กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ
DEPARTMENT OF HEALTH SERVICE SUPPORT

วารสารวิชาการกรมสนับสนุนบริการสุขภาพ ปีที่ 17 ฉบับที่ 3 กันยายน - ธันวาคม 2564 : 15-26
Department of health Service Support Journal Vol.17 No.3 September - December 2021 : 15-26

Received : 19 April 2021 Revised : 30 June 2021 Accepted : 22 August 2021

การพัฒนาเกณฑ์การทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาด้วยวิธี Isolated Chicken Eye ของห้องปฏิบัติการกลุ่มสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

DEVELOPMENT OF EYE IRRITATION TEST BY USING THE ISOLATED CHICKEN EYE TEST, LAC-THAI NIH

รัชชุรส อินคำลือ มาสเกียรติ บุญยฤทธิ์ จันทร์ญา แช่มช้อย ภัทรธิดาพร ทวีสุข นวขนิษฐ์ สัจจานนท์
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Ruchuros Inkomlue, Maskiet Boonyareth, Janya Chamchoy, Pattidaporn Taveesuk, Navakanit Sachanonta
National Institute of Health of Thailand ,Department of Medical Sciences.

บทคัดย่อ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มสัตว์ทดลองได้พัฒนาวิธีทดสอบความระคายเคืองต่อดวงตาด้วยวิธี Isolated Chicken Eye (ICE) ให้มีความสอดคล้องตามเกณฑ์การประเมินความระคายเคืองตามมาตรฐาน OECD TG 438 ซึ่งชี้บ่งระดับการก่อความระคายเคืองเพื่อจำแนกระดับความปลอดภัยของสารเคมีต่อดวงตาด้วยการใช้ดวงตาไก่จากโรงฆ่าสัตว์เป็นตัวทดสอบ และใช้เกณฑ์การประเมินระดับความรุนแรงของสารเคมีตาม Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) ครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในเกณฑ์การประเมินด้วยค่าดัชนีความระคายเคือง รวมถึงมีประเมินรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้นบนกระจกตาของดวงตาไก่ จากผลการทดสอบสารเคมี 26 ชนิด โดยผลของการประเมินจากค่าดัชนีความระคายเคืองพบว่าสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองรุนแรง Category 1 มีค่าดัชนีความระคายเคืองต่อดวงตาและค่าความขุ่นของกระจกตาแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสารเคมีที่ก่อความระคายเคือง Category 2A และสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองเล็กน้อย Category 2B และผลการประเมินทางจุลพยาธิวิทยาบนกระจกตาจากการทดสอบสารเคมีทั้งหมด 21 ชนิด พบว่าสารเคมี Category 2A เมื่อเทียบกับสารเคมี Category 2B พบลักษณะเนื้อตายของชั้นเยื่อบุของค่าเฉลี่ยคะแนนประเมินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้เห็นได้ว่าค่าดัชนีความระคายเคืองและการประเมินผลทางจุลพยาธิวิทยาสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการประเมินผลการทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาได้มากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : การทดสอบความระคายเคืองต่อดวงตา วิธี Isolated Chicken Eye ค่าดัชนีความระคายเคือง ผลกระทบทางจุลพยาธิวิทยาต่อดวงตา

Abstract

Laboratory Animal Center Thai NIH has developed the Isolated Chicken Eye (ICE) eye irritation test method to meet the criteria of OECD Test Guideline No.438, which is the test for identifying safety and classify irritants. This assessment is evaluated the ICE test with ocular irritation index and histopathological eye effect in corneal chicken. Results from a total of 26 chemicals categorized by the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals conducted with ICE test showed that the ocular irritation index and corneal opacity value obtained from Category 2A (irritant) and 2B (mild irritant) substances had statistically significant when compared to Category 1 (severe irritation) substances. While the score of corneal epithelial necrosis obtained from Category 2A and 2B substances were significant finding when compared to Category 1 substances. Therefore, the evaluation of the irritant index in combination with the histopathology for ICE test will increase the test efficiency.

Keywords : eye irritation test, Isolated Chicken Eye test, ocular irritation index, histopathological eye effect

