

Refractory Ceramic Fiber와 Rock Wool로 자극한 폐포대식 세포에서 Reactive Oxygen Species 분비와 관련된 세포내 신호변환계

가톨릭대학교 의과대학 성모병원 산업의학과¹, 가톨릭대학교 의과대학 약리학 교실²,
대한산업보건협회 부산지부³, 정해 산업의학센터⁴

김은경¹ · 김경아¹ · 임 영¹ · 양경숙³ · 오현숙⁴ · 이권행²

— Abstract —

Reactive Oxygen Species Generation of Refractory Ceramic Fiber- and Rock Wool-Induced Alveolar Macrophage and Associated Signal Transduction Pathway

Eun-Kyung Kim¹, Kyoung-Ah Kim¹, Young Lim¹, Kyung Sook Yang³,
Hyun-Sook Oh⁴, Kweon-Haeng Lee²

*Department of Occupational and Environmental Medicine, St. Mary's Hospital¹,
Department of Pharmacology, College of Medicine, The Catholic University of Korea²,
Korean Industrial Health Association Pusan Industrial Health Center³,
Jung Hae Industrial Medical Center⁴.*

Objectives : It is known that the high fibrogenecity of particles is connected with their cytotoxicity for macrophages. Although the molecular mechanism leading to fiber-induced fiber-induced cytotoxicity is still not clear, several mechanism have been suggested. The release of reactive oxygen species(ROS) from activated alveolar macrophages(AM) by dust have been suggested as a possible mechanism of particle-induced cell damage. But the mechanism which man-made vitreous fiber(MMVF) induces the production of ROS in AM is still not clear. In this study, we evaluated the relationship between ROS production and lactate dehydrogenase(LDH) release from alveolar treated with refractory ceramic fiber(RF2) or rock wool(RW1) and signal transduction path-way of ROS production in RF2 or RW1 exposed AM.

Methods : We investigated LDH release from MMVF-stimulated AM for index of cytotoxicity. To determine what kind of signal transduction pathways are involved in MMVF-stimulated ROS generation, we used some drugs which have an effect on the signal transduction pathway.

Results : RF2 and RW1 induced increase of LDH release with dose-dependent manner with RF2 having greater effect than RW1. There was a dose-dependent increase in the production of ROS by RF2 or RW1. At all level of concentration, RF2 induced more ROS production than RW1. Inhibitors of PKC(bisindolylmaleimide), PLC(U73122 and neomycine) and PTK(genistein and erbstatin) suppressed RF2 or RW1-induced ROS production.

Conclusion : There was significant correlation between LDH release and ROS production from AM treated with RF2 or RW1. RF2 and RW1 induced ROS generation through protein kinase C(PKC), phospholipase C(PLC) and protein tyrosin kinase(PTK) pathways.

Key Words : MMVF, Signal transduction pathway, Reactive oxygen species(ROS)

<접수일 : 1999년 9월 29일, 채택일 : 1999년 11월 3일>

교신저자 : 이 권 행 (Tel : 02-590-1203) E-mail : lkh@cmc.cuk.ac.kr

* 본 연구는 한국과학재단 '98 핵심전문연구(981-0715-116-1) 지원으로 수행되었음.

서 론

인조섬유들은 석면의 대체물질로 개발되어 절연물질로서 널리 이용되고 있다. 인조섬유들은 석면과 같은 섬유형태로 만들어져 이 물질들이 인체에 미칠 수 있는 유해성 특히 발암성에 대한 평가가 요구되고 있다.

석면을 이용한 여러 연구에 의하면 석면이 폐장내 흡입되면 이를 탐식한 대식세포가 탐식된 물질에 의하여 사멸되는 반응이 반복되어 일어나며 이런 반응은 섬유화 변화 및 분진에 의한 폐질환을 잘 일으키는 분진일수록 강력하고 분진을 탐식한 대식세포로부터 분비되는 여러 가지 매개물질들이 분진에 의한 폐장해 발생 과정에 중요한 역할을 한다 (Vallyathan 등, 1992). 따라서 분진의 독성효과 및 분진에 의한 폐질환 발현의 가능성을 알아보기 위하여는 일차적으로 분진에 의한 폐포대식세포의 반응을 알아보는 것이 중요하다.

