

—— 安乐死和仁慈终点

北京大学第三医院 王港 2022.4.20

实验动物在生命科学及生物医药等领域的研发和实验的重要基础性支撑作用

• 实验动物自身福利和生命尊严的保障

如何在保证动物实验结果科学可靠的前提下,来科学、规范的保障和不断提高实验动物的福利



1988年《实验动物管理条例》颁布实施,我国实验动物行业的规范化和科技水平获得了快速的提升

在提高实验动物质量方面,对实验动物的饮食及饲养环境等提出了具体要求

- 二十九条: "从事实验动物工作的人员对实验动物必须爱护,不得戏弄和虐待"
- 2006年《关于善待实验动物的指导性意见》,细化了善待实验动物的规定,对提高和改善动物福利水平起到了一定的作用

在饲养管理和使用实验动物过程中,要采取有效措施,使实验动物**免遭不必要的伤害**、饥渴、不适、惊恐、折磨、疾病和疼痛,保证动物能够实现自然行为,受到良好的管理与照料,**为其提供清洁、舒适的生活环境**,提供充足的、保证健康的食物、饮水,避免或减轻疼痛和痛苦等。



 2013年,中国实验动物学会实验动物福利伦理专业委员会被 民政部和中国科协批准正式成立,挂靠在国家卫生计生委科 研所

"首届中国实验动物福利伦理高峰论坛"

- 2014年,北京举办"中英首届实验动物福利伦理国际论坛"
- 2018年《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 358992-2018),我国首个有关实验动物福利伦理审查的国家标准



概念

按照实验动物福利伦理的原则和标准,对使用实验动物的 **必要性、合理性和规范性**进行的专门检查和审定

要点:对动物伤害的标准化审查

实验动物福利

人类保障实验动物健康和快乐生存权利的理念及其提供的相应外部条件的总和。 要点:强调保护实验动物的理念和其具体行动的统一。

实验动物伦理

人类对待实验动物和开展动物实验所应遵循的社会道德标准和原则理念。 要点: 强调个人职业道德和社会公德的统一。



审查机构

北京大学 第三临床医学院 第 三 医 院

关于调整北京大学第三临床医学院实验动物 伦理委员的通知

报:宋纯理 发:科研处、教育处、总务处、动物实验室、中心实验室、

经费代码:			
实验内容概述: (可增页附后)			
項目负责人;	. # 100		取 (称:
动物实验岗位证书编号;		ж	承电话 :
项目执行人1:	.40 100		却 代46k:
动物实验岗位证书编号:		ÆХ	寒电话:
项目执行人2:	.# 100		取: 4水:
动物实验岗位证书编号:		ÆX	寒电话:
项目执行人3:	100		职称:
动物实验岗位证书编号:		ÆX	寒电话:
项目执行人4:	.# 100		取: 4%:
动物实验岗位证书编号:		ÆX	承电话:





实验动物伦理委员会 实验动物福利伦理委员会 实验动物管理和使用委员会(IACUC)

审查内容

- 人员资质
- **设施条**件: 动物设施、设备、设备使用、生活空间、环境丰富 度等
- 实验动物医师: 资质、职责
- 动物来源:来源清楚、合法
- 技术规程: 饲养、设施管理、实验操作、环境控制、项目实施
- 动物饲养:饮食、饮水、特殊照料
- 动物使用: 3R原则、科学保定、麻醉、仁慈终点和安乐死
- 职业健康与安全:人员、动物、公共卫生及技术保障
- 动物运输:运输方案、人员、运输条件



审查内容

伦理审查重点是为了发现项目中存在的所有潜在的伦理问题,项目设计缺陷引发的动物不必要伤害,弃用成熟的动物替代技术而引发的不必要伤害,不科学的过多或过度地使用实验动物造成的不必要伤害,人员和环境安全存在的潜在的风险。

