

原 著

歯科材料・器械 Vol.28 No. 1 1-7 (2009)

## 歯冠用硬質レジン添加剤の細胞毒性に関する生物学的検討

松浦 理太郎<sup>1</sup> 三鑰えりこ<sup>1</sup>  
安楽 照男<sup>1</sup> 山本 哲也<sup>2</sup>

## Biological Investigation on the Cytotoxicity of the Additives in the Hard Resin for Dental Crowns

Ritaro MATSUURA<sup>1</sup>, Eriko MIKAGI<sup>1</sup>,  
Teruo ANRAKU<sup>1</sup> and Tetsuya YAMAMOTO<sup>2</sup>

**Keywords :** Hard resin, Biological evaluation, Cell toxicity test, Additives

Although dental hard composite resins contain various additives that improve color tones and adhesiveness, the biological safety of the additives have not been extensively investigated. We examined the influence of fluorescent and coloring pigments, which are common additives to hard composite resin for dental crowns, on colony formation, proliferation, DNA synthesis and protein synthesis of culture cells in addition to cytotoxicity. The coloring pigment inhibited colony formation, proliferation and protein synthesis whereas the fluorescent pigment had no effect on the cultured cells. Further, the low concentration of both pigments significantly enhanced DNA synthesis but did not induce apoptosis or necrosis of the culture cells.

**キーワード :** 硬質レジン, 生物学的評価, 細胞毒性試験, 添加剤

歯科用硬質レジンには、色調や接着性の向上のために様々な化合物が添加されているが、添加剤の生物学的安全性についての検討は少ない。そこで、歯冠用硬質レジンの添加剤である蛍光顔料および着色顔料の培養細胞のコロニー形成、細胞増殖、DNA合成および蛋白合成に及ぼす影響、さらには細胞障害性について検討した。着色顔料はコロニー形成、細胞増殖および蛋白合成を阻害したが、蛍光顔料はこれらに対し影響を及ぼさなかった。DNA合成は低濃度の着色顔料および蛍光顔料によって促進されたが、アポトーシスおよび壊死はいずれの顔料によっても誘導されなかった。

### 緒 言

歯科医療においては、金属やレジンといった人工材料が高頻度に用いられているが、近年、こうした歯科材料に対して生体適合性が強く求められるようになり、感作

性や細胞毒性などの様々な検証が行われるようになってきている。その結果、歯科用金属の中に含有されている水銀、パラジウム、ニッケル、クロムがアレルゲンとなりうることや<sup>1)</sup>、銅や亜鉛が細胞毒性を発揮することなどが明らかとなってきた<sup>2,3)</sup>。金属とともに使用頻度の

原稿受付 2008年8月19日、受理 2008年12月4日

<sup>1</sup> 山本貴金属地金株式会社 研究開発センター(〒781-5451 高知県香南市香我美町上分字大谷1090-3)

<sup>2</sup> 高知大学医学部歯科口腔外科学講座(〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮)

<sup>1</sup> R&D center, Yamamoto Precious Metal Co.,Ltd. (1090-3, kamibunaza, Kagami-Cho, Kohnan-City, Kochi 781-5451)

<sup>2</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kochi Medical School, Kochi University, Kochi (Kohasu, Oko-Cho, Nankoku-City, Kochi 783-8505)

高い歯科材料であるレジンについても同様の検証が行われており、モノマーが感作性<sup>4)</sup> および細胞毒性<sup>5)</sup> を有することが指摘されている。

光重合型歯冠用硬質レジンは、従来の加熱重合型のものより操作性や審美性に優れていることから、前装冠やジャケット冠などに広く用いられている。このレジンは、ウレタン系ジメタクリレート (UDMA) やトリエチレングリコールジメタクリレート (TEGDMA) などのベースモノマーと無機フィラーから構成され、微量の重合開始剤、蛍光顔料、着色顔料などの化合物が添加されている。これらのうち、無機フィラーはレジンの強度、磨耗性、吸水性、操作性、光学的特性に大きく関与することより、その種類や形状、粒度、充填率などについて多くの研究が行われてきた<sup>6~13)</sup>。しかしながら、レジンの生体適合性についての検討は充分になされているとは言えず、なかでも添加剤の安全性に関しては、企業秘密という観点からその詳細が公表されていないこともあって、最終的な製品もしくは添加剤に含有される個々の成分についての検討は行われているものの<sup>5)</sup>、種々の物質の混合物としての添加剤についての検討はほとんどなされていない。

