

第4.12章 家畜和马繁殖生产中体细胞核移植技术

第4.12.1条

引言

继OIE生物技术专家组于2006年4月3日至4月5日召开第一次会议之后，OIE生物标准委员会提出“制定关于体细胞核移植（SCNT）克隆生产技术对动物卫生所产生风险的建议，包括制定对利用该项技术获得的胚胎和动物卫生的评估标准”。以下建议将初步讨论如何识别和鉴定体细胞核移植克隆技术相关的动物卫生风险，并以此为基础对这些风险加以分析。

第4.12.2条

概述

生物技术专家组在其第一次会议上，建议动物繁殖生物技术分组应围绕克隆技术生命周期起草关于与动物繁殖生物技术相关的卫生风险分析方案。动物繁殖生物技术是指“使用辅助性繁殖技术进行动物生产。该类技术包括人工授精和其他体外技术，如体外受精、胚胎移植、胚胎分割，以及通过核移植进行无性繁殖的技术等”。以下建议仅针对体细胞核移植技术，按生命周期的不同阶段对通过生物技术生产的动物进行卫生风险分析。生命周期分为以下四个阶段：i）胚胎；ii）受体；iii）子代；iv）克隆动物所繁殖的后代。

第4.12.3条

范围

以下建议涉及以生物技术进行动物繁殖时所出现的动物卫生风险。

依据OIE及其生物标准委员会的要求，生物技术专家组建议确定动物卫生风险分析参数及其对环境安全、食品和饲料安全方面的影响。这些建议将首先重点关注风险评估、预防措施和在家畜和马繁殖生产中体细胞核移植技术应用指导的科学依据，不影响在以后添加其他相关问题。目前，这

些建议包括以下内容：

- 鉴定动物中存在的卫生风险，并且针对胚胎、受体、克隆动物以及克隆动物子代可能出现的风险制定管理建议；
- 与体细胞核移植克隆技术相关的动物安全风险以及预防措施；
- 与动物卫生相关的动物福利。

本章节没有讨论以下内容，但这些内容可能在其他机构或文件中已进行了讨论或已引起了关注，且OIE今后也有可能关注这些内容。文件未提及的内容包括：

- 生物技术食品生产安全及营养问题，如转基因食品（国际食品法典委员会提及）；
- 动物克隆所带来的环境释放风险；
- 与体细胞核移植技术或其他克隆技术无关的转基因动物所带来的风险；
- 与动物繁殖无关的生物技术；
- 生产用于异种器官移植动物或器官供体动物所带来的风险；
- 干细胞相关技术；
- 包括鱼在内的水生动物克隆所带来的风险；
- 其他陆生动物，如野生哺乳动物和非哺乳动物（包括禽类和昆虫）所带来的风险。

第4.12.4条

背景：风险分析—总则

- 1) 风险分析总体上包括：危害识别、风险评估、风险管理、风险交流。风险评估主要对危害所带来的风险进行评估（本法典第2.1章），监管机构在对实验性释放或商业释放做出决策时常使用这些原则，并根据风险评估结果决定是否需要进行管理或风险控制。风险管理是指风险管理者根据风险评估结果制定切实可行的风险预防措施或政策的过程，在这个过程中，应考虑包括社会因素、经济因素、法律因素在内的各种因素的变化。
- 2) 就动物疫病，尤其是本法典所列疫病的相关潜在风险已广泛达成共识，且可对风险进行定性或定量分析（本法典第2.1章）。就动物疫病而言，可能仅需进行风险定性分析，即用“高”、“中”、“低”、或“可忽略不计”等定性术语表示可能性或后果的严重程度。常规决策中往往使用不依赖数学模型的定性分析。定量或半定量的风险分析一般以数字（如1/1 000 000）表示风险等级。
- 3) 针对动物克隆的风险评估分为两大类，即绝对风险评估和相对风险评估。绝对风险评估不需要参照对象（如某种动物传播某种家畜疫病的可能性），而相对风险评估（又称为风险比较评估）一般是参照某一特定对象所进行的风险比较分析，如某一通过繁殖技术得到的动物与另一通过繁殖技术得到的动物相比，衡量它们向同种动物传播某种疫病风险的能力差异。

