

บทความ

เรื่อง การประเมินความเป็นพิษเฉียบพลัน ทางปาก ด้วยวิธี Class Method

หัวข้อย่อยที่ 1/3: หลักการและการเตรียมการทดสอบ

ผู้แปลและจัดทำ: สพ.ญ.ขวัญชนก พงษ์ประดิษฐ์



ภาพที่ 1 หนูแรทขณะถูกป้อนสารทดสอบ (oral gavage)



ภาพที่ 2 สภาพการเลี้ยง ขณะทดสอบ

แปลและเพิ่มเติมจาก

OECD-GLP, Section 4, Test number 423

แหล่งอ้างอิง

OCED/GLP. (2001). *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method.*

doi:<http://dx.doi.org/10.1787/9789264071001-en>

การประเมินความเป็นพิษเฉียบพลัน ทางปาก คือ

การทดสอบเพื่อวัดผลกระทบต่ออวัยวะชีวภาพแบบเฉียบพลัน จากการป้อนสารทดสอบเพียงครั้งเดียวหรือหลายครั้งภายใน 24 ชั่วโมง (OCED/GLP, 2001) แล้วเก็บข้อมูลอัตราการตาย (Mortality rate) อัตราการป่วย (Morbidity) และอัตราการป่วยตาย (Fatality rate) ผลการทดสอบสามารถจัดระดับความเป็นพิษของสารทดสอบได้ตามระบบ Globally Harmonized System (GHS)¹ และประมาณค่า LD50 (LD50 cut off) ได้ ข้อมูลจากการทดสอบมีประโยชน์ต่อกรรมวิธีการผลิต การจัดการสารทดสอบ และการนำสารทดสอบไปใช้อย่างถูกต้องและปลอดภัย

การทดสอบ Acute Oral Toxicity มี 3 วิธีคือ Fixed Dose, Up and Down method และวิธีที่นิยมมากที่สุดคือ Class Method ซึ่งจะอธิบายหลักการวิธีการทดสอบและการแปลผลอย่างละเอียดในบทความเรื่องนี้ โดยแบ่งออกเป็น 3 หัวข้อย่อย ตามลำดับ คือ

1/3 หลักการและการเตรียมการทดสอบ

2/3 วิธีการทดสอบ

3/3 การเก็บข้อมูลและการเขียนรายงานผล

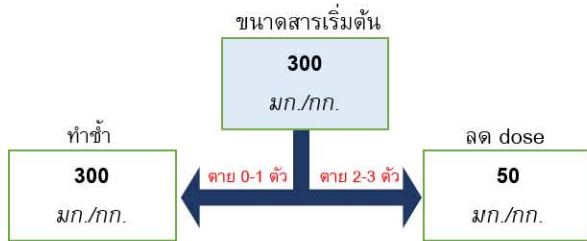
นิยาม

- ▲ Dose คือ น้ำหนักหรือขนาดของสารที่ใช้ป้อน ต่อน้ำหนักตัวสัตว์ มีหน่วยเป็น มก./กก.
- ▲ Concentration คือความเข้มข้นของสารในตัวทำละลายทั้งหมด มีหน่วยเป็น มก./มล.
- ▲ Volume คือ ปริมาณสารทดสอบที่เป็นของเหลว หน่วยเป็น มล.

¹ Globally Harmonized Classification System (GHS) เป็นระบบการจัดกลุ่มสารเคมีและสารผสมต่างๆ ในผลิตภัณฑ์เคมีที่ใช้อ้างอิงทั่วโลก บ่งบอกข้อมูลความอันตรายที่เกิดจากสารเคมีต่อสุขภาพมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ข้อมูลของ GHS จะช่วยลดความซ้ำซ้อนและค่าใช้จ่ายในการทดสอบและประเมินสารเคมีชนิดเดียวกัน

▶▶▶ หลักการทดสอบ Acute Oral Toxicity ด้วยวิธี class method

Class Method คือ การทดสอบที่แบ่งเป็นลำดับขั้นตอน โดยเริ่มการป้อนที่ขนาดสารเริ่มต้น (starting dose) 1 ใน 4 ขนาด ดังต่อไปนี้ คือ 5, 50, 300 และ 2,000 มก./กก. (หลักการเลือกสารจะกล่าวในหัวข้อ 2/3) ผลการทดสอบแต่ละขั้นตอน จะได้จำนวนสัตว์ที่ป่วยและ/หรือตาย เพื่อใช้พิจารณาทำขั้นตอนต่อไป อาจเป็นการให้ขนาดสาร (doses) ที่มากขึ้นหรือลดลง หรือยุติการทดสอบอย่างใดอย่างหนึ่ง (ภาพที่ 1) โดยปกติใช้เพศเมีย 3 ตัวต่อ 1 ขั้นตอนซึ่งถือเป็นวิธีที่ใช้สัตว์น้อยมาก แต่ยังสามารถแปลผลเพื่อจัดระดับความเป็นพิษของสารเคมีตาม GHS (มี 5 Category) และได้ค่า LD50² รายละเอียดของหลักการและข้อเสนอแนะ จะอธิบายเป็นข้อๆ ดังนี้