医療機器の生物学的安全性評価については、国際基準である ISO 10993「医療機器の生物学的評価」シリーズ、ISO 7405「歯科 - 歯科用医療機器の生体適合性の前臨床評価 - 歯科材料の試験方法」、JIS T 6001「歯科用医療機器の生体適合性の前臨床評価 - 歯科材料の試験方法」に準拠して行うこととされている。これらの規格には多

くの試験法が列記されており、医療機器のカテゴリー毎に必要とされる試験が定められている。しかしながら、より正確な歯科材料の生物学的安全性の評価を行うためには、新薬の効果および安全性が多段階のステージで様々な観点から評価されているように、前臨床試験と臨床試験の間を補完するような試験による検証も必要であると考えられる。

そこで本研究では、歯冠用硬質レジンの添加剤として使用されている蛍光顔料および着色顔料の生物学的安全性について、ISO 10993「医療機器の生物学的評価」シリーズに準拠した試験としてコロニー形成試験を行うとともに、これらの安全性をより詳細に検討すべく、培養細胞の増殖、DNA 合成および細胞質分画の蛋白量に及ぼす影響、さらには細胞障害性について検討を行ったので報告する。

## 材料および方法

### 1. 材料および試験液の調製

酸化チタン、酸化第二鉄、四酸化三鉄、ウルトラマリンブルー、酸化ジルコニウム、イソインドリノン (3,3'-(1,4-phenylenedimino) bis[4,5,6,7-tetrachloro-1H-isoindol-1-one])、ジケトピロロピロール (3,6-Bis(4-chlorophenyl)-2,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4-dione)、ベンズイミダゾロン (2-[1-[[2,3-Dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl]amino]carbonyl]-2-oxopropyl]azo]benzoic acid) を 2:1:1:1:1:1 の比率で混合したものを着色顔料、ユーロピウム付活ピロリン

表 1 各試料の主成分

着色顔料
酸化チタン
酸化第二鉄
四酸化三鉄
ウルトラマリンブルー
酸化ジルコニウム
イソインドリノン 3,3'-(1,4-phenylenedimino)bis[4,5,6,7-tetrachloro-1H-isoindol-1-one]
ジケトピロロピロール 3,6-Bis(4-chlorophenyl)-2,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4-dione
ベンズイミダゾロン 2-[1-[[2,3-Dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl]amino]carbonyl]-2-oxopropyl]azo]benzoic acid

蛍光顔料
ユーロピウム付活ピロリン酸ストロンチウム・マグネシウム
ユーロピウム付活ピロリン酸ストロンチウム
ユーロピウム付活ハロリン酸ストロンチウム
ユーロピウム付活クロロリン酸カルシウム・バリウム

酸ストロンチウム・マグネシウム、ユーロピウム付活ピロリン酸ストロンチウム、ユーロピウム付活ハロリン酸ストロンチウム、ユーロピウム付活クロロリン酸カルシウム・バリウムを等量混合したものを蛍光顔料とした(表1)。各顔料を5% (v/v) ウシ胎児血清(Hyclone) 添加MO5培地(Invitrogen)あるいは10% (v/v) ウシ胎児血清添加MEM培地(日本製薬)に対し0.1g/mlとなるよう懸濁させたのち、37℃の5%炭酸ガスインキュベーター中で24, 48あるいは168時間静置した。その後、溶液を1000rpmで10分間遠心し、上清を0.2μmの滅菌フィルター(Millipore)で濾過し、100%の試験原液とした。