บทนำ

การทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาจัดเป็นการประเมินความปลอดภัยวิธีหนึ่งที่กำหนดมาตรฐานและจำแนกประเภทของสารเคมีเป็นไปแนวทางเดียวกันทั่วโลกด้วยระบบ Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) โดยจำแนกประเภทสารเคมีที่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อดวงตาเป็นประเภทสารเคมีที่ไม่ก่อให้เกิดความระคายเคือง (No category) สารเคมีที่ก่อความระคายเคือง (Category 2A, irritants) สารเคมีที่ก่อความระคายเคืองเล็กน้อย (Category 2B, mild irritants) และสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองรุนแรง (Category 1, serious eye damage) ทั้งนี้ในส่วนของสหภาพยุโรป (EU) มีการแบ่งระดับสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองรุนแรง (Category 1) และสารเคมีที่ก่อความระคายเคือง (Category 2) เท่านั้น โดยไม่มีการแบ่งระดับสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองเล็กน้อย (Barroso et al., 2017) การทดสอบความระคายต่อดวงตานั้นเริ่มต้นในปี พ.ศ.2487 โดยใช้การทดสอบสารเคมีกับดวงตากระต่ายเป็นหลัก ด้วยวิธี Draize rabbit eye test แต่ในปัจจุบันมีวิธีทดสอบทางเลือกที่ได้รับการสนับสนุนโดยองค์กรทั่วโลกให้มีการปรับเปลี่ยนวิธีที่ใช้ทดสอบที่ไม่ก่อความทุกข์ทรมานต่อสัตว์ ซึ่งการทดสอบวิธีหนึ่งที่ได้รับการยอมรับในระดับมาตรฐาน OECD GLP ได้แก่ วิธีทดสอบการระคายเคืองต่อดวงตาโดยใช้ดวงตาไก่ที่ได้จากโรงงานฆ่าสัตว์ (Isolated Chicken Eye test; ICE test) ตามมาตรฐานการทดสอบ OECD Test Guideline No. 438 (OECD TG 438) ซึ่งได้รับการยอมรับตั้งแต่ปี 2552 เพื่อใช้เป็นการทดสอบทดแทนการใช้ดวงตากระต่าย ในปี พ.ศ. 2561 การทดสอบด้วยวิธี ICE ตาม OECD TG 438 (OECD, 2018) มีข้อแนะนำให้ใช้เกณฑ์ประเมินผลทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการประเมินระดับความรุนแรงของสารเคมี เนื่องจากพบข้อจำกัดในสารเคมีที่มีองค์ประกอบของแอลกอฮอล์อาจทำให้เกิดผลบวกลวงได้ (Barile, 2010) แต่ทั้งนี้เกณฑ์ประเมินทางจุลพยาธิวิทยาสามารถประเมินจำแนกได้ชัดเจนในสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองที่รุนแรงต่อดวงตา Category 1 เท่านั้น ซึ่งสารเคมีที่ก่อความระคายเคือง Category 2A และสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองเล็กน้อย Category 2B ส่งผลกระทบต่อดวงตารุนแรงที่แตกต่างกัน แต่ยังมีการรวบรวมผลการศึกษาในระดับจุลพยาธิวิทยาค่อนข้างน้อย ทั้งนี้ผลทางจุลพยาธิวิทยา เพื่อประเมินระดับความเสียหายของกระจกตา โดยการย้อมสี Hematoxylin & Eosin (H&E) สำหรับใช้ประเมินความเสียหายในระดับเซลล์และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเซลล์ในชั้นต่างๆ ของกระจกตาชั้น โดยเกณฑ์นั้นมีลักษณะเป็นระดับคะแนนก้ำกึ่งเชิงปริมาณ (semi-quantitative scoring) ผลกระทบจากการระคายเคืองพบว่ามีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นบนกระจกตา รวมถึงการหายของแผลที่เกิดขึ้นบนกระจกตา (Prinsen, Hendriksen, Krul & Woutersen, 2017) ซึ่งมีการรายงานความสัมพันธ์รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในสารที่ก่อระคายเคืองประเภท category 1 พบว่ามีความเสียหายอย่างชัดเจนในชั้นสโตรมา (stroma) จนถึงเยื่อบุชั้นใน (endothelium) บนกระจกตา ที่บ่งถึงการเสียหายแบบถาวร (irreversible) ส่วนพยาธิสภาพบนกระจกตาจากการระคายเคืองดวงตาในระดับที่ไม่รุนแรง จะมีผลกระทบที่เกิดขึ้นเพียงชั้นเยื่อบุ (epithelium) เท่านั้น และสามารถหายเป็นปกติของบาดแผลบนกระจกตาได้ภายใน 7-21 วัน ลักษณะดังกล่าวถือว่าเป็นการเสียหายแบบชั่วคราว (reversible) (Prinsen, Schipper & Wijnans, 2011) รวมถึงโครงสร้างชั้นต่างๆ และองค์ประกอบของเซลล์ของกระจกตาไก่เทียบเท่าได้ใกล้เคียงกับกระจกตาของมนุษย์ (Ritchey et al., 2011) จึงถือได้ว่าเกณฑ์การประเมินด้วยผลทางจุลพยาธิวิทยาของกระจกตาไก่ สามารถนำมาช่วยประเมินความเสียหายที่เกิดขึ้นได้ในระดับเซลล์ที่มีผลจากความรุนแรงของสารเคมีระดับต่างๆ และในปี พ.ศ.2561 ห้องปฏิบัติการกลุ่มสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้พัฒนาวิธีการทดสอบแล้วทวนสอบความใช้ได้ของวิธี ICE พบว่ามีความจำเพาะ 93 % ความไว 78 % และความถูกต้อง 88% จากการทดสอบกับสารเคมี 24 ชนิด (มาสเกียรติ, รัชชุรส, นวขนิษฐ์, และสมชาย, 2561) ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการกลุ่มสัตว์ทดลอง มีการพัฒนาเกณฑ์การทดสอบที่มีความสอดคล้องตามมาตรฐานที่ประกาศใช้ในปัจจุบัน (OECD, 2018) รวมถึงทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยค่าดัชนีความระคายเคือง (Irritation index) ที่เป็นค่าที่ชี้บ่งระดับ

