

实验动物替代方法原理与应用

**Alternative Laboratory Animal Methods
Principles and Applications**

主编 程树军 焦 红



科学出版社
www.sciencep.com

实验动物替代方法原理与应用

Alternative Laboratory Animal Methods
Principles and Applications

主 编 程树军 焦 红

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书系统论述实验动物替代方法的基本原理和在安全评价中的应用,全面反映替代技术研究的最新成果。全书上下两篇共 25 章,上篇为实验动物替代方法原理,介绍动物福利及 3R 原则的起源和法规管理,替代方法的验证认可和技术体系。下篇为动物试验替代方法应用,从动物试验的终点和安全评价的角度详细阐述替代方法的研究动态,并论及替代方法在生态环境、食品、化妆品、疫苗生物制品、医疗器械和纳米材料评价中的应用。重点突出替代方法的法规认可、实践应用、研究热点与前景展望。

本书可供生命科学、化学品/食品/化妆品安全、新药与生物制品研发、质检、环保、动物福利等领域专业技术人员和管理人员阅读,也可供医学、药、兽医学、食品科学、日用化学、动物学、实验动物学、毒理学和环境科学等专业的师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

实验动物替代方法原理与应用 = Alternative Laboratory Animal Methods Principles and Applications / 程树军,焦红主编. —北京:科学出版社,2010.9
ISBN 978-7-03-028812-7

I. 实… II. ①程…②焦… III. 实验动物-研究 IV. Q95-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 168331 号

策划编辑:周万灏 李国红 / 责任编辑:胡治国 周万灏 / 责任校对:李 影
责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

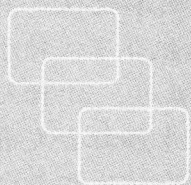
2010 年 9 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010 年 9 月第 一 次印刷 印张:41 1/2 插页:4

印数:1 2 000 字数:1 000 000

定价:128.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)



序

新技术或社会需求推动科学呈波浪式发展,毒理学亦是如此。2007年,美国国立研究院(NRC)描绘了具有划时代意义的21世纪毒理学的前景(注:Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy),提出毒理学应当由原来的体内动物研究向体外试验转变。打开了本领域即将发生变革的序幕。之后,各种合作联盟纷纷成立,研讨会和学术会议应接不暇,表明实现这一愿景的时代正在到来。美国国立卫生研究院前主任 Elias Zerhouni 评论道“动物试验不会旦夕消失,但是各机构的工作预示着其终结的开始”。

在这一前景付诸实现的过程中,摆在我们面前的,除了实现毒性作用路径所提供的科学发现的机遇以外,还要面对一旦技术挑战得以解决后如何对法规进行完善,包括新方法的标准化及质量保证、正式验证、包含范围设置的整合试验策略,以及新方法的最终全球化认可与应用等。这就要求在观念上综合把握困难的方方面面。

现代社会,人们越来越不情愿接受日常生活中存在的风险,因而,也就不情愿减少安全性评价方面的努力。被多数人接受的观点是:新的试验方法应当不低于当前安全评价的标准所能达到的水平,这就自然而然地形成了一种观念,即目前的方法学是新试验方法必须符合的金标准。因此,一方面新方法的研发投入并不足够,另一方面按照通常概括为“验证”过程的现行评价体系,新方法 with 现行方法相比常显示出某种局限性。这样做的后果导致毒理学的策略难以摆脱对“毒理学工具箱”进行“修修补补”的框架的束缚,即充其量不过是一块“补丁”被新“补丁”替换,这不是真正依从“21世纪毒理学前景”所建议的顺应毒理学变革而采取的对待新试验方法的开放的做法。

我们可以换个角度自问,设若不得不从头开始设计,管理毒理学应该如何进行? NRC 委员会的观点提出了一种新的方案,采用以现代技术为基础的和更加整合的新方法。包括对毒性作用路径认知的集成和现代技术的应用,如(人)细胞培养、低等物种筛选、组学技术(基因组、蛋白组、代谢组)、图像分析、高通量试验、包括 PBPK(基于药理学,更多的是基于毒理学的生理学模型)和 QSAR(定

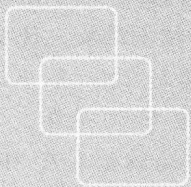
量构效关系)在内的计算机模型。既然认识到这些技术所产生的方法成为单一试验的想法是不现实的,那么将其组合起来成为另外一套成组试验(毒理学工具箱)或许可能实现。然而,如果我们只是从头开始建立新方法,而不仅仅是取代或增加新“补丁”,我们仍面临着一些根本问题,例如当新的试验组合不依赖于所应用的技术得以完成时,如何确定毒理学工具箱的局限性或有效性。21 世纪的毒理学,与其说是观念的转变,不如说更多的是适应现代科学技术和社会发展的需要,它同样需要国际社会的协调一致。世界范围内安全性评价领域相关方面就该报告而引发的讨论令人鼓舞,许多地方都在探讨新策略,令我最为激动的是看到我们的中国同行所作出的努力。

程博士是一位年轻的中国毒理学家,我们初次见面是在 2006 年 12 月,当时我是欧洲替代方法研究中心(ECVAM)的主任,在中国代表团参加完欧洲替代方法合作联盟(EPAA)第二次年会后,作为东道主我接待了代表团访问欧洲联合研究中心(意大利 ISPRA)。今年 1 月份,中国化妆品法规工作组访问了体外科学研究所(IIVS),我与程博士在美国马里兰州盖瑟斯堡再次见面。获知中国国内首部全面介绍 3R 原理和应用的专著即将出版,应著者之邀欣然为序。我深信该书的出版将会进一步推动新毒理学策略/方法的研发和动物试验替代方法在中国的发展。