## 2. 培養細胞を用いたコロニー形成試験

V79細胞(チャイニーズハムスター肺由来細胞)をMO5培地にて $2 \times 10^2$ 個/mlに調製したのち、24穴平底組織培養用マイクロプレートの各ウェルに0.5mlずつ播種し、37℃に設定した5%炭酸ガスインキュベーター中で6時間培養した。培養後、細胞がマイクロプレートの底面に接着していることを確認したのち培地を除き、各濃度の試験液(MO5培地にて24時間抽出したもの)を各々4個のウェルに0.5mlずつ加え、さらに6日間培養した。培養終了後、細胞を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で30分間固定後、0.1%メチレンブルー溶液で15分間染色して、細胞数50個以上のコロニー数を計測した。試験液の代わりにMO5培地を添加したウェルをコントロールとした。

## 3. 培養細胞を用いた細胞増殖、DNA合成および蛋白定量試験

3T3細胞(マウス由来線維芽細胞)をMEM培地にて $5 \times 10^4$ 個/mlに調製したのち、96穴平底組織培養用マイクロプレートの各ウェルに0.1mlずつ播種し、37℃に設定した5%炭酸ガスインキュベーター中で約24時間培養した。培養後、細胞がマイクロプレートの底面に接着していることを確認したのち培地を除き、各濃度の試験液(MEM培地にて各時間抽出したもの)を0.1mlずつ添加後48時間培養し、細胞増殖、DNA合成および蛋白合成を下記の方法にて測定した。

細胞増殖：上述の培養終了後、5mg/mlの3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma)溶液を各ウェルに10μlずつ添加し、37℃で4時間インキュベートした。培地を除去後、100μlの0.04M塩酸含有イソプロパノール溶液を加え、プレートミキサーを用いて室温で20分間攪拌した。その後、570nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー(THERMO max: Molecular Devices)にて測定し、コントロール値に対する相対比から細胞生存率を求めた。

DNA合成：上述の培養終了6時間前に[<sup>3</sup>H]-チミジン(New England Nuclear)を $3.7 \times 10^4$ Bq/well加え培養し、その後、0.25%トリプシン処理にて細胞を回収し、細胞内に取り込まれた[<sup>3</sup>H]の放射活性を液体シンチレーションカウンター(Pharmacia Biotech)によって測定し、コントロール値に対する相対比でもってDNA合成量とした。

蛋白定量：上述の培養終了後、0.25%トリプシン処理によって細胞を回収し、得られた細胞を1mmolのPhenyl methyl sulfonyl fluorideを添加した2-プロパノール溶液10μlとTNE緩衝液(20m mol/l Tris-HCl, pH 7.4, 2m mol/l EDTA)1mlの混合液50μlを加えることにより懸濁した。細胞懸濁液を12000rpmで15分間遠心し、その上清20μlを回収後、上清中に含まれる細胞質分画の蛋白量をBCA Protein Assay Kit(Pierce)を用いて測定した。各測定において、試験液の代わりにMEM培地を添加した際の測定結果をコントロール値とした。

## 4. フローサイトメトリー

MEM培地にて $5 \times 10^4$ 個/mlに調製した3T3細胞を径30mmの組織培養用ディッシュに3mlずつ播種し、37℃の5%炭酸ガスインキュベーター中で6時間培養した。細胞がディッシュの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各検体の試験原液(MEM培地にて24時間抽出したもの)を3mlずつ添加し、48時間培養した。培養後、ディッシュより0.25%トリプシンを用いて浮遊細胞および付着細胞を回収し、リン酸緩衝液を用いて $1 \times 10^6$ 個/mlに調製した。その後、Annexin V-FITC(Sigma)およびPropidium iodideにて染色したのち、フローサイトメーター(FACScalibur, Becton Dickinson)で測定し、CELLQUEST software(Becton Dickinson)を用いて解析した。