- 4) 不管使用哪种方法,危害识别是进行科学风险评估的第一步。在评估体细胞核移植技术克隆动物所带来的风险时(包括从胚胎开始到整个动物克隆过程和接下来的子代动物),仅能实行相对风险评估,明确这一点十分重要。由于风险定量评估技术相对较新,再加上各实验室的结果和所克隆出的动物种类存有差异,因此,对潜在风险进行系统性的绝对定量评估比较困难。此外,体细胞核移植技术克隆动物不存在新基因插入所带来的风险,但这种风险可能存在于转基因动物中。因此,分析导致动物卫生风险的原因时,必须结合分析现有参考因素。
- 5) 总之,应确定风险评估所针对的特定问题。正如图4.1中显示,我们首先关注的是胚胎产生过程中的最基本环节,即从卵细胞和体细胞供体动物的选择到利用克隆技术产生一个新胚胎的全过程。第二个阶段我们要关注的是克隆胚胎的受体动物和动物卫生和护理。第三个阶段关注的是克隆胚胎所产生的克隆动物,对其评估需要有明确的指导建议。第四个阶段,也是最后一个阶段关注的是克隆动物所产生的后代(正常有性繁殖所产生的后代)或是克隆动物再进行克隆所得到的克隆动物(即克隆动物的再克隆)。

第4.12.5条

与胚胎相关的动物卫生风险管理

体外生产胚胎技术已应用多年,尽管一些研究新方法为动物克隆带来了新的技术,但与体细胞核移植技术相关的很多卫生风险已在动物繁殖生物技术中明确指出(本法典第4.9章)。从体细胞核移植方法学角度分析,操作程序可分解如下:

- 1) 卵细胞(源自屠宰厂,通过阴道超声引导方法获得或通过剖腹获得)。应按照第4.9章的标准要求,对从屠宰厂获得的卵巢进行收集、运输和加工。

主要风险与卵细胞供体动物的卫生状况和卵细胞的质量密切相关。

- 2) 供体细胞(来自需要克隆的动物细胞,一般通过活组织采集、屠宰后采集或动物死亡后采集)。目前尚未发现与体细胞核移植克隆技术相关的新风险。在细胞转移过程中,可能存在内源性反转录病毒被激活的风险,然而这一风险仅在理论上存在,实际发生的可能性不大。目前一些实验程序中,可能使用某些化学物质处理供体细胞以修饰其组成,如细胞周期抑制剂或染色质修饰剂等。

- 3) 重构胚胎的体外培养(供体细胞和受体细胞的融合以及重构胚胎的体外培养过程)。

- 4) 与供体细胞和去核卵细胞融合方法及培养条件相关的风险。

另外,操作者必须保证代孕动物种类及其解剖结构和生理机能均符合受孕条件。

1. 卵细胞

实验室或生产者必须详细记录卵巢的相关资料,包括卵巢的来源、卵巢供体动物的卫生状态,以及供体动物以往系统性损伤和所在种群的详细资料,这些资料有助于避免在收集卵巢过程中出现交叉污染的问题。

卵泡液中可含有多种传染病病原体，如牛病毒性腹泻病毒，可污染来自健康动物的卵泡液。此外，收集卵细胞时也可能被血液或其他非卵泡性外源性物质所污染，污染的程度与卵泡采集技术（如抽吸或卵泡切割）直接相关。在采集每批次卵泡液时，应准备一份可显示此批次未受其他生物因子污染的代表性样本。

卵细胞在卵丘卵母细胞复合体内成熟后，往往将其置于培养基内进一步成熟。在挑选卵细胞和卵细胞成熟过程中需十分小心谨慎，应从收集的卵细胞中选择形态较好的细胞，同时应使用检验合格的培养基，避免使用未经检测或来源不明的血清和蛋白成分。为避免条件致病菌污染，可在培养基中添加适量和安全的抗生素。

