

邓少嫦,杨锦淳,林丹荣,等. 动物实验的人道干预点 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 128-132.

Deng SC, Yang JC, Lin DR, et al. Humane intervention points of animal experiments [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 128-132. doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.04.018

动物实验的人道干预点

邓少嫦,杨锦淳,林丹荣,丛 锋,赵维波*

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 随着动物福利研究的深入,作为3R优化原则的重要组成部分,动物实验过程中的人道干预点日益受到国际关注,人道干预点的确定和干预措施的选择是保障动物福利的关键。人道干预点是指动物实验过程中动物出现应该被干预状态的时间点,人道终点属于人道干预点的一种特殊表现形式,安乐死是人道干预点的一种实施方式。目前为保护实验动物福利,我国已出台多项标准和规范,而针对人道干预点的确定原则和干预措施仍没有系统要求,也缺乏相关的研究报道。本文拟综合国内外指导性文件及文献报道,系统描述动物实验过程中的人道干预点,以期为实验动物从业人员提供科学参考,最大程度减轻实验过程中动物所承受的疼痛和痛苦。

【关键词】 实验动物;动物福利;人道干预点;干预措施

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 02-0128-05

Humane intervention points of animal experiments

DENG Shaochang, YANG Jinchun, LIN Danrong, CONG Feng, ZHAO Weibo*

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 With the in-depth study of animal welfare, as an important part of 3R optimization principle, research on humane intervention points in animal experiments has gradually attracted international attention. Choosing the right humane intervention points and interventions is the key to safeguard animal welfare. Humane intervention points refers to the time when animals should be intervened during animal experiments. Humane endpoint is a type of humane intervention points, and euthanasia is an implementation method of humane intervention points. At present, a number of standards and regulations on animal welfare have been issued in our country, but few on humane intervention points. This paper will review the guides and literature reports on humane intervention points of animal experiment, and provide helpful references on animal welfare for animal experiment researchers.

【Keywords】 laboratory animals; animal welfare; humane intervention points; interventions

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

19世纪末,受动物保护主义运动的影响,西方发达国家开始关注动物的伦理福利问题。随着社会文明程度的提高以及生物医药领域实验动物的广泛使用,动物实验过程中的福利问题已成为科学界关注的焦点。针对实验动物福利西方发达国家已经建立了相对完善的理论体系^[1],如1986年欧洲共同体出台了《用于实验及其他科学目的的脊椎动物保护欧洲公约》,1998年加拿大动物保护协会(Canadian Council on Animal Care, CCAC)发布了《研究、教学和检测中选择实验动物仁慈终点指

南》^[2],2000年经合组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)发布《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》^[3],截至2011年美国国家科学院(National Academy of Sciences, NAS)已颁布八版《实验动物饲养管理和使用指南》^[4]。为适应国际实验动物福利的发展趋势,1997年我国科技部发布了《关于“九五”期间实验动物发展的若干指导意见》^[5],首次在国家层面提出了实验动物的“3R”原则,即减少(Reduction)、替代(Replacement)和优化

【基金项目】 广东省平台基地及科技基础条件建设项目(2021B1212060002)。

【作者简介】 邓少嫦(1979—),女,副研究员,研究方向:实验动物与比较医学、实验动物科技管理。E-mail: dengshaochang@gdlami.com

【通信作者】 赵维波(1976—),男,研究员,研究方向:实验动物科技管理。E-mail: zhaoweibo@gdlami.com

(Refinement)。之后我国陆续制定出台了多项法律、标准和认证规范,以指导和规范实验动物的伦理福利。2006 年科技部发布了《关于善待实验动物的指导性意见》^[6],2014 年国家标准化管理委员会和国家市场监督管理总局颁布了《实验动物机构质量和能力的通用要求》^[7],2018 年国家认证认可监督管理委员会出台了行业标准《实验动物人道终点评审指南》^[8],2021 年国家标准化管理委员会和国家市场监督管理总局颁布了《实验动物安乐死指南》^[9],这些指导性文件的发布为保障实验动物福利提供了依据和技术指导。

