

บทความ

เรื่อง การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน ทางปาก ด้วยวิธี Class Method

หัวข้อย่อยที่ 2/3: วิธีการทดสอบและการเลือกใช้ขนาดสารเริ่มต้น

ผู้แปลและจัดทำ: สพ.ญ.ขวัญชนก พงษ์ประดิษฐ์

จากบทความฉบับแรก กล่าวถึงหลักการทดสอบพิษเฉียบพลันทางปาก ด้วยวิธี class method รวมถึงการเตรียมสัตว์ทดลอง สภาพแวดล้อมการเลี้ยงและสารทดสอบ ในบทนี้จะอธิบายถึงขั้นตอนต่อไป คือการเลือกขนาดสารและขั้นตอนการปฏิบัติ ขนาดสารเริ่มต้น (starting dose) มี 4 ขนาดคือ 5, 50, 300 และ 2,000 มก./กก. และมีกรณีพิเศษที่เริ่มด้วย 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัว

หลักเกณฑ์การเลือกขนาดสารทดสอบเริ่มต้น ต้องอ้างอิงจากงานวิจัยหรือการทดสอบในอดีต โดยเน้นที่ข้อมูลการตายหรือความเป็นพิษเฉียบพลัน หากไม่เคยศึกษามาก่อน แนะนำให้เริ่มที่ 300 มก./ กก. น้ำหนักตัว แต่หากเป็นสารที่เคยศึกษาแล้ว พบว่ามีความปลอดภัยสูงหรือไม่มีความเป็นพิษ แนะนำให้เริ่มที่ขนาดสูงสุด (Limit dose) ดังตารางที่ 1



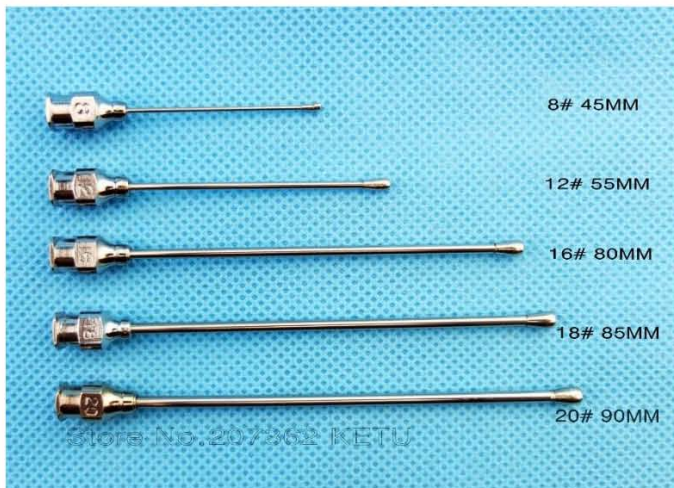
ตารางที่ 1 หลักการเลือกขนาดสารทดสอบเริ่มต้น ต้องอ้างอิงจากข้อมูลทางวิชาการอื่น ๆ

ขนาดสูงสุดถูกควบคุมให้มี 2 ค่าคือ 2,000 และ 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัว ไม่สามารถใช้ขนาดที่สูงกว่านี้ได้แล้ว สำหรับการทดสอบ Acute Oral Toxicity Testing แบบ Class Method การเลือกว่าจะเริ่มที่ 2,000 หรือ 5,000 ให้อ้างอิงจากข้อมูลเป็นหลัก โดยสารทดสอบที่มีความสำคัญ จำเป็นต้องใช้มากกว่า 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว จึงจะก่อให้เกิดคุณประโยชน์ต่อคน สัตว์และสิ่งแวดล้อม จึงให้เริ่มทดสอบที่ 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัว ทั้งนี้ต้องผ่านการทบทวนจาก "คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง" เสียก่อน เนื่องจากมีความเสี่ยงต่อสวัสดิภาพสัตว์ทดลองอย่างมาก

