研究简报

实验动物仁慈终点及安乐死的法规现状与思考*

史光华[1]　李麟辉[2]　吕龙宝[2]　张晓迪[2]　陈佳琦[2]

(1. 中国合格评定国家认可中心,北京　100062)(2. 中国科学院昆明动物研究所,昆明　650223)

摘要:仁慈终点及安乐死作为 3R 准则中“优化”原则的重要组成部分,国际上已形成了完善的法律法规体系,我国还需要在相关法规、标准方面进一步完善。本文通过介绍国外有关人道终点及安乐死的主要指南、法规,为我国有关工作的开展提供借鉴。

关键词:仁慈终点;安乐死;3R 准则

中图分类号:R-052　　**文献标识码**:B　　**文章编号**:1006-6179(2019)02-0072-04

DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2019.02.014

体现“替代、减少、优化”的 3R 准则是当今国际上开展动物试验普遍遵循的动物福利原则[1]。“替代原则”指使用其他方法而不用动物进行科学研究,或使用没有知觉的试验材料替代以往使用神志清醒、活的脊椎动物进行试验;“减少原则”指减少动物用量获取同样多的试验数据或使用一定数量的动物获得更多试验数据的方法;“优化原则”指通过改进或完善实验程序,减轻或减少给动物造成与实验目的无关的疼痛和不安[1-2]。目前,“优化”原则主要体现在应用仁慈终点并仁慈处死动物(即安乐死)[3]。因此,国际上将仁慈终点及安乐死作为一种优化策略,用来减轻动物在实验期间遭受的疼痛和痛苦[4]。

实际工作中如何正确实施仁慈终点及安乐死是实现“优化”原则的重要步骤。本文主要介绍国际上实验动物仁慈终点及仁慈处死动物的相关指南、法规实践现状,为业界同仁及我国相关法规、标准的完善提供参考。

1　国际及区域组织

1.1　经济合作与发展组织

经济合作与发展组织(Organization for economic co-operation and development, OECD)于 2000 年发布的《应用临床体征识别、评估安全性评价中动物实验仁慈终点的指南》(以下简称指南)适用于所有毒理学动物试验中使用的哺乳动物。指南详细叙述了识别动物疼痛和痛苦的方法、仁慈处死动物需要依据的毒性表现及仁慈处死动物的方法[5]。优化原则在该文件中得到了明确且充分的体现,在国际范围内具有至高的权威性[3]。

《指南》提出:仁慈处死动物需要根据动物正在承受疼痛和痛苦的程度来决定。观察者应熟悉动物正常和异常表现,要有能力来识别动物的毒性表现。对试验中的动物每天进行一次一般观察,至少一周一次进行详细检查,出现毒性表现后可增加观察次数。《指南》中对动物是否在承受疼痛和痛苦的观察指标及动物正在承受疼痛和痛苦的表现进行了详细说明。濒死和临近死亡的动物和正在遭受严重疼痛和痛苦的动物应进行安乐死。急性毒性试验中动物健康产生快速改变、重复染毒试验中动物毒性表现进行性加重时均应考虑是否对动物进行安乐死。

仁慈处死动物的方法即安乐死,是指处死动物时尽可能减少动物的疼痛和痛苦。《指南》主要介绍了物理学方法、注射法、吸入法、混合法等。物理学方法需要较高的技术熟练程度,鱼类和两栖类动

收稿日期:2018-09-12

* **基金项目**:“十二五”国家科技支撑计划(No.2011BAI15B03);国家质检总局科技计划项目(No.2011IK115)

作者简介:史光华(1967—),男,副研究员.研究方向:实验室认可、实验动物机构认可.E-mail: shigh@cnas.org.cn

李麟辉(1984—),男,工程师,从事实验动物科研管理工作.E-mail: lilinhui@mail.kiz.ac.cn

通信作者:吕龙宝(1974—),高级工程师, 研究方向:实验动物基础生物学和疾病模型.E-mail: lvlongbao@mail.kiz.ac.cn

物处死时一般选择物理方法,体质量小于 150 g 的啮齿类动物可采用颈椎脱臼法;犬、猫、猪、猴等大型动物处死时一般选择注射法;大鼠、小鼠和其他小型啮齿类动物一般选择二氧化碳吸入法。