Thomas Hartung,原欧洲替代方法验证中心(ECVAM)主任(2002 - 2008),现担任 CAAT 主任、德国康斯坦茨 Doerenkamp-Zbinden 教授,并在约翰霍普金斯大学彭博公共卫生学院环境卫生科学系主持证据毒理学。



2010 年 6 月



前言

诞生于 100 多年前的实验动物学是近现代生命科学的支撑和基础,实验动物为人类文明的发展和社会的进步作出了重要的贡献。50 年前(1959 年),《人道动物实验原理》(The Principles of Humane Experimental Technique)出版了,在这本具有里程碑意义的专著中,英国动物学家 William Russell 和微生物学家 Rex Burch 提出了著名的“3R”人道主义试验原则,即替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)。经过 50 年的发展,目前这一理念已被科学界普遍认可,并被立法部门接受。

近 20 年来,在以西方为主的动物福利运动和现代科学技术的推动下,3R 理念已逐渐成为生命科学研究中遵循的重要原则。体外试验技术、原理和方法已发展成为生命科学研究所不可缺少的重要组成部分。为了推动动物替代技术的发展,欧、美、日等主要发达国家不但成立了研究组织和管理机构,而且投入大量经费资助相关的研究。在这个领域不断有新技术、新方法得到推广和应用。这些技术已在生命科学研究的许多领域得到应用,有的成为影响国际贸易的技术壁垒,如欧盟化妆品动物实验禁令(2003/15/EC),欧洲化学品 REACH 法规、欧盟 86/609/EEC 指令等。实验动物替代理念的提出和替代方法的发展,与其说是社会进步的需要,不如说更多的来自科学技术进步的推动。特别是随着(人)细胞培养、低等生物筛查技术、分子生物学、组学技术(基因组、蛋白组、代谢组、细胞组)、组织工程技术、干细胞技术、生物标记技术、图像分析、高通量试验、计算机模拟技术等生物科学技术的发展,使许多以前需要利用活体动物进行的研究完全或部分可以利用体外的方法实现。2007 年,美国国立研究院(NRC)发表了具有里程碑意义文献“21 世纪的毒理学观念和策略”(Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy),提出毒理学应当由原来的体内动物研究向体外试验转变,为科学领域的这一变革起到了纲领性的作用,NIH 主任 Elias Zerhouni 认为“动物试验并不会在旦夕之间消失,但是各研发机构的工作预示着其终结的开始”。

近年来,我国加大了对动物试验替代技术的支持,如 2001 年科技部发布《科研条件建设“十五”发展纲要》中,就明确提出“推动建立与国际接轨的动物福利保障制度,鼓励在科学研究中使用替代实验动物技术的研究”;国家自然科学基金委员会把推动我国替代方法的研究纳入重点资助范围。2006 年国家科技部发布了《关于善待动物的指导意见》。使我国的科学研究用动物的福利与技术向前迈进了一大步。国家质检总局非常重视动物实验替代技术的法规咨询与技术交流,多次开展替代技术的研讨、培训与磋商。为了应对欧盟已于 2009

年实施的化妆品动物试验禁令,广东检验检疫局率先建立了检测实验室,建立检测标准,提供实验室检测技术服务,建立替代方法的资源共享网络和评价中心,开展相关的科学研究。

为了总结 3R 与实验动物福利技术的原理与背景,收集和整理动物试验替代方法的发展和前沿动向,向读者全面介绍实验福利与替代方法的由来、立法背景和技术进展。使实验动物替代从理念走向应用,从被动的技术应对走向自觉的技术实践。编者从 2006 年开始着手本书的编写工作,经过 4 年多的努力得以正式出版,愿以此书纪念 3R 发布 50 周年。

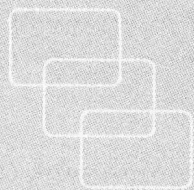
本书分上下两篇。上篇实验动物替代方法原理,分为 6 章,全面介绍动物福利及 3R 运动的历史与现状,国内外实验动物、动物福利及动物替代的法规化管理现状,替代方法的开发、验证与认可程序,替代方法的教育培训、学术交流和网络资源,体外试验系统与技术和替代实验室良好规范。下篇动物试验替代方法,分为 19 章,根据安全性评价动物试验的具体内容分章详细介绍动物实验及替代技术的进展,包括基本细胞毒性、急性毒性、皮肤刺激性/腐蚀性、皮肤过敏、皮肤吸收、亚慢性毒性、重复染毒和靶器官毒性、遗传毒性、光毒性、毒性动力学、致癌性、生殖和发育毒性、生态和环境毒性等。下篇还就替代方法在食品、化妆品、化学品、疫苗生物制品、医疗器械和纳米材料评价中的应用情况分章作了介绍。重点突出替代方法的验证认可现状和实践应用,并关注最新研究动态、技术热点和前景展望。书后附录包括 3R 与替代方法大事记、动物福利与替代方法网络资源和中英文索引方便读者检索。

