
การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ความระคายเคืองชนิดรุนแรงต่อดวงตา

มาสเกียรติ บุญฤทธิ์ รัชชรส อินคำลือ นวชนิษฐ์ สัจจานนท์ และสมชาย แสงกิจพร
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000
Email: maskiet.b@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ การทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สุขภาพมีแนวโน้มการใช้วิธีทดสอบทางเลือกใหม่ที่ไม่ใช้สัตว์ทดลองเพิ่มขึ้น ซึ่งการทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาด้วยวิธี Draize rabbit eye test เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหรืออวัยวะที่ได้จากโรงงานฆ่าสัตว์มาทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง การศึกษานี้ได้ทำการทบทวนวิธีทดสอบการก่อการระคายเคืองโดยใช้ดวงตาไก่จากโรงงานฆ่าสัตว์ตาม OECD Test Guideline 438 ผลจากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีด้วยสารเคมีที่ทราบประเภทการก่อการระคายเคืองต่อดวงตาตาม United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals จำนวน 24 ชนิด ให้ค่าความจำเพาะ ค่าความไว ค่าความถูกต้อง ค่าผลบวกหลง และค่าผลลบหลง เท่ากับร้อยละ 93, 78, 88, 7 และ 22 ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงว่าการทดสอบการก่อการระคายเคืองต่อดวงตาชนิดรุนแรงให้ค่าความใช้ได้ของวิธีทดสอบอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้กระต่ายเพื่อทดสอบการระคายเคืองในห้องปฏิบัติการสัตว์ทดลองต่อไป

Accepted for publication, 29 November 2018

บทนำ

การทดสอบการก่อการระคายเคืองต่อดวงตา (Eye irritation or corrosion) เป็นการประเมินความปลอดภัยเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สุขภาพ เครื่องสำอาง สารเคมีต่างๆ รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในบ้านเรือน โดยทั่วไปการทดสอบความระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวใช้สัตว์ทดลองประเภทกระต่ายด้วยวิธี Draize rabbit eye test⁽¹⁾ ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Draize และคณะตั้งแต่ปี พ.ศ. 2487 ซึ่งทำให้กระต่ายได้รับความเจ็บปวด ทรมาน หรือตาบอดได้ระหว่างการทดลอง การหาวิธีการทดสอบที่ทดแทนการใช้สัตว์ทดลองเป็นการทดสอบที่องค์กรสากลระหว่างประเทศ เช่น The European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA), The National Toxicology Program's Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) หรือ The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) เป็นต้น ได้หาข้อตกลงร่วมกัน^(2, 3, 4, 5) เพื่อให้เกิดการยอมรับผลการทดสอบด้วยวิธีการทดสอบแบบใหม่ โดยใช้จำนวนสัตว์ทดลองให้น้อยลง (Reduction) ทำให้สัตว์ทดลองไม่เจ็บปวดทรมาน (Refinement) และไม่ใช่สัตว์ทดลองสำหรับการทดสอบ (Replacement) โดยที่ผลการทดสอบคงให้ความน่าเชื่อถือ แม่นยำ ถูกต้อง และสอดคล้องกับหลักของการวิจัยและทดสอบสากลในสัตว์ทดลอง “The three R's principles” ของ Russell and Burch (1959)⁽⁶⁾ ด้วย

ปัจจุบันข้อตกลงการค้าระหว่างประเทศยอมรับผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์สุขภาพ และผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในบ้านเรือนที่ผ่านการทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้นโดยไม่ใช้สัตว์ทดลอง^(7, 8) โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในกลุ่มยุโรปที่ต่อต้านการนำสัตว์ทดลองมาใช้ทดสอบ (Testing ban) และปฏิเสธการซื้อขายผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องสำอางที่อ้างอิงผลการทดสอบในสัตว์ทดลอง (Marking ban) ซึ่งเริ่มดำเนินการดังกล่าวในปี พ.ศ. 2552 จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2556 ไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องสำอางที่ผ่านการทดสอบในสัตว์ทดลอง ยกเว้นการทดสอบในเรื่องความเป็นพิษแบบสะสม (Repeated-dose toxicity) ความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ (Reproductive toxicity) และเภสัชจลนศาสตร์ด้านพิษวิทยา (Toxicokinetics) ที่ยังจำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลองอยู่⁽⁹⁾ ผลของมาตรการดังกล่าวทำให้เกิดการผลักดันและสนับสนุนจากหน่วยงานองค์กรสากลระหว่างประเทศดังกล่าว เพื่อวิจัยและพัฒนาหาวิธีการทดสอบแบบทางเลือกใหม่ที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่มาจากเซลล์ร่างกายของมนุษย์⁽⁴⁾ เช่น เซลล์ผิวหนัง EpiDerm™ ของบริษัท MatTek Corporation (USA) หรือเซลล์ผิวหนัง EpiSkin™ ของบริษัท Episkin (France) เป็นต้น สำหรับทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity or cell functional assays) หรือใช้อวัยวะที่ได้จากสัตว์ (Organotypic assays) สำหรับทดสอบด้านความปลอดภัย⁽²⁾ เช่น ใช้ดวงตาวัวสำหรับวิธี Bovine Cornea Opacity/Permeability test หรือใช้ไข่ไก่สำหรับวิธี Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane เป็นต้น

การทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาโดยใช้ดวงตาไก่ที่ได้จากโรงงานฆ่าสัตว์ด้วยวิธี Isolated Chicken Eye test (ICE)⁽¹⁰⁾ ถือเป็นการทดสอบความปลอดภัยต่อดวงตาชนิดหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในการวิจัย ประเมิน หรือจำแนกผลิตภัณฑ์ หรือสารเคมีต่างๆ ในระดับของการเกิดการระคายเคืองอย่างรุนแรงได้ (Severe eye irritation/corrosion) ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่ได้รับการยอมรับจากองค์กรสากล เช่น The U.S. Environmental Protection Agency (EPA), The European Union (EU), The European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) และ The Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) เป็นต้น โดยใช้ทดแทนการทดสอบที่ใช้กระต่ายตามวิธี Draize rabbit eye test การทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาโดยใช้ดวงตาไก่ด้วยวิธี ICE พัฒนามาจากวิธีการทดสอบ Isolated Rabbit Eye (IRE) ของ Burton AMG และคณะที่ใช้ดวงตากระต่ายที่ผ่าออกมาศึกษา⁽¹¹⁾ ต่อมา Prinsen MK และ Koëter HBWM ได้พัฒนาวิธี ICE ต่อจากวิธี IRE⁽¹²⁾ และมีการใช้แพร่หลายในห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอุตสาหกรรมเครื่องสำอางของประเทศกลุ่มทวีปยุโรป^(13, 14)

การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบความใช้ได้ของการทดสอบความระคายเคืองชนิดรุนแรงต่อดวงตาด้วยวิธี ICE เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการทดแทนการใช้สัตว์ทดลองสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ และเพื่อนำไปประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สุขภาพที่ทดสอบในห้องปฏิบัติการของกลุ่มสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีสำหรับการทดสอบ

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบเป็นชนิด AR grade (Analytical Reagent grade) จำนวนทั้งหมด 24 ชนิด และได้รับการจัดประเภท (Category) ตาม United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) ได้แก่ Acetic acid (Sigma-aldrich), Acetone (Sigma-aldrich), 1-Butanol (Sigma-aldrich), Chlorhexidine (Sigma-aldrich), Diethanolamin (Sigma-aldrich), Ethanol (Sigma-aldrich), Ethyl acetate (Sigma-aldrich), Glycerol (Sigma-aldrich), Imidazole (Sigma-aldrich), Methanol (Sigma-aldrich), 1-Propanol (Sigma-aldrich), Sodium oxalate (Sigma-aldrich), Silver nitrate (Sigma-aldrich), Trichloroacetic acid (Sigma-aldrich), Triacetin (Sigma-aldrich), Toluene (Sigma-aldrich), Benzalkonium chloride (Sigma-aldrich), Dibenzyl-L-tartaric acid (Sigma-aldrich), Formic acid (Sigma-aldrich), 2,6-Dichlorobenzoyl chloride (Merck), Dimethyl sulfoxide (Calbiochem), Ethyl-2-methylaceto-acetate (Sigma-aldrich), Methyl cyclopentane (Sigma-aldrich), n-Hexane (Merck) ส่วนการย้อมสีกระจกตาใช้สาร Sodium fluorescein (Sigma-aldrich)

เครื่องมือและอุปกรณ์

กล้องตรวจตาชนิดลำแสงแคบ (Slit Lamp Microscope L-0187, Inami, Japan) เครื่องวัดความหนาของกระจกตาด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Corneal Pachymeter AccuPach VI, Accutome, USA) เครื่องควบคุมการปล่อยสารละลาย (Peristalsis Pump WT600-2J, Baoding Longer Precision Pump, China) เครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม (Weighing balances AB204-S, Mettler Toledo, USA) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) และชุดกล้องใส่ดวงตา (Eye holder Chambers) ผลิตและสั่งประกอบภายในประเทศ