1.2　欧盟

1.2.1　ETS 123:欧盟《用于实验及其他科学目的的脊椎动物保护欧洲公约》(European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes)第 5 款的补充说明(Appendix A- Guidelines for accomodation and care of animals),对动物的安乐死提出了要求:所有处死动物的人道方法均需要有一定专业技能的人员施行,而这些专业技能只能通过适当培训获得。处死动物所采用的方法宜遵循欧洲委员会关于实验动物施行安死术推荐意见中规定的原则(第 1 部分和第 2 部分)。深度昏迷的动物可采用放血法处死,但在未实施麻醉的情况下,不宜使用在失去知觉前造成肌肉麻痹的药物方法、产生箭毒样作用的药物方法,以及电流不通过大脑的电击法。动物处置只有在确认动物死亡后才可施行。

1.2.2　欧盟 2010/63/EU:欧盟 27 国于 2013 年 1 月 1 日起实施新的保护试验用动物指令,该法规承认目前仍需要使用动物进行试验的现状,并把仁慈终点提上了法律层面。新指令第 1 条就明确了 3R 原则,指出应确保优化的原则并不局限于指导科学实验,还应运用于动物的照料、护理、饮食和繁殖过程[6]。

指令禁止动物遭受非常严重的疼痛和痛苦,在条款 23 第 13 条中规定“尽可能避免以死亡作为试验终点,以更早期和仁慈的终点取代”,第 15 条规定“如果涉及到可能是长期的而不能缓解的剧烈疼痛、痛苦或不适,成员国应确保该项目不被执行”,并在附件八中列出了试验程序中动物痛苦严重程度分类。第 6 条规定了强制性人道处死动物的内容,并在附件四中列出了不同实验动物进行仁慈处死的具体指南[7]。

2　其他国家

2.1　美国

美国国家科学院发布的《实验动物饲养管理和使用指南(第八版)》对动物仁慈终点判定及安乐死的时机、方法选择、评价都做了详细介绍。明确指出在某些实验临近实验终点时,若动物即将遭受无法减轻的剧痛和不适、甚至是死亡时,可采用仁慈终点代替实验终点[8]。

仁慈终点的判定需要衡量模型、动物种类、动物健康状况、实验目的、机构政策和法规要求等多种要素。实验动物管理和使用人员应该熟悉动物的行为、生理、生化方面的健康特征,才可辨识不同动物对疼痛的临床症状,如悲鸣、消沉、行为异常、外貌动作异常、懒怠不动等。通常情况下认为引起人类疼痛的手术也会引起动物疼痛。

实验方案中应该包括执行安乐死的标准,比如身体或行为缺陷等级、肿瘤大小等。当实验结束,镇静剂、止痛剂及其他方法无法减轻实验动物疼痛忧虑时,才能进行安乐死。执行安乐死时药剂和方法的选择取决于动物种类和实验目的。一般来说,吸入性或非吸入性安乐死药剂优于物理安乐死(如颈椎脱臼法、斩首、穿透式击杆法)。评价安乐死方法是否妥当,应该考虑几方面:使动物在无痛苦、无焦虑或短暂痛苦的状态下失去意识或死亡的能力;可靠性;不可逆性;引导动物丧失意识的时间;种类和年龄限制;与研究目标一致性;工作人员的安全以及对他们情绪的影响。

2.2　加拿大

1998 年加拿大动物保护协会(CCAC)发布了《研究、教学和检测中选择实验动物仁慈终点指南》,为用于生物医学研究、教学及试验中动物疼痛及痛苦终点的选择进行规范,并指出动物使用的优化是一个渐进过程,需要不断寻找更为人道的动物实验终点将动物使用过程中其经历的痛苦最小化[9]。