本书部分内容来自作者承担的国家自然科学基金、科技部攻关项目、质检总局和广东省科技项目的支持,本书的编写过程中,非常荣幸地得到了国家质检总局进出口食品安全局、广东出入境检验检疫局、广东省科技厅各级领导的关心和指导。CAAT 现任主席 Thomas Hartung 博士在今年年初中国质检总局化妆品代表团访问美国期间,应著者之邀请欣然为序。本书编委由来自国家质检总局,中国检验检疫科学研究院,广东、上海、北京等直属检验检疫局,中山大学、南方医科大学、广州医学院、广东药学院等高校以及法国欧莱雅研发和创新中心、美国体外科学研究所,药检疾控系统,玫琳凯公司和华代体外科学研究所等机构的 30 多名学者教授组成。使得本书能站在全球的角度审视替代方法的国际进展与成果。对全体编委的辛勤付出深表谢意。特别感谢国家质检总局的李元平、俞太尉、林伟,广东省实验动物学会的陈菊玉、余亮、黄韧,法国欧莱雅研发和创新中心的 Valérie Facy、Annie Black、Damien Lelièvre、Pascale Justine、Nathalie Alépée 和欧莱雅(中国)研发和创新中心的余晓君、裘捷、李楠、吴越。感谢我的同事许崇辉、刘慧智、李妙珍、刘超,感谢研究生黄楠楠、陈晓清、任美玲、郎静、步犁、教华英,对我的家人以及其他给予支持和关注的朋友,在此一并致以衷心的感谢。

由于本书涉及的学科是目前国际上发展最快的领域之一,实践性强,新技术结合紧密,加之作者水平所限,不足和疏漏之处在所难免,敬请读者批评指正。希望在本书再版的时候有更多的有识之士参与进来,共同推动我国实验动物替代技术的发展。

程树军

2010 年 7 月于广州



目 录

上篇 实验动物替代方法原理

第 1 章 动物福利与 3R 原则	(1)
Chapter 1 Animal Welfare and 3R Principle	(1)
第 1 节 动物实验的历史与观念	(1)
第 2 节 动物福利运动	(9)
第 3 节 3R 理论的形成和发展	(13)
第 2 章 实验动物福利与替代方法的法律规定	(20)
Chapter 2 Regulations of Animal Welfare and Alternative Methods	(20)
第 1 节 世界各国动物福利的法律规定	(20)
第 2 节 世界各国实验动物的法律规定	(22)
第 3 节 动物试验替代的法律规定	(25)
第 3 章 替代方法的验证与认可	(31)
Chapter 3 Validation and Acceptance of Alternative Methods	(31)
第 1 节 替代方法的验证	(31)
第 2 节 替代方法的认可	(43)
第 3 节 验证的发展	(44)
第 4 章 替代方法的研究培训与信息交流	(54)
Chapter 4 Alternatives Methods Research, Education, Training and Communication	(54)
第 1 节 动物实验替代方法的社会发展推动	(54)
第 2 节 动物实验替代方法的技术进步推动	(58)
第 3 节 信息交流与学术出版物	(62)
第 4 节 教育与培训	(67)
第 5 节 3R 运动在我国的发展	(70)
第 5 章 实验动物替代技术	(73)
Chapter 5 Animal Testing Alternative Technology	(73)
第 1 节 动物实验及标准化	(73)
第 2 节 毒理学计划	(76)
第 3 节 动物试验替代技术	(82)
第 4 节 组学技术	(91)

第 6 章 体外试验系统及规范	(100)
Chapter 6 In Vitro Test System and Specification	(100)
第 1 节 体外替代实验室良好规范	(100)
第 2 节 良好细胞培养规范	(106)
第 3 节 体外试验系统	(109)

下篇 动物试验替代方法应用

第 7 章 基本细胞毒性	(122)
Chapter 7 Basal Cytotoxicity	(122)
第 1 节 基本细胞毒性的特征	(122)
第 2 节 细胞毒性检测方法	(126)
第 3 节 用于替代实验的基本细胞毒性方法	(131)
第 4 节 细胞毒性的新标志	(135)
第 8 章 急性毒性试验及替代方法	(140)
Chapter 8 Acute Toxicity Test and Alternative Methods	(140)
第 1 节 概述	(140)
第 2 节 急性毒性分级	(145)
第 3 节 急性经口毒性试验的减少和优化	(147)
第 4 节 急性吸入毒性试验的减少和优化	(154)
第 5 节 急性毒性试验替代方法	(160)
第 9 章 皮肤刺激/腐蚀试验及替代方法	(172)
Chapter 9 Skin Irritation/Corrosion Test and Alternative Methods	(172)
第 1 节 概述	(172)
第 2 节 皮肤刺激/腐蚀的体内试验方法	(179)
第 3 节 皮肤刺激/腐蚀替代方法的设计	(184)
第 4 节 皮肤腐蚀试验的替代方法	(195)
第 5 节 皮肤刺激试验的替代方法	(200)
第 10 章 皮肤吸收和渗透试验及替代方法	(209)
Chapter 10 Skin Absorption/Penetration Test and Alternative Methods	(209)
第 1 节 概述	(209)
第 2 节 皮肤吸收和渗透试验的替代方法	(213)
第 3 节 替代方法前景预测	(222)
第 11 章 皮肤致敏试验及替代方法	(225)
Chapter 11 Skin Sensitisation Test and Alternative Methods	(225)
第 1 节 概述	(225)
第 2 节 皮肤致敏的动物试验方法	(226)
第 3 节 皮肤致敏试验的替代方法	(231)
第 12 章 光毒性试验及替代方法	(252)
Chapter 12 Photo-induced Toxicity Test and Alternative Methods	(252)
第 1 节 概述	(252)
第 2 节 光毒性的体内试验	(257)
第 3 节 急性光毒性及替代方法	(260)
第 4 节 光遗传毒性及替代方法	(268)