อุปกรณ์และขั้นตอนการป้อนสารทดสอบ

1. อุปกรณ์ ใช้เข็มป้อนสาร (มีชื่อเรียกหลากหลาย เช่น Stomach tube, intubation cannula, feeding tube หรือ gavage needle/tube) ปัจจุบันทำจากวัสดุ 3 ชนิดคือโลหะ พลาสติกและยาง ขนาดและความยาวต้องเลือกให้เหมาะสม ดังตาราง โดยใช้ความยาวตั้งแตริมฝีปากจนถึงปลายลิ้นปี่ (Xyphoid Process) ในท่ายึดคอ

	หนูแรท	หนูเม้าส์
ขนาด (Gauge, G)	16G - 20G	18G - 24G
ความยาว (ซม., นิ้ว)	3.8 - 10 ซม. (1.5 - 4 นิ้ว)	2.5 - 3.8 ซม. (1.0 - 1.5 นิ้ว)



ภาพที่ 1 ตัวอย่างเข็มป้อนสารที่ทำจาก Stainless Steel ในขนาดต่างๆ
ที่มา KETU store, China



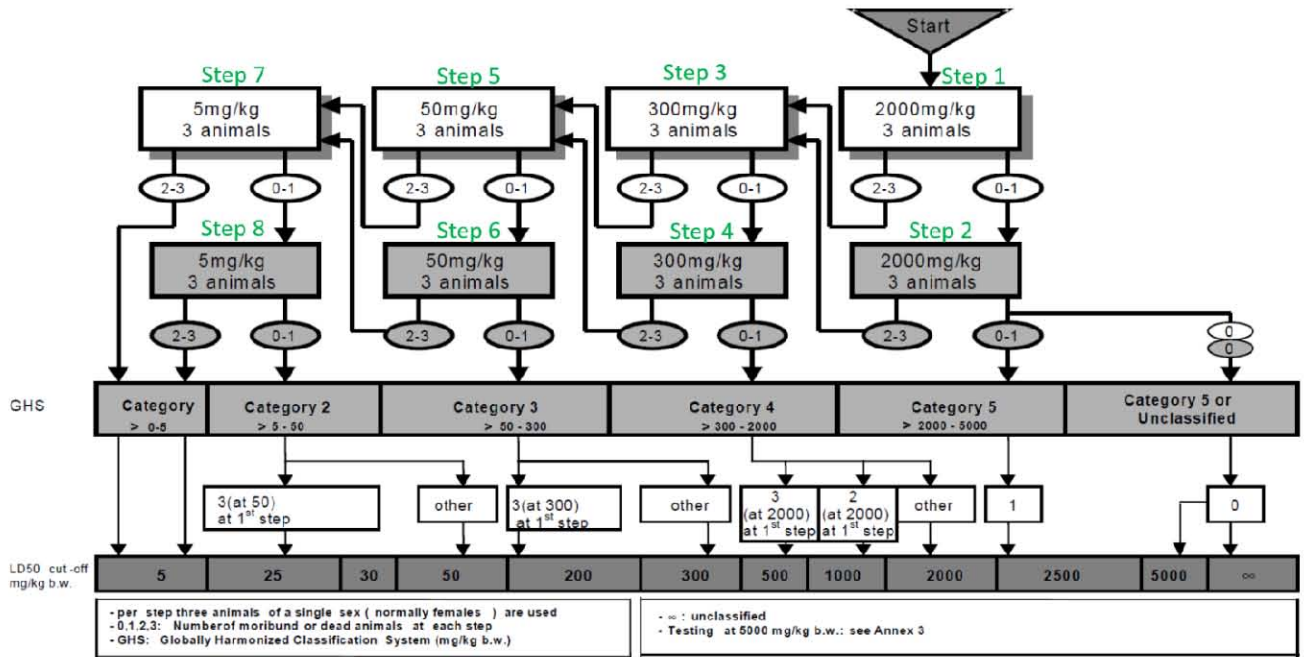
ภาพที่ 2 วิธีการวัดความยาวเข็มป้อนสาร ในหนูเม้าส์
ที่มา SOP: ACC-2012-Tech09, UBC Animal Care Guideline