ภาพที่ 3 แผนผังแสดงตัวอย่าง 2 ขั้นตอนการทดสอบ เริ่มที่ 300 มก./กก. คือขั้นตอนที่ 1 และอัตราการตายจากผลของขั้นตอนที่ 1 จะใช้พิจารณาการใช้ dose ในขั้นตอนที่ 2 ต่อไป คือหากพบว่าสัตว์ตายไม่เกิน 1 ตัวให้ทดสอบซ้ำที่ 300 มก./กก. แต่หากตาย 2-3 ตัวให้ทดสอบต่อที่ 50 มก./กก.

หลักการเบื้องต้น

- ▶ ไม่จำเป็นต้องป้อนสารทดสอบใน doses ที่มีข้อมูลแน่ชัดแล้วว่า มีฤทธิ์กัดกร่อนหรือระคายเคืองอย่างรุนแรง
- ▶ สัตว์ที่มีอาการเจ็บปวดรุนแรง ทุกข์ทรมานยาวนาน หรือมีสภาพใกล้ตาย (moribund state) ในระหว่างการทดสอบต้องถูกยุติโดยทำเมตตาฆาต และถูกนำไปแปลผล เช่นเดียวกับสัตว์ที่ตายระหว่างการทดสอบ
- ▶ เจ็บใจที่ใช้พิจารณาว่า สัตว์อยู่ในระยะที่ควรทำเมตตาฆาตหรือไม่ ระบุไว้ใน Humane Endpoint Guideline Document ซึ่งจะแสดงในบทความเรื่องต่อไป

- ▶ Dose ที่ใช้ในการทดสอบวิธี class method ได้ถูกกำหนดไว้แล้ว (pre-defined doses) ที่ 5, 50, 300 และ 2,000 มก./กก. และควรเลือกใช้ตามที่กำหนด เพื่อที่ผลการทดสอบจะสามารถใช้จัดระดับสารเคมีได้ ตามระบบ GHS
- ▶ ผลการทดสอบวิธีนี้ จะไม่ได้ค่า LD50 ที่แม่นยำ แต่สามารถใช้ประเมินค่าที่ใกล้เคียงได้จากอัตราการตายของสัตว์ในกลุ่มการทดสอบ เมื่อได้ป้อนสารอย่างน้อย 2 doses โดยมีอัตราการตายระหว่าง 0-100%
- ▶ การกำหนดค่า pre-defined doses โดยไม่คำนึงว่าเป็นสารชนิดใด ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่มีจำนวนเท่ากันในทุกๆ ขั้นตอน จะช่วยเพิ่มความสม่ำเสมอของการรายงานผล และช่วยลดความสูญเสียในการทำซ้ำ
- ▶ ก่อนเริ่มการทดสอบ ควรทราบข้อมูลของสารทดสอบจากการศึกษาก่อนหน้า เช่น ข้อมูลคุณลักษณะและโครงสร้างเคมี, คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (Physiochemical properties), ผลการศึกษาจากห้องปฏิบัติการ (in vitro) และการทดสอบในสัตว์ (in vivo), ข้อมูลพิษวิทยาของสารทดสอบ, เป้าหมายของการนำสารทดสอบไปใช้ เป็นต้น
- ▶ ข้อมูลเหล่านี้มีความจำเป็นต่อการเลือกใช้ขนาดสารทดสอบเริ่มต้น ลักษณะอาการของสัตว์ที่ต้องเฝ้าระวัง และใช้เป็นข้อมูลประกอบการแปลผล

² LD50 (Medium lethal Oral Dose) คือขนาดของสารทดสอบต่อน้ำหนักตัวสัตว์ ที่ป้อนเพียงครั้งเดียวแล้วทำให้เกิดการตาย 50% ของกลุ่มสัตว์ทดสอบ