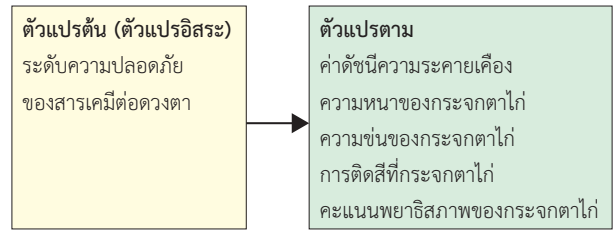
ความรุนแรงของสารเคมีได้ ซึ่งมีรายงานว่า Irritation index ที่มากขึ้นจะพบในกลุ่มสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองที่รุนแรงขึ้น ทั้งนี้ Irritation index จึงใช้เป็นเกณฑ์ในการชี้วัดระดับความรุนแรงของสารเคมีได้ (Koll, Cott, Ravenzwaay & Landsiedel, 2017) และมีรายงานเพิ่มเติมในกรณีการทดสอบ ICE ที่มีการใช้เกณฑ์การประเมินผลทางจุลพยาธิวิทยาของกระจกตาไก่ในการจำแนกประเภทสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองและชี้บ่งระดับความรุนแรงได้อย่างชัดเจนขึ้นในกรณีที่พบผลกระทบที่มีความก้ำกึ่งระหว่างการสัมผัสสารเคมีประเภท Category 1 กับสารเคมีประเภท Category 2 (Prinsen et al., 2017) ทั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมผลทางจุลพยาธิวิทยาของเซลล์กระจกตาไก่ที่ได้รับผลกระทบจากสารเคมีประเภท Category 2A และสารเคมีประเภท Category 2B ซึ่งปัจจุบันยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย จึงทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อรวบรวมเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการพัฒนาเกณฑ์การประเมินระดับความปลอดภัยของสารเคมีต่อดวงตาต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเกณฑ์การประเมินระดับความปลอดภัยของสารเคมีต่อดวงตาของห้องปฏิบัติการกลุ่มสัตว์ทดลองด้วยวิธี Isolated Chicken Eye test ซึ่งมีความสอดคล้องตามเกณฑ์การประเมินความระคายเคืองต่อดวงตาตามมาตรฐาน OECD TG 438 และเพิ่มเติมเกณฑ์การประเมินระดับความรุนแรงของสารเคมีตาม GHS ด้วยการประเมินค่า irritation index รวมถึงเปรียบเทียบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้นบนกระจกตาไก่จากการสัมผัสสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองทั้งในส่วนของสารเคมีประเภท Category 2A และสารเคมีประเภท Category 2B

กรอบแนวคิด

วิธีการทดสอบความระคายเคืองต่อดวงตาด้วยวิธี Isolated Chicken Eye ตาม OECD Test Guideline No. 438 ได้มีการพัฒนาและเพิ่มเติมหลักเกณฑ์การประเมินผลกระทบที่เกิดขึ้นจากสารเคมีที่ก่อระคายเคือง เพื่อทำให้วิธีการทดสอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการประเมินระดับความรุนแรงของสารเคมีต่อดวงตามากยิ่งขึ้น โดยมีกรอบแนวคิดดังนี้



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิด

สมมติฐาน

ระดับความปลอดภัยของสารเคมีต่อดวงตา หรือระดับความเป็นอันตรายของสารเคมีตามระบบ GHS ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความหนา ความขุ่น และการติดสีที่กระจกตาที่แตกต่างกัน และมีผลต่อการประเมินค่าดัชนีความระคายเคือง รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของกระจก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การพัฒนาวิธีการทดสอบความระคายเคืองต่อดวงตาด้วยวิธี Isolated Chicken Eye ตาม OECD Test Guideline No. 438 เพื่อให้มีความสอดคล้องตามเกณฑ์การประเมินความระคายเคืองต่อดวงตาตามมาตรฐาน OECD GLP และส่งผลให้การประเมินความระคายเคืองต่อดวงตามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วิธีการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกชนิดของสารเคมีที่มีใช้ภายในห้องปฏิบัติการ แบ่งตามระดับความปลอดภัยของสารเคมีตาม GHS โดยแบ่งเป็นสารเคมีประเภท Category 1 จำนวน 5 ชนิด สารเคมีประเภท Category 2A จำนวน 11 ชนิด และสารเคมีประเภท Category 2B จำนวน 10 ชนิด ซึ่งเกณฑ์การประเมินผลการระคายเคืองบนกระจกตาไก่ ตาม OECD Test Guideline No. 438