2. การอดอาหารสัตว์ ต้องอดอาหาร (fasting) และชั่งน้ำหนักตัวสัตว์ก่อนป้อนสารทดสอบ ยกเว้นน้ำ ที่ให้กินได้ตามปกติ ระยะเวลาการอดอาหารของหนูแรทและหนูเม้าส์แตกต่างกัน ดังนี้

	หนูแรท	หนูเม้าส์
ก่อนป้อนสารทดสอบ	8 - 12 ชั่วโมง	3 - 4 ชั่วโมง
หลังป้อนสารทดสอบ	3 - 4 ชั่วโมง	1 - 2 ชั่วโมง
----- ไม่ต้อง งดน้ำ -----		

จุดประสงค์การอดอาหารก่อนและหลังป้อนสารทดสอบ เพื่อไม่ให้อาหารไปรบกวนกระบวนการแตกตัวหรือการดูดซึม แต่หากป้อนสารแบบแบ่งให้หลายครั้งๆ (fraction) อาจจำเป็นต้องให้ควบคู่กับอาหารไปเลย หรือขึ้นอยู่กับระยะเวลาการป้อนสารเสร็จสิ้น

3. ขั้นตอนการป้อน



ภาพที่ 3 แผนผังแสดงการเริ่มทดสอบสารที่ 2,000 mg/kg และลำดับขั้นตอนต่อไป โดยพิจารณาจากอัตราการตายและป่วยตายของกลุ่มสัตว์ทดลอง

ยกตัวอย่างขั้นตอนการทดสอบเริ่มที่ 2,000 มก./กก. (Step 1) เพื่อเป็นแนวทางการอ่าน flow chart สำหรับขนาดสารทดสอบอื่นๆ ต่อไป คำอธิบายตามภาพที่ 3

Step 1 ป้อนสารทดสอบครั้งแรกที่ขนาด 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว ให้หนูทดลองทั้งหมด 3 ตัว จากนั้นสังเกตอาการนาน 14 วัน ผลมี 2 ลักษณะ คือ

▶ พบสัตว์ป่วยหรือตาย 0-1 ตัว ให้ทำ Step 2 จัดกลุ่มหนูทดลองเพิ่มอีก 3 ตัว แล้วป้อนซ้ำที่ขนาด 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว สังเกตอาการนาน 14 วัน ผลมี 3 ลักษณะ

- ▶ ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย ตั้งแต่การป้อนครั้งแรก (Step1+2 = 0) **สรุปได้ว่า** สารทดสอบอยู่ในกลุ่ม category 5 หรือ unclassified มีค่า LD50 มากกว่า 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัว จนถึงประมาณการไม่ได้
- ▶ พบสัตว์ป่วยหรือตาย 1 ตัว ในกาป้อน Step 1 **สรุปได้ว่า** สารทดสอบอยู่ในกลุ่ม category 5 มีค่า LD50 เท่ากับ 2,500 มก./กก. น้ำหนักตัว
- ▶ พบสัตว์ป่วยหรือตาย 2-3 ตัว ต้องจัดกลุ่มและเปลี่ยนความเข้มข้นสารทดสอบเป็น 300 มก./กก. น้ำหนักตัว (ดู STEP 3)

▶ พบสัตว์ป่วยหรือตาย 2-3 ตัว ให้เปลี่ยนความเข้มข้นเป็น 300 มก./กก. น้ำหนักตัว ในขั้นตอนต่อไป (ดู STEP 3)

Step 3 จัดกลุ่มหนูทดลอง 3 ตัว เพื่อป้อนขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัว สังเกตอาการ 14 วัน ผลมี 2 ลักษณะ