第 5 节 光变态反应(光敏性)及替代方法	(273)
第 6 节 替代方法前景预测	(277)
第 13 章 眼刺激/腐蚀试验及替代方法	(282)
Chapter 13 Ocular Irritation/Corrosion Test and Alternative Methods	(282)
第 1 节 概述	(282)
第 2 节 眼刺激性/腐蚀性的动物实验	(284)
第 3 节 眼刺激性/腐蚀性的替代方法	(290)
第 4 节 替代方法前景预测	(307)
第 14 章 遗传毒性/致突变试验及替代方法	(311)
Chapter 14 Genotoxicity/Mutagenicity Test and Alternative Methods	(311)
第 1 节 概述	(311)
第 2 节 遗传毒性试验要求和策略	(313)
第 3 节 遗传毒性的体内实验方法	(318)
第 4 节 遗传毒性的体外方法	(323)
第 15 章 重复染毒毒性试验及替代方法	(340)
Chapter 15 Repeat Dose Toxicity Test and Alternative Methods	(340)
第 1 节 概述	(340)
第 2 节 重复染毒毒性动物试验方法	(342)
第 3 节 重复染毒毒性的体外评价策略	(348)
第 4 节 替代方法前景预测	(352)
第 16 章 靶器官毒性及替代方法	(357)
Chapter 16 Target Toxicology and Alternative Methods	(357)
第 1 节 概述	(357)
第 2 节 神经系统毒性及替代方法	(360)
第 3 节 呼吸系统毒性及替代方法	(368)
第 4 节 血液/心血管系统毒性及替代方法	(372)
第 5 节 肝毒性及替代方法	(378)
第 6 节 肾毒性及替代方法	(385)
第 17 章 毒代动力学与代谢试验及替代方法	(394)
Chapter 17 Toxicokinetics & Metabolism and Alternative Methods	(394)
第 1 节 概述	(394)
第 2 节 毒代动力学与代谢试验方法	(396)
第 3 节 毒代动力学与代谢试验替代方法	(400)
第 4 节 替代方法前景预测	(414)
第 18 章 致癌性试验及替代方法	(419)
Chapter 18 Carcinogenicity Test and Alternative Methods	(419)
第 1 节 概述	(419)
第 2 节 致癌性动物实验方法概述	(421)
第 3 节 致癌性试验的减少和优化方法——转基因小鼠模型	(426)
第 4 节 致癌性试验的替代方法	(434)
第 5 节 替代方法前景预测	(440)
第 19 章 生殖和发育毒性试验及替代方法	(442)
Chapter 19 Reproductive & Developmental Toxicity Test and Alternative Methods	(442)

第1节	概述	(442)
第2节	生殖和发育毒性的动物试验	(449)
第3节	生殖和发育毒性的研究策略与验证的方法	(459)
第4节	生殖和发育毒性的替代方法	(474)
第20章	化学品危害评估/生态毒性评价及替代方法的应用	(493)
Chapter 20	Chemical Hazard Evaluation/Ecotoxicology Assessment and Alternative Methods Application	(493)
第1节	化学品法规管理概述	(493)
第2节	化学品生态毒性及替代方法	(498)
第3节	化学品毒性评价的组合试验策略和决策树	(510)
第21章	食品风险评估及替代方法的应用	(524)
Chapter 21	Food Safety Assessment and Alternative Methods Application	(524)
第1节	概述	(524)
第2节	胃肠道吸收的替代方法	(531)
第3节	食物过敏动物试验及替代方法	(540)
第4节	生物毒素动物试验的替代方法	(544)
第22章	化妆品风险评估与替代方法的应用	(555)
Chapter 22	Cosmetics Risk Assessment and Alternative Methods Application	(555)
第1节	化妆品风险评估概论	(555)
第2节	欧盟化妆品法规对动物试验替代方法的规定	(565)
第3节	化妆品安全评价的动物试验替代方法	(566)
第23章	疫苗和生物制品中评价及替代方法的应用	(573)
Chapter 23	Vaccine and Biological Products Safety Assessment and Alternative Methods Application	(573)
第1节	概述	(573)
第2节	疫苗和生物制品评价中的动物试验	(575)
第3节	疫苗和生物制品研究中动物试验的替代方法	(581)
第24章	医疗器械生物学评价及替代方法的应用	(592)
Chapter 24	Medicine Instrument Biology Assessment and Alternative Methods Application	(592)
第1节	医疗器械生物学评价概述	(592)
第2节	医疗器械生物学评价试验方法	(596)
第3节	动物实验的替代方法	(609)
第25章	纳米材料的安全性评估及替代方法的应用	(614)
Chapter 25	Nanomaterials Safety Assessment and Alternative Methods Application	(614)
第1节	概述	(614)
第2节	纳米材料的安全评价策略	(616)
第3节	化妆品中纳米微粒的安全评价	(631)
附录1	动物福利及替代方法大事记	(636)
附录2	3R和替代方法网络信息资源	(640)
附录3	缩写和索引	(645)