ประกอบด้วย ความหนาของกระจกตา (corneal swelling) ความขุ่นของกระจกตา (corneal opacity) การติดสีที่กระจกตา (fluorescein retention) แล้วนำมาหาค่า Irritation index ด้วยการหาค่าเฉลี่ย (mean) ของเกณฑ์การประเมินของสารเคมีที่ทำการทดสอบต่อดวงตา ซึ่งสารเคมี 1 ชนิดทำการทดสอบกับดวงตาไก่ จำนวน 3 ดวง แล้วคัดเลือกค่า mean สูงสุด (maximum mean) ในแต่ละเกณฑ์เพื่อนำค่า maximum mean คำนวณหาค่า Irritation index (Koll, et al., 2017) ดังนี้

Irritation index = maximum mean corneal swelling + maximum mean opacity*20 + mean fluorescein retention score*20

และในส่วนของการประเมินเปรียบเทียบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้นบนกระจกตาไก่จากการสัมผัสสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองทั้งในส่วนของสารเคมีประเภท Category 2A และสารเคมีประเภท Category 2B โดยระบบการให้คะแนนพยาธิสภาพของกระจกตาไก่ตาม OECD Test Guideline No. 438 แสดงรายละเอียดตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงระบบการให้คะแนนพยาธิสภาพของกระจกตาไก่ตาม OECD Test Guideline No. 438

Parameter	Observation	Score	Description
Epithelium : Erosion	Very slight	1/2	Few single cells up to the entire single superficial layer
	Slight	1	Up to 3 layers are gone
	Moderate	2	Up to 50% of the epithelial layer is gone
	Severe	3	Epithelial layer is gone up to the basement membrane
Epithelium :Vacuolation	Very slight	1/2	Single to few scattered cells
	Slight	1	Groups of vacuolated cells or single string of cells with small vacuoles
	Moderate	2	Up to 50% of the epithelium consists of vacuolated cells
	Severe	3	50-100% of the epithelium consists of vacuolated cells
Epithelium : Necrosis	Normal	-	< 10 necrotic cells
	Very slight	1/2	10-20 necrotic cells
	Slight	1	20-40 necrotic cells
	Moderate	2	Many necrotic cells but < 50% of the epithelial layer
	Severe	3	50-100% of the epithelial layer is necrotic
Stroma : Pyknotic nuclei	Normal	-	< 5 pyknotic nuclei
	Slight	1	5-10 pyknotic nuclei
	Moderate	2	> 10 pyknotic nuclei
Stroma : Disorder of fibres	Present	P	Irregular appearance of the fibres
Endothelium: Necrosis	Present	P	The endothelium consists of only one layer, so a grade is not relavant

ที่มา: OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (OECD, 2018)

ขั้นตอนการศึกษา

ในวันทำการทดสอบจะได้รับหัวไก่ที่ยังมีดวงตาด้วยการห่อผ้าชุบสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% และแช่น้ำแข็ง นำส่งมายังห้องปฏิบัติการกลุ่มสัตว์ทดลองภายใน 4 ชั่วโมงจากโรงฆ่าสัตว์ ก่อนทำการทดสอบนำหัวไก่มาผ่าแยกดวงตาออก แล้วคัดเลือกดวงตาไก่ โดยมีเกณฑ์ที่จะผ่านการคัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบต่อต้องไม่มีความขุ่นของกระจกตา โดยวัดค่าด้วยกล้องตรวจตาชนิดลำแสงแคบ (slit lamp microscope) และย้อมติดสี 2% sodium fluorescein ที่กระจกตา มีคะแนนไม่มากกว่า 0.5 จึงผ่านการคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบกับสารเคมี ซึ่งขั้นตอนทดสอบกับสารเคมีจะนำดวงตาไก่มายึดในกล่องที่ปล่อยสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% ที่อุณหภูมิ 32±1.5 องศาเซลเซียส เพื่อทำการปรับสภาพดวงตาเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ซึ่งดวงตาไก่จำนวน 3 ดวงทำการทดสอบด้วยสารเคมี 1 ชนิด โดยสารเคมีที่มีลักษณะกายภาพที่เป็นของแข็งใช้ปริมาณ 0.03 กรัม และสารเคมีที่เป็นของเหลวใช้ปริมาณ 0.03 มิลลิลิตร ทำการใส่สารทดสอบบนกระจกตาเป็นเวลา 10 วินาที ล้างออกด้วยสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% แล้วทำการตรวจความขุ่นของกระจกตาด้วยกล้อง slit lamp microscope แล้วนำดวงตาไก่มาวัดการติดสีที่กระจกตาด้วย 2% sodium fluorescein ที่เวลา 30 นาที และวัดค่าความหนาของกระจกตาด้วยเครื่องอัลตราโซนิกแบบสัมผัส (corneal pachymeter) ซึ่งเครื่องมือวัดดังกล่าวจะทำการทดสอบด้วยการปรับเทียบค่า (calibrate) บนแท่งควบคุม (calibration test block) ที่หยดสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% ซึ่งเป็นการควบคุมคุณภาพก่อนทำการทดสอบ แล้วจึงทำการวัดความหนาของกระจกตาที่เวลา 30, 75, 120, 180 และ 240 นาที

