

회화방법에 따른 폐 내 석면섬유의 투과전자현미경 분석

한정희* · 정용현 · 양정선

한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원

Analysis of Asbestos Fiber in Lungs by Transmission Electron Microscopy According to the Digestion Method

Jeong Hee Han* · Young Hyun Chung · Jung Sun Yang

Occupational Safety and Health Research Institute(OSHRI),
Korea Occupational Safety and Health Agency(KOSHA)

ABSTRACT

Objectives: This study was designed to establish an accurate analytical method for asbestos in a biological sample for determining occupational asbestos-related diseases and relief of the health effects of environmental asbestos.

Methods: Biological samples were obtained from lungs of rats following intratracheal instillation of asbestos(Chrysotile, anthophyllite) and were prepared according to digestion method(Wet digestion, high temperature ashing, low temperature ashing). The samples were then analyzed for asbestos fibers using a transmission electron microscope equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer.

Results: Low temperature plasma ashing removed more of the organic components and reduced fiber loss compared to the wet digestion method, making specimens so prepared more suitable for transmission electron microscopy.

Conclusions: The low temperature ashing technique is the most accurate method for analyzing asbestos in biological samples.

Key words : asbestos, lung tissue, digestion, TEM, EDX

I. 서 론

현재 국내에서는 석면 취급이 전면적으로 금지된 상태로 석면의 사용 자체는 감소하고 있지만 과거 석면수입 및 사용실태를 감안할 때 오랜 기간 동안 광범위하게 사용되어 석면에 대한 노출이 불가피한 실정이다. 또한, 석면의 잠복기(10년~40년)를 감안하면 향후 석면에 의한 질병이 계속 발생될 것으로 예상된다. 석면 피해자를 보상하기 위한 제도적 장치로 직업적 석면노출 근로자의 경우 고용노동부의 「산업재해 보상보험법」에 따라 산재보상을 받을 수 있으며(Kim, 2009), 환경성 석면노출에 의한 건강피해자의 경우

2011년 1월부터 시행된 환경부 「석면피해구제법」에 따라 보상이 이루어질 수 있게 되었다(MoE, 2011).

석면관련 질병은 주로 조직병리학적 검사를 기반으로 임상적 판단과 영상의학적 판단 등을 종합하여 판정한다. 석면피해구제법에서는 원발성 폐암의 경우 건조폐 중량 1 g당 석면소체가 5,000개 이상, 길이 1 μm 이상인 석면섬유가 5,000,000개 이상, 길이 5 μm 이상인 석면섬유가 2,000,000개 이상이거나 기관지폐포 세정액 1 mL당 석면소체가 5개 이상이면 석면피해를 인정하고 있다. 하지만, 이 기준에는 구체적인 분석방법을 정하고 있지 않다. 석면피해구제법의 석면피해 인정기준은 1997년 핀란드 헬싱키에서 개최된 석면

*Corresponding author: Jeong Hee Han, Tel: 042-869-0346, E-mail: hanjh@kosha.net

Chemical Safety and Health Research Center, Occupational Safety and Health Research Institute, KOSHA,
30 Expo-ro 339beon-gil, Yuseong-gu, Daejeon 305-380

Received: September 25, 2013, Revised: December 12, 2013, Accepted: December 17, 2013

폐와 폐암에 대한 국제전문가회의(The Internal Expert Meeting on Asbestos, Asbestosis, and Cancer)에서 합의한 헬싱키기준(The Helsinki Criteria) 및 일본의 석면관련질환 인정기준을 근거로 수립되었다. 그러나, 헬싱키기준은 구체적인 분석방법에 대하여 별도로 규정하고 있지 않으며 비교적 석면소체를 잘 형성할 수 있는 각섬석계 석면을 기준으로 하고 있다. 실제로 이는 주사전자현미경을 이용하여 분석한 결과로 위상차현미경이나 투과전자현미경 등 다른 방법으로 분석을 수행하는 실험실에 쉽게 적용하기 어려우며, 실제 폐암 사례에서 기준치 이하로 검출되는 경우가 많다고 한다(Attanoos et al., 2004). 사문석계 석면은 각섬석계 석면과는 다른 특성을 가지고 있고 석면소체를 잘 형성하지 않으므로 이 기준을 적용하기에는 한계가 있으며(Churg et al., 1982), 석면소체의 수는 폐 내의 석면형태, 길이, 석면농도 등에 영향을 받기 때문에 석면섬유의 수와 상관성을 보이지 않아 정확한 석면농도를 반영하지 않을 수 있다(Roggli et al., 2010). 따라서, 생체시료의 정확한 석면분석을 위해서는 분석에 적합한 장비와 숙련된 분석자를 보유하고, 대표성 있는 시료의 채취, 신뢰성 있는 전처리 방법과 분석방법, 적절한 결과보고에 대한 기준을 수립하는 것이 필요하다(Devuyst et al., 1994).