최근 석면 및 유리규산과 같이 세포독성이 강한 광물성분진을 중심으로 산소기(oxygen radical)들의 역할에 대한 연구들이 발표되고 있다(Cochrane, 1991; Dalal 등, 1990; Donaldson 등, 1985; Freeman과 Crapo, 1982). 산소기들은 세포막의 불포화 지방산을 과산화시켜 세포를 파괴하고 세포내 DNA의 base modification 또는 strand breakage를 유발하여 유전독성과 발암성 발현을 유발하는데 직접적인 역할을 하는 한편 염증이나 섬유화 반응에 관여하는 유전자 발현에도 관여한다.

그러나 흡입된 분진을 탐식한 폐포대식세포로부터 산소기가 분비되는 기전은 일부 분진에서만 연구되고 있다. 예를 들어 in vitro에서 석면에 의하여 자극된 폐포대식세포에서 산소기 분비의 증가는 폐포대식세포의 세포막과의 상호반응에 의하여 phospholipase C(PLC)와 protein kinase C(PKC) pathway와 관련되어 있는 것으로 생각되고 있으나(Holian 등, 1994; Roney와 Holian, 1989, Lim 등 1997a; Lim 등 1997b) 인조섬유에서는 아직까지 연구된 바 없다. 분진에 의한 폐질환 발생에 있어 세포독성이나 산소기의 중요성을 생각할 때 이에 대한 연구는 반드시 수반되어야 할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 인조섬유에 의한 폐포대식세포의 세포독성에 인조섬유와 대식세포의 반응에 의하

여 생성되는 산소기의 역할을 알아보고 이에 관련된 신호변환계를 밝혀 인조섬유에 의하여 산소기가 발생되는 기전 더 나아가 세포독성을 일으키는 과정을 이해하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 인조섬유

인조섬유는 The Japan Fibrous Material Research Association(JFMRA)에서 표준화한 JFM standard reference fibrous sample중에서 선택하여 사용하였다. 실험에 사용된 인조섬유는 refractory ceramic fiber(RF2), rock wool(RW1)이었으며 RF2와 RW1의 길이의 기하평균±기하표준편차는 각각 $11.0 \pm 1.96 \mu\text{m}$ 와 $16.5 \pm 2.5 \mu\text{m}$ (Kohyama, 1997)이었다. μg 당 섬유수는 RF2가 $8.7 \times 10^3/\mu\text{g}$ 이었고 RW1은 $1.7 \times 10^3/\mu\text{g}$ 이었다(Yamato 등, 1998).

2. 기관지 폐포세척 및 폐포대식세포 분리

흰쥐(Sprague-Dawley)를 ketamine 근육주사로 전신마취 시킨 후 우심실에 혈관바늘(18G)을 삽입하여 헤파린이 함유된 4 °C의 인산완충용액으로 폐가 깨끗해 질 때까지 관류시켰다. 관류상태하에서 후두 및 기도를 절개한 후 정맥도자(No. 14)를 기관지에 삽입하고 37 °C 인산완충용액으로 기관지폐포 세척을 시행하였는데 세척은 5 ml씩 10회 실시하였다. 회수된 세척액을 50 ml conical tube에 모은 후 즉시 얼음 속에 보관하였고 이 세척액을 800 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리 한 후 남은 cell pellet을 인산 완충용액으로 2회, RPMI-1640으로 1회 세척하였다. 이 중 일부를 세포 원심분리(cytocentrifuge)한 후 Giemsa용액으로 염색하여 총 기관지 폐포세척액내 세포들 중 폐포대식세포가 90 % 이상임을 확인하였다. 대식세포의 생존율(viability)은 trypan blue exclusion법으로 관찰되었다.