การเลือกใช้สัตว์ทดลอง

- ♣ **ชนิดสัตว์** – เป็น Rodent ชนิดใดก็ได้ แต่แนะนำหนูแรท (rat)
- ♣ **เพศ** – เพศใดก็ได้ แต่แนะนำเพศเมีย เพราะจากผลการทดสอบมากมายพบว่า เพศเมียตอบสนองต่อความเป็นพิษมากกว่าเพศผู้ (ต่างเพียงเล็กน้อย) โดยเพศเมียที่ใช้ทดสอบต้องไม่เคยผ่านการคลอดลูก (nulliparous) หรือกำลังตั้งครรภ์ (non-pregnant) หากสารทดสอบมีคุณสมบัติการเกิดพิษสัมพันธ์กับเพศหรือฮอร์โมนเพศผู้ ก็ควรเลือกใช้เพศผู้
- ♣ **อายุ** – ใช้วัยรุ่นสุขภาพดี (healthy young adult) มีอายุในวันเริ่มทดสอบ (วันป้อนสาร) ที่ 8-12 สัปดาห์
- ♣ **น้ำหนัก** – ไม่ได้ระบุชัดเจนในคู่มือ แต่ที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ กำหนดไว้ที่ 180-220 กรัม และน้ำหนักวันที่เริ่มการทดสอบต้องไม่แตกต่างกัน $\pm 20\%$ จากน้ำหนักเฉลี่ยของสัตว์ กลุ่มที่ทดสอบในขั้นตอนก่อนหน้า

สภาพแวดล้อมการเลี้ยงและอาหาร

- ♣ **อุณหภูมิ** – ในห้องทดสอบสัตว์ อยู่ในช่วง $22 \pm 3^\circ\text{C}$
- ♣ **ความชื้นสัมพัทธ์** – กำหนดไว้ที่ 30 ถึง 70% แต่ช่วงที่เหมาะสมมากที่สุดคือ 50 ถึง 60%
- ♣ **ความสว่าง** – มีแสง 12 ชั่วโมงและมีมืด 12 ชั่วโมง
- ♣ **อาหารและน้ำ** – ต้องสะอาดและเหมาะสมสำหรับสัตว์ทดลอง สามารถให้ได้แบบไม่จำกัด (Ad libitum)
- ♣ **ความหนาแน่นการเลี้ยง** – ไม่ได้กำหนดชัด แต่ภายใน 1 กรง ต้องได้รับสาร doses เดียวกันทั้งหมด และไม่หนาแน่นจนรบกวนการสังเกตอาการของผู้ปฏิบัติงาน

การจัดกลุ่มและปรับสภาพ

- ♣ **จัดกลุ่ม** - โดยการสุ่ม (random) แล้วทำเครื่องหมายประจำตัวสัตว์ให้ชัดเจน หลังจากนั้นเลี้ยงต่อไปโดยปราศจากการทดสอบอย่างน้อย 5 วัน เรียกช่วงนี้ว่า **การปรับสภาพสัตว์** (Acclimatization)

การเตรียมสารทดสอบ

- ♣ **คุณลักษณะสารทดสอบ** - สารที่บ่อนต้อง (ทำให้) มีลักษณะเป็นสารละลายในน้ำ (aqueous solution) สารแขวนลอย (Suspension) หรือสารแขวนตะกอน (emulsions) ของเหลวที่เป็นตัวทำละลายอาจเป็นน้ำหรือน้ำมันก็ได้ แต่หากไม่ใช้น้ำกลั่น/น้ำสะอาด ต้องแสดงรายละเอียดด้านพิษวิทยาของตัวทำละลายนั้น
- ♣ **การเตรียม Dose หรือขนาดสารทดสอบ** - สารทดสอบที่มีลักษณะดั้งเดิมเป็นของเหลว (1) อยู่แล้ว คำนวณการให้ตามปริมาตร (Volume)
- ♣ สำหรับสารที่ต้องทำละลาย (2) จะถูกคำนวณการให้เป็นความเข้มข้น (concentration) เสียก่อน ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญและไม่ควรเกิดความผิดพลาด ดังนั้นต้องมีขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ หรือตามแต่ผู้ตรวจประเมินระบบกำหนด
- ♣ **ปริมาณการป้อนต่อตัวสัตว์** - สารทั้ง 2 กรณี (1,2) คิดปริมาณการให้สูงสุดตามน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง โดยทั่วไปให้ 1 มล./น้ำหนักสัตว์ 100 กรัม แต่บางกรณีที่เป็นสารละลายในน้ำ สามารถให้ 2 มล./น้ำหนักสัตว์ 100 กรัมได้ หลังพิจารณาความเหมาะสมแล้ว
- ♣ **ระยะเวลาเตรียมสารทดสอบก่อนป้อน** - ควรสั้นที่สุด เพื่อให้ความคงตัวของสารและคุณสมบัติอื่นๆ ไม่เปลี่ยนแปลง เว้นแต่มีข้อมูลความคงตัวของสารทดสอบ (Stability) ที่ยอมรับได้