上篇 实验动物替代方法原理

第 1 章 动物福利与 3R 原则

Chapter 1 Animal Welfare and 3R Principle

第 1 节 动物实验的历史与观念

一、实验动物与动物实验的概念

实验动物(animal)、设备(equipment)、信息(information)和试剂(reagent)共同构成了生命科学研究必须具备的 4 个基本要素,通常称之为 AEIR 要素,实验动物居于首位。

实验动物(laboratory animal)是指经人工饲养,对其携带的微生物、寄生虫实行控制,遗传背景明确或者来源清楚,用于科学研究、教学、生产、检定及其他科学实验的动物。实验动物不同于野生动物、经济动物(如家畜、家禽)和观赏动物(如宠物)。

实验动物用于科学实验的结果应该具有可靠性、精确性和可重复性。为此实验动物必须满足科学实验应具备的 4 项基本要求,即:①对实验处理表现出极高的敏感性;②对实验处理个体反应表现出极强的均一性;③模型性状具有遗传上的稳定性;④动物来源具有易获得性。实验动物必须是先天遗传性状、后天繁育条件、微生物和寄生虫携带状况、营养需求以及环境因素等方面受到全面控制的动物。因此,实验动物有其特定含义,其一是必须人工培育,遗传背景明确,来源清楚,即遗传限定的动物;其二是

对其携带的微生物、寄生虫实行人工控制,即微生物寄生虫限定的动物;其三是主要用于科学实验。由于实验动物种类有限,目前某些遗传背景不十分清楚,对其携带的微生物、寄生虫未做净化处理的动物也在用于科学实验,它们只能为试验用动物(experimental animal)。试验用动物是指能用于科学实验的动物,包括试验动物和某些野生动物、经济动物和观赏动物中一些用于实验的动物。其中有的动物未经严格的遗传学控制和微生物寄生虫学控制,标准化控制程度低。

动物实验(animal testing)是以实验动物为实验对象进行处理并观察其反应以获取资料的科学实验,包括以实验动物整体水平的综合性反应为评价指标的实验、以实验动物为对象的观测、以实验动物为材料来源的局部器官及系统的实验以及以实验动物的各种表现参数作为权衡尺度的实验室工作。对生命科学而言,动物实验结果的科学性、准确性及精密度与实验动物的选择、实验条件、实验技术与方法等直接相关。现代动物实验除了满足上述科学性的要求之外,还必须遵循伦理学规范,符合 3R 原则。

二、动物实验的必要性

(一) 实验动物推动了生物医学的发展

自古以来,实验动物就是生物医学研究

和教学的基本工具,动物实验也是现代生物医学研究的主要手段。动物实验在揭开生命本质和起源之谜,保证人类健康和推动整个生命科学方面发挥了重要作用。

早在公元前4世纪至公元前3世纪,希腊杰出的生物学奠基人亚里士多德运用解剖技术展示了各种动物的内在差别,这是西方最早关于动物实验的文献记载。我国史料记载,炎黄时代便有“神农尝百草,一日而遇七十毒”的描述。古罗马时期,Galen医生就曾通过对多种动物进行初步的活体解剖来推论人体的生理功能,对医学发展影响很大。公元1世纪前后英国的《埃伯斯医药籍》以及15世纪李时珍的《本草纲目》中记载的大量药物和药方许多都是通过动物实验初步验证的。17世纪,英国医生 William Harvey 采用活体解剖的办法以蛙、蛇、鱼等几种动物做实验,发现了血液循环现象,使生理学真正发展为一门学科,也为实验药理学开创了新纪元。18世纪末,科赫用牛、羊等动物做实验,发现了结核杆菌,提出了科赫原则。19世纪,巴斯德开始在动物身上复制人类疾病的模型,用动物实验方法来研究疾病发生的原因和条件,开创了现代微生物学。人们以巴斯德的理论确认了许多种传染性疾病并研制出了相应的预防疫苗(包括白喉、破伤风、狂犬病、百日咳、结核、脊髓灰质炎、麻疹、流行性腮腺炎、风疹等)。巴甫洛夫用狗做实验,在心脏生理、消化生理和高级神经活动方面取得了重大成就。

动物实验研究不仅直接推动了疫苗和生物制剂的问世,而且在抗生素的开发方面也起到了重要的推动作用。磺胺药物的发现就有实验动物的功劳,研究这些化合物的德国细菌学家 Domagk 小组坚持把所有候选药物,除了用琼脂平板上生长的细菌进行筛选外,还都要用感染的小鼠进行筛选(即鼠保护实验),Domagk 敏锐地发现候选药物百浪多息(prontosil,第1个合成的磺胺类药物)在小鼠体内

实验中抗菌效果极为有效,但它对体外培养的细菌却无效。Damask 以其对抗菌药物的研究获得1939年诺贝尔奖。相反,缺乏适当动物实验研究却使青霉素的应用推迟了10年。Alexander 在1929年的研究中没有用小鼠检测其含粗青霉素的培养物的效果(虽然他的确也指出这种培养物对小鼠和兔没有毒性),直至1940年,牛津大学的 Florwey 等最终通过鼠保护实验表明青霉素是一种具有奇效的抗生素而使其得以广泛应用。