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ค่า Irritation index ของสารเคมีที่ได้รับการทดสอบนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติพรรณนา และทดสอบสมมติฐานข้อมูล โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทิศทางเดียว (One-way ANOVA) และในส่วนของคะแนนพยาธิสภาพของกระจกตาไก่ของสารเคมีประเภท Category 2A และสารเคมีประเภท Category 2B นำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติการทดสอบความแตกต่างของสองประชากรอิสระด้วย Mann-Whitney U test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ผลการศึกษา

จากการทดสอบสารเคมีที่จำแนกความระดับความรุนแรงตามระบบ GHS ต่อดวงตาทั้งหมด 26 ชนิด โดยใช้เกณฑ์ตาม OECD TG 438 ซึ่งประเมินจากค่าเฉลี่ยการบวมของกระจกตา (corneal swelling) ความขุ่นของกระจกตา (corneal opacity) และการติดสีของกระจกตาด้วยสีย้อม sodium fluorescein (fluorescein retention) แล้วนำมาหาค่า irritation index พบว่าสารเคมีประเภท Category 1 มีค่า irritation index ตั้งแต่ 128-168 ส่วนสารเคมีประเภท Category 2A และประเภท Category 2B มีค่า irritation index ตั้งแต่ 32-149 และ 18-100 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเกณฑ์การประเมินบนกระจกตาไก่และ Irritation index ของสารเคมีตาม GHS

Chemical category (GHS)	Chemical name	Maximum mean			Irritation index*
		Corneal swelling	Corneal opacity*20	Fluorescein retention*20	
1	1-butabol	6	74	60	140
1	Propanol	15	60	60	135
1	Dibenzoyl-tartaric acid	20	54	54	128
1	Chlorhexidine	28	80	60	168

ตารางที่ 2 แสดงค่าเกณฑ์การประเมินบนกระจกตาไก่และ Irritation index ของสารเคมีตาม GHS (ต่อ)

Chemical category (GHS)	Chemical name	Maximum mean			Irritation index*
		Corneal swelling	Corneal opacity*20	Fluorescein retention*20	
1	Benzalkonium chloride 5%	10	74	60	144
2A	sodium dibasic	18	34	60	112
2A	citric acid	3	80	66	149
2A	sodium oxalate	6	10	22	38
2A	Fushin	19	60	40	119
2A	Hematoxy	4	14	14	32
2A	Magnesium chloride	11	6	6	23
2A	Potassium cyanide	69	34	60	163
2A	Sodium thiosulphate	21	6	0	87
2A	EDTA	1	27	20	48
2A	Potassium ferricyanide	0	66	0	66
2A	2,6 dichlorobenzylchloride	25	60	60	145
2B	NaCl	5	0	14	19
2B	Dibenzoyl-tartaric acid	14	40	46	100
2B	Quinacrine dihydrochlorine	1	20	14	35
2B	Sodium bicarbonate	0	14	4	18
2B	Glycerol	25	14	26	65
2B	Ethyl 2 methyl acetoacetate	15	10	10	35
2B	Sodium hydroxide 1 N	0	80	60	140
2B	Poly (vinylpyrrolidone)-iodine	18	16	40	74
2B	Potassium phosphate	10	0	13	23
2B	Sodium hydrogen phosphate	7	6	20	33

เมื่อนำค่า irritation index และ corneal opacity ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean±S.E.) ระหว่างสารเคมีประเภท Category 1 กับสารเคมีประเภท Category 2A และ Category 2B แล้ว พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (irritation index: p-value = 0.020, <0.001; corneal opacity : p-value = 0.032, <0.001 ; ตารางที่ 3)

ในส่วนของการประเมินรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของกระจกตาตามพยาธิสภาพของกระจกตาไก่ตาม OECD TG 438 โดยรายละเอียดตามตารางที่ 1 พบว่าพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นบนกระจกตาจากการสัมผัสสารเคมีประเภท Category 2A เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีประเภท Category 2B พบลักษณะ epithelium necrosis ซึ่งมีลักษณะเนื้อตายของชั้นเยื่อบุของกระจกตา เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าของคะแนนพยาธิสภาพกระจกตาไก่ทางสถิติแล้ว พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.040) ทั้งนี้รอยโรคอื่นๆ ของชั้น epithelium ทั้งการลอกหลุด (erosion) และช่องว่าง

ภายในเซลล์ (vacuolation) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ผลการทดสอบไม่พบรอยโรคที่ผิดปกติของไฟเบอร์ในชั้นสโตรมา (disorder of fibres) รวมถึงเนื้อตายของเยื่อบุชั้นใน (endothelial necrosis) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 แสดงเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเกณฑ์การประเมินบนกระจกตาไก่และ irritation index ของกลุ่มสารเคมีตาม GHS