指南主要对如何确定仁慈终点进行了详细介绍,并对啮齿类动物单克隆抗体制备、癌症研究、毒理学研究和毒性测试、疼痛研究、传染病研究、疫苗试验等研究中仁慈终点的确定给予指导意见。指南给出了选择合适仁慈终点的推荐程序:使用评分法对动物身体状况进行评估,所得分数意味着动物偏离正常状态的程度,可看作为是动物疼痛和痛苦的增加。

试验过程中的动物会随着不适、疼痛和痛苦的程度表现出异常,因此在实验前应熟知动物的行为特性。根据研究内容制定观察指标对动物状况进行评分可为仁慈终点的判定提供客观参考,以此来建立动物疼痛评估方法。评估动物身体状况主要有五

个方面,分别为体质量变化、外部体征表现、心率和呼吸频率等临床指标、非诱导行为的变化及外部刺激的行为反应。除这些行为和生理指标外,儿茶酚胺、皮质激素、催乳素、肿瘤坏死因子、白细胞介素等血液生化指标也可用来衡量动物的压力和痛苦。确定观测指标后,对部分重要指标还需要进行选择和优化。例如当某种特殊疾病或在有毒情况下动物状况发生恶化时,低温也可能成为动物情况恶化的重要指标:流感病毒感染小鼠体温的降低(低于32 ℃)预示着它们的死亡;细菌感染的小鼠体温低于 34 ℃的低温预示着死亡。在大鼠关节炎模型中,抓挠次数的增加是关节炎发展最显著的行为改变,表明其存在慢性疼痛。在一些医学试验中,当不明确动物对处理产生的效应时,使用少数动物进行预实验来确定动物表现,有助于确定观测指标及频率。

3 中国

动物福利的 3R 原则首次出现在 1997 年《关于“九五”期间实验动物发展的若干指导意见》中[10]。为适应国际上动物福利的发展趋势,2006 年科技部发布了《关于善待实验动物的指导性意见》,明确指出“善待实验动物”就是倡导 3R 原则。

国家标准(GB/T 27416—2014)《实验动物机构质量和能力的通用要求》第七章中,有 5 个条款和 6 个条款对安乐死术和人道终点的实施提出了要求。强化了实验动物人道终点和安乐死术的重要性,在组织机构设置、工作内容安排、工作程序运作、基本原则的把握等方面为实验动物机构的良好运作提供了制度上的保证。相对而言,该标准提出的要求还是概略性的、原则性的,内容还不够具体细化,对于评价的内容以及如何评价没有做出具体的规定和建议。对于实际工作中遇到的具体问题难以给出具体的指导,在很大程度上还需要依靠人为裁定,不利于管理实施。若要对具体的实验动物福利工作进行指导,这两部分内容需要进一步的细化和完善,以利于实际工作的开展和持续评估。

4 展望

西方发达国家在实验动物仁慈终点及安乐死的实施方面已经建立了完整的理论体系,与其相比,我国在法规标准体系建立方面还处于起步阶段,需要尽快补充和完善。

当前我国实验动物服务业正在快速融入全球经济发展的步伐中,动物福利相关法规、标准都应尽快完善,建立符合国际规范的动物福利审查、实施、评价制度。同国外相关人道处死动物的法律法规相比,现阶段我国在实验动物安乐死依据及方法相关内容的起草处于起步阶段。应借鉴其他国家的制定内容,细化相关条文并加强可操作性,为解决实际工作中的问题提供指导。

值得注意的是,实验动物福利相关法律是一把双刃剑,完备的法律法规可以增强我国实验动物产品在国际贸易中的竞争力,反之则会增加不必要的负担[11]。因此制订工作必须根据我国生物医学研究方面的国情因地制宜。完善的法规内容将有助于实验动物福利工作的开展和评估,对于加强我国实验动物的福利管理具有重要的意义;有助于提高认可结果的公信力,促进政府部门对认可结果的采信;加快实验动物机构认可制度认可结果的国家间互认,继而实现国际间互认的步伐;突破实验动物相关技术性国际贸易壁垒,加快实验动物相关科研和产业的国际化交流和发展。

参 考 文 献

[1] Russell W M S, Burch R L. The Principles of Humane Experimental Technique[M]. London: Methuen,1959.