การเตรียมสารเคมีสำหรับทดสอบ

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบที่มีสภาพเป็นของเหลวเตรียมในความเข้มข้นที่ไม่เจือจางเป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นสารเคมีบางตัวที่ระบุไว้ใน OECD Test Guidelines 438⁽¹⁰⁾ และในฐานข้อมูลการทดสอบ Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)⁽¹⁵⁾ ที่ให้เจือจางด้วยสารละลายน้ำเกลือ (physiological isotonic saline) ก่อนการทดสอบ ส่วนสารเคมีที่เป็นของแข็งให้ทำการบดให้ละเอียดก่อนการทดสอบ

การทดสอบกับสารเคมี

ทำการทดสอบตาม OECD Test Guideline 438⁽¹⁰⁾ โดยทำการเก็บดวงตาที่ติดกับหัวของโกโก้ที่ได้รับจากโรงงานฆ่าสัตว์ที่มีการฆ่าและนำส่งห้องปฏิบัติการไม่เกิน 4 ชั่วโมง นำมาผ่าเก็บดวงตาและใช้ภายใน 2 ชั่วโมง ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% (0.9% normal saline) แล้วตรวจสอบความสมบูรณ์ภายนอกของดวงตา โดยดูการขุ่นของกระจกตา และการย้อมสีที่กระจกตาด้วย 2% (w/v) sodium fluorescein ดวงตาที่ผ่านการตรวจสอบที่ไม่พบการขุ่นและการติดสีที่กระจกตาที่คะแนนมากกว่า 0.5 (ตามวิธีการอ่านผลในตารางที่ 2 และ 4) ถูกนำไปยัดไว้

ที่กล้องควบคุมที่ปล่อยสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% ที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 32 ± 1.5 องศาเซลเซียส ในอัตรา 3-4 หยด/นาที ทำการปรับสภาพดวงตาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดค่าความขุ่นและค่าความหนาของกระจกตาก่อนการทดสอบกับสารเคมี (ที่เวลา 0 นาที) จากนั้นทดสอบกับสารเคมีโดยใช้ดวงตาจำนวน 3 ตาต่อการทดสอบแต่ละครั้ง (ทดสอบ 3 ครั้งต่อสารเคมีแต่ละชนิด) โดยนำสารเคมีใส่ลงในบริเวณกระจกตาเป็นเวลา 10 วินาที ซึ่งสารเคมีที่มีสภาพเป็นของเหลวใช้ปริมาณ 0.03 มิลลิลิตร ส่วนสารเคมีที่มีสภาพเป็นของแข็งใช้ทดสอบในปริมาณ 0.03 กรัม เมื่อครบ 10 วินาที จึงล้างออกด้วยสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% ประมาณ 20 มิลลิลิตร แล้วทำการตรวจวัดค่าความขุ่นและค่าความหนาของกระจกตาที่เวลา 30, 75, 120, 180 และ 240 นาที หลังการทดสอบกับสารเคมีแต่ละชนิด โดยวัดค่าความหนาของกระจกตาด้วยเครื่อง Corneal Pachymeter และตรวจความขุ่นของกระจกตาผ่านกล้องจุลทรรศน์สำหรับตรวจตาชนิดลำแสงแคบ (Slit-Lamp Microscope) ส่วนการวัดการติดสีที่กระจกตาด้วย 2% (w/v) sodium fluorescein ทำการตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์สำหรับตรวจตาชนิดลำแสงแคบที่เวลา 30 นาทีหลังทดสอบกับสารเคมีในการทดสอบใช้ตัวอย่างควบคุมลบ (negative control) ที่เป็นสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% เป็นตัวทดสอบ

การอ่านผลการทดสอบ

ดวงตาที่ทดสอบกับสารเคมีทำการอ่านผลและประเมินตามเกณฑ์ของ OECD Test Guideline 438⁽¹⁰⁾ ดังนี้

การบวมของกระจกตา (corneal swelling)

วัดการบวมของกระจกตาด้วยเครื่อง corneal pachymeter แล้วทำการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การบวมของกระจกตา ตามสูตร

$$\frac{(\text{ค่าการบวมของกระจกตาที่เวลาตรวจวัด} - \text{ค่าการบวมของกระจกตาที่เวลาเริ่มต้น 0 นาที}) \times 100}{\text{ค่าการบวมของกระจกตาที่เวลาเริ่มต้น 0 นาที}}$$