## 5. 統計解析

各試験は3回の繰り返し測定を行い、統計処理にはWilcoxonの順位和検定を用い、危険率5%未満を有意差ありとした。

## 結 果

### 1. V79細胞のコロニー形成能に及ぼす影響

V79細胞のコロニー形成能は、いずれの濃度の蛍光顔料によっても影響を受けなかった(図1)。一方、着色顔料は12.5%以上の濃度でコロニー形成を有意に阻害し、その阻害効果は濃度依存的で、100%濃度の着色顔料の添加によりコロニー形成は完全に阻害された。

### 2. 3T3細胞の増殖、DNA合成および細胞質分画の

#### 蛋白量に及ぼす影響

蛍光顔料は、いずれの抽出時間および濃度においても

3T3細胞の増殖には影響を及ぼさなかった(図2A)。

一方、着色顔料は12.5%の24時間抽出液で約40%の細胞増殖抑制を示し、抽出時間を48および168時間に長くしても、また、濃度を25, 50および100%に上げても増殖抑制効果は約40%であった(図2B)。

着色顔料および蛍光顔料はいずれの濃度においても3T3細胞のDNA合成を促進し、12.5および25%の濃度ではコントロールの200から450%であったのに対し、50%の濃度では200から400%, 100%の濃度では200%前後と50%以上の濃度ではDNA合成促進作用は低下した(図3Aおよび3B)。各顔料のDNA合成促進作用は50%の濃度までは抽出時間が長い程強いものの、100%の濃度では抽出時間に関係なく同程度のDNA合成促進作用を示した。

蛍光顔料はいずれの抽出時間および濃度においても

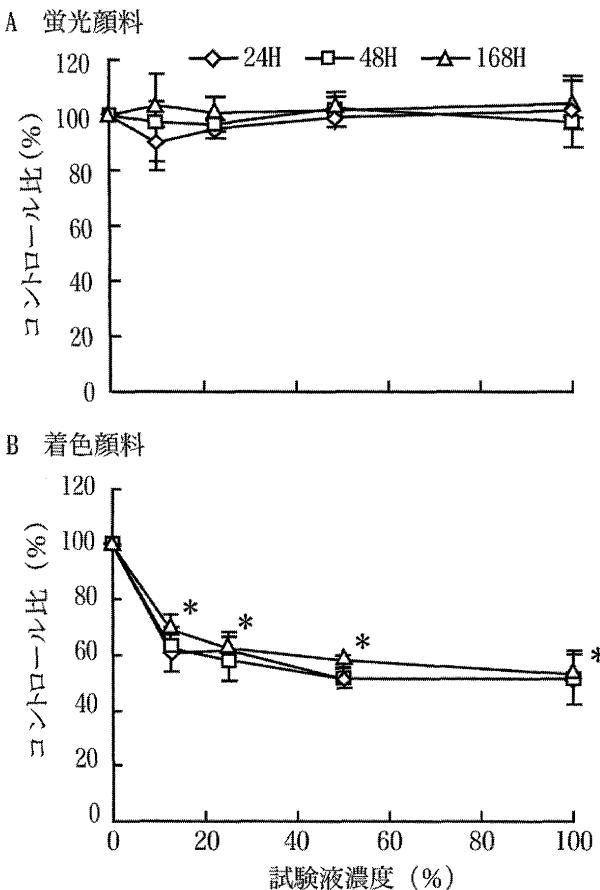


図2 3T3細胞の増殖に及ぼす蛍光および着色顔料の影響

3T3細胞を各濃度の蛍光(A)および着色顔料(B)の抽出液(24, 48および168時間抽出)の存在下で48時間培養後、MTTを用いて細胞数を求め、コントロール値に対する相対比より細胞生存率を算出した。

\*: コントロールに対して有意差有り ( $p < 0.05$ )

