上海交通大学医学院 **Shanghai Jiao Tong University School of Medicine** 实验动物科学部 **Department of Laboratory Animal Science (DLAS)**	**政策编号 (Policy Number):** DLAS–MP–ANIM.04
管理政策 **Management Policy**	**版本 (Version Number):** 1.0
标题：小鼠以及大鼠安乐死 **Title: Euthanasia of Mice and Rats**	**生效日期 (Effective Date):** 2015/6/1
	替换版本 (Supersedes): 无

1 执行标准

在动物实验过程中通常会对小鼠及大鼠进行临床研究，手术操作以及样品采集，并要求确保实验结束后对动物实施人道的安乐死程序，该程序应依据课题组提交的“实验动物研究及使用计划”或按照本政策的规定执行。

2 背景

在上海交通大学医学院范围内进行的动物实验，全部实验动物都需要实施“人道终点”操作，具体“人道终点”的操作方法根据国际 AAALAC 认证，美国农业部的 The Animal Care Unit of the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)以及美国国立卫生研究院（NIH）的 Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW)的相关规定实施。同时美国兽医学会（AVMA）制定的动物安乐死指南（2013 版）也作为参考标准执行。

具体的小鼠和大鼠的安了死方法包括以下几种：

a) 二氧化碳（CO_2）窒息

b) 麻醉状态下颈椎脱臼（仅限于 200g 以下动物）

c) 麻醉状态下断头

d) 麻醉状态下放血

e) 吸入过量麻醉气体

f) 注射过量麻醉剂（例如：戊巴比妥钠）

以上麻醉方法，上海交通大学医学院实验动物科学部根据《实验动物饲养管理和使用指南》（Guide）推荐使用二氧化碳窒息的方法。

3 角色

1) **课题组实验人员和实验动物科学部饲养人员：**必须遵守以下政策所列的各项内容。确保采用正确的方法对动物实施安乐死。所采用的方法必须是课题组提交的“实验动物研究及使用计划”中所描述的。如需对安乐死方法进行修改，需经过 IACUC 批准后方可实施。

2) **IACUC：**IACUC 委员会对课题组提交的“实验动物研究及使用计划”所描述的安乐死方法进行认定，确定该方法是否适用于实验动物及动物实验。

3) **所有即将涉及动物实验的人员：**需对所涉及安乐死方法接受充分的培训，确保完全掌握正确的安乐死方法。实验动物科学部可以对实验人员开展安乐死操作培训，具体联系实验动物科学部底楼接待室 021-63846590-776508。

4) **“实验动物研究及使用计划”所列的实验人员：**必须接受二氧化碳安乐死操作培训，并在实验操作过程汇总中接受实验动物科学部的监督，如出现违规行为应及时纠正。

4 定义

1) **安乐死：**在动物承受不可缓解的病痛以及非存活手术和样本采集时对动物实施的一种痛苦感最低或无痛苦感的死亡方式，安乐死操作过程通常分为主要方法和辅助性物理致死方法两步骤组成。

2) **辅助性物理致死方法：**动物实施安乐死后，需使用第二种安乐死的方法来确保动物不会从安乐死状态中恢复。通常第二种安乐死方法为物理性的操作方法，并主要通过对动物组织或器官的破坏来实现，具体方法包括双侧胸部打开，放血以及断头。颈椎脱臼方法不做为辅助性物理致死方法。

3) **安乐死容器：**安乐死容器通常采用饲养笼盒或特殊的有机玻璃容器，能够将动物放入并通入二氧化碳，该容器应为透明器皿以便随时观察动物状态。

5 政策内容

1) 课题组长和所有列入“实验动物研究及使用计划”的课题组实验人员都需遵守实验动物福利，并对动物实施“人道终点”。
2) 实施安乐死的操作人员必须经过相关的培训，认证合格后方可进行安乐死操作。
3) 在对动物实施“人道终点”时，安乐死的操作方法必须列入“实验动物研及究使用计划”或采用经过 IACUC 批准的其他方法。
4) 对动物实施安乐死操作后必须使用辅助性物理致死的方法确保动物死亡。辅助性物理致死的方法主要包括以下几种：
   a) 双侧胸部打开。
   b) 断头。
   c) 器官或组织采集（采集的量足以确保动物不会从窒息状态恢复）。
   d) 放血。
   e) 颈椎脱臼的方法不作为确认死亡的方法。

