳不会污染任何组织)。

二氧化碳吸入法的缺点在于由于二氧化碳比空气重,在容器内尚未灌满时,动物往往将头部抬高而难以迅速死亡;有些动物对二氧化碳的耐受性较高,如牛、马等大型动物、鱼类、水中哺乳类、新生啮齿类动物,往往无法有效的吸入足量的二氧化碳,需要较长时间操作才能完成安乐死。

使用二氧化碳会引起一些动物福利问题,很多研究都发现动物对较低浓度二氧化碳厌恶。有证据表明 20% 二氧化碳即可激活大鼠的恐慌^[7]。在执行二氧化碳的安乐死过程中,目前还没有办法可以让动物免于痛苦(除非动物用非抑制性麻醉剂预先麻醉)。为保证动物减少痛苦,可以采取渐近式充气(每分钟小于 40%)避免引发疼痛。如果在动

物饲养笼中处死动物,应尽可能避免抓取应激,在动物放松(甚至睡着)状态下饲养笼内实施处死操作,从而减少“过程性应激”。同时应结合其他物理方法,如放血、断头等确认动物死亡。

4.2.2 其他吸入性麻醉剂

卤代类吸入麻醉剂如异氟醚、七氟醚、氟烷等,可以用作实验室的啮齿类动物的麻醉剂,应用过量的吸入性麻醉剂执行安乐死也是一种较好的选择,可以作为二氧化碳的替代方案。缺点是当动物暴露于致死剂量的麻醉剂时,许多物种的动物均显示出相同的厌恶和应激行为,与暴露于二氧化碳的动物表现一样。此外,当动物进入吸入性麻醉剂容器中,由于麻醉剂量被容器设置成亚致死浓度,因此,安乐死的过程非常缓慢;在执行安乐死的过程中,为增加容器内麻醉剂的浓度,会在容器内放入被麻醉剂浸泡过的纱布,刺激性的液体可能会直接接触动物。有些动物对高浓度的卤代类吸入麻醉剂有一些厌恶,但是不会像应用高浓度二氧化碳那样诱发疼痛^[8]。但在大多数情况下,并没有找到这些替代物可以替换二氧化碳的优势。除去对动物福利的关注,挥发性麻醉剂是环境污染物,与二氧化碳相比毒性更大。

目前有研究利用氮气和氩气来替换氧气。尽管对啮齿类动物来说,缺氧是痛苦的,但当猪暴露于氮气时,其痛苦较小。跨物种的安乐死方法需要谨慎,在氮诱导缺氧的安乐死方法中得到了较好的验证。虽然大多数哺乳动物对氮诱导缺氧厌恶,但是,在家禽类应用效果较好,实验证明,啮齿类动物和水貂是不可应用氮气进行安乐死,但是在猪和家禽类是可以接受的^[3]。

应用一氧化氮安乐死会诱发动物失去意识。一氧化氮不仅会使动物遭受痛苦,也会对人的安全造成威胁,因此不推荐使用。乙醚对黏膜具有刺激性,易燃。乙醚一般用于实验室安乐死,如肝细胞的收集测定等。

4.3 物理方法

物理的安乐死方法主要有颈椎脱位、撞击头部、断头、放血、微波刺激等;物理法只要有良好的技巧及适当的工具的配合下,能迅速使动物解除疼痛死亡。但是未受过训练的人去实施物理性方法,不仅容易造成人员受伤,更可能使动物因未完全死亡而造成极大的痛苦。有些方法,如放血、脑脊髓穿刺等,不建议作为动物安乐死的单一方法,配合

其他方法使用较好。

对于一些小动物(如啮齿动物、禽类、仔兔、鸟类)断头和颈椎脱位被认定为是可接受的方法,但其关键在于操作者的技能。为保证动物福利,物理性安乐死方法的最佳做法是对操作人员进行系统的培训。相对而言,断头不是理想的方法,但由于爬行动物和两栖动物的中枢系统对脑缺氧相对不敏感,因此断头是它们执行安乐死的唯一选择,如对此类动物进行安乐,应先进行镇静,目的是迅速抑制维持意识的脑中枢^[9-10],减少动物痛苦。

目前,国际上可以接受的专业物理方法通常使用专门微波设备及低温设备。对于斑马鱼,应将其快速浸入冰水中造成低体温,迅速引发冷休克^[11-12];对于新生啮齿动物,推荐缓慢冷却,无需直接将它们放在预冷的表面,放在预冷的表面会在低体温诱发无意识之前引发疼痛。

物理方法的优点在于这种方法通常很便宜,无化学药剂污染组织,执行完成度高,且仅需要很少的设备或不需要设备,快速;缺点在于:对操作者的技术要求较高,如操作技术不佳,恐无法使动物迅速死亡,而导致动物的更大痛苦;不适用于保持动物头/颈部完整的研究;一次只能杀死一只动物;在抓取和保定的时候可能导致动物紧张。