본 연구에서는 전자현미경을 이용한 생체시료의 석면분석 방법의 표준화 방안을 제시하기 위하여 회화방법의 차이에 따라 석면을 분석하고 검증함으로써 직업병 판정 및 석면피해자 구제를 위한 신뢰성 있는 기초자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질 및 시료의 채취

1) 시험물질 선택

시험물질로 국내 석면광산에서 채취한 사문석계 석면인 백석면(Chrysotile)과 각섬석계 석면인 안소필라이트석면(Anthrophyllite)을 사용하였다. 시험물질은 각각 시료분쇄기(MM301, Retsch, Germany)에서 30 Hz, 90초간 잘게 분쇄하여 사용하였다.

2) 시험동물 및 사육환경

시험동물은 SLC사(Japan)에서 생산한 특정병원체부

재(Specific pathogen free, SPF)의 Sprague-Dawley(SD) 7주령 수컷 랫드를 구입하여 사용하였다. 각 동물은 청정동물 사육실에서 7일간 순화 후 정상군, 백석면 투여군, 안소필라이트 투여군으로 하여 각 군당 5마리씩 분리하여 사육하였다. 사육기간 동안 환경은 온도 22±3℃, 상대습도 50±20%, 환기회수 12~15회/시간(전환기방식), 명암주기 조명 12시간(08:00~20:00), 조도 150~300 Lux가 되게 하였으며, 멸균사료(Labdiet 5053, PMI, USA)와 음용수 여과기(WFU-25, Sibata., Japan)를 이용하여 여과 및 자외선 살균한 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 연구에서는 실험동물의 보호와 윤리적인 취급을 위하여 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후(승인번호 : IACUC-11-7) 규정에 따라 수행하였다.

3) 폐조직의 채취

분쇄한 시험물질을 식염수에 2 mg/0.3 mL의 농도로 분산 및 멸균한 후 기도내주입법(Intratracheal instillation)을 이용하여 실험동물의 기도를 통하여 폐 내에 직접 투여한 후 부검하여 폐조직을 적출하였다(Brain et al., 1976).

2. 전자현미경 시료제작

1) 시험물질

시료는 Sakai et al.(1991)의 시료제작방법을 참고하여 분쇄한 시험물질을 증류수 50 mL에 1 mg 정도 넣고 1시간 이상 초음파로 분산하였다. 분산된 혼합물을 폴리카보네이트멤브레인필터(Nuclepore polycarbonate membrane filter; pore size 0.22 μm, diameter 25 mm, Millipore #GTTP 02500)에 흡인여과하여 건조한 후 진공증착기(Vacuum evaporator, 950X EMITECH, UK)를 이용하여 탄소막을 증착하였다. 이것을 탄소막이 증착된 그리드(Carbon coated grid; diameter 3 mm, 200 mesh, EMS CF-200) 위에 놓고 클로로포름 증기(Chloroform vapor)를 이용하여 필터를 용해하여 제거하였다.

2) 폐조직

폐실질 조직은 메스를 이용하여 수 mm로 잘게 잘라 3개의 유리병에 나누어 건조하였다. 건조방법은 저온 회화를 위한 동결건조방법과 고온회화 및 습식회화를 위한 고온건조방법을 사용하였다. 동결건조는 시