▷ พบสัตว์ป่วยหรือตาย 0-1 ตัว ให้จัดกลุ่มหนูทดลองเพิ่ม 3 ตัว Step 4 ป้อนซ้ำที่ขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัว สังเกตอาการต่อภายใน 14 วัน ผลมี 2 ลักษณะ

▶ พบสัตว์ป่วยหรือตาย 0-1 ตัว **สรุปได้ว่า**สารทดสอบอยู่ในกลุ่ม category 4 ค่า LD50 คัดจากผลการทดสอบที่ขนาด 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว (STEP 1) คือ

⇒ ป่วยหรือตาย 3 ตัว จากผลการทดสอบที่ STEP 1 มีค่า LD50 เท่ากับ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว

⇒ ป่วยหรือตาย 2 ตัว จากผลการทดสอบที่ STEP 1 มีค่า LD50 เท่ากับ 1,000 มก./กก. น้ำหนักตัว

⇒ ป่วยหรือตาย 0-1 ตัว จากผลการทดสอบที่ STEP 1 มีค่า LD50 เท่ากับ 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว

▶ พบสัตว์ป่วยหรือตาย 2-3 ตัว ให้จัดกลุ่มหนูทดลองเพิ่ม 3 ตัว แล้วเปลี่ยนความเข้มข้นเป็น 50 มก./กก. น้ำหนักตัว (Step 5 : ไม่ได้อธิบายต่อ)

▷ พบสัตว์ป่วยหรือตาย 2-3 ตัว ให้จัดกลุ่มหนูทดลองเพิ่ม 3 ตัว แล้วเปลี่ยนความเข้มข้นเป็น 50 มก./กก. น้ำหนักตัว (Step 5 : ไม่ได้อธิบายต่อ)

หมายเหตุ สำหรับวิธีการทดสอบที่เริ่มด้วย 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัว อยู่ในเอกสารแนบท้าย

4. ระยะเวลาการป้อนสารในแต่ละ Step ขึ้นอยู่กับข้อมูลเวลาที่สัตว์เริ่มแสดงอาการ (onset) ระยะเวลาที่สัตว์แสดงอาการ (duration) ระดับความรุนแรงของอาการ (severity of sign) เพื่อให้มั่นใจจำนวนของสัตว์ที่ป่วยหรือตายในแต่ละกลุ่ม ก่อนเริ่มขนาดสารถัดไป

----- จบ -----

เอกสารอ้างอิง

Andrew, K., & McErlance, S. (2015). *Oral Dosing (gavage) in adult Mice and Rat*. Retrieved from

<https://animalcare.ubc.ca/sites/default/files/documents/TECH%2009%20Oral%20Dosing%20%28Gavage%29%20%282015%29.pdf>

Integrity, O. f. (2018). *ADMINISTRATION OF SUBSTANCES BY ORAL GAVAGE IN MICE AND RATS*. The University of Melbourne. Retrieved 2018, from