采用适当的清洁和消毒程序非常重要，在从事体外受精的实验室应特别强调这一问题。在胚胎成熟和进一步培育的过程中，应鼓励采用正确的操作方式，并遵守相关卫生条例。

2. 供体细胞

为减少风险：

- 需实施良好实验室规范，正确采集动物的供体细胞，并在符合卫生要求的条件下进行培养。
- 必要时，应记录克隆细胞的传代情况，而且需观察各个阶段抽检细胞样本的细胞系染色体组成。如有可能，采用合适的程序定期采集细胞样本以进行形态和其他生物学鉴定。
- 种细胞系（用于下一阶段的克隆）应采取最佳方法保存以维持其活力，并进行细菌、真菌、支原体及病毒检测，以确定无外源性物质污染（参照《国际胚胎技术协会手册》）。

3. 胚胎克隆或重构程序

考虑到胚胎质量和移植的成功率，克隆过程中需慎重使用化学试剂和其他试剂。

使用化学和物理方法进行受体与供体细胞融合时必须小心谨慎。应依据现有实验操作程序和相关学术报告，对胚胎克隆程序加以优化，以避免胚胎的早期死亡。

胚胎重构后，如需对胚胎细胞实施共培养，应认真筛选共培养的细胞，每一批细胞都需抽检一个样本，用于细菌、真菌、支原体和病毒的检测。

胚胎应在合适的时间段内进行培养和采集，以备移植或冷冻保存。胚胎的清洗和保存程序应严格按照国际标准（国际胚胎技术协会操作规范）进行。

移植胚胎前应对其等级认真进行评定（第4.8章和第4.9章）。

第4.12.6条

与受孕动物（代孕母畜）相关的风险管理

1) 代孕母畜的卫生风险

与体外胚胎相比，目前体细胞核移植技术的胚胎更容易造成怀孕失败，且在某些种群中容易导致胎盘异常。胚胎的缺陷和胚胎移植到代孕母畜体内的失败对代孕母畜并无危险，而且代

孕母畜完全可以吸收胚胎组织，并恢复代孕能力。如果在怀孕中后期出现自然流产，且胎儿及其胎盘不能从体内排出时，将对母畜产生危险。由于实验室诊断费用较高，肉牛及奶牛企业利润空间较低，对牛在自然交配和人工授精过程中发生的流产均未进行诊断。当动物群体的流产率超过3%~5%时，将引起畜主和兽医人员的担心。在评估体细胞核移植和其他繁殖技术对母畜怀孕产生的影响时，应考虑到潜在的外在因素，疫病、营养不良和恶劣环境条件等因素可影响动物的生殖力和胚胎存活率。在这些情况下，怀孕中出现的风险与应激因素直接相关，而与所使用的技术无关。

目前已观察到种群对胚胎移植的特殊影响。克隆胚胎异常的原因可能是供体细胞的遗传重编程不完全，不同动物种类的遗传重编程发生在胚胎发育的不同时间段。许多牛和绵羊的体细胞核移植（SCNT）克隆胚胎异常未在山羊和猪的克隆胚胎中出现。体外胚胎操作量与怀孕的成功率呈反比关系，该反比关系在体细胞核移植技术和体外受精胚胎中均已得到证实。与其他繁殖技术不同的是，体细胞核移植技术的妊娠失败现象可出现在牛孕期的任何阶段。孕后3~9个月内所出现的妊娠失败通常与水肿、脐部肿大和胎盘异常有关。

2) 代孕母畜给克隆胚胎带来的风险

与正常怀孕方式相比，目前没有发现代孕动物对克隆胎儿带来新的风险。在正常怀孕中可能会出现风险主要包括疫病的垂直传播，以及由于代谢和生理应激反应所产生的畸形。

在代孕动物对克隆胚胎的卫生风险方面，很难确定体细胞核移植技术相对其他技术的胚胎早期妊娠失败频率，因为没有对其他技术妊娠失败进行诊断统计，无法进行比较。此外，利用体细胞核移植克隆技术的妊娠同样也受到外界应激因素的影响。