료를 -70°C 이하의 초저온냉동고에서 최소 1시간 이상 동결시킨 후 유리병에 넣어 동결건조기(Freeze dryer; FD 8505, ILSINLAB, Korea)에 넣고 -80°C 에서 24시간 동결건조하였다. 고온건조는 시료를 유리병에 넣어 건조기(Dry oven; DMC-122, Daeil, Korea)에 넣어 60°C 에서 24시간 건조하였다. 완전히 건조된 시료는 무게를 측정한 후 저온회화, 고온회화, 습식소화법으로 나누어 회화하였다. 저온회화(Low Temperature plasma Ashing, LTA)는 동결건조된 시료를 저온회화장치(Plasma reactor; PR-31, Yamato, Japan)에 넣어 출력 40 W, O_2 유량 50 mL/min으로 24시간 저온회화 처리하였다. 고온회화(High Temperature Ashing, HTA)는 고온건조된 시료를 고온회화로(KL-600, Sibata, Japan)에 넣어 450°C 에서 6시간 고온회화처리하였다. 습식소화(Wet Digestion, WD)는 건조된 시료를 원심분리관에 같은 양의 차아염소산나트륨(Sodium hypochlorite)을 넣고 60°C 의 건조기에 1~2시간 두었다. 회화한 시료는 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 버리고 다시 침전물에 증류수를 가하여 교반하는 세정작업을 3회 수행하였다. 회화한 시료를 초음파분산장치로 5분간 초음파 분산한 후 폴리카보네이트멤브레인필터를 사용하여 여과하였다. 이 필터를 건조한 후 진공증착기를 사용하여 탄소막을 증착하고, 그 필터를 다시 탄소막이 증착된 그리드 위에 올려놓고 클로로포름 증기로 용해한 후 폐 내 섬유분석을 위한 시료로 사용하였다.

3. 석면섬유 분석

시험물질의 전처리조건에 따른 분석결과의 정확도를 비교하기 위하여 제작된 그리드는 EDX(EX-200, Horiba, Japan)가 장착된 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope; TEM, H-7100FA, Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다. TEM의 가속전압은 100 kV로 하였고 시료를 넣고 저배율로 관찰하여 좋은 시야상을 선택한 후 고배율로 확대하여 석면섬유 여부를 확인하고, 길이와 직경을 측정하였다. 그리고 섬유 EDX 스펙트럼을 얻어 구성원소와 성분비를 분석하고, 전자회절상(Electron diffraction)을 얻어 그 결정구조를 파악하여 석면의 종류를 구분하였다. Figure 1에는 석면의 종류를 평가하는 방법을 구체적으로 순서도로 나타내었다.

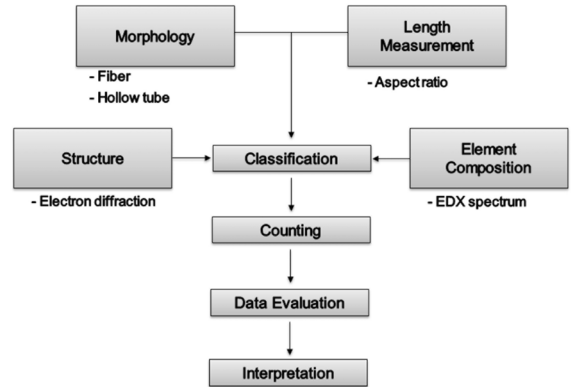


Figure 1. Evaluation of asbestos

4. 실험결과의 재현성 및 교차분석

시료전처리방법의 차이에 따른 석면분석결과의 정밀도와 재현성을 분석하기 위하여 폐조직 시료를 혼합하여 균질화한 후 다시 나누어 3회 분석하였다.

5. 통계처리

시험물질 분석, 생체시료의 석면분석 등의 시험결과는 평균과 표준편차로 표시하였으며, Sigma stat(Ver. 2.03, Systat software Inc., USA) 통계프로그램으로 t-test 평균비교를 이용하여 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. 시험물질의 특성

시험물질을 전자현미경을 이용하여 형태를 관찰한 결과 백색면은 가늘고 긴 형태가 많았으며 주로 다발(Bundle) 형태를 가지고 있었다(Figure 2). 석면섬유를 임의로 20개씩 선정하여 원소분석과 크기측정 결과 백색면은 Mg($57.68\% \pm 0.57$), Si($41.36\% \pm 0.54$), Fe($0.96\% \pm 0.22$)를 함유하고 있으며, 직경은 $0.07 \pm 0.03 \mu\text{m}$, 길이는 $4.55 \pm 3.02 \mu\text{m}$ 로 나타났다. 이에 비하여 안소필라이트는 굵고 긴 막대 모양으로 3 원소조성비는 Mg($39.66\% \pm 0.90$), Si($56.64\% \pm 2.06$), Fe($3.70\% \pm 1.55$)로 나타났으며, 직경은 $0.75 \mu\text{m} \pm 0.62$, 길이는 $5.89 \mu\text{m} \pm 1.74$ 이었다(Table 1).