3. LDH assay

6-well plate에 cell을 깔고 안정화시킨 뒤 광물 섬유들을 가하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 pyruvate-NADH용액과 섞어서 37 °C에서 30분간 배양하였다. 여기에 2 mg/ml 2,4-dinitro-

phenylhydrazine in 1N HCl을 가하고 20분 동안 다시 배양한 후 0.4N NaOH를 넣었다. Spectrophotometer를 이용하여 455 nm에서 반응이 끝난 시료들의 흡광도를 측정하였다.

4. Luminol 반응을 이용한 ROS 생성의 측정

ROS의 생성은 luminol을 이용하여 chemiluminescence를 측정하였다. 1×10^6 개/200 μ l의 cell을 측정용 tube에 분주하여 2시간 배양 후 측정 직전에 2회 세척하여 죽은 세포를 제거하고 10^{-4} M의 luminol이 포함된 Dulbecos phosphate buffered saline(dPBS)를 200 μ l 가하고 광물성 섬유 처리량의 40배액을 10 μ l 첨가한 후 luminometer (Model 1250, Bio-Orbit, Turk, Finland)를 이용하여 chemiluminescence를 측정하였고 이 값이 최고치에 달했을 때의 mV를 취하여 반응값을 비교하였다.

5. 세포 내 신호전달효소 억제제가 분진에 의한 대식세포의 ROS 생성능에 미치는 영향

PLC 억제제인 neomycine(2 mM)과 U-

73122(5 μ M), protein tyrosine kinase(PTK) 억제제인 genistein(20 μ M)과 erbstatin(5 μ M) 또는 PKC 억제제인 bisindolylmaleimide를 30분간 전처리 한 후 광물성 섬유를 첨가하여 세포 내 신호전달효소와 인조섬유에 의한 폐포대식세포의 ROS 생성능과의 관계를 조사하였다.

6. 통계학적 분석

모든 실험결과와 평균±표준편차로 표시하였다. 두 군간의 차이는 Mann-Whitney test로 분진농도에 따른 실험결과와 변화는 GLM trend test로 검정하였다. 두 검사치간의 상관관계는 spearman correlation test로 조사하였다.

결 과

1. 인조섬유가 폐포대식세포의 세포독성에 미치는 영향

인조섬유로 자극한 폐포대식세포의 LDH 분비능을 세포독성의 지표로 조사하였다. Fig. 1은 인조섬유를 폐포대식세포와 반응시키고 3시간 경과한 후

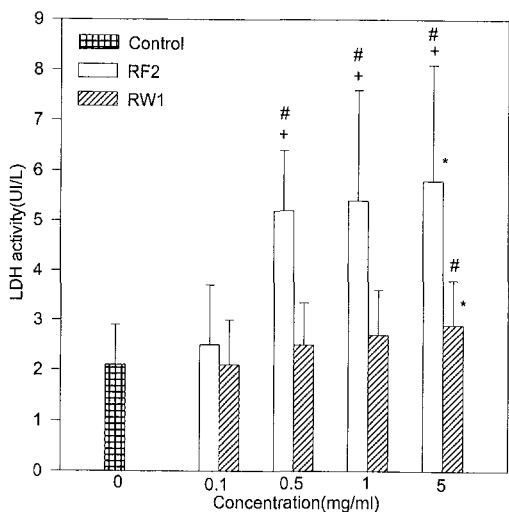


Fig. 1. Effects of MMVF on LDH release of alveolar macrophages(10^6 cells) at different concentration of MMVF.