动物实验过程中人道终点和安乐死方式的选择作为伦理福利最重要的组成部分,国内外指导性文件均已做出了详细的要求和技术指导。近年来国外开始关注实验过程中的人道干预点,如 CCAC 制定的《研究、教学和检测中选择实验动物仁慈终点指南》详细描述了动物实验人道干预点的判断原则和部分实施建议^[2]。人道终点属于人道干预点的一种特殊表现形式,安乐死是人道干预点的一种实施方式。动物实验人道干预点的选择作为 3R 优化原则的重要组成部分,与实验动物的福利息息相关,但是目前国内关于人道干预点的研究相对缺乏。本文将重点依据 CCAC 制定的《研究、教学和检测中选择实验动物仁慈终点指南》和相关文献报道,系统描述动物实验的人道干预点,目的是为实验动物从业人员在实际工作中提供科学的参考依据,最大程度地减轻实验动物在科学活动期间所遭受的疼痛和痛苦。

1 人道干预点及干预措施的定义及意义

人道干预点是指动物实验过程中针对动物出现的状况应施加干预措施的时间点,措施包括动物的支持性护理、创伤动物的止痛镇痛、疾病动物的治疗甚至安乐死等,人道干预的目的是尽可能降低动物在科学活动过程中所承受的疼痛和痛苦^[10]。

人道终点的设置是 3R 优化原则的重要体现,长期以来研究人员常将安乐死作为实验动物的人道终点,极少关注实验动物在安乐死之前所承受的疼痛和痛苦。在实际研究过程中,动物在达到人道终点之前已经承受了一定程度的非福利待遇,这些非福利待遇可能已经违反了 3R 原则。例如,在伦理方案的审查中一般要求当实验小鼠体重下降超过 20%且无法正常饮食时,需要实施安乐死。如果

该时间点早于科学终点,则需要考虑增加动物数量来达到科学研究的要求,且在达到人道终点之前动物的状态在持续恶化,这些明显违反了 3R 中减少和优化原则^[11]。如果在体重下降的过程中,对动物施加不影响科学研究目的的干预措施,不仅可以实现研究的科学目标,也可以减少动物的疼痛和痛苦,最大限度地实现动物福利。因此,人道干预点的确定及干预措施的实施有助于在满足动物福利的同时实现科学目标。

2 人道干预点及干预措施的实施主体、原则及程序

2.1 人道干预点及干预措施的实施主体

人道干预点的确定及干预措施的实施主体包括兽医及研究人员。美国国家科学院《实验动物饲养管理和使用指南》指出,兽医的主要职责是“监督动物实验期间和动物整个生命周期内的动物健康和临床护理”^[4]。科学数据的收集是研究人员关注的重点,而动物福利的保护应是兽医的职责。人道干预点及干预措施的实施需要研究人员和兽医共同确定,并找到双方均能接受的平衡点。当出现动物福利与研究目的相冲突时,应以动物福利保护为主,研究人员不应一味地追求科学目的,而忽视对动物福利的保护。人道干预点的确定及干预措施的实施需要在伦理方案中进行描述。当伦理方案被批准之后,在研究开始之前所有研究人员、兽医、动物设施负责人、动物饲养人员等均应进行相关培训和考核,确保一旦动物出现人道干预点状态,可以及时有效地对相关动物进行人道干预。

2.2 人道干预点评价及干预措施的实施原则

建立科学的评价标准是人道干预点确定及干预措施实施的关键,研究人员和兽医应共同制定客观的人道干预点评价标准。人道干预点的评价指标应该是客观且可测量的,如动物体重、体貌特征、生理活动、对外界刺激的反应、疼痛表现等。评价指标应尽可能地定量,如无法直接定量时,可转化为评分的方式进行间接定量。选择明确的可量化指标,可以最大程度减小不同观察人员对指标评价的主观性^[12]。CCAC 推荐使用评分表的方式对动物的福利状况进行记录,利用评分表可以直观清晰地描述动物非福利状态及其等级,跟踪记录动物福利的变化情况,最大程度保障不同观察者对干预点判断的一致性^[2]。