เกณฑ์การประเมิน	Cat. 1 (n = 5)	Cat. 2A (n = 11)	Cat. 2B (n = 10)
Irritation index	143.00±6.80	90±23.32*	47.40±15.65*
Corneal swelling	15.80±3.85	10.00±3.51	9.00±4.70
Corneal opacity	68.40±4.87	39.60±13.44*	17.60±6.50*
Fluorescein retention	58.80±1.20	40.40±10.19	20.80±7.20

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ Category 1 ที่ $p<0.05$

ตารางที่ 4 แสดงคะแนนพยาธิสภาพของกระจกตาไก่ตาม OECD Test Guideline No. 438

Chemical Category (GHS)	Chemical Name	Epithelium			Stroma		Endothelium
		Erosion	Vacuolation	Necrosis	Pyknotic nuclei	Disorder of fibres	Necrosis
2A	sodium dibasic	0	0	2	1	-	-
2A	citric acid	0	0	0	0	-	-
2A	sodium oxalate	0	0	1	1	-	-
2A	Fushin	0	0	1	0	-	-
2A	Hematoxy	0	0	0	0	-	-
2A	Magnesium chloride	0	1	0	0	-	-
2A	Potassium cyanide	1	1	0	0	-	-
2A	Sodium thiosulphate	2	1	0	0	-	-
2A	EDTA	0	0	0	0	-	-
2A	Potassium ferricyanide	0	0	0	0	-	-
2A	2, 6 dichlorobenzylchloride	0	2	2	1	-	-
2B	NaCl	1	1	0	0	-	-
2B	Dibenzoyl-tartaric acid	0	0	0	0	-	-
2B	Quinacrine dihydrochlorine	0	0	0	0	-	-
2B	Sodium bicarbonate	0	2	0	0	-	-
2B	Glycerol	1	1	0	0	-	-
2B	Ethyl 2 methyl acetoacetate	0	0	0	0	-	-
2B	Sodium hydroxide 1 N	0	0	0	0	-	-

ตารางที่ 4 แสดงคะแนนพยาธิสภาพของกระจกตาไก่ตาม OECD Test Guideline No. 438 (ต่อ)

Chemical Category (GHS)	Chemical Name	Epithelium			Stroma		Endothelium
		Erosion	Vacuolation	Necrosis	Pyknotic nuclei	Disorder of fibres	Necrosis
2B	Poly (vinylpyrrolidone)-iodine	0	0	0	0	-	-
2B	Potassium phosphate	0	1	0	0	-	-
2B	Sodium hydrogen phosphate	0	0	0	0	-	-

อภิปรายผล

การทดสอบ ICE ตามมาตรฐาน OECD GLP TG 438 ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบทางเลือก เพื่อลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองในการทดสอบความระคายเคืองต่อดวงตา จัดเป็นลักษณะการทดสอบประเภทการศึกษาภายนอกกายสัตว์ทดลอง (*ex vivo*) ซึ่งดวงตาไก่นั้นมีโครงสร้างความหนาของชั้นต่างๆของกระจกตา รวมถึงองค์ประกอบเซลล์กระจกตาที่ใกล้เคียงกับมนุษย์ (Ritchey et al., 2011) จึงทำให้วิธีการทดสอบ ICE สามารถนำมาประเมินผลกระทบที่เกิดจากการสัมผัสสารเคมีที่มีระดับความระคายเคืองต่างๆ ได้ใกล้เคียงในมนุษย์ เมื่อทำการประเมินความระคายเคืองบนกระจกตาไก่ด้วยค่า irritation index โดยใช้พื้นฐานจากเกณฑ์การประเมินการเปลี่ยนแปลงบนกระจกตาไก่ตาม OECD TG 438 ทั้งค่าการบวม ความขุ่น และการติดสีบนกระจกตานั้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารเคมีประเภท Category 1 ได้ค่า irritation index ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสารเคมีประเภท Category 2A และ Category 2B ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานการทดสอบสารเคมีทั้งหมด 26 ชนิดและพบว่า irritation index ของสารเคมีประเภท Category 1 มีค่า irritation index ในช่วง 88-125 สารเคมีประเภท Category 2A มีค่า irritation index ตั้งแต่ 89-94 และในส่วนของสารเคมีประเภท Category 2B มีค่าตั้งแต่ 86-90 (Koll, et al., 2017) การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม ทั้งในส่วนของ corneal opacity และการบวมของกระจกตา (corneal swelling) เนื่องจากกระจกตาเมื่อได้รับผลกระทบจากการสัมผัสสารเคมีจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในชั้นเยื่อบุของกระจกตา (corneal epithelium) ที่เป็นผนังกั้น (barrier) สิ่งแปลกปลอมชั้นแรกตามธรรมชาติ การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อทำการวัดค่า corneal opacity ของสารเคมีประเภท Category 1 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสารเคมีประเภท Category 2A และ Category 2B เนื่องจากกระจกตาเมื่อสัมผัสกับสารเคมีประเภท Category 1 จะได้รับความเสียหายจากการระคายเคืองที่รุนแรงมากกว่าในสารเคมีประเภท Category 2A และ Category 2B ซึ่งเป็นการเสียหายของกระจกตาที่สัมผัสสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองเพียงเล็กน้อย (mild irritant) (Wilson, Ahearne & Hopkinson, 2015) ความเสียหายของระดับเซลล์จากการสัมผัสสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองรุนแรงจะพบความเสียหายถึงชั้น stroma และ endothelium (Prinsen et al., 2011) รวมถึงผลกระทบจากการสัมผัสสารเคมีที่สามารถก่อความระคายเคืองที่รุนแรงนั้น ทั้งนี้ยังส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีนจึงพบความขุ่นมากขึ้นที่กระจกตาได้ (Wilson et al., 2015) ค่า corneal opacity ที่สูงขึ้นจากการสัมผัสสารเคมีประเภท Category 1 ที่ได้รับผลกระทบต่อกระจกตาที่รุนแรง จะส่งผลให้ค่า irritation index สูงขึ้นเช่นกัน ทำให้เห็นได้ว่าค่า irritation index ซึ่งเป็นเกณฑ์เพิ่มเติมสามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อชี้บ่งระดับความรุนแรงของสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองต่อดวงตาได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบผลการประเมินทาง

จุลพยาธิวิทยาของกระจกตาไก่ด้วยการเปรียบเทียบจากการสัมผัสสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองระหว่างสารเคมีประเภท Category 2A และ Category 2B พบลักษณะ epithelium necrosis ที่มีความแตกต่างของคะแนนของพยาธิสภาพของกระจกตาไก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้พยาธิสภาพดังกล่าวบ่งชี้ถึงการบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) ที่แสดงถึงความเสียหายของเซลล์เมมเบรน (cell membrane) (Miller & Zachary, 2017) ทั้งนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมในกรณีเมื่อกระจกตาได้รับการสัมผัสกับสารเคมีประเภท Category 2A และ Category 2B เซลล์ที่เกิดความเสียหายไม่รุนแรงจะมีความสามารถในการซ่อมแซมตัวเองได้ และแผลที่เกิดขึ้นบนกระจกตาก็สามารถหายกลับมาเป็นปกติได้ (fully reversible) ภายใน 21 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามจะพบความเสียหายของกระจกตาที่รุนแรงจากการสัมผัสสารเคมีประเภท Category 1 และไม่สามารถหายกลับมาเป็นปกติ (irreversible) ได้ (Barroso et al., 2017; Lotz et al., 2016) จึงทำให้การศึกษาผลกระทบของ corneal epithelium ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญใช้ในการประเมินผลทางจุลพยาธิวิทยาที่ใช้ในการประเมินความเสียหายของดวงตา มีประโยชน์ในการนำผลทางจุลพยาธิวิทยามาร่วมประเมินในกรณีที่จำแนกประเภทสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองที่มีผลก่อความระคายเคืองที่มีความก้ำกึ่งและไม่สามารถจำแนกประเภทสารเคมีได้อย่างชัดเจน จากการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาเกณฑ์ประเมินทางจุลพยาธิวิทยา โดยเกณฑ์ดังกล่าวมีการใช้ค่าคะแนนทางพยาธิวิทยาที่มีลักษณะ semi-quantitative scoring ซึ่งเกณฑ์ดังกล่าวแสดงผลกระทบของเซลล์จากการสัมผัสสารเคมีที่มีความรุนแรงที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังเป็นการรวบรวมข้อมูลของสารเคมีประเภท 2A และสารเคมีประเภท 2B ที่ยังมีการรายงานค่อนข้างน้อย หากมีการพัฒนาเกณฑ์ดังกล่าวเพื่อใช้ในการร่วมประเมินเพื่อจำแนกระดับความปลอดภัยของสารเคมีนั้น ควรนำระบบการให้คะแนนดังกล่าวนำมาทวนสอบความใช้ได้เพื่อทำให้เกิดความน่าเชื่อถือของเกณฑ์การประเมินตามหลักการทางสถิติ (Gibson, Olivier & Meyerholz, 2013) ทั้งนี้พบการรายงานการใช้เกณฑ์ประเมินทางจุลพยาธิวิทยาของกระจกตาไก่ในการทดสอบ ICE ซึ่งมีผลต่อความถูกต้อง (accuracy) ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวมากขึ้น รวมถึงพบว่าผลลบลวง (false negative) มีค่าลดลงด้วย (Cazelle et al., 2014) การศึกษาผลทางจุลพยาธิวิทยาด้วยการย้อมสี H&E ซึ่งเป็นสีย้อมมาตรฐานนั้นอาจไม่เพียงพอในการแยกแยะส่วนประกอบต่างๆ ในชั้นเมมเบรน (membrane) จึงมีข้อแนะนำในการย้อมสี Periodic Acid-Schiff (PAS) ซึ่งเป็นการย้อมสีพิเศษเพิ่มเติมที่สามารถเห็นโครงสร้างของชั้นต่างๆ ของกระจกตา ที่มีองค์ประกอบของคอลลาเจนที่แตกต่างกันส่งผลต่อการติดสีของชั้นต่างๆ ของกระจกตาที่ชัดเจนขึ้น ส่งผลให้การประเมินผลทางจุลพยาธิวิทยาของกระจกตานั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Prinsen et al., 2011) จึงทำให้เห็นได้ว่าการนำเกณฑ์ประเมินดังกล่าวมาร่วมประเมินเพิ่มเติมสามารถช่วยในการจำแนกประเภทสารเคมีที่ก่อความรุนแรงที่แตกต่างกันได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