从动物福利角度来说,在物种合理的情况下,物理方法是最合适的安乐死方法,可以避免或减小动物死亡前所承受的不必要的疼痛和痛苦,但是对实施安乐死的人员感官刺激较大,需要加强实验者的心理培训^[13];并且所有的物理方法均会产生创伤,对动物和人都存在潜在的危险,因此,对于操作熟练程度是至关重要的。

5 小结

选择不恰当的安乐死方法会使动物遭受巨大痛苦,因此,在每项研究中要始终考虑最佳的安乐死方法,考虑要素包括:动物的福利性、科学性、实践性和动物种类等,并不是所有方法都适用于所有动物和每一次特定的实验,应根据实验要求,选择恰当的安乐死方法是至关重要。

参考文献:

- [1] Leary S, Underwood W, Anthony R, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition [M]. USA, University of Alaska Anchorage, 2013.
- [2] Carbone, L, Guanzini, L. Adoption options for laboratory

animals[J]. Lab Animal, 32 (9) , 37 –41.

[3] GB/T 35892—2018, 实验动物 福利伦理审查指南[S].2018。

[4] Reilly JS. Euthanasia of animals used for scientific purposes. Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching, Adelaide[S].2001.

[5] Ziemann AE, Allen JE, Dahdaleh NS, et al. The Amygdala is a Chemosensor that Detects Carbon Dioxide and Acidosis to Elicit Fear Behavior[J]. Cell, 2009, 139(5) :1012 –1021.

[6] Hawkins P, Playle L, Golledge H, et al. Newcastle Consensus Meeting on Carbon Dioxide Euthanasia of Laboratory Animals [C]. 2006.

[7] Makowska J, Golledge H, Marquardt N, et al. Sedation or inhalant anesthesia before euthanasia with CO₂ does not reduce behavioral or physiologic signs of pain and stress in mice[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2012, 51(1) :396 –397.

[8] Wong D, Makowska IJ, Wrary DM. Rat aversion to isoflurane versus carbon dioxide[J]. Biol Lett. 2013,9 (1) :20121000.

[9] Carbone L, Carbone ET, Yi EM, et al. Assessing cervical dislocation as a humane euthanasia method in mice[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2012,51 (3) , 352 –356.

[10] Bekoff M, Goodall J. Encyclopedia of animal rights and animal welfare[M]. USA, Greenwood Press, 2010.

[11] Blessing JJ, Marshall JC, Balcombe SR. Humane killing of fishes for scientific research; a comparison of two methods[J]. J Fish Biol.2010, 76(10) :2571 –2577.

[12] Bayne K, Turner PV. Animal Laboratory Animal Welfare, American College of Laboratory Animal Medicine Series [M]. USA, Academic Press, 2014.

[13] 朱玉峰, 王元占, 杨培梁, 等. 浅谈实验动物安乐死[J]. 中国医学伦理学, 2011, 24(2) :260 –261.

[收稿日期]2018 –08 –02

(上接第 127 页)

[53] Rovira M, Arrey G, Planas JV. Exercise-induced hypertrophic and oxidative signaling pathways and myokine expression in fast muscle of adult zebrafish[J]. Front Physiol. 2017,8:1063.

[54] Pelster B, Sanger AM, Siegele M, et al. Influence of swim training on cardiac activity, tissue capillarization, and mitochondrial density in muscle tissue of zebrafish larvae[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003,285 :R339-R347.

[55] Hasumura T, Meguro S. Exercise quantity-dependent muscle hypertrophy in adult zebrafish (Danio rerio)[J]. J Comp Physiol B. 2016,186(5) :603 –14.

[56] Gabriel JP, Ausborn J, Ampatzis K, et al. Principles governing recruitment of motoneurons during swimming in zebrafish[J]. Nat Neurosci. 2011,14(1) :93 –9.

[57] Palstra AP, Rovira M, Rizo-Roca D, et al. Swimming-induced exercise promotes hypertrophy and vascularization of fast skeletal muscle fibres and activation of myogenic and angiogenic transcriptional programs in adult zebrafish[J]. BMC Genomics, 2014,15 :1136.

[58] Palstra AP, Tudorache C, Rovira M, et al. Establishing zebrafish as a novel exercise model: swimming economy, swimming-enhanced growth and muscle growth marker gene expression[J]. PLoS One. 2010,5(12) :e14483.

[59] 中华人民共和国科学技术部. 关于发布《关于善待实验动物的指导性意见》的通知[EB/OL]. http://www.most.gov.cn/fggw/zfwj/zfwj2006/200609/t20060930_54389.htm, 2006 年 9 月 30 日.

[收稿日期]2018 –07 –27