+ : significantly different from RW1
: significantly different from control
* : significantly linear increase with concentration of fiber

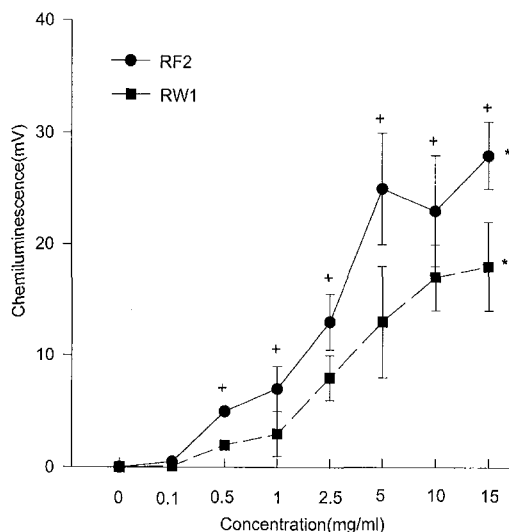


Fig. 2. Concentration-response effect of MMVF on chemiluminescence of alveolar macrophages.

* : significant linear increase with concentration of fibers
+ : significantly different from RW1

분진의 농도에 따른 배양 상층액내 LDH의 농도를 보여준다. RF2와 RW1 모두 자극한 분진의 농도가 증가할수록 배양 상층액내 LDH의 농도가 증가하였으며 ($P < 0.05$) RF2에서는 0.1 mg/ml 자극군을 제외한 모든 농도에서 그리고 RW1에서는 5 $\mu\text{g/ml}$ 자극군에서만 대조군에 비하여 LDH의 분비가 유의하게 증가되었다. 또한 0.1 mg/ml군을 제외한 모든 농도에서 RF2군에서 RW1 군에 비하여 유의하게 증가되었다.

2. 인조섬유가 폐포대식세포의 ROS 생성에 미치는 영향

RF2와 RW1 모두 자극하는 섬유의 양이 증가할수록 ROS 생성농도 증가하는 농도-반응관계를 보였으며 같은 분진 농도에서 RW1에 비해서 RF2군에서 ROS 생성능이 유의하게 증가되어 있었다 ($P < 0.05$, Fig. 2).

3. 인조섬유에 의한 ROS의 생성능과 세포독성간의 상관관계

인조섬유로 자극한 폐포대식세포의 ROS 생성능과 세포독성의 지표인 LDH의 상관관계는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 RF2와 RW1에서 모두 ROS 생성능이 증가할수록 세포독성의 지표인 LDH가 증가하는 유의한 양의 상관관계를 보였다. 상관계수는

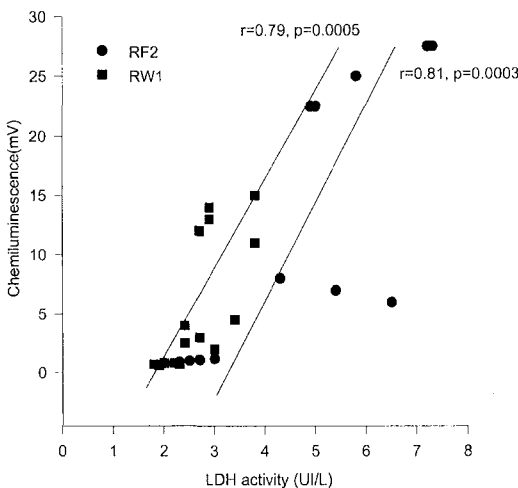


Fig. 3. Relationship between LDH release and ROS production from alveolar macrophages treated with RF2 or RW1.

RF2에서는 0.81 ($p=0.0003$) 이었고 RW1에서는 0.79 ($p=0.0005$) 이었다.

4. 인조섬유에 의한 ROS 생성시 신호변환계

인조섬유에 의한 ROS 생성과정의 신호변환계를 알아보기 위하여 신호변환과정에 영향을 미치는 여러 가지 억제제를 분진 자극전 전처리하고 인조섬유에 의한 ROS의 변화를 살펴보았다. 인조섬유로 자극된 폐포대식세포의 respiratory burst는 PKC의 활성도에 의하여 결정되었다. 폐포대식세포에서 RF2와 RW1에 의한 ROS 생성은 PKC 억제제인 bisindolylmaleimide (5 μM)에 의하여 90 % 이상 억제되었다.