สรุปผล

การพัฒนาเกณฑ์การประเมินระดับความปลอดภัยของสารเคมีต่อดวงตาด้วยวิธีทดสอบความระคายเคืองต่อดวงตาด้วยวิธี ICE ของห้องปฏิบัติการกลุ่มสัตว์ทดลองที่มีความสอดคล้องตามมาตรฐาน OECD GLP TG 438 ด้วยการเพิ่มเกณฑ์การประเมินด้วยค่าดัชนีความระคายเคือง และผลทางจุลพยาธิวิทยานั้น เพื่อทำให้การทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับผลกระทบที่เกิดขึ้นกับดวงตามนุษย์เมื่อสัมผัสสารเคมีมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกณฑ์ประเมินผลทางจุลพยาธิวิทยา ซึ่งการนำเกณฑ์ดังกล่าวประเมินผลร่วมด้วยนั้น สามารถจำแนกประเภทสารเคมีที่ก่อให้เกิดความระคายเคืองได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังใช้เป็นแนวทางในการตรวจประเมินระดับความปลอดภัยเบื้องต้นในด้านการระคายเคืองต่อดวงตาของสารเคมีได้อีกทางหนึ่ง

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบผลทางจุลพยาธิวิทยาของกระจกตาจากการสัมผัสสารเคมีประเภท Category 2A และ Category 2B ซึ่งยังมีรายงานการศึกษาประเด็นดังกล่าวค่อนข้างน้อย หากมีการนำเกณฑ์ประเมินดังกล่าวด้วยระบบการให้คะแนนก้ำกึ่งเชิงปริมาณมาใช้ในการจำแนกระดับความปลอดภัยของสารเคมีนั้น ควรนำมาทวนสอบความใช้ได้เพื่อทำให้เกิดความน่าเชื่อถือของเกณฑ์การประเมินตามหลักการทางสถิติเพื่อสามารถนำมาเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Barile , F.A. (2010). Validating and Troubleshooting Ocular In Vitro Toxicology Tests. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 61(2): 136-145.

Barroso, J., et al. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). Archives of Toxicology Journal, 91(2): 521-547.

Boonyareth, M., Inkomlue R., Sachanonta N., Sangkitporn S. (2018). Method Verification of Isolated Chicken Eye Test. Bulletin of The department of Medical Sciences Journal, 60(4): 168-180. (in Thai).

Cazelle, E., et al. (2014). Suitability of histopathology as an additional endpoint to the Isolated Chicken Eye Test for classification of non-extreme pH detergent and cleaning products. Journal of Toxicology in Vitro, 28(4): 657-666.

Gibson, KN., Olivier, AK., Meyerholz, DK. (2013). Principles for valid histopathologic scoring in research. Journal of Veterinary Pathology, 50(6): 1-22.

Kolle, SN., Cott, AV., Ravenzwway, BV., Landsiedel, R. (2017). Lacking applicability of in vitro eye irritation methods to identify seriously eye irritating agrochemical formulation: Results of bovine cornea opacity and permeability assay, isolated chicken eye test and the EpicularTM ET-50 method to classify according to UN GHS. Journal of Regulatory Toxicology and Pharmacology, 85(2017): 33-47.

Lotz, C., et al. (2016). Alternative Methods for the Replacement of Eye Irritation Testing. Journal of ALTEX, 33(1): 55-67.

Miller, MA., Zachary, JF. (2017). Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. Pathologic Basis of Veterinary Disease, Retrieved January 22, 2021, from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7171462/

OECD. (2018). OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Retrieved February 16, 2021, from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/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_9789264203860-en

Prinsen, MK., Schipper, MEI., Wijnands, MVW. (2011). Histopathology in the isolated chicken eye test and comparison of different staining of the cornea. Journal of Toxicology in Vitro, 25(7): 1475-1479.

Prinsen, MK., Hendriksen, C., Krul, C., Woutersen, RA. (2017). The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits. Journal of Regulatory Toxicology and Pharmacology, 85(2017): 132-149.

Ritchey, ER., et al. (2011). The chicken cornea as a model of wound healing and neuronal reinnervation. Journal of Molecular Vision, 17: 2440-2454.

Wilson, SL., Ahearne, M., Hopkinson, A. (2015). An overview of current techniques for ocular toxicity testing. Journal of Toxicology, 327(2015): 32-46.