นำค่าเปอร์เซ็นต์การบวมของกระจกตาทั้ง 3 ดวงตาที่ได้ ของแต่ละเวลาของสารเคมีที่ทดสอบแต่ละครั้ง มาหาค่าเฉลี่ย แล้วให้เกณฑ์การบวมตามตารางที่ 1 (ICE Class for Mean Corneal Swelling) โดยเลือกจากค่าเฉลี่ยที่สูงสุด (% Mean Corneal Swelling) เป็นเกณฑ์ตัดสิน

ตารางที่ 1 เกณฑ์การบวมของกระจกตา (ICE classification criteria for corneal swelling)⁽¹⁰⁾

Mean Corneal Swelling (%)	ICE Class
0 to 5	I
>5 to 12	II
>12 to 18 (>75 min after treatment)	II
>12 to 18 ($\leq$ 75 min after treatment)	III
>18 to 26	III
>26 to 32 (>75 min after treatment)	III
>26 to 32 ($\leq$ 75 min after treatment)	IV
>32	IV

ความขุ่นของกระจกตา (corneal opacity)

ตรวจวัดระดับความขุ่นของกระจกตาผ่านกล้องจุลทรรศน์สำหรับตรวจตาชนิดลำแสงแคบของแต่ละตาที่ทดสอบโดยให้คะแนนความขุ่นตามตารางที่ 2 (Corneal opacity scores) จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ยแต่ละครั้งของแต่ละเวลาของสารเคมีที่ทดสอบ แล้วให้เกณฑ์ความขุ่นของกระจกตาตามตารางที่ 3 (ICE classification criteria for opacity) โดยเลือกจากค่าเฉลี่ยที่สูงสุด (Mean Maximum Opacity Score) เป็นเกณฑ์ตัดสิน

ตารางที่ 2 ค่าการให้คะแนนความขุ่นของกระจกตา (Corneal opacity scores)¹⁰

Score	Observation
0	No opacity
0.5	Very faint opacity
1	Scattered or diffuse areas; details of the iris are clearly visible
2	Easily discernible translucent area; details of the iris are slightly obscured
3	Severe corneal opacity; no specific details of the iris are visible; size of the pupil is barely discernible
4	Complete corneal opacity; iris invisible

ตารางที่ 3 เกณฑ์ความขุ่นของกระจกตา (ICE classification criteria for opacity)⁽¹⁰⁾

Mean Maximum Opacity Score*	ICE Class
0.0–0.5	I
0.6–1.5	II
1.6–2.5	III
2.6–4.0	IV

* Maximum mean score observed at any time point

การติดสีของกระจกตา (fluorescein retention)

ตรวจวัดการติดสีที่กระจกตาโดยการย้อมด้วย 2% (w/v) sodium fluorescein และดูผ่านกล้องจุลทรรศน์สำหรับตรวจตาชนิดลำแสงแคบเป็นเวลา 30 นาทีหลังทดสอบกับสารเคมี โดยให้คะแนนการติดสีตามตารางที่ 4 (Fluorescein retention scores) จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย แล้วให้เกณฑ์การติดสีของกระจกตาตามตารางที่ 5 (ICE classification criteria for mean fluorescein retention)

ตารางที่ 4 เกณฑ์การให้คะแนนการติดสีของกระจกตาด้วย sodium fluorescein ⁽¹⁰⁾ (Fluorescein retention scores)

Score	Observation
0	No fluorescein retention
0.5	Very minor single cell staining
1	Single cell staining scattered throughout the treated area of the cornea
2	Focal or confluent dense single cell staining
3	Confluent large areas of the cornea retaining fluorescein

ตารางที่ 5 เกณฑ์การประเมินการติดสีของกระจกตาด้วย sodium fluorescein ⁽¹⁰⁾ (ICE classification criteria for mean fluorescein retention)

Mean Fluorescein Retention Score at 30 minutes post-treatment*	ICE Class
0.0–0.5	I
0.6–1.5	II
1.6–2.5	III
2.6–3.0	IV