- 人员资质
- 项目实施的目的、意义
- 拟使用动物的种类、数量、项目设计方案(3R原则)
- 麻醉、镇痛、特殊护理和安乐死、仁慈终点



安乐死

- 安乐死是实验动物福利的核心内容之一
- 2006年科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》指出:处死实验动物不使用安乐死的单位,将吊销单位实验动物生产许可证或实验动物使用许可证
- 美国兽医医学会(AVMA):《Guidelines for the Euthanasia of Animals》(2020版动物安乐死指南)
- 加拿大动物保护协会(CCAC):《CCAC guidelines on euthanasia of animals used in science》
- 欧盟委员会:《Recommendations for euthanasia of experimental animals》





安乐死 (enthanasia)

• 安乐死 (euthanasia)

eu 好的,美好的 thanatos 死亡

常用于描述采用一种减轻或消除疼痛和痛苦的方法来结束动物的生命

以科学人道的理念和方式,使动物生理和心理痛 苦最小化而采取的动物意识迅速丧失的处死过程



安乐死

• 实施条件

在达到以下条件时, 可实施安乐死

- a) 得到实验结果或动物实验结束
- b) 经实验动物医师评估判定,实验动物痛苦程度超过预期或预设的**仁慈终点**
 - c)动物实验失败或无法完成
 - d) 其他不适合继续繁殖或饲养的原因



安乐死 (enthanasia)

• 基本原则

尊重生命 快速少痛

守法合规 方法正确

人员培训 场所适合

死亡确认

• 吸入性气体

常见吸入性药物包括二氧化碳、氮气、一氧化碳、乙醚、 氟烷、甲氧氟烷、异氟烷、安氟醚等。

• 大部分吸入性药物对人体有害,应在通风良好场所实施。

• 所有通过吸入气体对动物实施安乐死的方法都有影响动物福利的可能,因为此类方法通常不能使动物立即失去意识。



• 吸入性气体

- 动物从接触气体到丧失意识的时间长短取决于气体置换率、容器的容积以及气体浓度。
- 用于安乐死的笼盒/空间须能使动物保持舒适状态,即不过分拥挤且没有异味。
- 新生动物、爬行动物、两栖动物、兔和禽类通常不适合用吸入气体的方式安乐死。 (兔从笼具中抓出之前,可先用镇定剂,这样做可以减少其屏住呼吸的行为)



CO₂

- 是啮齿类动物最常用的吸入性药物。吸入40%二氧化碳时很快达到麻醉效果,而长时间持续吸入可导致动物死亡
- 新生的啮齿类动物,对缺氧耐受性高,必须确保动物足够长的暴露时间,直到动物对疼痛刺激再无反应或者使用辅助性方法,例如脱颈椎法或断头术来确保动物死亡
- 合理的CO₂置换率(每分钟30%~70%容器体积)
- 在两次安乐死操作之间,应将容器中残余的二氧化碳体积分数降至最低(尽量排空),避免将动物放进一个预充了纯二氧化碳的容器中。

CO₂

- 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;
- 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。
- 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)。



CO₂(啮齿类)

- C.2.1 放入动物前,不可先灌注 CO2 到安乐死箱内。
- C.2.2 放入动物,以每分钟替换安乐死箱容积 30%~70% 的速度灌注 CO₂ 于箱内,确定动物不动、不呼吸、瞳孔放大。关闭 CO₂,再观察 2 min~3 min(豚鼠 5 min),确定动物死亡。
- C.2.3 动物尸体以不透明感染性物质专用塑料袋包装、储藏至冷冻柜后依法焚烧或委托有资质的单位 处理。

小鼠年龄	CO ₂ 暴露时间 min	备注
0 日龄~6 日龄	60	需配合断颈法合并使用
7 日龄~14 日龄	20	需配合断颈法合并使用
15 日龄~20 日龄	10	
≥21 日龄	5	

吸入麻醉剂(异氟醚、七氟醚、氟烷等)

- 可以作为二氧化碳的替代方案
- 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
- 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。
- 挥发性麻醉剂是环境污染物,与二氧化碳相比毒性更大。