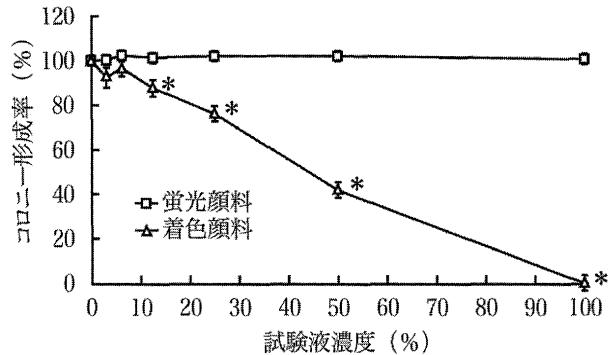


図1 V79細胞のコロニー形成に及ぼす蛍光および着色顔料の影響

V79細胞を各濃度の蛍光および着色顔料の24時間抽出液の存在下で6日間培養後、コロニー数を計測し、コントロール値に対する相対比を求めた。

\*: コントロールに対して有意差有り ( $p < 0.05$ )

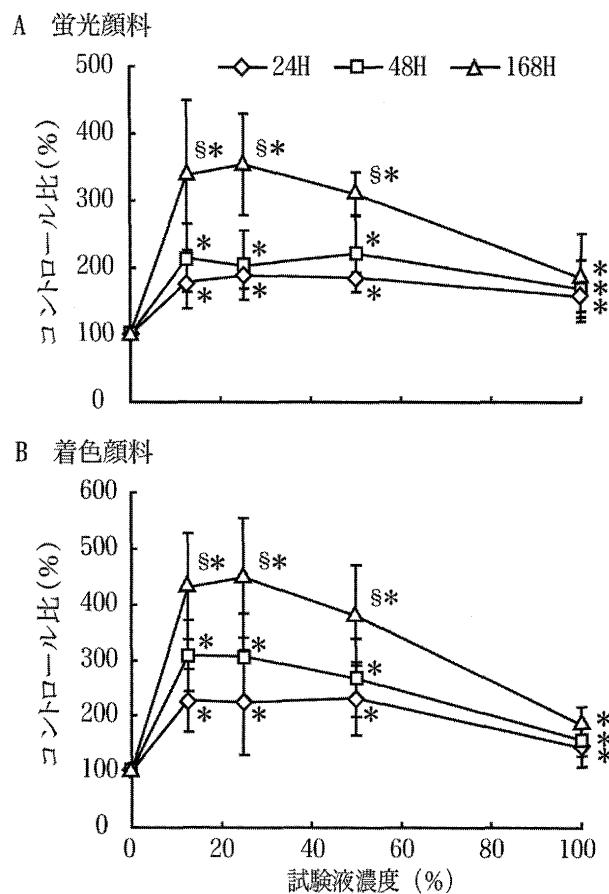
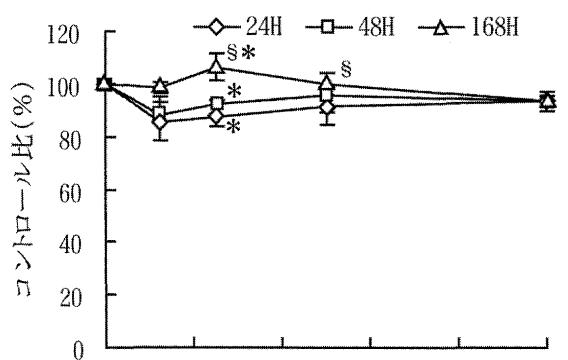


図3 3T3細胞のDNA合成に及ぼす蛍光および着色顔料の影響

3T3細胞を各濃度の蛍光(A)および着色顔料(B)の抽出液(24, 48および168時間抽出)の存在下で42時間培養した後、 $[^3\text{H}]$ -チミジンを添加してさらに6時間培養した。その後、 $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み量を計測し、コントロール値に対する相対比よりDNA合成量を算出した。

\*: コントロールに対して有意差有り ( $p < 0.05$ )  
§: 24時間抽出試料に対して有意差有り ( $p < 0.05$ )