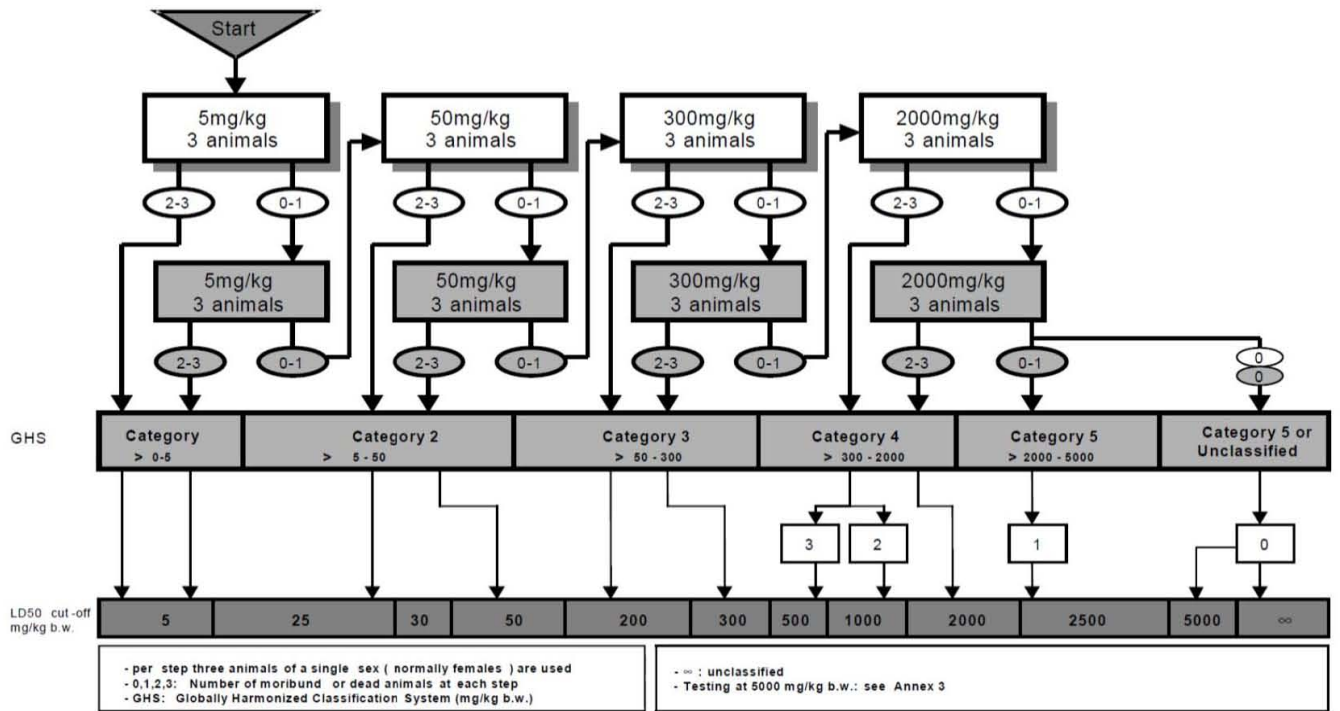
https://staff.unimelb.edu.au/_data/assets/pdf_file/0005/1974344/STANDARD-Oral-gavage-in-mice-and-rats-FINAL.pdf