人道干预措施的实施应尽可能地减少对科学

研究目的的干扰。选择适当的人道干预措施可以避免因动物状态变化引起的非预期的并发症和病理改变,如血压升高导致的心血管病理变化,动物腹泻引起的胃肠道疾病,动物行为异常导致的饮食和体重的异常改变等,对这些非预期状况的人道干预可以提高研究的质量和实验结果的可重复性。

2.3 人道干预点及干预措施的实施程序

人道干预点的确定和干预措施的实施需要遵循一定的程序,按照科学研究时间段不同可划分为科学活动开始之前、科学活动开展期间和科学活动结束后。

2.3.1 科学活动开始之前应制定人道干预点及干预措施方案

科学活动开始之前应选择合适的人道干预点和干预措施,并制定可靠的动物观察程序,这些均应在伦理方案中进行描述并得到伦理委员会的批准。人道干预点及干预措施的确定需要参考国内外规范、文献报道和兽医建议等,当没有相关的理论或文献支持如何确定人道干预点时,必须进行预实验,预实验结果须在正式试验开展之前提交给伦理委员会。方案制定的原则是首先考虑对科学目标影响最小的干预措施,而且应确保干预措施本身对动物福利影响最小化,此外必须寻求研究人员和兽医共同接受的干预措施^[13]。科学研究过程往往存在一定的不确定性,为了切实保障动物福利,在研究过程中可能需要调整既定的人道干预点和干预措施,这些修改需要在伦理方案中进行修订和备案。

2.3.2 科学研究开展期间人道干预点及人道干预措施的实施

在科学活动开展期间,应密切关注动物状态,一旦动物出现人道干预点,则必须按照伦理方案记载的方式对动物进行干预。当动物出现非预期状况时,可适当调整方案的人道干预点或人道干预措施。科学活动期间,动物的一般状态变化及所有的干预措施均需有相关记录,记录中应注明相关的人员,以方便研究结束之后开展回顾性分析。此外,在研究过程中相关评价人员需定期进行适当的沟通,以确保人道干预点评价方法和干预措施的一致性。人道干预措施包括但不限于以下方式:对于手术后的动物应给予止痛治疗以缓解动物的疼痛和焦虑,对于实验中感染的动物可进行抗生素的治疗,对于脱水或饮食困难的动物可适当提供水分和

营养支持,出现严重影响动物福利的情况可以将动物剔除出研究或采取安乐死措施。对于特殊的研究,可制定个性化的人道干预措施。

(1) 实验动物手术后的人道干预

心血管疾病、骨关节疾病、呼吸系统疾病的基础研究常涉及模型构建及受试物的干预后评价,这些研究往往需要对动物进行手术。手术操作带来的疼痛和痛苦一直是动物福利关注的重点,因此手术前中后的人道干预显得尤为重要。术前,手术人员需要熟悉动物习性、解剖结构和健康状况,选择适当的麻醉剂和麻醉方式,遵循“宜浅勿深”的原则。此外,为防止麻醉过程中出现动物呕吐,食物进入气管导致窒息,应在术前进行适当禁食和禁水。针对大动物,应在术前进行相应的检查,如常规检查、影像检查、血液学检查等,以充分暴露动物潜在的心肺功能、肝肾功能及血液学疾病,由此才能根据个体情况制定合适的麻醉和手术方式。术中,要严格控制污染源,并遵循微创原则以最小的创伤进行手术和治疗。一般麻醉动物术中会出现体温下降,需要注意术中保暖,并密切监控动物体温、呼吸、心电、血氧等指标,出现异常马上予以救治。针对全身麻醉的动物应尽快苏醒,过多拖延可能会导致并发症的发生。术后,应根据手术情况适当给予一定的止痛治疗,术中出血较多或术后较虚弱的动物可以适当补液,恢复期的动物可以适当饲喂高蛋白高能量的饲料以促进其恢复,为预防和控制术后感染可根据需要对创面适当使用抗生素。