2. 폐조직의 석면 분석결과

폐조직 시료를 분석한 결과 석면섬유는 쉽게 확인할 수 있었으나, 석면소체는 검출하기가 어려웠다.

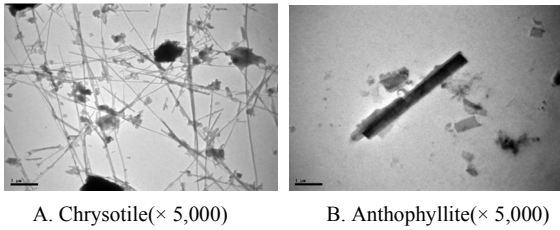


Figure 2. TEM image of test material

습식소화법을 이용하여 제작한 시료는 배경이 지저분하여 석면섬유를 분석하는데 방해가 되었으며, 고온회화법은 섬유의 소실이 많아 시간이 많이 소요되

었다(Table 2). 이에 비해 저온회화법은 비교적 배경이 깨끗하고 석면섬유의 보존상태가 양호하였다. 석면섬유농도를 분석한 결과 저온회화법, 습식회화법, 고온회화법 순으로 농도가 높게 나타났으며, 특히 길이가 5 μm 이상인 섬유소의 농도의 차이가 크게 나타났다(Table 3). 석면섬유의 크기는 표준석면에 비해 백석면의 경우 고온회화법에서 가장 크기가 줄어들었으며, 저온회화법의 경우 가장 적게 변화하였다(Table 4). 원소조성비의 변화를 분석한 결과에서는 표준석면에 비해 유의한 변화를 보였는데 백석면의 경우 Mg가 감소하고 Si가 증가하였으며, 안소필라이

Table 1. Characteristics of test material

Test material	Element Composition (Atomic %, Mean \pm S.D.)		Size(μm , Mean \pm S.D.)		Aspect ratio (Mean \pm S.D)
			Diameter	Length	
Chrysotile	Mg	57.68 \pm 0.57	0.07 \pm 0.03	4.55 \pm 3.02	80.63 \pm 58.83
	Si	41.36 \pm 0.54			
	Fe	0.96 \pm 0.22			
Anthophyllite	Mg	39.66 \pm 0.90	0.75 \pm 0.62	5.89 \pm 1.74	20.36 \pm 25.25
	Si	56.64 \pm 2.06			
	Fe	3.70 \pm 1.55			

Table 2. Comparison of asbestos fiber image in lung according to digestion method

Digestion method	Chrysotile(x10,000)	Anthophyllite(x5,000)
WD		
HTA		
LTA		

Table 3. Comparison of asbestos concentrations in lung by fiber size according to digestion method

Digestion method	Size	Fiber Concentration($\times 10^6$ fibers/g, Mean \pm S.D.)	
		Chrysotile	Anthophyllite
Control (raw material)	Total	8,814,244	5,182
	$< 5 \mu\text{m}$	5,288,546	2,073
	$\geq 5 \mu\text{m}$	3,525,698	3,109
WD	Total	29,968 \pm 4,359	117.22 \pm 34.62
	$< 5 \mu\text{m}$	24,151 \pm 2,968	61.56 \pm 15.97
	$\geq 5 \mu\text{m}$	5,817 \pm 1,865	55.66 \pm 18.96
HTA	Total	22,460 \pm 7,403	105.06 \pm 25.32
	$< 5 \mu\text{m}$	19,480 \pm 6,140	101.53 \pm 22.49
	$\geq 5 \mu\text{m}$	2,979 \pm 1,406	56.06 \pm 4.27
LTA	Total	32,065 \pm 6,376	133.51 \pm 51.08
	$< 5 \mu\text{m}$	23,726 \pm 6,194	60.92 \pm 24.26
	$\geq 5 \mu\text{m}$	8,338 \pm 205	72.59 \pm 27.83