f) 如果在“实验动物研究及使用计划”中无特殊说明，推荐使用双侧胸部打开操作为辅助性物理致死的方法。

5) 动物安乐死后，对动物尸体的丢弃应严格准守“DLAS-MP-ANIM.01 动物尸体处理”政策的相关规定。

6) 二氧化碳窒息安乐死方法相关内容：

a) 二氧化碳安乐死方法不用于小于 15 日龄的新生大鼠以及小鼠，因为新生大鼠以及小鼠对缺氧环境的耐受能力较强，在缺氧环境中可存活超过 50 分钟。

b) 二氧化碳来源：必须使用钢瓶灌装的二氧化碳气体（由专业的气体公司提供），干冰，灭火器以及其他化学方法制备的二氧化碳气体不可应用到大鼠和小鼠安乐死操作中。

c) 二氧化碳安乐死容器：推荐使用饲养笼盒，因为动物从饲养笼盒中转移出进行安乐死动物可导致动物出现应激反应。也可以使用安乐死专用容器进行操作。

d) 安乐死容器应该采用透明的有机玻璃材料制作。在进行安乐死操作的时候不能够出现动物拥挤的状况，即确保每只在安乐死容器中的动物四肢都接触容器底部，从而使动物失去意识后能够有足够的空间趴在笼盒底部而不至于叠加到另外一只动物身上。

e) 在进行安乐死过程中，大鼠和小鼠不能同时放入同一安乐死容器中进行操作，因为不同种动物间会造成应激反应，无法达到安乐死的目的。

f) 在动物放入安乐死容器时，容器内应为室内气体，不存在任何安乐死气体。两次安乐死操作间期应预留充足的时间将容器中的二氧化碳释放，通常为 1-2 分钟，确保下一批安乐死动物不会突然暴露在高浓度二氧化碳气体中。根据实验表明当实验动物突然暴露在高浓度二氧化碳环境中时动物将在 10 秒内出现心率变化并感受到疼痛，然后才失去知觉，到 40 秒后才出现死亡（图 1）。如果安乐死容器中二氧化碳浓度缓慢上升，则动物会在失去知觉后才出现心率变化并不感受到疼痛，然后死亡（图

2），因此根据以上实验，安乐死容器中二氧化碳浓度应缓慢上升，以确保对动物实施真正的安乐死程序。

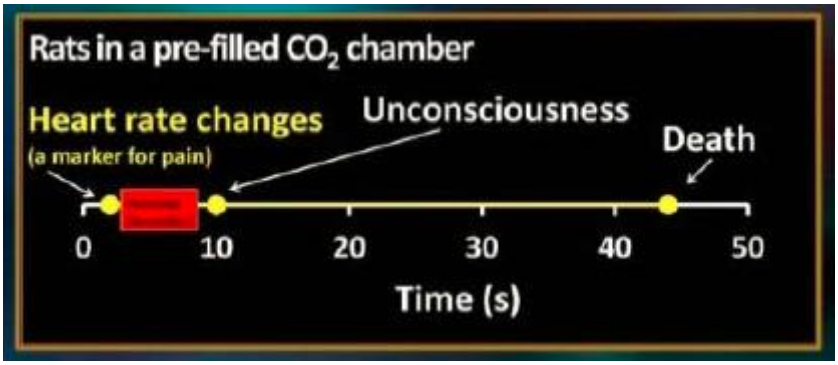

图 1

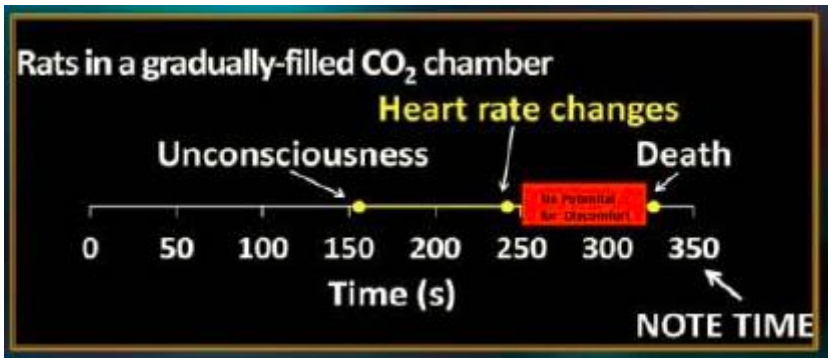

图 2

g) 根据美国兽医学会（AVMA）制定的动物安乐死指南（2013 版）以及其他指南规定当动物放入安乐死容器后，二氧化碳在容器内的充盈速率不应超过 30%，即 1L 的容器二氧化碳的充盈速度（流量）不应超过 0.3L/分钟。