* คะแนนตามเกณฑ์ที่ได้จากตารางที่ 4

เกณฑ์การแปรผลการทดสอบ

ทำการประเมินผลการทดสอบการระคายเคืองตามระบบ UN GHS Classification โดยใช้ผล ICE Class ที่ได้จากการอ่านผลรวมทั้ง 3 วิธี (endpoints) และเกณฑ์ตัดสินตาม OECD Test Guideline 438 ⁽¹⁰⁾ ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยที่ Category 1 บ่งถึงการระคายเคืองต่อดวงตาดังรุนแรง ซึ่งประกอบด้วยผลการทดสอบของวิธีที่มี ICE Class ทั้ง 3 เกณฑ์เป็น IV (3 x IV), หรือมี ICE Class ที่เกณฑ์ IV และ III จำนวน 2 และ 1 ค่าตามลำดับ (2 x IV, 1 x III), หรือมี ICE Class ที่เกณฑ์ IV และ II จำนวน 2 และ 1 ค่าตามลำดับ (2 x IV, 1 x II), หรือมี ICE Class ที่เกณฑ์ IV และ I จำนวน 2 และ 1 ค่าตามลำดับ (2 x IV, 1 x I), หรือมีค่าความขุ่นของกระจกตาที่คะแนนมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ที่เวลา 30 นาที จำนวนอย่างน้อย 2 ตา หรือมีค่าความขุ่นของกระจกตาที่คะแนนเท่ากับ 4 ที่เวลาใด ๆ เป็นจำนวนอย่างน้อย 2 ตา หรือพบการหลุดลอกของชั้น epithelium กระจกตา เป็นจำนวนอย่างน้อย 1 ตา สำหรับผลการทดสอบที่บ่งชี้ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อดวงตาดังอยู่ในประเภท No category ซึ่งให้ผลทดสอบ ICE Class ทั้ง 3 วิธีมีเกณฑ์ที่เท่ากับ I (3 x I) หรือมี ICE Class ที่เกณฑ์ I และ II จำนวน 2 และ 1 ค่าตามลำดับ (2 x I, 1 x II) หรือมี ICE Class ที่เกณฑ์ II และ I จำนวน 2 และ 1 ค่าตามลำดับ (2 x II, 1 x I) ส่วนผลการทดสอบที่ไม่เข้าเกณฑ์ใด ๆ จัดอยู่ในเกณฑ์ No prediction can be made ซึ่งอาจเป็นสารเคมีที่อยู่ในประเภท Category 2 ที่ให้ผลทดสอบ ICE Class ทั้ง 3 วิธีนอกเหนือไปจากค่าที่กำหนดในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เกณฑ์ตัดสินการระคายเคืองต่อดวงตาตามระบบ UN GHS Classification⁽¹⁰⁾

UN GHS Classification	Combinations of the 3 Endpoints
No Category	3 x I 2 x I, 1 x II 2 x II, 1 x I
No prediction can be made	Other combinations
Category 1	3 x IV 2 x IV, 1 x III 2 x IV, 1 x II* 2 x IV, 1 x I* Corneal opacity ≥ 3 at 30 min (in at least 2 eyes) Corneal opacity = 4 at any time point (in at least 2 eyes) Severe loosening of the epithelium (in at least 1 eye)

* Combinations less likely to occur

การคำนวณผลความใช้ได้ของวิธี

ผลที่ได้จากการทดสอบกับสารเคมีรวม 24 ชนิด ทำการทดสอบซ้ำกัน 3 ครั้ง แล้วนำผลที่ได้ตามเกณฑ์ในตารางที่ 6 มาคำนวณค่าความใช้ได้⁽¹⁶⁾ ของวิธีทดสอบความระคายเคืองต่อดวงตาชนิดรุนแรงตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การคำนวณหาความไวและความจำเพาะของการทดสอบวิธี ICE

ประเภทสารเคมี ตามวิธี ICE	ประเภทสารเคมีตาม UN GHS	
	Category 1	NC, Category 2
Category 1	True positive (a)	False positive (b)
NC, NP	False negative (c)	True negative (d)

NC = No Category, NP = No prediction can be made

$$\begin{aligned}
 \text{ค่าความจำเพาะ (specificity)} &= [d/(d+b)] \times 100 \\
 \text{ค่าความไว (sensitivity)} &= [a/(a+c)] \times 100 \\
 \text{ค่าความถูกต้องเท่ากับ (accuracy)} &= [(a+d)/(a+b+c+d)] \times 100 \\
 \text{ผลบวกหลง (false positive rate)} &= [b/(b+d)] \times 100 \\
 \text{ผลลบหลง (false negative rate)} &= [c/(a+c)] \times 100
 \end{aligned}$$