兽医人员应需对整个怀孕过程进行观察，因为与其他繁殖技术中出现的怀孕异常一样，在常规体检中可诊断这些异常。如有可能，应对克隆怀孕中出现的问题进行收集整理并建立一个数据库，这将有利于动物卫生专家的工作。

- 胚胎移植前，应认真评价代孕母畜的总体卫生状况，具体的卫生指标应包括：没有感染和疫病，疫苗的合理使用等。如可能，追踪母畜成功受孕、无生产问题及产后顺利康复的相关资料。
- 体细胞核移植技术胚胎妊娠失败最容易发生在牛移植怀孕后的60天内，这与其他繁殖技术的情况很相似，但体细胞核移植克隆胚胎在胎盘形成时间内（怀孕后45~60天）最容易发生妊娠失败，这表明胚胎死亡可能是由胎盘异常所引起。胎盘异常会导致有害物质在胎儿及其胎衣聚积，或导致母畜无法向胎儿提供足够的营养和氧。在怀孕期间，应对怀孕母畜进行仔细观察。一旦确认怀孕，对怀孕母畜的卫生状况需进行定期的检查和评估，并一直持续到生产。
- 为了确定代孕母畜是否怀孕并在孕期最初的3个月跟踪母畜健康的情况，应使用B超进行检查，并测定激素水平和常规生理指标。在检查结果的基础上，提供有针对性的管理和营养方案，保证怀孕的顺利进行。
- 在临产时，需要仔细观察怀孕母畜的分娩信号。在某些动物种类中，普遍出现的一个问题是

宫缩乏力和无宫缩。无宫缩可导致推迟产期，并容易产生后遗症，因此，出现该情况时需要进行助产。

- 必要时，应在临产时进行手术助产。手术中应采取相应步骤，以确保胎儿和母畜的安全。
- 手术可能会对动物产生损害，比如手术中过度的牵引、胎衣滞留等。出现此类情况时，必须在产后对动物进行细心照料。

3) 克隆动物卫生风险的管理

在妊娠期间和产后均可出现克隆动物卫生问题，问题类型与其他辅助繁殖技术的问题相同，但克隆动物卫生问题更为常见，关键是应确定问题是遗传因素还是后天因素所引起的。如果体外操作不佳，在羊和牛出现胎儿巨大综合征的现象将特别明显，这种综合征可能与胎盘异常有关，而与胎儿畸形无关。在小反刍动物中，该综合征发生的频率较低。

- 为了保证克隆动物的健康，合理的饲养方法比较重要。应为新生儿保证提供初乳和洁净的卫生环境，并在出生后的数周内进行监测。
- 应系统地针对克隆动物常见表型异常进行检查，如肛门闭锁、脐疝、屈肌收缩、心脏与呼吸功能不全和不会吸乳。这些措施可加强对新生动物的有效护理，从而提高克隆动物的成活率。
- 不明原因或由于系统性并发症所导致的死亡目前已见报道，因此，为了确定克隆动物的健康状态，需要对其进行全面的检查。提倡跟踪观察克隆动物的健康状况，动物健康检查记录应至少持续到动物的性成熟阶段，包括记录其繁殖能力（繁殖力指标）。
- 在与克隆技术相关的各种争议中，经常会提及胎儿巨大综合征和其他严重畸形问题。应开展此方面的研究，并建立同行评议数据。应依据动物种类对克隆动物进行动物福利评估。如在最初筛查时发现福利方面的问题，则应对其表型开展更深入的特性研究，以获取相关信息。
- 应对动物群的各个生长阶段（从动物出生至其初情期）开展适当的监视，并加以记录，以确认和验证克隆动物的基因性状。

4) 与克隆动物有性繁殖后代有关的卫生风险管理

当前尚没有证据表明，克隆动物经有性繁殖后产生的后代所面临的卫生风险有升高的迹象。一些数据显示，在克隆过程中产生的基因重排错误可在接下来的有性繁殖过程中得到纠正。

- a) 对卫生状况和动物福利相关内容的鉴定，将有助于提供关于有性繁殖后代的信息。
- b) 观察克隆动物有性繁殖产生后代的繁殖力将有利于评价其繁殖力与正常动物的差别。