流量计算公式：

$$\text{容器体积（L）} = \frac{\text{容器高度（cm）} \times \text{容器宽度（cm）} \times \text{容器长度（cm）}}{1000}$$

最大可接受流量 = 容器体积（L）×0.3L/分钟

上海交通大学医学院实验动物科学部常规使用的容器（笼子）尺寸，30%流量的计算：

标准小鼠笼子 — 2L/分钟

标准大鼠笼子 — 6.5L/分钟

安乐死容器（标准大鼠笼盒）—6.5L/分钟

如使用其他不同尺寸的容器需要重新计算流量

注：禁止任何超过规定最大流量的二氧化碳安乐死操作。

h) 二氧化碳安乐死操作过程中必须保证动物在二氧化碳环境中暴露充分的时间以确保动物的死亡，这个时间通常需要 **5-6 分钟**，为进一步确定死亡，上海交通大学医学院实验动物科学部推荐在观察动物无呼吸动作后仍需将其置于安乐死容器中 **2 分钟**，确保动物完全死亡。如需要采取动物的新鲜组织或器官，应在动物无呼吸动作后立即将动物取出，在采取组织后，采取辅助性物理致死方法来确定动物死亡。

i) 辅助性物理致死方法：

- 双侧胸部打开确认死亡的操作：大多数情况下优先使用该操作作为二次安乐死的方法。操作时使用剪刀将大鼠或小鼠双侧胸部打开，将肺部暴露，以保证动物无法从安乐死中恢复。
- 放血：安乐死后当某个器官（如肝脏，心脏，肾脏，等）需要被采集，放血是最常用的方法，将器官从体内移出时，连接器官和心血管系统的动脉和静脉被切断，从循环系统中释放剩余的血液；如果不需要采集器官，则实施一个体内主要静脉（如颈静脉或下腔静脉）的深切，将血液完全释放。
- 断头法：是使用断头器（新生鼠可以用剪刀）快速切断延髓，将动物头部从动物身体上快速、完全去除的过程；操作时将断头器固定于实验台上，用左手按住实验动物的脊背部，拇指放在右腋下部，用食指和中指夹住左前腿。将实验动物的颈部放在断头器的开口部，慢慢放下刀柄。但接触到实验动物时，用力按下刀柄切断其颈部即可。注意防止血液的喷出对实验人员的影响。如果使用这种技术，要确定头和身体分开，建议头和身体分离后间隔 5 厘米以上，保证动物被完全斩首。

j) 对未遵守以上二氧化碳安乐死行为的实验人员需通报课题组长以及IACUC，并且停止相关动物实验，进行再培训，通过考核确认可以正确操作二氧化碳安乐死程序后方可继续进行实验。

7) 采用戊巴比妥类药物过量注射的方法实施动物安乐死：注射过量戊巴比妥类药物是实施安乐死较为快速和可靠的方法。如果不引起动物恐惧和痛苦时，可使用麻醉药物过量注射的方法实施安乐死。但动物行为限制和保定会给动物增加额外的恐吓和不安，必要时使用镇静剂的方法辅助进行安乐死。使用该种方法同样需要辅助性物理方法作为第二种安乐死手段来确保动物的死亡。

a) 注射剂量：不低于 250mg/kg，如果低于这个剂量将照成动物深度麻醉，并且存在从安乐死状态苏醒的可能。

b) 注射途径：可以使用腹腔注射（IP），静脉注射（IV），心脏注射（IC）。当采用心脏注射时必须对动物进行麻醉方可实施。

8) 吸入过量麻醉气体实施安乐死：实施该操作使用常规的麻醉气体，例如：异氟烷，七氟烷等，具体操作方法和规定与使用二氧化碳安乐死方法相同。并且需要辅助性物理方法作为第二种安乐死手段来确保动物的死亡。

9) 麻醉状态下颈椎脱臼实施安乐死：当采用二氧化碳、过量麻醉气体以及过量戊巴比妥类药物注射的方法会对样本采集及实验产生影响的时候可使用颈椎脱臼的方法进行安乐死。使用颈椎脱臼的方法前需对动物实施麻醉，减少操作过程中的疼痛，做到安乐死的要求。在进行颈椎脱臼操作时，需确定脱臼的幅度为：动物的枕(骨)髁到第一颈椎的脱臼脱离 2-4mm。使用该种方法操作同样需要辅助性物理方法作为第二种安乐死手段来确保动物的死亡。