ผล

การทดสอบกับสารเคมีตามที่ระบุไว้ใน OECD Test Guidelines 438 และสารเคมีอื่นๆ ที่ระบุในฐานข้อมูลการทดสอบ The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) ที่จำแนกชนิดตามระบบ UN GHS ทั้งหมดจำนวน 24 ชนิด โดยทำการทดสอบกับสารเคมีแต่ละชนิด 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ข้าง ได้ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาของสารเคมีชนิดต่าง ๆ แต่แต่ละครั้งการทดสอบตามตารางที่ 8 ซึ่งพบว่า สารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น UN GHS Category 1 ที่ได้ทดสอบจำนวนรวม 27 ครั้ง มีผลการทดสอบด้วยวิธี ICE ที่ตรงกับคุณสมบัติของสารจำนวน 21 ครั้ง ส่วนการทดสอบด้วยสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น UN GHS Category 2 และ No Category จำนวนรวม 45 ครั้ง ได้ผลการทดสอบด้วยวิธี ICE ที่ตรงกับคุณสมบัติของสารจำนวน 42 ครั้ง

เมื่อนำผลของการทดสอบที่ได้มาคำนวณผลความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อการเกิดความระคายเคืองตาในระดับที่รุนแรง ได้ค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 93% ค่าความไว (sensitivity) เท่ากับ 78% ค่าความถูกต้องเท่ากับ (accuracy) เท่ากับ 88% ค่าผลบวกлож (false positive rate) เท่ากับ 7% และค่าผลลบлож (false negative rate) เท่ากับ 22% ส่วนผลการทดสอบดวงตากับตัวอย่างควบคุมที่เป็นสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% ให้ผลการทดสอบตรงกับเกณฑ์ที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง หรือ UN GHS No Category ตลอดการทดสอบ (ไม่ได้แสดงผล)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาตามวิธี OECD Test Guideline 438 *

สารเคมี	ลักษณะทางกายภาพ	ผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
10% Acetic acid (Category 1)	ของเหลว	Category 1	NP**	Category 1
1-Butanol (Category 1)	ของเหลว	NP	NP	Category 1
2,6-Dichlorobenzoyl chloride (Category 2A)	ของเหลว	Category 1	Category 1	NP
70% Ethanol (Category 2A)	ของเหลว	No Category	No Category	NP
Acetone (Category 2A)	ของเหลว	NP	No Category	No Category
5% Benzalkonium chloride (Category 1)	ของเหลว	Category 1	Category 1	Category 1

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาตามวิธี OECD Test Guideline 438 * (ต่อ)

สารเคมี	ลักษณะทางกายภาพ	ผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
Chlorhexidine (Category 1)	ของแข็ง	Category 1	Category 1	Category 1
Dibenzyl-L-tartaric acid (Category 1)	ของแข็ง	Category 1	Category 1	NP**
Diethanolamine (Category 2A)	ของเหลว	NP	NP	NP
Dimethyl sulfoxide (No Category)	ของเหลว	NP	No Category	No Category
Ethyl acetate (Category 2A)	ของเหลว	NP	NP	NP
Ethyl-2-methylaceto-acetate (Category 2B)	ของเหลว	NP	NP	No Category
Formic acid (Category 1)	ของเหลว	Category 1	Category 1	Category 1
Glycerol (No Category)	ของเหลว	No Category	NP**	NP
Imidazole (Category 1)	ของแข็ง	Category 1	NP	Category 1
Methanol (Category 2A)	ของเหลว	NP	NP	NP
Methyl cyclopentane (No Category)	ของเหลว	No Category	No Category	No Category
n-Hexane (No Category)	ของเหลว	No Category	No Category	No Category

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาตามวิธี OECD Test Guideline 438 * (ต่อ)

สารเคมี	ลักษณะทางกายภาพ	ผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1-Propanol (Category 1)	ของเหลว	Category 1	Category 1	NP**
3% Silver nitrate (Category 2B)	ของเหลว	NP	NP	NP
Sodium oxalate (Category 2B)	ของแข็ง	No Category	Category 1	NP
Toluene (Category 2B)	ของเหลว	NP	NP	NP
Triacetin (No Category)	ของเหลว	No Category	No Category	No Category
30% Trichloroacetic acid (Category 1)	ของเหลว	Category 1	Category 1	Category 1

* ผลรวม Endpoints ของการตรวจสอบการขุ่น การบวมและการติดสีของกระจกในการทดสอบกับสารเคมีที่ทราบประเภท UN GHS