5) 再克隆或克隆动物再克隆生产的动物相关卫生风险管理

近来刚开始有了一些关于再克隆动物的信息，因此，有必要实施以下措施：

- a) 为加强对再克隆动物卫生情况的了解，应确定克隆动物经再次克隆产生的动物卫生特征（卫生状况和动物福利方面的信息）。
- b) 应观察再克隆动物的繁殖力，并与正常动物进行比较。

第4.12.7条

总结

本章主要目的是通过与其他繁殖技术的比较，提出对体细胞核移植克隆动物进行动物卫生风险评估的科学依据和建议，这些建议着重关注风险评估、预防措施以及引导体细胞核移植技术在家畜和马生产中的科学应用。这些内容将随着科学知识的更新而进一步完善。

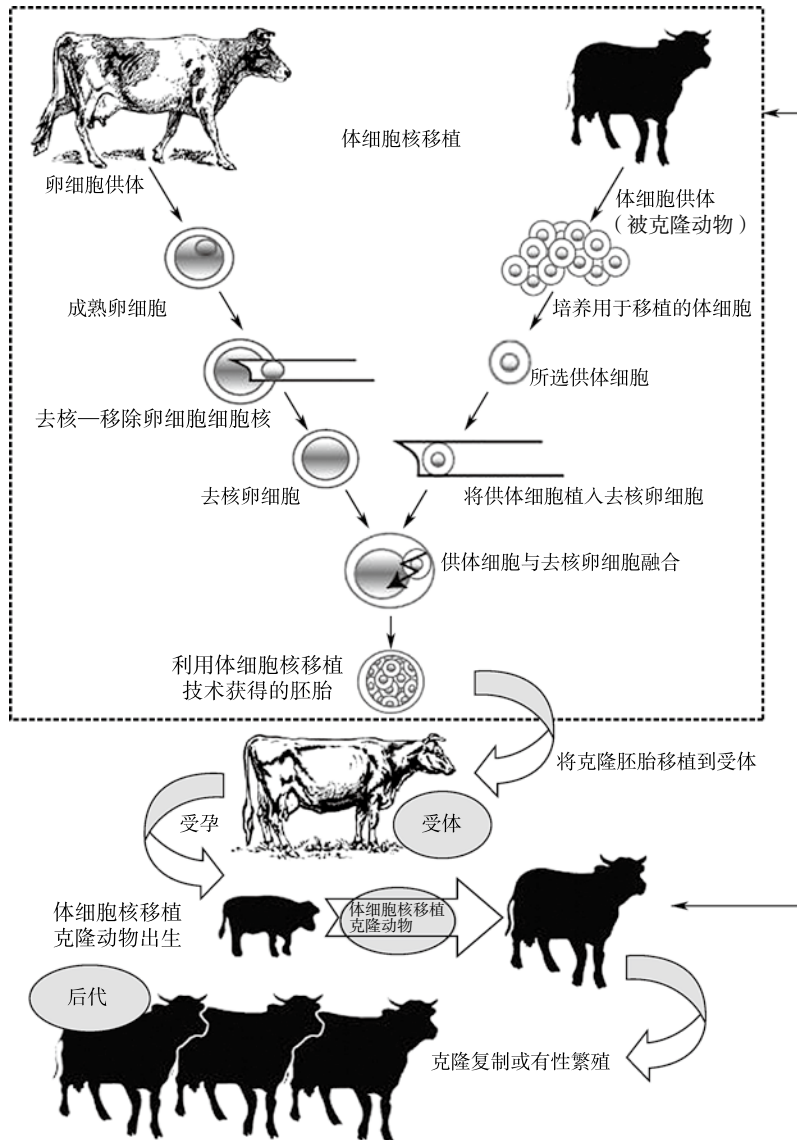


图4.1 体细胞核移植技术及克隆动物的再克隆

注：于2008年首次通过，于2017年最新修订。