• 注射药物

- 常用注射药物包括巴比妥类药物、氯化钾等
- 常用注射方式包括:静脉注射、腹腔注射、心脏注射等, 优先选择静脉注射。
- 腹腔注射需使用较高剂量的药物,会使动物死亡时间延长及死前挣扎。
- 心脏注射只适用于呈现垂死、休克或深度麻醉中的动物。



巴比妥类药物

- 静脉注射巴比妥酸盐和巴比妥酸衍生物是实验动物安乐死的首选方法
- 绝大多数种类的动物都可以使用此药物注射实施安乐死。
- 大剂量的安乐死药物必须通过心内注射,或静脉给予,不可采用肌肉内注射、皮下注射等其他方式给予,以避免药物引起的疼痛反应。腹腔注射也会引起疼痛。
- 剂量没有掌控好,没有进行死亡的验证,有潜在复苏的可能。需要采用辅助的方法确认动物是否死亡;需要相关培训。
- 常用的戊巴比妥钠,目前管控难以获得



氯化钾

- 全身麻醉/无意识状态下,静脉/心脏注射氯化钾 (1~2mmol/kg)
- 不能用于有意识的脊椎动物安乐死
- 一经注射很快引体肌肉组织阵挛



乙醇

- 适用范围:成年小鼠
- 对于用作抗体生产的动物,乙醇类注射是首选的安乐死方法。

静脉注射乙醇类化合物能够改变细胞膜流动性,并改变神经细胞离子通路以及降低神经细胞活性。

腹腔注射后,能够使动物的神经和呼吸系统被抑制达到麻醉和安乐死的目的。 给成年小鼠腹腔注射0.5 mL 体积分数为70%~100%的乙醇溶液,小鼠在2~4 min 内出现肌肉逐渐松弛、翻正反射丧失、呼吸和心跳停止等临床症状,随后死亡

• 乙醇不能用于小于35 日龄的小鼠安乐死,也不能用于比小鼠体型更大的动物(如大鼠)



三溴乙醇

- 不能单独用于安乐死。
- 多数IACUC允许作为啮齿类麻醉药物,但有争议(腹膜炎和死亡)

• 乌拉坦

- 不能单独用于安乐死。
- 在实施物理性安乐死操作前,可先使用乌拉坦麻醉动物。



• 物理方式

- 可采用颈椎脱臼、断颈、电击、头部击碎、放血、弹簧枪等物理方式
- 可用于解剖性状适合使用的或其他安乐死方法影响实验结果的动物
- 操作人员需接收完整的技术训练,并以尸体多次练习后方可正式实施

- 颈椎脱臼可用于**体重低于200g的啮齿类动物、禽类及兔**。除非有特殊需求,实施颈椎脱臼前可给予动物镇定剂,以减少动物的应激
- 因实验需求无法使用化学/CO₂时,可使用断颈法。因实验所需采集动物 全身血液或放血,需麻醉待动物失去知觉后实施。



颈椎脱臼

- 适用范围:被处死的动物体型较小,例如小于3 kg 的禽类、体质量小于200 g 的啮齿类和小于1 kg 的兔,且操作人员要足够熟练。
- 采用直接脱颈椎法安乐死动物,动物的脑电活动还能够维持约13~30 s;
- 亦有研究认为,在动物脱颈椎后,其脑电图不足以证明动物仍然能感受到疼痛,即动物在脱颈椎后会很快失去意识。
- 如实验人员技术生疏或力量不足,需在动物麻醉后进行。
- 对于体质量大于1 kg 的兔,可借助能够固定兔头部的特殊 装置,操作人员通过拉拽兔的后肢也可完成兔颈椎脱臼安 乐死(使用前先行练习)



断颈/头

- 适用范围: 因科学研究需要,使用麻醉气体或注射用麻醉药品会影响组织、血液、尿液等样本的分析结果时。
- 断头可以使动物在5~30 s即脑死亡。
- 可利用特制的断头装置,实施动物断头操作。
- 如操作正确,大鼠和小鼠不会因为断头或处于其他大鼠或小鼠被断头的现场而产生下丘脑-垂体-肾上腺轴的应激反应。
- 用于动物安乐死的闸刀,必须保持清洁,且刀片足够锋利,定期维护保养。
- 在正式使用断头装置前,先使用麻醉的动物或用动物尸体加以练习,确保能熟练操作。