A 蛍光顔料



B 着色顔料

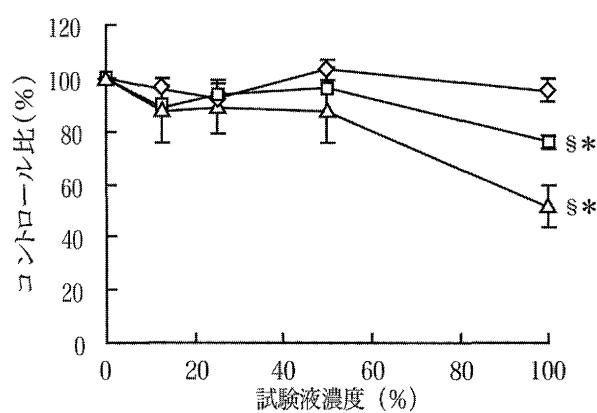


図4 3T3細胞の蛋白合成に及ぼす蛍光および着色顔料の影響

3T3細胞を各濃度の蛍光(A)および着色顔料(B)の抽出液(24, 48および168時間抽出)の存在下で48時間培養した後、蛋白量を測定し、コントロール値に対する相対比より蛋白合成量を算出した。

\*: コントロールに対して有意差有り( $p < 0.05$ )  
§: 24時間抽出試料に対して有意差有り( $p < 0.05$ )

3T3細胞の細胞質分画の蛋白量に影響を及ぼさなかった(図4 A)。一方、着色顔料は12.5, 25および50%の濃度ではいずれの抽出時間の試験液も細胞質分画の蛋白量に影響を及ぼさなかったものの、100%の濃度では48および168時間の抽出試験液が細胞質分画の蛋白量の減少を示し、それぞれの試験液で処理したときの細胞質分画の蛋白量はそれぞれコントロールの76および51%であった(図4 B)。

### 3. フローサイトメトリー解析

着色顔料および蛍光顔料で処理した3T3細胞におけるアポトーシスに陥った細胞数および壊死細胞数は、着色顔料ではそれぞれ1.4および14.2%、蛍光顔料ではそれぞれ0.1および16.3%で、いずれもコントロールとの間に有意差は認められなかった(図5)。

## 考 察

レジン系歯科材料の生物学的安全性に関する報告は、主にレジンモノマーの主成分であるUDMAやTEGDMAにおいてなされており、これらが細胞毒性、変異原性およびアレルギー誘発能を有し、安全性に多少なりとも問題があることが指摘されている<sup>14,15)</sup>。レジン系歯科材料にはモノマー以外にポリマーや種々の添加物が含有されており、これらもまた生体に何らかの為害作用を有することが報告されている<sup>5)</sup>。レジン系歯科材料の添加剤としては紫外線吸収剤、光増感剤、重合禁止剤、還元剤、各種顔料などが挙げられるが、これらの含有の有無やその含有量に関しては製品によって異なり、また、その詳細が明らかにされていないことが多い。そのため、レジンモノマーと比較して、添加剤の生物学的安全性に関する報告はあまり散見されない。そこで今回は、歯冠用硬質レジンの添加物の生物学的安全性を検討する中で、蛍光顔料ならびに着色顔料について、ISO 10993に準拠したコロニー形成試験に加え、培養細胞を用いたいくつかの検討を行った。

レジンに添加する顔料の量は、実際の使用においては歯の色調によって大きく異なる。そのため本試験では、歯冠用硬質レジンに用いられている主要な着色・蛍光顔料成分を混合したものを試料として用いた(表1)。各顔料成分のうち、酸化チタン、酸化第二鉄、酸化ジルコニウムなどは歯科材料としてよく用いられる材料であり、これらの生物学的安全性についてはいくつかの報告がなされている。Kangら<sup>16)</sup>は、酸化チタンのナノサイズ粒子が活性酸素および癌抑制遺伝子産物であるp53の活性化を介して末梢血リンパ球のDNA切断や細胞毒性を生じさせることを報告している。さらに、酸化チタンや四酸化三鉄のナノサイズ粒子がミトコンドリア活性の低下、細胞生存率の低下、細胞障害、変異などを引き