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

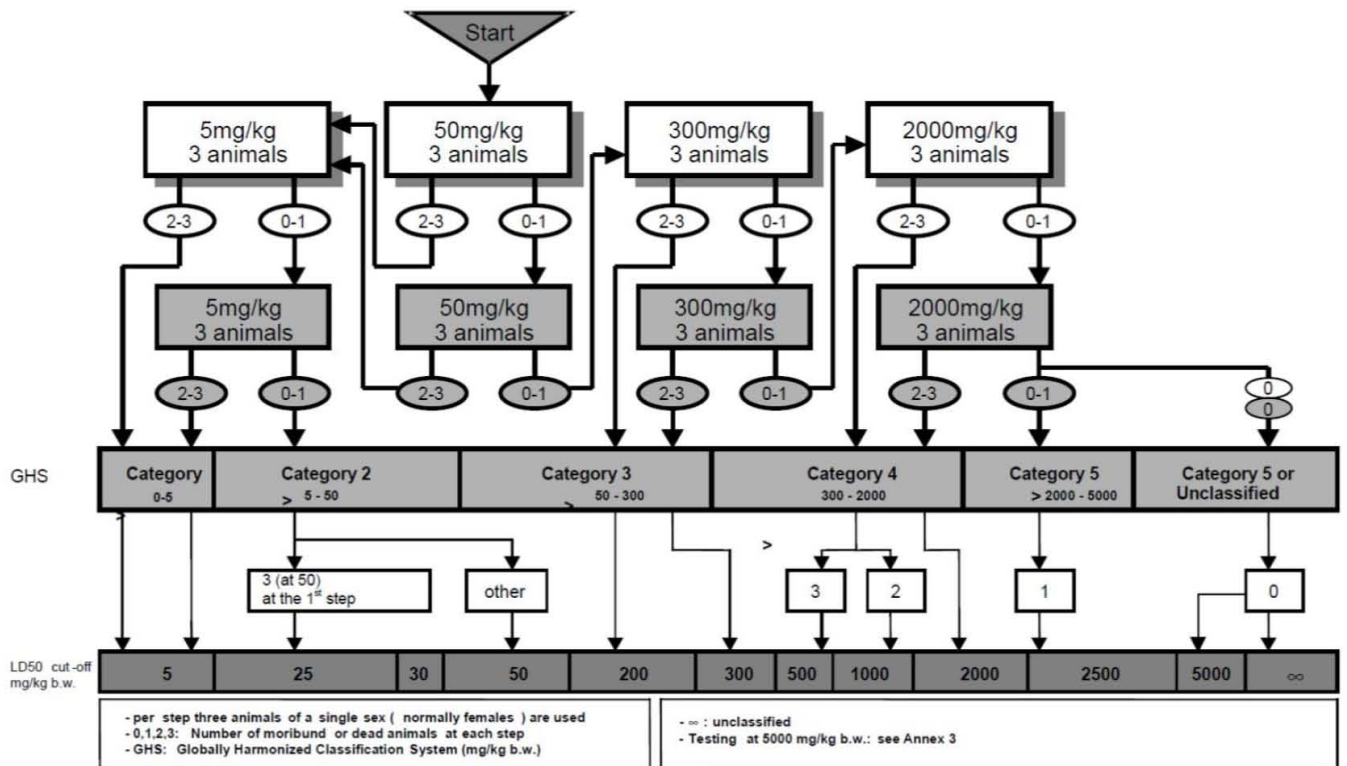
doi:<http://dx.doi.org/10.1787/9789264071001-en>

เอกสารแนบ

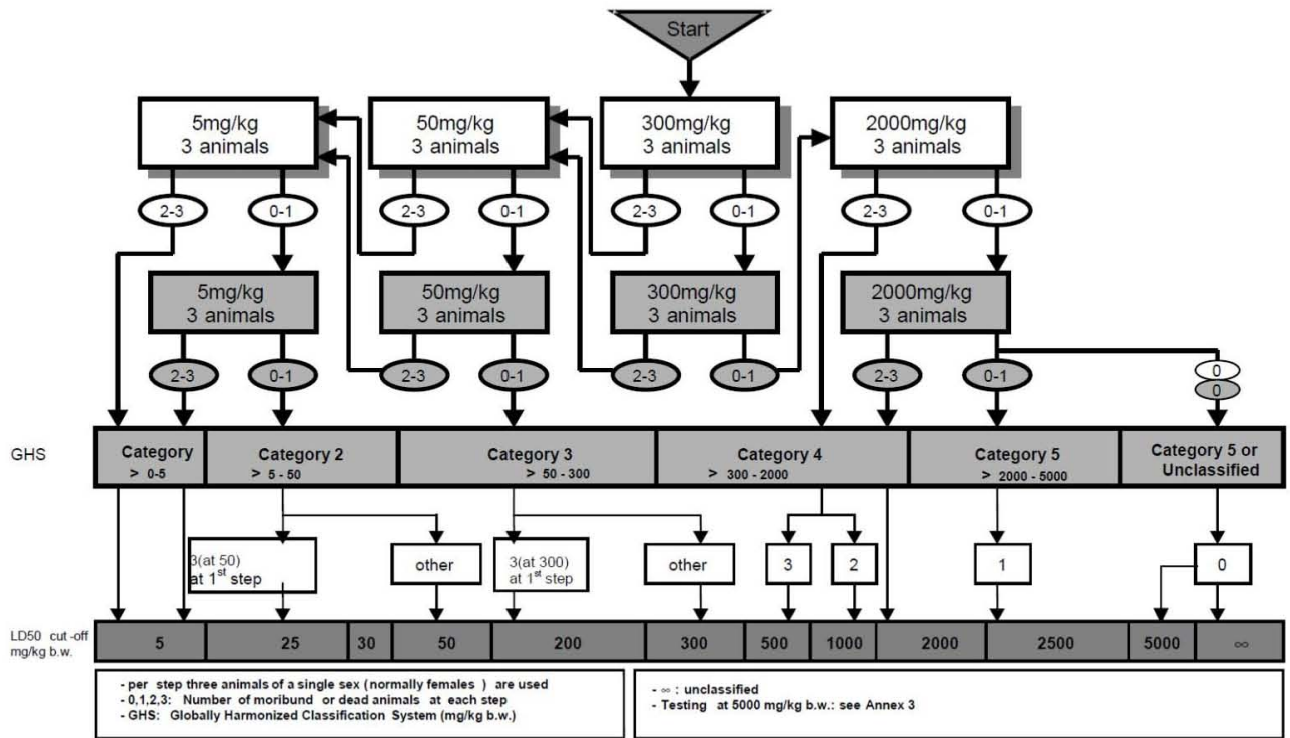
แสดงขั้นตอนและหลักเกณฑ์การป้อนสาร เริ่มที่ขนาด 5, 50, 300 และ 2,000 มก./กก น้ำหนักตัว รวมถึงขนาด 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัว ซึ่งต้องผ่านการพิจารณา ก่อนเริ่มทดสอบอย่างถี่ถ้วน