常用安乐死方法

安乐死方法	>14 日龄且 体重<200 g 啮齿类动物	体重<200 g 200 g~1 000 g		犬	猫	猴	牛,马, 猪
静脉注射巴比妥类药物注射液	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
腹腔注射巴比妥类药物注射液	Y	Y	Y	X	Y	Х	Y
二氧化碳(CO2)	Y	Y	Y	X	X	х	X
先麻醉,后采血(放血)致死	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
先麻醉,后静脉注射氯化钾 (1 meq/kg~2 meq/kg)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
先麻醉,后断颈	Y	Y	N	X	X	Х	Х
先麻醉,后颈椎脱臼	Y	Y	X	X	X	х	X
动物清醒中直接断颈(头)	N	N	N	X	Х	х	х
动物清醒中直接颈椎脱臼	N	Х	Х	X	Х	х	Х
电昏后放血致死	X	X	X	X	X	Х	Y
at an about the end of						. h. 1 h	

注:Y---建议使用;X---不得使用;N---不推荐,除非实验需要(操作人员操作熟练;通过审核)。

啮齿类动物安乐死方法

1日龄~ 6日龄	7 日龄~ 14 日龄		>14 日龄且 体重>200 g
N	Y	Y	Y
N	Y	Y	Y
N	Y	Y	Y
N	N	Y	Y
Y	Y	Y	Y
Y	N	N	N
Y	X	X	X
N	N	Y	Y
N	N	Y	Y
N	N	Y	X
	6 日龄 N N N N Y Y Y N N	6 日龄 14 日龄 N Y N Y N Y N N N N N N N N N N N N N	6日龄 14日龄 体重<200 g N Y Y N Y Y N Y Y N N Y Y Y Y Y N N N N Y N N Y N N Y N N Y N N Y

注:Y---推荐方法;N----不推荐方法,但经 IACUC 同意后可使用的方法;X----不推荐使用;IP----腹腔注射;IV----静脉注射。

仁慈终点(Humane Endpoints)

- 最早见于1998年荷兰召开的"生物医学研究中实验动物仁慈终点大会"
- 早期,定义为能反映实验动物遭受严重疼痛、痛苦或濒临死亡最早的指标。核心为"在所提及指标出现时提前对动物实施安乐死"。
- 目前, 仁慈终点被看作"**优化原则**"的一部分, 其定义 也发展为一种优化策略, 其目的是尽可能减轻实验期间动 物遭受的疼痛和痛苦。



仁慈终点

考虑人道对待动物的要求和实验要求,合理终 止动物用于实验的时机

仁慈终点的确定是科学目的与动物福利相权衡的结果



如何确定仁慈终点

1) 权衡性原则

根据实验科学价值与将对动物造成伤害进行权衡

2) 伤害最小化原则

在实验前,尽可能预判将对动物造成伤害/痛苦的程度,最大程度避免以动物的濒死、死亡以及严重的疼痛和痛苦作为仁慈终点,对动物伤害最小化

3)持续优化原则

在实现动物科学目的前提下,不断寻求更为人道的动物实验终点,使动物在使用过程中所经历的痛苦不断趋于缩小



仁慈终点评价指标

1) 多数动物实验的通用性指标(状态、行为)