Table 4. Size of asbestos fiber in lung according to digestion method

Digestion method	Dimension	Fiber size(μm , Mean \pm S.D.)	
		Chrysotile	Anthophyllite
Control (raw material)	Diameter	0.07 \pm 0.03	0.75 \pm 0.62
	Length	4.55 \pm 3.02	5.89 \pm 1.74
WD	Diameter	0.06 \pm 0.05	0.81 \pm 1.05
	Length	4.59 \pm 5.28	6.39 \pm 5.65
HTA	Diameter	0.07 \pm 0.04	0.60 \pm 0.63
	Length	3.56 \pm 4.57	4.76 \pm 4.34
LTA	Diameter	0.06 \pm 0.02	0.85 \pm 0.95
	Length	4.63 \pm 4.31	6.99 \pm 5.52

Table 5. Elemental composition of asbestos fiber in lung according to digestion method

Digestion method	Element	Element composition(Atomic %, Mean \pm S.D.)	
		Chrysotile	Anthophyllite
Control (raw material)	Mg	57.68 \pm 0.57	39.66 \pm 0.90
	Si	41.36 \pm 0.54	56.64 \pm 2.06
	Fe	0.96 \pm 0.22	3.70 \pm 1.55
WD	Mg	53.90 \pm 0.80*	35.62 \pm 2.46*
	Si	46.10 \pm 0.80*	55.44 \pm 3.55
	Fe	≤ 0.01	8.94 \pm 3.91*
HTA	Mg	51.75 \pm 0.80*	33.50 \pm 2.94*
	Si	48.25 \pm 0.80*	59.02 \pm 4.65
	Fe	≤ 0.01	7.47 \pm 2.90*
LTA	Mg	55.59 \pm 2.95*	37.98 \pm 1.80*
	Si	44.41 \pm 2.95*	56.31 \pm 2.18
	Fe	≤ 0.01	5.71 \pm 1.95*

* : Significant differences as compared with control(p<0.05)

† : Significant differences as compared with control(p<0.01)

트는 Mg가 감소하고 Fe가 증가하였는데 특히 고온 회화법에서 가장 변화가 많았으며 저온회화법에서 가장 변화가 적었다(Table 5).

3. 재현성 분석 결과

균질화한 시료를 각각 다른 회화방법을 사용하여 전처리한 후 TEM으로 분석하여 재현성을 확인한 결과 습식소화법은 13.72 \pm 1.82, 고온회화법은 1.08 \pm 0.18으

Table 6. Analytical reproducibility of asbestos fiber concentration in lung according to digestion method

Digestion method	Fiber Concentration($\times 10^6$ fibers/g)			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean \pm S.D.
WD	11.81	15.44	13.90	13.72 \pm 1.82
HTA	1.21	1.16	0.88	1.08 \pm 0.18
LTA	23.23	38.62	46.83	36.23 \pm 11.98

로 비교적 재현성이 있었으나 이에 비해 저온회화법은 36.23 \pm 11.9로 나타났다(단위: $\times 10^6$ 개 섬유수/건조 폐 조직 1 g)(Table 6).

IV. 고 찰

석면섬유는 분석감도가 충분한 방법을 사용하여 분석한다면 모든 사람의 폐에서 발견할 수 있다. 광학현미경은 직경이 0.25 μm 보다 큰 섬유는 관찰할 수 있지만 비석면 섬유와 석면섬유를 정확히 구별할 수는 없다. 석면을 정확히 분석하기 위해서는 섬유의 전자회절상이나 구성성분을 분석할 수 있는 EDX가 장착된 전자현미경을 사용하여야 한다(Roggli et al., 2010). 또한, 실험실은 사용하는 분석방법에 대한 일반인의 정상 참고값을 분석하여 보유하는 것이 좋다. 이러한 참고 값은 석면농도가 비정상적인 침착을 나타내는지 확인하고 해당 질환이 과거 석면노출의 가능성이 있는지 추정할 수 있다(Brochard et al., 1998).

석면분석시 유의해야 할 조건으로는 시료의 회화 방법, 석면의 크기와 내구성을 들 수 있다. 미국과 독일에서 수행한 동물실험 결과(Stanton & Wrench, 1972; Stanton et al., 1977; Pott, 1978; Stanton et al., 1981; Pott, 1987)에 의하면 섬유의 길이가 중피종을 유발하는데 중요한 요소이며, 길이가 8 μm 이상, 직경이 0.25 μm 이하인 섬유가 가장 위험하다고 하였다. 또한, 1980년대에 폐 조직 내 광물학적인 연구 결과에 의하면, 폐 섬유증(Lung fibrosis)과 각섬석계 석면과는 용량반응관계가 인정되었지만 백석면은 폐 섬유증과 용량반응관계가 인정되지 않았다. 각섬석 석면은 백석면에 비하여 석면폐증, 폐암, 악성중피종 등을 유발할 수 있는 가능성이 높다고 알려져 있다(Churg et al., 1984).