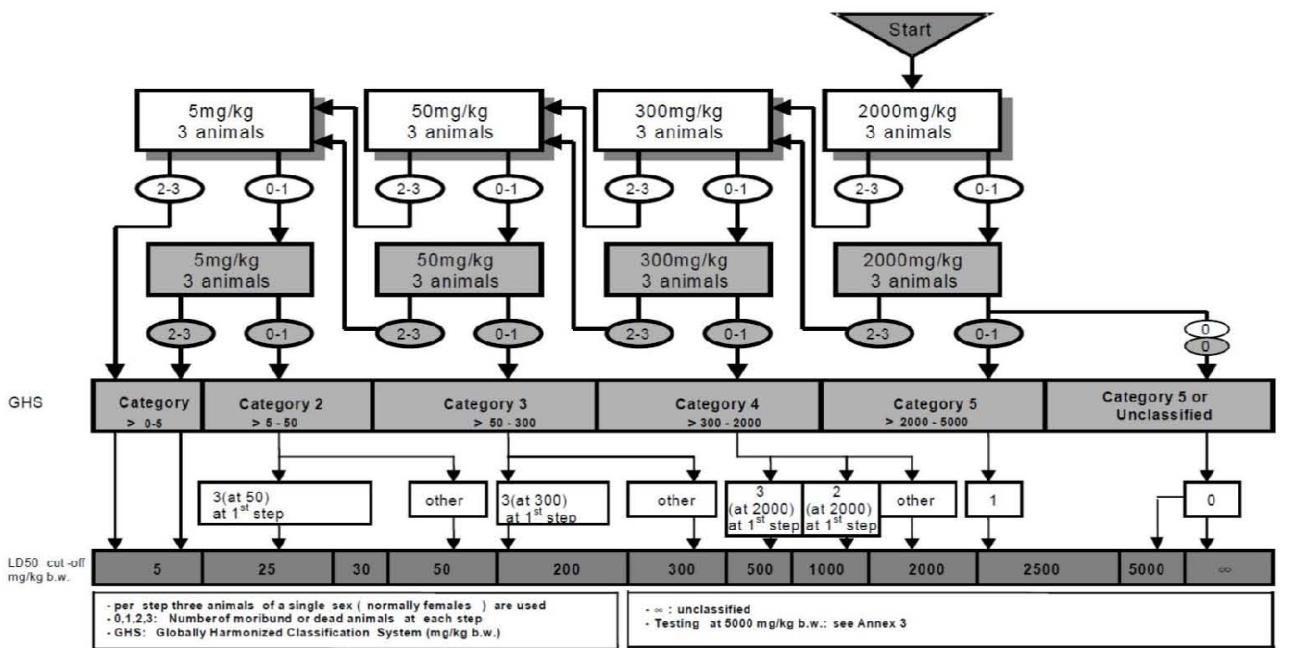
ภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการป้อนสาร เริ่มที่ขนาด 5 มก./กก. น้ำหนักตัว