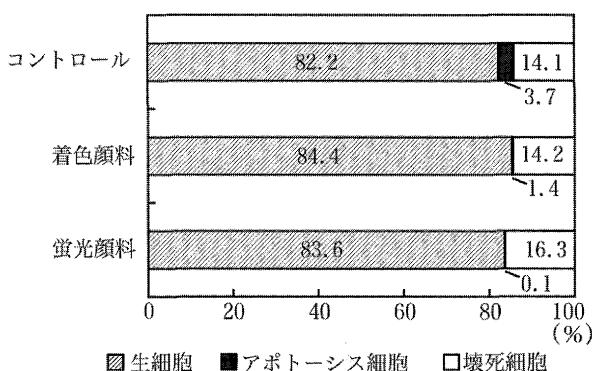


図5 蛍光および着色顔料の3T3細胞に及ぼす障害作用

3T3細胞を100%濃度の蛍光および着色顔料の24時間抽出液の存在下で48時間培養後、Annexin V-FITCおよびPropidium iodideにて染色し、フローサイトメーターにて解析した。3回の繰り返し実験において有意差は認められず、代表例を示した。

起こすことが報告されている<sup>17,18)</sup>。加えて、酸化ジルコニウムにも Vero 細胞の増殖抑制作用があることが示されている<sup>19)</sup>。これらの報告からすると、本研究において認められた着色顔料のコロニー形成、細胞増殖、DNA 合成、細胞質分画の蛋白量に対する作用は、こうした成分に基づくのではないかと考えられる。しかしながら、本試験では表 1 に示した成分の混合物を培養液に懸濁し、0.2 μm のフィルターでろ過した溶液を試験溶液として用いたため、実際にどの成分がどれだけ試験液に溶出しているかは明らかではない。したがって、今後、着色顔料試験溶液に含まれる各成分を分析し、培養細胞に及ぼす影響との関連を検討する必要がある。

培養細胞のコロニー形成、細胞増殖および細胞質分画の蛋白量は蛍光顔料によって影響されなかったが、着色顔料によっていずれも抑制された。これに対し、DNA 合成は低濃度の蛍光顔料および着色顔料いずれによっても促進された。細胞増殖を促進しなかったにもかかわらず DNA 合成が促進されたことからすると、両顔料が変異原性を有している可能性が示唆される。しかしながら、細菌を用いた復帰突然変異試験において、いずれの顔料にも変異原性は認められなかった（データ示さず）。現時点で、両顔料の DNA 合成促進作用の機序については不明であるが、今後、顔料で処理した細胞の細胞周期の解析などを行い、明らかにしていく必要がある。通常、コロニー形成および細胞増殖の抑制はアポトーシスあるいは壞死といった細胞死が誘導されることによって生じるが、フローサイトメトリーにおいて両顔料はいずれの細胞死も誘導しなかった。<sup>[3]H</sup>-チミジンの細胞内への取り込みは DNA 合成期(S期)に生じることより、蛍光顔料および着色顔料は DNA 合成を促進する作用を有していると思われる。しかしながら、両顔料にはコロニー形成や細胞増殖を促進させる作用はなく、逆に、着色顔料ではコロニー形成および細胞増殖は抑制された。このことは、両顔料は S 期以降の G2 期あるいは有糸分裂期(M 期)において細胞周期を停止させる作用を有している可能性を示唆している。細胞周期はサイクリン依存性キナーゼ(CDK) およびサイクリンから成る複合体によって制御されていることより、今後、各顔料の CDK およびサイクリン発現に及ぼす影響を分析する必要があると思われる。

本研究で使用した蛍光顔料および着色顔料は、ISO 10993 「医療用具の生物学的評価シリーズ」に準拠した *in vivo* 系評価法である急性毒性試験、皮膚感作試験、口腔粘膜刺激試験において毒性を示さなかった（データ示さず）。しかしながら、今回の検討において蛍光顔料に毒性は認められなかつたものの、着色顔料には細胞毒性が認められた。*in vitro* の実験系は用いる細胞や検体

の濃度などが *in vivo* の実験系とは大きく異なり、単純に両者を比較することは困難であるが、少なくとも *in vivo* の実験系において毒性を示さなかつたからといって生物学的安全性が保証されるものではないことを念頭に置く必要があるものと考えられる。