生物医学发展中还有许多新发现和新技术的应用是通过动物实验获得的。1665年,Wren成功地用羽管对犬施行静脉注射;Lower成功地对犬进行了输血,为后来人体静脉注射与输血提供了依据。1792年,Jenner发现牛痘可以保护人不生天花,这是世界上第1个疫苗。人类第1个证实的细菌病是牛羊的炭疽病(1878年)。第1个放线菌病是在牛体发现(1877年),第2年才在人体分离到此病原。最早发现的病毒病是犬的狂犬病(1885年)和牛羊口蹄疫(1897年)。最早发现的原虫病是骆驼的苏拉病(1880年),不久又发现鸟的疟原虫,然后才发现人的原虫病。虫媒病也是先在动物中发现(牛的德克萨斯热,1893年),以后才知道疟疾、黄热病、斑疹伤寒都是昆虫传播。慢病毒(包括艾滋病毒在内)最初也是在绵羊的痒病中发现,后来才在库鲁患者中分离到。几乎所有疫苗都是先通过动物实验在动物中研制成功,然后移用到人。如最早的死病毒疫苗的鼻祖是猪瘟疫苗,弱毒疫苗则是禽霍乱疫苗;最早的寄生虫病疫苗是牛的网尾线虫疫苗;最早的肿瘤疫苗是鸡的马立克病疫苗等。

从生物医学的历史发展进程看,生物医学的每一重大发展与进步几乎都与动物实验息息相关,现代医学各领域许多最重要的进步都离不开以实验动物研究为基础的探索。实验动物代替人体受试者的地位,没

有其他任何技术和方法可以完全取代,可以说现代医学的发展仍离不开动物实验。

(二) 动物实验与人类生活紧密相关

实验动物作为活的“度量衡”直接或间接地影响着社会发展和生活的各个方面。

1. 医药领域 实验动物与医学、生物学的关系最为密切。探求人类疾病的发生、发展、预防、治疗,都需要通过动物实验加以阐明和证实。了解人类自身的心理、精神、行为进化,了解衰老和延缓衰老的过程等都离不开实验动物。新药、疫苗、生物制品、诊断试剂的研发、生产、质检等方面,实验动物也起着非常重要的作用,尤其是在新药的药效学测试和安全性评价必须通过严格的动物实验。

2. 农牧领域 农业上大量使用的杀虫剂、除草剂等农药的生态安全以及人类健康安全等都离不开动物实验。兽药、新农药的研发常常由于对人类健康危害或对生态系统的破坏而以失败告终。欧盟要求对农药的环境影响进行评估,除需要进行动物实验外,还需要进行生态动物的试验。

3. 工业领域 食品原料和添加剂、化妆品、纺织品、日用化学品等经常需要通过动物实验证明其应用于人类的安全性。

4. 环境保护领域 由于人类活动而不断增长的各种环境因素,如放射性物质、噪声、空气污染物、生物毒素、日用化学品等,对人类生活空间造成的污染、对人类健康的危害、对生态环境中其他生物的影响等的研究都离不开动物实验的支持。可以说,实验动物和动物实验已深入到人们生活的各个领域,包括科学研究、教学、环境、军事等。

三、动物实验的局限性

(一) 动物实验存在片面性

片面性主要表现在以下方面:

1. 实验动物作为人类疾病动物模型的不足 大多数实验动物被应用于医学研究的主要方式是动物模型,特别是各种疾病动物模型。研究人员通过遗传控制、基因干预、外科手术或注入外来物质等方式诱发动物产生疾病,“模拟”人类的疾病。然而这种研究具有明显的缺陷,因为每个物种都是由多个系统和器官组成的十分复杂而又相互关联的有机体,物种之间在漫长的进化过程中已形成了无数微妙而又重要的差异。施加于动物一个或几个特殊器官或系统产生的“模拟”效应,往往不能精确预测或不能全面复制该疾病表现出的复杂的生物学特征。在这种不确定性的情况下,将动物实验结果的数据外推到其他物种(包括人类)可能是不可靠的。当然,“动物模型”最好类似于人的情况,但没有哪种理论能够证明这种类推法的有效性。因此,动物实验结果外推到人从理论上讲也缺乏逻辑性。

2. 实验动物作为安全性预测依据的局限性 实验动物的一个重要用途是用来测试药物和其他化学物质的安全性。但是,不同动物所测得的结果往往不一致,经常还相互矛盾。1988年, Lester Lave 在《自然》杂志上报道,使用大鼠和小鼠测试 214 种化合物的致癌性的双重试验,其反应一致性的仅有 70%,啮齿类动物和人之间的相关性更低。Olson 1998 年报道 131 种化学物对动物的毒性与人的毒性的吻合率,啮齿类为 6%,非啮齿类(犬和猴)为 28%,合并后仅 36%,所有的物种吻合率可达 69%。David Salsburg 也发现,已知 19 种人类摄入时会致癌的化合物,如采用规定的标准用量,只有 7 种化合物能在小鼠和大鼠身上引起癌症。

3. 动物实验误差不可避免 当人们对生物医学中的一些理论产生怀疑和争论时,往往引用动物实验的研究结果作为证据。但是,动物实验的结果有时是模棱两可的或者是不全面的,不同动物试验往往在试验方

案、动物种属选择和试验条件上存在差异,互相持相反观点的人往往都能获得支持其理论的证据。如 2006 年,英国某实验室研制一种名为 TGN1412 的免疫制剂,动物试验表明能激活调节性免疫 T 细胞,从而应用于自体免疫疾病治疗,但人体志愿者在应用这种抗体后出现同实验动物完全相反的结果。