Fig. 4와 5에서 보는 바와 같이 U73122는 RF2에 의한 chemiluminescence를 인조섬유만으로 처리한 대조치의 44.7 % 그리고 RW1에 의한 chemiluminescence는 50.8 % 억제시켰다. Neomycine으로 전처리하는 RF2로 자극한 폐포대식세포의 ROS 생성을 74.5 % 그리고 RW1에 의한 ROS 생성을 78 % 억제하였다.

Genistein과 erbstatin은 protein tyrosine kinase (PTK) 억제제로서 사용되었으며 genistein

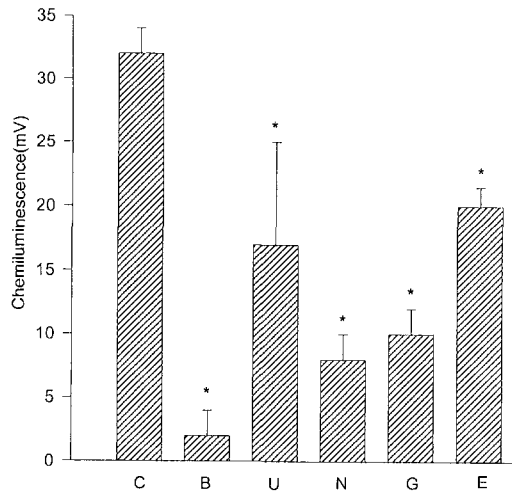


Fig. 4. Effects of various drugs on chemiluminescence of RF2 stimulated alveolar macrophages. C: RF2, B: bisindolylmaleimide, U: U-73122, N: neomycine, G: genistein, E: erbstatin.

* : significantly different from C, $p < 0.05$

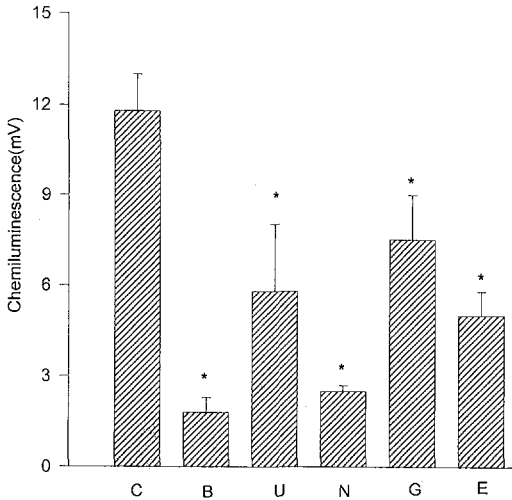


Fig. 5. Effects of various drugs on chemiluminescence of RW1 stimulated alveolar macrophages. C: RW1, B: bisindolylmalaymide, U: U-73122, N: neomycine, G: genistein, E: erbstatin.

* : significantly different from C, $p < 0.05$

은 ATP 결합부위에 경쟁적으로 결합함으로써 PTK 활성도를 방해한다. PTK 억제제들은 인조섬유에 의한 ROS 생성을 억제시켰다. Genistein과 erbstatin은 각각 20 μM 과 1 μM 의 농도에서 ceramic fiber에 의한 chemiluminescence를 약 68 %와 37.4 % 억제시켰다. RW1에서는 각각 36.4 %와 57.6 % 억제시켰다.