## 結 論

歯冠用硬質レジンの添加剤として使用されている蛍光顔料および着色顔料の培養細胞のコロニー形成、細胞増殖、DNA 合成および細胞質分画の蛋白量に及ぼす影響、さらには細胞障害性について検討し、以下の結果を得た。

1. 着色顔料はコロニー形成、細胞増殖および細胞質分画の蛋白量を抑制したが、蛍光顔料はこれらに対し影響を及ぼさなかった。

2. DNA 合成は低濃度の着色顔料および蛍光顔料いずれによっても強く促進されたが、アポトーシスおよび壞死はいずれの顔料によっても誘導されなかつた。

## 文 献

- 1) 濱野英也、金属アレルギー、海老原全、松村光明、濱野英也編、チアーサイドの歯科とアレルギーガイドブック、デンタルダイヤモンド；2004. p.38-41.
- 2) 高田尚美、各種の歯科用金属材料の細胞毒性に関する研究－L 1210 細胞の細胞増殖およびコロニー形成能による検討－、日大歯学 1984；58 : 48-58.
- 3) 飯島 敏、各種純金属の歯周組織に及ぼす影響に関する実験病理学的研究、日歯周誌 1989；31 : 997-1020.
- 4) Tosti A, Guerra L, Vincenzi C, Peluso AM. Occupational skin hazards from synthetic plastics. Toxicol Ind Health 1993 ; 9 : 493-502.
- 5) Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. J Biomed Mater Res 1995 ; 41 : 474-480.
- 6) 松村英雄、田上直美、中村光夫、前装用コンポジットの諸性質と臨床成績、歯界展望 2000 ; 95 : 937-952.
- 7) 平 雅之、岡崎正之、高橋純造、重合型コンポジットレジンのフィラーを科学する、DE 1998 ; 124 : 15-18.
- 8) 岡本 明、光重合コンポジットレジンのフィラーおよびマトリックスレジン組成が各種強度に及ぼす影響、日歯保存誌 1993 ; 36 : 1008-1019.
- 9) 宮坂 平、ハイブリッド型フィラーの表面処理法 第 1 報配合方法と機械的性質、歯材器 1996 ; 15 : 1-13.
- 10) 岸本吉則、星川 武、山本裕久、安楽照男、ゾル-ゲル法を用いた歯冠用硬質レジンの開発、日歯技工会誌 2002 ; 23 : 88-92.
- 11) 岸本吉則、星川 武、安楽照男、山本裕久、歯科用硬質レジンの開発、日歯技工会誌 2003 ; 24 : 61-66.
- 12) 岸本吉則、星川 武、山本裕久、安楽照男、動的粘弾性測

- 定による歯冠用硬質レジンの評価. 日歯技会誌 2003 ; 24 : 67-71.
- 13) 小池宏典, 岸本吉則, 安楽照男, 山本裕久. チオール化合物を用いた硬質レジン用プライマーの開発. 日歯技会誌 2003 ; 24 : 79-83.
- 14) Kanerva L, Estlander T, Jolanki R. Occupational skin allergy in the dental profession. Dermatol Clinics 1994 ; 12 : 517-532.
- 15) Kanerva L, Jolanki R, Leino T, Estlander T. Occupational allergic contact dermatitis from 2-hydroxyethyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate in a modified acrylic structural adhesive. Contact dermatitis 1995 ; 33 : 84-89.
- 16) Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Chung HW. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. Environ Mol Mutagen 2008 ; 49 : 399-405.
- 17) Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicol In Vitro 2005 ; 19 : 975-983.
- 18) Wang JJ, Sanderson BJ, Wang H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutat Res 2007 ; 628 : 99-106.
- 19) Keçeli SA, Alanyali H. A study on the evaluation of the cytotoxicity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, TiO<sub>2</sub> and ZrO<sub>2</sub>. Turkish J Eng Env Sci 2004 ; 28 : 49-54.