[2] 瞿叶清,哈惠馨,郭玉琴,等.3R 原则在医学实验动物工作中的应用[J].实验动物科学,2010,**27**(6):84-85.

[3] 候粉霞,鱼涛,杨慧芳.“替代、减少、优化(3R)”原则在 OECD 毒性评价试验方法中的体现[J]. 毒理学杂志,2009,**23** (5):409-411.

[4] Bryan H, Timo N, Gemma P. The Cost Manual of Laboratory Animal Care and Use[M]. USA:CRC Press,2011:333-353.

[5] OECD -organization for Economic Co-operation and Development (2000). OECD Guidance Document on the recognition, Assessment and use of Clinical signs as Humane Endpoints for Experimental Animals used in Safety Evaluation.

[6] 刘 超,程树军,罗苑妮,等. 欧盟保护实验动物新指令 2010/63/EU 介绍及比较分析[J]. 中国比较医学杂志,2012, **22** (5):72-76.

[7] European Commission. Directive 2010 /63 /EU of the European Parliament and of the council of on the protection of animals used for scientific purpose[S].Official Journal of the European Union L 276 /33, 2010.

[8] Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition [M]. The national academies press. 2010.US,Washington,D.C.

[9] Canadian Council on Animal Care. Guidelines on choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. 1998.

[10] 王萧,蒋荣荣,董浩然,等. 动物福利/实验动物福利的意义及现状探讨[J].吉林中医药:2014, **34** (10):996-999.

[11] 王梦楠.国内外实验动物福利法律问题研究[D].青岛:中国海洋大学,2014.

The Present Situation and Thinking of the Regulation on Humane Endpoint and Euthanasia of Laboratory Animal

SHI Guanghua[1], LI Linhui[2], LÜ Longbao[2], ZHANG Xiaodi[2], CHEN Jiaqi[2]

(1.*China National Accreditation Service for Conformity Assessment*, *Beijing* 100062, *China*)

(2. *Kunming Institute of Zoology. CAS*, *Kunming* 650223, *China*)

Abstract: Laboratory animal welfare is currently followed by 3R principle. Humane endpoint and euthanasia are the important part of "refinement" of 3R principle, and has been formed a perfect system of laws and regulations in the international community. China need further improvement on the relevant laws, regulations, and standards. This paper introduces the main laws and regulations on humane endpoint and euthanasia, and hopes to provide reference for the development of related work in China.

Key words: humane endpoint; euthanasia; 3R principle

(上接第 71 页)

Making and Application of Laser Locator for Laboratory Animal Magnetic Resonance Imaging System

WANG Zhangjing, LEI Jianfeng, ZHAO Yuanyuan, XUE Bing

(*Capital Medical University Medical Center Laboratory Animal Imaging Room*, *Beijing* 100069, *China*)

Abstract: **Objective** To design and develop a simple rat and mouse laser locator to provide a safe, convenient, accurate and affordable experimental tool for medical NMR experiments. **Method** Selected plexiglass plates and laser locator combination assembled into small animal laser locator. **Result** Compared with other similar products, the mouse laser locator has the advantages of simple and safe manufacture, basically meeting the experimental requirements and low price. **Conclusion** The small animal laser locator plays an active role in the nuclear magnetic inspection of small animals, which greatly shortens the experiment time and improves the accuracy of the placement of experimental animals, providing a powerful guarantee for the next step of nuclear magnetic resonance scanning of experimental animals.

Key words: nuclear magnetic; rat; mouse; locator