体重变化: 快速下降、成长期不增重、恶病质及肌肉消耗,不摄食/摄食减少

外部体征变化:全身脱毛、无法治疗的长期腹泻、持续性倦怠伴蜷缩、弓背、目光呆滞、精神萎靡、嗜睡或持续趟卧等

生理指标:可测量的心率、呼吸频率、体温、生化指标等,腹泻、呼吸困难、黄疸、 出血等症状

异常行为:活动下降、刻板、离群、烦躁等

2) 特定研究的特定性指标

肿瘤研究、老化研究、感染性研究、基因修饰模型相关研究等



仁慈终点计划

可独立存在, 也可作为实验方案的一部分

计划包括: 科学目的、主要评价指标、指标时间进程、观察频率、终止实验的时机。

根据实验要求和动物状态, 明确仁慈终点的判定准则, 符合现行公认原则 常规实验, 依据既往结果、权威著作、期刊参考文献等选择仁慈终点

新开展的实验研究,对动物可能遭受的疼痛和痛苦缺乏了解时,开展预实验,以 了解可能的发病情况、病变进程,有助于初步确立仁慈终点。

达到仁慈终点的动物,如无法以药物或其他方式缓解痛苦/疼痛,规定施行安乐 死的时机

实验过程中和结束后再评估(合理性、科学性)



适用于多种动物的体貌分级

分级	表述	表现
1级	痩弱	骨骼结构极为突出,很少或没有肉/肌肉覆盖,脊椎分段清晰
2 级	偏瘦	脊椎分段明显,背部髋骨易于触诊
3 级	适中	脊椎和髋骨不突出,稍微施压即可触诊
4 级	偏胖	脊柱呈连续柱状,用力施压才可触诊椎骨
5 级	肥胖	轮廓光滑笨重,通过肉和皮下脂肪触诊不到骨架



疼痛/痛苦等级量化表(状态、行为)

评分		变量			
体质量变化	0	正常; 不确定;体重降低<5%;			
	2 3	体质量降低 10%~15%;排便的量和粪便性状有变化; 体质量降低>20%;不摄食、饮水			
	0	正常(被毛光滑,眼睛清亮);			
体态	1 2	缺少梳理; 被毛凌乱,眼鼻出现分泌物;			
	3	被毛极度凌乱,体态异常(如弓背),目光呆滞,瞳孔放大			
可潤量临床指标	1	正常(各指标均处于生理标准内); 徽小变化,有统计学意义 ;			
A Deal war alles No. 3El No.	2	体温变化1℃~2℃,心率和呼吸频率加快达到 30%, 体温变化>2℃,心率和呼吸频率加快达到 50%以上,或明显下降			
	0	正常;			
行为	1 2	细微变化; 异常行为,活动性下降,警觉性下降,不活跃,离群;			
	3	无刺激时发声,自残,焦躁不安或长时间不动			
	0 1	正常(正常的刺激后反应行为); 轻微抑郁或反应过度;			
对外界刺激的反应	2	异常反应,行为适度改变; 对刺激反应强烈,或肌肉反应微弱,处于昏迷前期状态			

非人灵长类仁慈终点推荐指标

- a) 未麻醉或镇静状态下,动物无法站立或极度勉强才可站立长达 24 h;
- b) 高温或低温超过 24 h 且经治疗无改善;
- c) 体重降低 15%~20%,或动物出现恶病质或消耗性症候;
- d) 动物完全丧失食欲达 5 d 或饮欲达 3 d,或食欲、饮欲不佳(低于正常量的 50%)分别达 7 d 和 5 d 且经治疗无改善时;
- e) 明显可知动物感染,或因动物体温升高、白细胞数目增加而诊断为感染,在抗生素治疗无效并 伴随动物全身性不适症状出现时;
- f) 出现器官功能丧失的临床症状且治疗无效,或经兽医判断预后不佳时。包括但不限于,
 - 1) 心血管系统:失血过量、给予输液治疗后仍贫血(低于 20%);
 - 2) 呼吸系统,呼吸困难、发绀;
 - 3) 消化系统:严重呕吐或下痢、消化道阻塞、套迭或腹膜炎;
 - 4) 泌尿道系统:肾衰竭(血尿素氮、肌酐值升高超过正常范围 2 倍以上);
 - 5) 肌肉骨骼系统:肌肉受损或骨折使肢体功能丧失;
 - 6) 皮肤:无法治愈的伤口,反复性自残;
 - 7) 神经系统:中枢神经抑制(长时间对外界刺激无反应)、震頭、痉挛、瘫痪、对止痛剂治疗无效的疼痛。