(2) 实验动物脱水后的人道干预

脱水是由于动物水分摄入不足或丢失过多导致的体液减少,猪是较容易出现脱水的实验动物。猪机体脂肪含量高而水分含量少,随着体型的增长对水分的需求也在增加。猪体内水分的摄入主要来源于饮食,当动物出现疾病时,必然会引起其食欲下降,摄入水分减少。此外,相比于其他实验动物,猪更易出现胃肠道疾病,导致腹泻脱水。猪的脱水症状一般表现为精神状态差,嘴巴干燥,尿量减少,粪便干燥,排便困难,体重下降等。当失水量达到体重 4% 左右为轻度脱水,失水量达到体重 6% 左右为中度脱水,失水量达到体重 9% 左右为重度脱水,当失水量达到 16% 以上猪将处于濒死状态。实验猪长期脱水会导致明显的生理和病理变化,如胞内酶活性下降,引起代谢障碍,血液循环衰竭和血液浓缩,导致机体代谢物长期留存在体内,引起

一系列毒性反应。如果是轻度脱水,可采用经口补液的方法,同时在饲料或饮水中补充适量的氯化钠和葡萄糖等。腹腔内补液的方式可以让脱水猪快速获得补液,但是也可能对动物脏器造成损伤,引起腹膜炎等。如果出现严重的脱水症状,可采用静脉补液的方式,但需控制好补液量和输注速度。补液之后观察动物精神状态、口腔潮湿程度、排尿次数、排便情况等,以判断干预效果^[14]。

(3) 小鼠肿瘤模型的人道干预

肿瘤研究一直是生命科学研究的热门方向,每年有大量的实验小鼠被用于肿瘤发生发展机制治疗药物的筛选研究。在科学终点到来之前,作为研究的一部分这些动物的肿瘤不可避免地影响了动物福利。因此有必要在此过程中实施人道干预,以尽可能保护动物福利。小鼠移植瘤模型可以通过肿瘤的体积和重量来确定人道干预点^[15-16],肿瘤体积的计算方法为(长×宽²)/2,人道干预点应选择在 1.5 cm³ 时^[17]。肿瘤重量计算方式为约 1 g/cm³,当肿瘤的重量达到体重的 10% 时,可作为人道干预点^[18]。当人道干预点出现时,应增加动物观察和肿瘤测量频次,如发现动物出现攀爬困难,不能够取得笼盒一定高度的食物和水瓶时,应将饲料放置在笼盒底部,或者给予果冻类饮食。当肿瘤出现大溃疡或者渗出性溃疡时,应给予支持性护理;当破溃伤口周围出现感染时可给予适当抗生素治疗;当动物因肿瘤破溃出现疼痛行为时应给予镇痛治疗。如果经以上干预症状仍未得到改善,可选择安乐死^[19]。当肿瘤小鼠体重下降 20% 时,应将动物从研究中移除,实施安乐死。

(4) 长寿小鼠模型的人道干预

由于小鼠的寿命较短,常被用来进行相关寿命的影响研究。老年动物的行为、外观或健康状况可以作为人道干预点的评价指标,如老年小鼠体重改变、筑巢能力的下降,饮食和饮水困难,在种群中更易受到伤害等,出现这些状况时,预示着人道干预点的到来^[2]。2020 年英国科学家 Wilkinson 等^[20]对科学研究中使用的老年小鼠的护理、饲养和管理进行综述,他们指出当小鼠体重短期内下降 5%~10% 时,应给予动物软化的饲料,并密切关注动物的一般状态。当体重下降 10%~20% 时,应寻找导致体重下降的原因并予以纠正,同时提供软化饲料和方便的饮水。当体重下降超过 20% 且无法正常饮食,需要对动物进行安乐死。而当老年小鼠体重短期内增加 5%~10% 时需要检查是否有腹水或肿瘤,