(二) 动物实验有时可造成误导

在动物试验中观察到许多明显与人体反应不同的异常现象,有的可能是供试动物物种本身所特有的正常的生物学特性反应,也可能是非自然手段所引起的变化,或是由于实验室环境的应激反应所致,如 F344 大鼠自发肿瘤。标准化程度不高的实验动物(如非人灵长类动物和犬)通常具有较高的自发病变率,这种异常性可能与人类的病理变化毫不相关。如果据此而提出什么实验假说或假设,那么只能是差之毫厘,谬以千里。

动物试验有时还能够把研究人员引入歧途,如有时通过动物试验未能预测药物的毒性反应而过早地临床应用引起人类的疾病或死亡。例如,提高心输出量的药物米力农(milrinone)可提高诱发性心力衰竭的大鼠的存活率,但有严重慢性心力衰竭的人服用这种药后病死率却增加 30%。20 世纪 80 年代初,常用的止痛药氯苯酰二甲基吡咯乙酸钠很受消费者欢迎,当使用者体内发生严重的过敏反应甚至导致死亡、成百上千人的生命受到威胁之后才被从市场中取缔。再如抗抑郁药 nomifensine 对大鼠、家兔、犬和猕猴毒性极小,但在人类却会引起肝脏中毒和贫血。美国曾对 1976 年至 1985 年期间上市 209 种新药中的 98 种进行评价,发现其中 52% 的药物具有“严重的批准后的危险”,而当时在动物试验和有限的人体试验中未曾预见。而与此类似的尚未发现的不良反应较低的潜在药物又有多少呢?与此相反,我

们无法估计又有多少具有潜在应用价值的药物却被放弃或禁止使用。

许多医学领域的重要进展之所以被推迟,部分原因是由于动物试验结果的误导所致。20 世纪 30 年代,对猴的研究导致了一些严重错误的观念从而延迟了对脊髓灰质炎的防治。这些研究认为,脊髓灰质炎病毒主要侵染神经系统,这与先前的临床研究认为胃肠系统是主要的感染途径相矛盾。直到后来人们才证实,这是因为通过滴鼻接种疫苗已对脑组织人为地产生了亲和力。这一错误的结论导致人们指导临床对该病产生错误的预防措施,并延迟了疫苗的开发。直到 1949 年,当人们首次使用人的肠道和四肢等非神经组织细胞培养这种病毒获得成功时,才改变了这一错误观念。

总之,动物试验应用于科学研究和检测只是许多可用的实验技术之一。除了动物试验外,还有许多可靠和可行的方法可供使用,包括流行病学调查、临床试验、体外组织和细胞培养、非介入性研究(图像分析)和计算机模型等。新技术的应用可明显提高动物试验的效率以及与人类的相关性。

四、动物实验与毒理学

毒理学是生物医学的一门重要基础学科,是研究化学因子、物理因子和生物因子与生物机体的有害交互作用的科学。毒理学最先是从事药理学发展而来的,药理学为毒理学的发展奠定了科学基础。与药理学主要研究药物对生物体的有益作用不同,毒理学研究化学物在一定条件下对生物体的有害作用。在某种程度上药理学和毒理学的发展都离不开动物试验。

毒理学试验可采用整体动物、离体动物器官、组织、细胞或非生物的方法进行。根据所采用的方法不同,可分为体内试验和体外试验,通常把利用活体动物进行的试验称

为体内(in vivo)试验,利用离体、培养物或非生物方法进行的试验称为体外(in vitro)试验。毒理学还利用受控的人体试验和流行病学调查直接研究外源化学物对人体和人群健康的影响。各种毒理学研究方法的优

缺点见表 1-1。现代毒理学虽然仍以动物实验为主要方法,但更重视新技术的应用,如体外技术、数学模拟技术、蛋白和基因组技术等,将在以后各章详细介绍。

表 1-1 毒理学研究方法的优缺点

研究方法	流行病学研究	受控的临床研究	体内试验	体外试验
优点	• 真实的暴露条件 • 在各化学物之间发生相互作用 • 测定在人群的作用 • 表示全部人的敏感性	• 规定的受控的暴露条件 • 在人群中测定反应 • 对某组人群的研究是有力的证据 • 能确定效应的强度	• 易于控制暴露条件 • 能测定多种效应 • 能评价宿主特征的作用(如性别、年龄、遗传特征等)和其他调控因素(饮食等) • 可能评价机制	• 影响因素少,易于控制 • 可进行某些深入的研究 • 人力物力花费少
缺点	• 耗资、耗时多 • (事后性)无健康保护 • 难以确定暴露,有混合暴露问题 • 可检测的危害性增加应达到 2 倍以上 • 测定指数较粗(发病率、病死率)	• 耗资多 • 较低浓度和较短时间的暴露 • 限于较少量人群(一般≤50) • 限于暂时、微小、可逆的效应 • 最敏感的人群一般不适于研究	• 动物暴露与人暴露相关的不确定性 • 受控的饲养条件与人的实际情况不一致 • 暴露的浓度、时间模式与人群暴露显著不同	• 不能全面反应毒性作用,不能作为毒性评价和危险性评价的最后依据 • 难以观察慢性毒作用