不同实验动物疼痛/痛苦/不适的特殊表现

动物种类	姿态	声音	脾气	运动	其他
大鼠	持续睡眠	抓取或按压受影响部位 时尖叫	可能变得更温顺或更易怒		小鼠会扭动打滚, 吃食幼崽
兔	看上去焦虑,面朝笼子 (躲藏的姿势)	尖锐的尖叫	踢,刮伤或反应迟钝		没有食物或水的 泼洒;吃食幼崽
豚鼠		急促反复的尖叫	很少发怒;通常是平静的; 表现出恐惧和不安	拖拉后腿	没有食物或 水的 泼 洒
狗	焦虑的瞥视;寻找凉的平面; 夹着尾巴;目光悲伤	狂吠,特殊声音尖叫	易怒或局促不安、及其 顺从;失控		阴茎突起;频繁排尿
猫	蜷缩成一团	特殊的哭声或嘶嘶声,啐唾沫	耳朵耷拉;很怕被抓;畏缩		
猴子	头部前倾,两臂身前交叉摆动	尖叫,惨叫	痛苦的表情		



肿瘤研究的推荐指标

- a) 一般实验,肿瘤负担不应超过动物正常体重的 5%;治疗性实验中,不能超过动物体重的 10% (10%表明,体重 25 g 的小鼠背部皮下肿瘤直径达 17 mm,体重 250 g 的大鼠背部皮下肿瘤的直径达 35 mm);
- b) 肿瘤不能到达严重影响动物行使正常功能的位置,或由于肿瘤的生长引起动物痛苦(固体肿瘤);
- c) 动物减轻的体重超过正常动物体重的 20%(应考虑到肿瘤所占的分量);
- d) 肿瘤生长点出现溃疡或感染;
- e) 转移到其他组织器官;
- f) 持续的自残行为。

Nature: 肿瘤大小不应超过15 mm 麻省总医院IACUC 动物福利指南中的规定是15 mm UK 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



按照实验动物福利伦理的原则和标准, 对使用实验动 物的必要性、合理性和规范性进行的专门检查和审定



收录于话题

#PLOS系列

- 0



为"Isolation and characterization "phiKMV-like" bacteriophage and therapeutic effect on mink hemorrhagic pneumonia"的研究论 文 该研究证明了当诵过超声零化给 药时, 噬菌体具有对抗与水貂肺部感 染有关的铜绿假单胞菌的潜力。 但是, 在2022年1月20日, 该文

章被撤回。主要原因是该研究违背了 动物的福利 (不合适使用麻醉剂及安 乐死使用的方法) 的政策, 所有在世 的作者都不同意撤稿。



麻醉和安乐死使用的方法, 人们对研究中

使用的动物的福利提出了担忧。在与

违反实验伦理? Nature高引论文 也照撤不误!

原创 JLX 解螺旋 2018-07-26 19:33



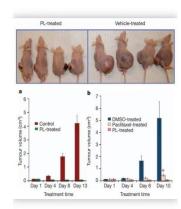
转载请注明:解螺旋:临床医生科研成长平台

2011年,哈佛医学院、麻省总医院的学者曾在 Nature上发表过一篇Letter, 他们证实了一种 名为piperlongumine (PL) 的小分子具有抗 癌作用。

menu v nature

Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to

同时, 有其他学者对该研究的数据存在疑虑。 对此、原作者们于2012年在Nature上发表了一 篇勘误, 其中包含了新的柱状图和小鼠肿瘤图 片。然而,事情并没有因此消停。看看下图的 小鼠图片, 聪明的你有没有觉得哪里不太对?



在之后的关注与研究中, 一个致命的问题就被 关注到了: 这些实验似乎不符合动物福利和伦 理、小鼠体内的肿瘤生长巨大、直径已经远突 破了1.5cm, 超出了麻省总医院在动物实验伦 理规定中的要求, 这可让接受实验的小动物们 承受了更加巨大的痛苦。























健康医学中心楼818

大动物实验: 5872

小动物实验: 5871