如果不是上述情况则可以适当增加动物运动并限制高热量饮食。当动物出现明显脱毛时,需检查其皮肤表面是否正常,并提供较软的筑巢材料,若是病理性脱毛则可采用一定的治疗手段。当小鼠罹患溃疡性皮炎且侵蚀面积较大时,应给予适当的维生素膳食或抗生素治疗。此外 Flurkey 等^[21]研究发现如果小鼠体重和体温乘积的平均值降低 10%,则应该对小鼠实施安乐死,根据这种计算方法可以准确预测动物死亡偏差在两周以内。

(5) 实验鱼的人道干预

目前实验鱼已广泛应用于生命科学领域,但针对鱼的福利保护研究仍落后于其他实验动物。压力是影响鱼类健康和福利的一个重要因素。不同的压力会影响鱼的血压和膀胱膨胀度,也会改变鱼骨骼和肌肉组织的负荷^[22]。此外,鱼的眼睛无任何保护,可能因碰撞、光刺激而受到伤害^[23]。鱼的人道干预点包括食欲不振、游泳行为的改变(缺乏统一的移动方向、跳跃、在水面喘息等)、对刺激的反应迟缓、对光刺激敏感性增加或减弱、攻击性增强、呼吸频率改变、鳞片脱落、皮肤溃疡、眼睛混浊等,针对个体出现的人道干预点,应对该个体进行分离、治疗或安乐死,对于群体出现人道干预点症状,应及时更换水质并进行相应的治疗^[24]。

2.3.3 人道干预点及干预措施的回溯性分析

科学活动结束后,应对人道干预点设置的合理性和干预措施的有效性进行回溯性分析。

(1) 人道干预点和措施有效性评价

对人道干预点和干预措施选择有效性评价应从多个方面进行,如人道干预点选择的科学性、干预措施实施的一致性、干预措施本身对动物福利的影响评价等。对于人道干预点,需要评估干预点的选择是否在动物正好需要时,即评估动物的监测频率选择是否恰当。对于人道干预措施,需评估这些措施是否确实保护了动物福利,以及措施的实施对科学研究的影响程度。此外,需要评估相关记录的质量和完整性,进一步评价所有参与人员在人道干预点选择和干预措施实施上的一致性。

(2) 对将来研究的指导意义

人道干预点和干预措施的评估信息应及时反馈给研究人员、兽医及动物护理委员会,以期对将来类似研究伦理方案的制定、评估和实施提供相应指导。通过这些信息可以不断精确人道干预点的选择时机,进一步完善人道干预措施的选择和实施。通过回溯性分析,总结科学活动中人道干预点

选择和干预措施实施的得失,并对所有参与人员进行宣贯,为之后类似研究提供科学参考。为了在科学界形成一种对实验动物人文关怀的文化,相关人员和机构可以通过文献发表、学术会议、多媒体等方式,分享人道终点选择和人道干预措施实施的成功及失败经验。

3 结语

实验动物的伦理福利将随着人类文明程度的不断提高而持续受到关注。科学技术的迅猛发展,国家科技部门的重视及科研工作者意识的提升,将为我国实验动物福利事业的发展提供强大助力。随着我国多项法规和标准的出台,实验动物福利保护和 3R 原则已在生物医药领域达成共识,人道终点和安乐死已得到贯彻执行,但是目前的研究发现人道终点并非完全符合动物福利和 3R 原则。

CCAC 出台的《研究、教学和检测中选择实验动物仁慈终点指南》提出了人道干预点的概念,并详细描述了动物实验人道干预点的判断原则和一些干预措施的建议。人道干预点的提出相比于人道终点,更加符合动物福利和 3R 原则。动物实验人道干预点的确定及干预措施的选择是科学目的和动物福利权衡的结果,科学合理的人道干预点和干预措施将有助于在实现科学目的的同时最大程度地减轻实验动物所承受的疼痛和痛苦。随着科技的进步,将会有更多科学和人道的干预措施出现。