고 찰

석면과 인조섬유는 모두 섬유형 규산염 (fibrous silicates)으로 (Rom, 1992) 규산염 분진에 의한 세포파괴 및 폐독성에는 산소기가 중요한 역할을 하는 것으로 (Vallyathan, 1992; Schapira 등, 1994) 생각되고 있다. 생리적으로 반응성 산소기는 세포대사와 산화 환원반응의 정상적인 생성물로서, 폐세포들은 이들 산소기의 독성에 대해 방어할 수 있는 체계를 갖추고 있다 (Vallyathan, 1992). 분진 탐식의 결과로서 발생한 산소기의 생산의 증가는 세포의 방어기전을 손상시키고 결과적으로 세포파괴를 가져온다 (Mossman 등, 1986; Shatos 등,

1987; Donaldson 등, 1985). 또한 산소기는 NF- κB 와 같은 transcription factor를 활성화시켜서 TNF- α 를 비롯한 여러 가지 염증성 섬유화성 매개물질의 분비를 증가시킴으로써 손상된 조직주위에 염증반응 및 섬유화 반응을 유도한다. 따라서 섬유형 분진의 생물학적 반응성을 알아보기 위하여는 ROS 측정이 반드시 수반되어야 할 것이다. 더욱이 산소기는 유전자 손실 및 돌연변이 유발등 발암성의 기전과 관계가 깊은 것으로 알려져 있어 ROS의 생성을 유도하는 기전을 밝히는 것이 큰 의의를 갖는다.

외부 물질에 대한 폐장의 1차 반응세포는 폐포대식세포이다. 따라서 분진과 염증세포의 반응에 의하여 생산되는 반응성 산소기의 1차 분비세포는 폐포대식세포가 되며 이 반응이 다른 염증세포의 침윤 및 침윤된 염증세포로부터 반응성 산소기의 분비에도 영향을 미침으로 매우 중요하다 (Thomas 와 Hunninghake, 1987; Dubois 등, 1989). 따라서 분진에 폭로된 폐포대식세포의 반응성 산소기 분비능에 관한 연구가 중심을 이루어 왔는바 본 연구에서도 폐포대식세포를 이용하여 광물성 섬유의 ROS 생성능을 조사하였다.

본 연구에 의하면 MMVF 중의 하나인 RF2와 RW1은 폐포대식세포에서 ROS의 생산을 증가시켰으며 증가는 각각의 분진의 양에 따라 ROS 생산량도 증가하는 농도-반응관계를 보였으며 세포독성의 지표로서 측정된 LDH의 분비량과 밀접한 상관관계가 있어 RF2와 RW1에 의한 폐포대식세포 손상에 ROS가 일부나마 관여함을 알 수 있었으며 이는 다른 연구결과와도 일치하였다 (Luoto 등, 1997).

본 연구결과 RF2와 RW1은 ROS 생성능이 서로 달라 폐포대식세포를 자극한 분진 농도가 같을 때 RW1에 비하여 RF2로 자극한 경우 ROS 생성능이 더 컸다. 여러종류의 MMVF를 대상으로 ROS와 세포독성과의 관계를 본 Luoto (1997)의 연구에 의하여 refractory ceramic fiber라도 종류에 따라 폐포대식세포에서 ROS 생성을 자극하는 정도가 차이가 있어 본 연구결과만으로 refractory ceramic fiber가 rock wool보다 ROS 생성능이 높다고 말할 수는 없을 것으로 생각된다. 또한 지금까지 연구결과들에 의하여 분진에 의하여 유도된 ROS 생산과 분진의 크기를 비롯한 물리적인 성질간에는 관련

성이 증명되어 있지 않아(Gormley 등 1985) 두 섬유형 분진간의 분진의 크기차이는 ROS 생성능에 큰 영향을 미치지 않았을 것으로 생각된다.

입자형 또는 섬유형 분진이 폐포대식세포에서 respiratory burst를 일으키며 여러 복잡한 신호 변환계가 그 과정에 관여할 것으로 보고 있지만 그 정확한 기전은 밝혀지지 않고 있다. 1994년 Holian은 광물성 섬유에 의한 ROS 생성과 PLC의 관련성을 보고하였는데 석면의 한종류인 chrysotile은 phosphatidylinositol(PI) turnover를 증가시켜 inositol-3-phosphate(IP3)와 diacylglycerol(DAG)를 생성시킨다고 보고한 바 있다.