석면섬유와 석면소체는 거의 대부분의 사람의 폐 내에서 발견되는데 석면분석결과는 복잡한 노출양상

(섬유의 형태, 농도, 크기), 침착과 제거, 노출된 기간과 노출이후 경과기간의 영향을 받는다. 특히, 백석면 섬유는 각섬석계 석면에 비하여 생체내구성(Biopersistence)이 약하여 폐에서 빨리 제거되므로 석면소체의 농도는 주로 폐실질조직 내에 있는 긴 각섬석계 석면의 농도를 반영한다(DeVuyst et al., 1998). 본 연구에서 사용한 시험물질인 국내산 석면도 전자현미경 관찰시 석면소체를 관찰하기 어려워 석면섬유 수를 측정하여 석면농도를 계산하였다.

한편, Kayser et al.(1999)은 폐조직을 습식소화와 고온회화 처리를 하여 비교분석한 결과 고온회화방법이 습식회화방법보다 석면농도가 높았지만 상호 유의성은 없었다고 하였다. 하지만 이는 광학현미경을 이용한 방법으로 정확한 석면분석을 기대하기 어려운 면이 있다. Gylseth & Baunan(1981)은 폐조직을 다양한 전처리 조건하에서 주사전자현미경으로 분석한 결과를 비교하여 발표하였는데, 공극이 0.8 μm 인 필터로 여과하였을 경우 섬유의 손실이 나타났으며, 고온회화 및 저온회화 처리를 한 시료에서 긴 섬유들이 파괴되어 석면농도 증가에 영향을 준다고 하였는데 습식소화에 비해 저온회화법에서 4배 정도 높게 나타났다고 하였다. 그러나, 실제로 저온회화법이 습식소화법보다 유기물을 확실하게 제거하기 때문에 전자현미경 분석시료에 적합하다. 저온회화 시에는 석면섬유의 소실을 최소화하면서 유기물만 제거하도록 회화시간, 출력강도와 산소분압 조건을 최적화하는 것이 중요하다. 향후 연구에서는 저온회화 시 전처리 조건에 따른 결과 값의 비교를 통하여 분석의 정확도를 높이는 것이 필요하다고 생각한다.

이와 같이 폐조직의 석면분석결과의 해석을 위해서는 표준화된 분석방법, 적절한 정상 참고 값 설정뿐만 아니라 폐에서 섬유의 침착, 분포, 제거에 영향을 주는 요소의 포괄적인 이해와 다양한 석면관련 질환의 용량-반응의 차이를 고려해야 한다. 석면섬유

의 농도가 높은 것은 석면에 노출이 되었다는 확인은 되지만 석면관련 질환의 증거는 아니다. 또한, 석면분석 결과가 음성이면 석면에 노출되지 않았음을 증명하지만 백석면에 노출되었다면 노출이력을 주의 깊게 평가하여야 한다. 생체시료의 석면분석은 기술적이며 전문적 기반을 갖춘 실험실에서 수행되어야 하며 분석방법은 항상 동일하게 하고 명확하게 설명할 수 있도록 재현성 있는 결과를 제공하는 것이 중요하다.

V. 결 론

폐조직 시료의 전처리시 회화방법에 따른 결과를 비교한 결과 고온회화법, 습식소화법, 저온회화법 순으로 석면섬유의 농도가 높게 나타났으며, 크기와 원소조성비가 유의성 있게 변화하였다. 이는 전처리 과정에서 섬유의 소실 및 영향을 많이 받은 것을 의미하며, 저온회화법으로 회화하는 것이 가장 정확하게 분석할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 신뢰성 검증을 위한 재현성을 분석한 결과 습식소화법과 고온회화법은 저온회화법에 비하여 재현성이 좋지만 결과 값이 낮게 나타났으며, 반대로 저온회화법은 재현성은 떨어지지만 정확한 결과를 보여주었다. 본 연구는 전자현미경을 이용한 생체시료 석면분석 기법을 확립하고, 분석방법을 표준화하는데 기여하여 향후 국내의 석면에 의한 직업병 및 석면노출 피해자의 진단을 위한 기초자료로 활용할 수 있을 것이다.