10) 麻醉状态下断头实施安乐死：当采用二氧化碳、过量麻醉气体以及过量戊巴比妥类药物注射的方法会对样本采集及实验产生影响的时候可使用断头的方法进行安乐死。使用断头的方法前需对动物实施麻醉，减少操作过程中的疼痛，做到安乐死的要求。断头操作时需使用断头装置辅助，断头装置要定期保养，确定铡刀的保持锋利。该方法不需要第二种安乐死方法确保动物死亡。

11) 深入麻醉状态时放血实施安乐死：使用该种方法对动物实施安乐死时，血压的迅速降低会使动物产生焦虑和痛苦，因此使用该方法时应对动物进行麻醉，确定动物完全失去知觉后方可实施放血安乐死。

12) 对胎儿及新生大鼠及小鼠的安乐死（日龄小于 15 日的新生的大鼠及小鼠）：

a) 子宫内怀孕 14 天以内胎儿的安乐死：怀孕 14 天以内的胎儿对痛觉的感知很小或没有，并且当母体被安乐死或将胎儿移出子宫都将导致胎儿的快速死亡，因此可以采用安乐死母鼠的方法从而导致子宫内胎儿的死亡。

b) 怀孕 15 天或以上至出生前的胎儿安乐死：文献显示，当胎儿在母体内发育到 15 天，其痛觉感知开始出现，并且胎儿在这个阶段对吸入式麻醉敏感性低于成年母鼠，因此母鼠采用吸入式麻醉或二氧化碳窒息的方法安乐死后，取出胎儿需对其使用手术剪刀进行断头操作才内确保其死亡。当需要完整的胎儿进行实验室时，应将取出的胎儿通过麻醉剂注射或母体注射麻醉剂的方法对胎儿进行麻醉，方可将取出的胎儿进行固定或液氮冷冻等实验操作。

c) 新生小鼠或大鼠至发育到 15 日龄安乐死：上海交通大学医学院实验动物科学部推荐对这个阶段的动物采用断头的方式实施安乐死。具体操作可以使用手术剪刀或断头台实施，请参考本政策中的相关内容。

d) 大于 15 日龄的大鼠及小鼠安乐死：请参考本政策中成年动物安乐死方法执行。

13) 上述安乐死的方法全部为上海交通大学医学院 IACUC 可接受安乐死方法或条件性接受安乐死方法。同时还存在一些不可接受的安乐死方法。

a) 可接受的安乐死方法：是指那些容易实现并且完全做到“人道终点“的安乐死方法，例如：二氧化碳安乐死方法。

b) 不可接受的安乐死方法：那些对动物伤害大，并且无法完成“人道终点“的方法，例如：敲头的方法处死动物，这些方法是 IACUC 严格禁止的。

c) 条件性接受的安乐死方法：条件性接受的安乐死方法需在特殊条件下执行，并且存在生物安全及对操作人员损伤的风险。这些方法必须向上海

交通大学医学院 IACUC 提供科学依据和具体操作说明，经 IACUC 批准后方可实施。主要包括以下两种方法：

i. 非麻醉状态下颈椎脱臼操作：这种方法操作对象仅限于体重低于 200g 以下的大鼠或小鼠。相关人员需经过培训方可实施动物操作，操作前需经过 IACUC 批准。

ii. 非麻醉状态下断头操作：这种操作首先需要通过 IACUC 严格审查，经批准后实施。操作过程中需要满足的条件包括：使用锋利的铡刀，人员需要经过严格的培训，使用保定器来固定动物以减少动物被抓取造成的应激反应，尽量避免对操作人员的伤害。以上所述条件满足后方可实施断头操作。

14) 在实验过程中可能需要使用一些未列入此政策的方法对动物实施安乐死，在使用这些方法前应向 IACUC 提交申请，说明科学依据，经 IACUC 批准后可实施安乐死操作。如果有任何安乐死相关问题未在该项政策以及其他上海交通大学医学院实验动物相关政策中说明请联系 IACUC 提出建议。

准备人：　　日期：
Prepared by:　　**Date：**

撰稿人　　日期：
Author:　　**Date：**

批准人：　　日期:
Approved by:　　**Date:**

原始政策启用时间（Date of Original Policy）：

附录 1

修订内容	修订人及修订日期	审核人及审核日期	批准人及批准日期

备注：一切管理政策文档由医学院实验动物科学部办公室归档