또한 폐포대식세포가 외부흡입물질을 탐식하면 NADPH oxidase를 활성화되어 일련의 산소기 발생반응을 촉진하며 이 때 PKC, PLC 효소가 관계되어 있음이 보고 된바 있다(Roney와 Holian, 1989). 따라서 본 연구에서도 RF2와 RW1가 PKC와 PLC 효소에 관련이 되었는지를 확인하기 위해서 일련의 실험을 진행하였다.

본 연구결과 RF2와 RW1에 의한 ROS 생성은 PKC억제제인 bisindolylmaleimide의 전처리에 의하여 억제되었다. 또한 PLC의 역할을 밝히기 위하여 PLC 억제제인 U73122와 neomycine으로 전처리한 폐포대식세포에 RF2와 RW1으로 자극하였을 때 ROS의 생산이 억제되어 RF2와 RW1에 의하여 유도되는 ROS 생산이 PKC와 PLC와 관계가 있음을 알 수 있었다.

또한 폐포대식세포에서 protein tyrosine kinase(PTK) pathway가 유리규산(Lim 등, 1997a)이나 석면(Lim 등 1997b)에 의한 ROS 생산에 관여한다는 보고가 있었으나 MMVF에 대한 연구는 보고된 바 없었다. 본 연구에서는 분진처리 전 PTK 억제제인 genistein과 erbstatin을 전처리하였는데 두 약제 모두 RF2와 RW1에 의해 ROS 생산을 억제하였는바 RF2와 RW1에 의한 ROS 생산과정에는 PTK pathway가 관여할 것으로 생각되었다.

본 연구결과로 보아 RF2나 RW1은 폐포대식세포에서 ROS의 생성을 유도하며 ROS가 이들 분진에 의한 폐손상에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었으며 RF2와 RW1에 의한 ROS 생성에 PKC, PLC, PTK가 관련이 있을 것으로 생각되었다.

요 약

목 적 : 분진에 의하여 활성화된 폐포대식세포로부터 분비되는 ROS가 세포손실의 원인의 하나로서 제시되고 있으나 MMVF가 대식세포에서 어떠한 과정을 통하여 ROS의 생성을 유도하는지는 명백히 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 RF2와 RW1에 의한 폐포대식세포의 세포독성에 산소기의 역할을 알아보고 이에 관련된 신호변환계를 밝혀 MMVF에 의한 ROS 생산과정 더 나아가 세포독성을 일으키는 과정을 이해하고자 실시되었다.

방 법 : 인조섬유로 자극한 폐포대식세포의 세포독성 측정하기 위하여 LDH 분비를 그리고 ROS 생산은 chemiluminescence 방법으로 측정하였다. 신호전달과정 중 어떤 것이 MMVF가 자극해서 생성되는 ROS를 포함하는지를 알아보기 위해서 신호전달과정에 영향을 주는 여러 가지 물질을 사용하였다.

결 과 : RF2와 RW1을 폐포대식세포에 반응시켰을 때 농도-반응관계를 보이며 LDH 분비가 증가되었으며 ROS 생성도 농도-반응관계를 보이면서 증가되었다. 같은 분진농도에서 RF2가 RW1으로 처리했을 때 보다 LDH분비 및 ROS 생성능이 증가되어 있었다. RF2와 RW1로 자극한 ROS 생성능은 PKC 억제제인 bisindolylmaleimide(5 μ M)에 의하여 90 %이상 억제되었다. 또한 U73122(PLC 억제제)로 전처리시 RF2와 RW1에 의한 chemiluminescence를 현저히 억제시켰고 neomycine(PLC 억제제)으로 전처리했을 때 마찬가지로 억제되었다. PTK의 억제제인 genistein과 erbstatin을 사용하였을 때 RF2와 RW1에 의한 ROS 생성능이 현저히 억제되었다.