参考文献:

- [1] 陶凌云,周洁,倪丽菊,等. 典型发达国家实验动物人道终点的选择 [J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(6): 451-454.
- [2] Olfert E, Bhasin J, Latt R, et al. CCAC Guidelines on: choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing [M]. Ottawa Ontario: Canadian Council on Animal Care; 1998.
- [3] Zeiger E. Summary of the OECD's new guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation [M]. France: OECD; 2003.
- [4] Janet CG. Guide for the care and use of laboratory animals: eighth edition [M]. Washington, D. C.: National Academies Press; 2011.
- [5] 刘晓宇,卢选成,贺争鸣. 实验动物仁慈终点技术研究的发展与应用 [J]. 实验动物科学, 2016, 33(2): 54-60.
- [6] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [EB/OL]. [2006-09-30]. https://www.most.gov.cn/xxgk/xinxifenlei/fdzdgnr/fgz/gfxwj/gfxwj2010before/201712/t20171222_137025.html
- [7] 国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 实验动物机构质量和能力的通用要求: GB/T 27416-2014 [S]. 2014.
- [8] 国家认证认可监督管理委员会. 实验动物人道终点评审指南: RB/T 173-2018 [S]. 2018.
- [9] 国家市场监督管理总局,国家标准化管理委员会. 实验动物安乐死指南: GB/T 40362-2021 [S]. 2021.
- [10] Brunt MW. Clarity for humane intervention points [J]. Lab Anim (NY), 2014, 43(11): 392.
- [11] Williams WO, Baneux P. Humane Intervention Points: Refining endpoint terminology to incorporate non-euthanasia intervention options to improve animal welfare and preserve experimental outcomes [J]. Lab Anim, 2022, 56(5): 482-489.
- [12] Wolfe AM, Rahman M, McFadden DG, et al. Refinement and successful implementation of a scoring system for myxomatosis in a susceptible rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) model [J]. Comp Med, 2018, 68(4): 280-285.
- [13] Peterson NC, Nunamaker EA, Turner PV. To treat or not to treat: the effects of pain on experimental parameters [J]. Comp Med, 2017, 67(6): 469-482.
- [14] 王汉祥. 猪脱水症状的综合防治措施探讨 [J]. 兽医导刊, 2021, 381(23): 126-127.
- [15] Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1989, 24(3): 148-154.
- [16] Wallace J. Humane endpoints and cancer research [J]. ILAR J, 2000, 41(2): 87-93.
- [17] Faustino-Rocha A, Oliveira PA, Pinho-Oliveira J, et al. Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements [J]. Lab Anim (NY), 2013, 42(6): 217-224.
- [18] Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research [J]. Br J Cancer, 2010, 102(11): 1555-1577.
- [19] Paster EV, Villines KA, Hickman DL. Endpoints for mouse abdominal tumor models: refinement of current criteria [J]. Comp Med, 2009, 59(3): 234-241.
- [20] Wilkinson MJ, Selman C, McLaughlin L, et al. Progressing the care, husbandry and management of ageing mice used in scientific studies [J]. Lab Anim, 2020, 54(3): 225-238.
- [21] Flurkey K, Mcurrer J, Harrison D. Mouse models in aging research [M]. Amsterdam: Elsevier; 2007.
- [22] Boglione C, Gisbert E, Gavaia P, et al. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors [J]. Rev Aquacult, 2013, 5: S121-S167.
- [23] Brydges NM, Boulcott P, Ellis T, et al. Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish [J]. Appl Animal Behav Sci, 2009, 116(2-4): 295-301.
- [24] Sloman KA, Bouyoucos IA, Brooks EJ, et al. Ethical considerations in fish research [J]. J Fish Biol, 2019, 94(4): 556-577.

[收稿日期] 2022-07-05