(一) 现代毒理学仍以动物实验为主

毒理学的主要任务是评价外源化合物的毒性,以研究化学物对人体的有害作用,通常需要借助实验动物模型才能实现这一目的,即以实验动物为试验对象,以模拟人体暴露的条件进行染毒,观察毒性作用。现代毒理学仍然以动物实验为主,其基本原则表现在:

1. 实验动物的毒理学效应可以外推到人 其基本假设前提是人是最敏感的物种,实验动物(特别是哺乳动物)和人在解剖、生理、生化代谢等生物学过程方面有很多相似之处。以单位体表面积计算在实验动物产生毒性作用的剂量通常和人相近,而以体重计算则人比动物敏感,差别可能高达 10 倍。因此,可以通过安全系数计算人的相对安全剂量。

2. 实验动物必须暴露于高剂量 这是发现对人造成潜在危害的可靠方法,根据群体效应发生率会随着剂量或暴露的增加而增加的原则,毒理学试验中设置多个试验组,通过观察剂量-反应(效应)关系确定受试物的毒性效应和有关毒性终点的参数。但这些参数对于判断某种化学物是否安全还是不够的,因为毒理学试验中实验模型所需的动物总是远远少于处于危险中的人群,为了在少量动物中得到有统计意义的可靠结果,需要应用相对较高的剂量,提高效应发生的频率以便被检测,然后根据毒理学原则外推估计低剂量的危险性。

3. 实验动物的染毒方式接近于人可能的暴露途径 为了使实验具有代表性和可重复性,必须使用成年健康(雄性和雌性未孕)实验动物,而将幼年、老龄和妊娠雌性动物作为

特殊情况另作研究。毒理学动物实验结果的敏感性取决于受试物的毒性效应强度和实验误差两个因素。因此,应严格控制可能影响动物实验的各种因素,采用标准的试验方法,实施质量保证措施,降低实验误差。这样通过实验毒理学的一系列研究,可以对化学物的某一方面或某几方面的毒性进行选择性价。

毒理学作为一门实验科学,是以动物实验为中心,以体外实验、人体实验和流行病学调查为补充。毒理学动物实验的设计、实施、结果观察和评价是毒理学研究的基本内容。毒理学试验作为化学物、化妆品、药品等健康相关产品安全评价的主要手段,已列入各国际组织、各国政府所颁布的规程或指南中。

(二) 毒理学动物实验的局限性

现代科学技术的发展在证明生物体共同衍生和演化规律的同时,也越来越多地证明了不同物种间以及生物个体间基因、蛋白以及代谢等多方面的差异,尽管各国政府主管部门制订了有关药品和各种化学品安全性评价的规范或准则,并不断使其完善,希望利用啮齿类和非啮齿类的毒理学研究能为安全性评价提供毒理学证据,但是以动物资料预测人类毒性的预测价值尚有待研究。正如 WHO 在《临床前药物安全性实验原则》文件中所指“虽然事先对生物活性物质进行了最仔细的研究,但给人类使用时总是不可避免地要冒一定的风险”,这就是毒理学动物实验的局限性。其原因主要是

1. 从动物实验外推到人的不确定性

实验动物和人对外源化学物的毒性反应敏感性存在很大差异,有时甚至存在本质差别。虽然毒理学动物实验通常采用两种或两种以上的动物,并尽可能选择毒性反应与人相似的动物,但要完全避免物种差异是不可能的。例如,降胆固醇药氯苯氧异丁酸乙酯对犬的毒性较大,而对大鼠、猴和人的毒

性小;苯可引起犬白细胞增多及脾脏和淋巴结增生,但对兔只能引起白细胞减少及造血器官发育不全。已证实大鼠饲以大剂量糖精会诱发膀胱癌发生,但人类膳食中糖精含量要低得多,与此相当的剂量则不会诱发膀胱癌。在高浓度条件下,糖精在大鼠膀胱内造成不溶的沉淀,随后对膀胱上皮细胞造成慢性刺激,促进细胞增生,最终形成膀胱肿瘤;但人类即使过量摄入这种人造甜味剂,在人的尿液中也不会达到形成沉淀的浓度。

表 1-2 显示了用猴预测人体毒性时的准确性。可以看出,骨髓和胃肠道的真阳性百分率最高,分别为 80%和 92%,假阴性率也最低,分别为 8%和 0%;其次为肝脏毒性,真阳性率为 52%;肾、心血管及神经肌肉的真阳性率则均较低,分别为 32%、28%和 24%,假阴性率也较高分别为 8%、12%和 4%;其他系统则真阳性率更低,还有不少假阳性结果。

表 1-2 用猴预测人体器官系统毒性时的准确性(%)

器官系统	真阳性	真阴性	假阳性	假阴性
注射部位	16	40	36	8
皮肤	12	40	32	16
心血管	28	36	24	12
呼吸	16	16	64	4
骨髓	80	0	12	8
淋巴组织	4	24	72	0
胃肠道	92	0	8	0
肝脏	52	4	44	0
肾脏	32	4	56	8
神经肌肉	24	12	60	4

表 1-3 显示用犬预测毒性试验和人的毒性结果的准确性。可以看出对骨髓的抑制作用,猴的结果与犬接近;对胃肠道毒性(主要为呕吐),猴的预测率较犬低;对肝、肾、神经肌肉等毒性则和犬相近。若同时采用犬和猴两种动物的实验结果,则预测率可提高,其中对骨髓毒性真阳性率可高达 83%,