결 론 : 이상의 결과로 보아 RF2와 RW1은 폐포대식세포에서 ROS 생성은 농도-의존적으로 증가시켰고 LDH 분비와 ROS 생성능 사이에는 유의한 양의 상관관계가 있었으며 RF2와 RW1 자극에 의한 폐포대식세포의 PKC, PLC 그리고 PTK의 세포내 신호전달계와 관련이 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Cochrane CG, Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991;21(Suppl 3C):23s-30s.
- Dalal NS, Shi X, Vallyanthan V. Role of free radicals in the mechanisms of hemolysis and lipid peroxidation by silica : comparative EST and cytotoxicity studies. *J Toxicol Environ Health* 1990;29:307-316.
- Donaldson K, Shought J, Hannant D, Bohon RE. Increased release of hydrogen peroxide and superoxide anion from asbestos primed macrophage. *Inflammation* 1985;9:139-147.
- Dubois CM, Bissonnetle E, Rola-Pleszczybski M. Asbestos fiber and silica particles stimulate rat alveolar macophages to release tumor necrosis factor. *Am Res Respir Dis* 1989;139:1257-1264.
- Freeman BA, Crapo JD. Free radicals in tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:412-426.
- Holian A, Kelly K, Hamilton RF. Mechanisms associated with human alveolar macrophage stimulation by particulates. *Environ Health Perspect* 1994;102(suppl 10):69-74.
- Gormley IP, Kowolick MJ, Cullen RT. The chemiluminescent response of human phagocytic cells to mineral dust. *Br J Exp Pathol* 1985;66:409-416.
- Holt PF. *Inhaled Dust and Disease*. John Wiley & Sons, 1987.
- Lim Y, Kim SH, Cho YJ, Kim KA, Oh MW, Lee KH. Silica-induced oxygen radical generation in alveolar macrophage. *Industrial Health* 1997a;35:380-387.
- Lim Y, Kim SH, Kim KA, Oh MW, Lee KH. Involvement of protein kinase C, phospholipase C and protein tyrosine kinase pathways in oxygen radical generation by asbestos-stimulated alveolar macrophage. *Environ Health Perspect* 1997b;105(5):1325-1327.
- Kohyama N, Tanaka Z, Tomita M, Kudo M, Shinohara Y. Preparation and characteristics of standard reference samples of fibrous minerals for biological experiments. *Industrial Health* 1997;35:415-432.
- Luoto K, Holopainen M, Sarataho M, Sarolainen K. Comparison of cytotoxicity of man-made vitreous fibres. *Am Occup Hyg* 1997;41(1):37-50.
- Mossman BT, Marsh JP, Shatos MA. Alteration of superoxide dismutase activity intratracheal epithelial cells by asbestos and inhibition of cytotoxicity by antioxidants. *Lab Invest*. 1986;54:204-212.
- Rom WN. *Environmental and Occupational Medicine* 2nd ed : Little, Brown and Company, 1992.
- Roney PL, Holian A. Possible mechanism of chrysotile asbestos-stimulated superoxide anion production in guine pig alveolar macrophages. *Toxicol Appl Phamacol* 1989;100:132-144.
- Schapira RM, Ghio AJ, Effros RM, Morrisey J, Dawson CA, Hacker AD. Hydroxyl radicals are formed in the rat lung after asbestos instillation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:573-579.
- Shatos MA, Doberty JM, Marxh JP, Mossman BT. Prevention of asbestos induced cell death in rat lung fibroblasts and alveolar macrophages by scavengers of active oxygen species. *Environ Res* 1987;44:103-116.
- Thomas PD, Hunninghake GW. Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1987;13:747-760.
- Vallyathan V, Mega JF, Shi X, Dalal NS. Enhanced generation of free radical from phagocytes induced by mineral dusts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;6:404-413.
- Yamato H, Morimoto Y, Tsuda T, Ohgami A, Kohyama N, Tanaka I. Fiber numbers per unit weight of JFM standard reference samples determined with a scanning electron microscope. *Industrial Health* 1998;36:384-387.