** NP = No prediction can be made

วิจารณ์

การทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาในระดับที่รุนแรงด้วยวิธี ICE ตาม OECD Test Guideline 438⁽¹⁰⁾ ด้วยสารเคมีทั้งหมดรวม 24 ชนิดนั้น ได้ค่าความจำเพาะ ความไวและความถูกต้อง เป็นไปในทางเดียวกันกับรายงานของ Balls M และคณะ⁽¹⁷⁾ ที่ได้ค่าความจำเพาะ ความไวและความถูกต้องมีค่าเท่ากับ 81%, 50% และ 69% ตามลำดับ และรายงานของ Prinsen MK และคณะ⁽¹⁸⁾ ที่ได้ค่าความจำเพาะ ความไวและความถูกต้องมีค่าเท่ากับ 100%, 50% และ 97% ตามลำดับ รวมทั้งใกล้เคียงกับที่ระบุใน OECD Test Guideline 438^(10, 19) แสดงว่าวิธี ICE ที่ได้ทดสอบในห้องปฏิบัติการกลุ่มสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข สามารถใช้ทดแทนการทดสอบด้วยกระต่ายได้

สารเคมีที่ใช้ทดสอบในการศึกษานี้ครอบคลุมตามรายละเอียดใน OECD Test Guideline 438⁽¹⁰⁾ และได้เลือกสารเคมีทดสอบเพิ่มเติมตามที่มีข้อมูลจำแนกการระคายเคืองตาม UN GHS⁽¹⁵⁾ อีกทั้งการทดสอบกับตัวอย่างควบคุมลบให้ผลเป็นไปตามข้อกำหนด OECD Test Guideline 438⁽¹⁰⁾ ตลอดการทดสอบ อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราผลบวกสูงและผลลบสูงที่ได้จากการศึกษานี้ค่อนข้างต่างจากผลการศึกษาของ Balls M และคณะ⁽¹⁷⁾ ซึ่งอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของชนิดและจำนวนของสารเคมีที่นำมาทดสอบ อีกทั้ง OECD Test Guideline 438⁽¹⁰⁾ ได้ระบุว่าการทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาในระดับที่รุนแรงด้วยวิธีนี้จะให้การใช้ได้ของวิธีทดสอบที่มีค่าผลลบสูงที่สุดในสารที่มีสภาพเป็นของแข็งและสารลดแรงตึงผิว (surfactants) ให้ค่าผลบวกสูงที่สูงกับสารเคมีที่เป็นประเภทแอลกอฮอล์ จึงควรตรวจด้านพยาธิวิทยา (Histopathology decision criteria) ของเนื้อเยื่อกระจกตาชั้น Epithelium ในระดับของการถูกทำลายเพิ่มเติม เพื่อแยกประเภทของการระคายเคืองชนิด UN GHS Category 1 ได้อย่างชัดเจนขึ้นกับสารเคมีทดสอบที่เป็นสารซักฟอก (detergents) และสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า pH อยู่ระหว่าง 2 ถึง 11.5^(10, 20, 21)

สรุป

ผลจากการทดสอบเพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธี ICE ตาม OECD Test Guideline 438 ได้ค่าความจำเพาะความไว และความถูกต้อง เท่ากับ 93%, 78% และ 88% ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้วิธีนี้จึงสามารถนำไปใช้ศึกษาวิจัยหรือทดสอบความระคายเคืองต่อดวงตาในระดับรุนแรง (severe eye irritation/corrosion) ของสารเคมีหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพประเภทเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในบ้านเรือน ทดแทนการใช้สัตว์ทดลองและเป็นการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการกลุ่มสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข สำหรับนโยบายการยกเลิกการทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาในสัตว์ทดลองเชิงรุกที่อาจจะประกาศใช้ภายในประเทศต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ สพ.ญ.เรวดี บุตรารักษ์ ที่ได้ริเริ่มสนับสนุนการวิจัยและทดสอบโดยทางเลือกใหม่ที่ทดแทนการใช้สัตว์ทดลองของกลุ่มสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข และขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิทยาศาสตร์ (TCELS, องค์การมหาชน) ที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณในการจัดซื้อเครื่องมือสำหรับการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

1. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther 1944; 82: 377-90.
2. Balls M, Berg N, Bruner LH, Curren RD, de Silva O, Earl LK, et al. Eye irritation testing: the way forward. The report and recommendations of ECVAM workshop 34. Altern Lab Anim 1999; 27: 53-77.
3. ESAC statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on Organotypic in vitro assay as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe irritants as determined by US EPA, EU(R41) and UN GSH classifications in a tiered testing strategy, as part of a weight of evidence approach. [Online]. 2007 [cited 2017 Nov 1]; [3 screens]. Available from URL: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC26_statement_Organotypic_20070510c.pdf.
4. Vinardell MP, Mitjans M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. J Pharm Sci 2008; 97: 46-59.
5. Hood E. Alternative test models: ocular safety assays accepted. Environ Health Perspect 2008; 116(9): A381.
6. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
7. Scientific Committee on Consumer Safety. Memorandum on alternative test methods in human health safety assessment of cosmetic ingredients in the European Union. Brussels: European Commission; 2009.
8. Cosmetics and toiletries: report from ethical consumer. [Online]. 2017 [cited 2017 Nov 2]; [4 screens]. Available from: URL: <http://ethicalconsumer.org/ethicalreports/cosmeticstoiletriesspecialreport.aspx>

9. European Commission. Ban on animal testing. [Online]. 2017 [cited 2017 Nov 2]; [3 screens]. Available from: URL: https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/animal-testing_en.
10. OECD. Test no. 438: Isolated chicken eye test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. Paris: OECD; 2017.
11. Burton ABG, York M, Lawrence RS. The in vitro assessment of severe eye irritants. *Food Cosmet Toxicol* 1981; 19(4): 471-80.
12. Prinsen MK, Koëter HB. Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the draize eye irritation test with rabbits. *Food Chem Toxicol* 1993; 31: 69-76.
13. Schutte K, Prinsen MK, McNamee PM, Roggeband R. The isolated chicken eye test as a suitable in vitro method for determining the eye irritation potential of household cleaning products. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 54(3): 272-81.
14. McNamee P, Hibatallah J, Costabel-Farkas M, Goebel C, Araki D, Dufour E, et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: eye irritation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 54(2): 197-209.
15. National Toxicology Program. Current status of in vitro test methods for identifying ocular corrosives and severe irritants: isolated chicken eye test method. [Online]. 2006 [cited 2017 Nov 10]; [168 screens]. Available from: URL: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/docs/ocutox_docs/ocubrd/ice/icebrd.pdf.
16. van Stralen KJ, Stel VS, Reitsma JB, Dekker FW, Zoccali C, Jager KJ. Diagnostic methods I: sensitivity, specificity, and other measures of accuracy. *Kidney Int* 2009; 75(12): 1257-63.
17. Balls M, Botham PA, Bruner LH, Spielmann H. The EC/HO international validation study on alternatives to the draize eye irritation test. *Toxicol In Vitro* 1995; 9(6): 871-929.
18. Prinsen MK. The chicken enucleated eye test (CEET): a practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem Toxicol* 1996; 34(3): 291-6.
19. Lowther D, Prinsen M, Amcoff P, Barroso J, Zuang V, Kojima H, et al. International acceptance of in vitro alternative ocular safety testing methods: the isolated chicken eye test method (draft OECD TG 438). [Online]. 2009; [cited 2017 Nov 10]; [1 screen]. Available from: URL: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/meetings/7thwc/lowther.pdf>.
20. Kolle SN, van Cott A, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Lacking applicability of in vitro eye irritation methods to identify seriously eye irritating agrochemical formulations: results of bovine cornea opacity and permeability assay, isolated chicken eye test and the EpiOcular™ ET-50 method to classify according to UN GHS. *Regul Toxicol Pharmacol* 2017; 85: 33-47.
21. Verstraelen S, Van Rompay AR. CON4EI: development of serious eye damage and eye irritation testing strategies with respect to the requirements of the UN GHS/EU CLP hazard categories. *Toxicol In Vitro* 2018; 49: 2-5.

Method Verification of Isolated Chicken Eye Test

**Maskiet Boonyareth* Ruchuros Inkomlue Navakanit Sachanonta
and Somchai Sangkitporn**

National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

Abstract Alternative studies, using non-animal methods, for safety tests on healthcare products are increasing. Draize rabbit eye test is one of the methods that can be replaced by cell-based assays or organotypic assays. This study was to conduct and to verify Isolated Chicken Eye test (ICE) according to OECD Test Guideline 438. A total of 24 chemicals with classification as categorized by United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals were used in the study. Our results demonstrated that specificity, sensitivity, accuracy, false positive rate and false negative rate were at percentages of 93, 78, 88, 7 and 22, respectively. Our data indicated that the method verified is acceptable to be used to replace the rabbit tests for identifying chemicals inducing serious eye damage in our animal laboratory.