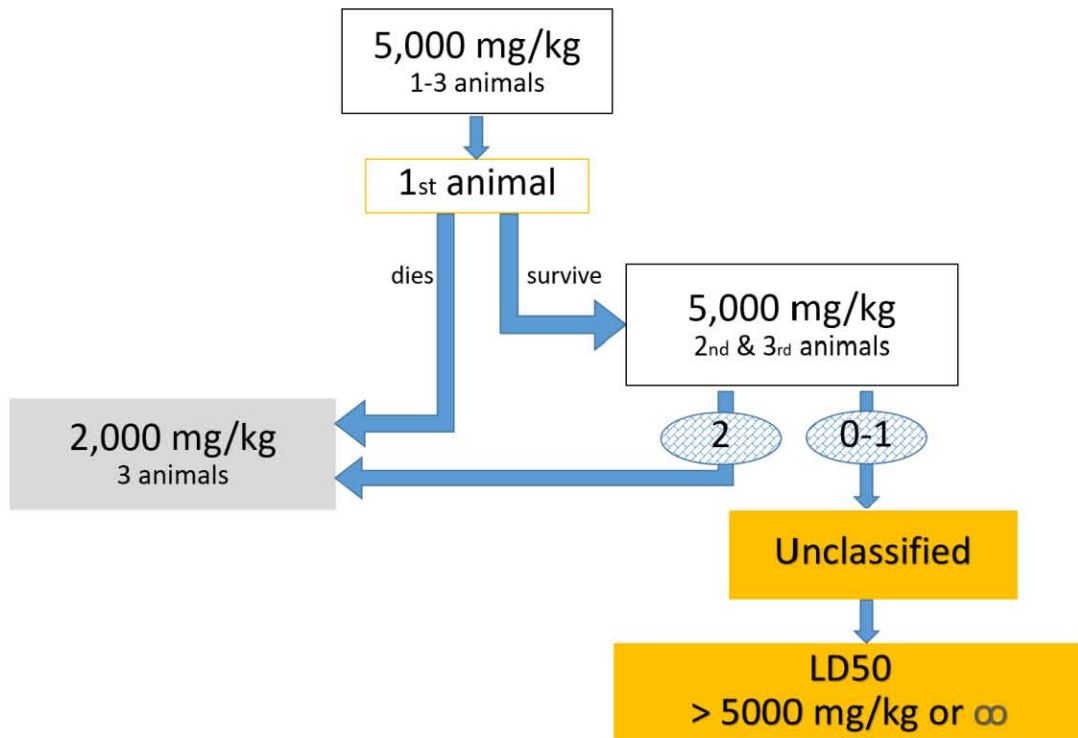
ภาพที่ 5 แสดงขั้นตอนการป้อนสาร โดยเริ่มที่ขนาด 50 มก./กก. น้ำหนักตัว



ภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการป้อนสาร โดยเริ่มที่ขนาด 300 มก./กก.น้ำหนักตัว



ภาพที่ 7 แสดงขั้นตอนการป้อนสาร โดยเริ่มที่ขนาด 2,000 มก./กก.น้ำหนักตัว



ภาพที่ 8 แสดงขั้นตอนการเริ่มป้อนสารที่ขนาด 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัว (ต้องพิจารณาอย่างถี่ถ้วนก่อนการทดสอบที่ความเข้มข้นนี้) โดยจะป้อนเพียงครั้งเดียวในสัตว์ 1 ตัวก่อน ผลที่ได้จะใช้พิจารณาการป้อนในขั้นตอนต่อไป