References

Asbestos, asbestosis, and cancer: Helsinki criteria for diagnosis and attribution. *Scand J Work Environ Health* 1997;23:311-316

Attanoos RL, Gibbs AR. Analytical techniques in diagnostic pulmonary pathology. *Current Diagnostic Pathology* 2004;10:252-258

Brain JD, Knudson DE, Sorokin SP, Davis MA. Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environ Res* 1976;11(1):13-33

Brochard P, Monsó E, Gibbs A, Pairon JC, Dumortier P. Definitions of control populations and reference levels. *Eur Respir J* 1998;11:1417-1418

Churg A, Wiggs B, Depaoli L, Kampe B, Stevens B. Lung asbestos content in chrysotile workers with mesothelioma. *Am Rev Respir Dis* 1984;130(6):1042-1045

DeVuyst P, Brochard P, Gibbs A, Fischer M, Karjalainen A, Costabel U. Basis for the interpretation of fibres and asbestos bodies in biological samples. *Eur Respir J* 1998;11:1423-1424

DeVuyst P, Karjalainen A, Dumortier P, Pairon JC, Monso E et al., Guidelines for mineral fibre analyses in biological samples : report of the ERS working group. *European Respiratory Journal* 1998;11:1416-1426

DeVuyst P, Missouni A, Van Muylem A, Rocmans P, Dumortier P. Systematic asbestos bodies counting in lung specimens resected for lung cancer. *Eur Respir J* 1997;10:(Suppl. 25), 19s

Gylseth B, Baunan RH, Bruun R. Analysis of inorganic fiber concentrations in biological samples by scanning electron microscopy. *Scand j work environ health* 1981;7:101-108

Johnston I, Britton J, Kinnear W, Logan R. Rising mortality from cryptogenic fibrosing alveolitis. *Br Med J* 1990;301:1015-1017

Kayser K, Becker C, Seeberg N, Gabius HJ. Quantitation of asbestos and asbestos-like fibers in human lung tissue by hot and wet ashing, and the significance of their presence for survival of lung carcinoma and mesothelioma patients. *Lung Cancer* 1999;24:89-98

Kim SG. Compensation and diagnosis of asbestos related disease. *Korean J Fam Med* 2009;30:335-343

Ministry of employment and labor(MoEL). Enforcement decree of the industrial accident compensation insurance act. 2009

Ministry of environment(MoE). Enforcement decree of the asbestos injury relief act. 2011

Pott F. Problems in defining carcinogenic fibers. *Ann Occup Hyg* 1987;31(4B):799-802

Pott F. Some aspects on the dosimetry of the carcinogenic potency of asbestos and other fibrous dusts [in German]. *Staub-Reinhalt Luft* 1978;38:486-490

Roggli VL, Gibbs AR, Attanoos R, Churg A, Popper H et al. Pathology of asbestosis-An update of the diagnostic criteria. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:462-480

Roggli VL, Greenberg SD, McLarty JW, Hurst GA, Hieger LR et al. Comparison of sputum and lung asbestos body counts in former asbestos workers. *Am Rev Respir Dis* 1980;122(6):941-945

Roggli VL, Oury TD, Sporn TA, EDX. Pathology of

Asbestos-Associated Diseases. 2nd ed. New York, NY: Springer;2004:34-70

Sakai K, Hisansga N, Kojima A, Takeuchi Y Elemental composition of asbestos fibers recovered from human lung[in Japanese]. Ann. Rep. Nagoya City Public Health Res. Inst 1991;37:116-119

Stanton MF, Layard M, Tegeris A, et al. Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestoses and other fibrous minerals. J Natl Cancer

Inst 1981;67(5):965-975

Stanton MF, Layard M, Tegeris A, Miller E, May M et al. Carcinogenicity of fibrous glass: pleural response in the rat in relation to fiber dimension. J Natl Cancer Inst 1977;58(3):587-603

Stanton MF, Wrench C. Mechanisms of mesothelioma induction with asbestos and fibrous glass. J Natl Cancer Inst 1972;48(3):797-821