

사업계획서

					과제번호				
단위과제명	정책 연구								
과제명	국문	이산화티타늄의 관리방안 마련을 위한 과학적 규제 기반 연구							
	영문								
주관연구 책임자	소속기관	(주)켄온	연구지원	부서명	사업개발 본부	연락처	전자우편		
	법인번호	333-86-00035		담당자	박은성	010-356 9-5507	buffett21 @chemon. co.kr		
	성명	박영철	직위	센터장	전공	독성학			
	(영문)	Yeong-Chul Park			세부전공	독성평가			
	전화	031-526-9345	전자우편	ycpark@chemon.co.kr					
	휴대전화	010-5502-3388			주민등록번호 (앞번호만 기재)	610515			
총연구기간	2022년 3월 1일 ~ 2012년 5월 31일(3 개월)								
총 연구개발비	22,000 천원								
연구년차	연구기간			연구개발비					
당해년도	2012년 6월 1일 ~ 2012년 8월 31일			22,000 천원					
관계규정과 모든 지시사항을 준수하면서 컨설팅을 성실히 수행하고자 다음과 같이 사업계획서를 제출합니다. 2022 년 2 월 21 일 주관연구책임자 : 박영철 (인) 주관연구기관장 : 켄온 (직 인) 식품의약품안전처 귀하									

목 차

< 정책연구과제 >

1. 요약문	
.....	
2. 연구개발비 총괄표	
.....	
3. 정책연구의 필요성	
.....	
4. 정책연구의 목표 및 내용	
.....	
5. 정책연구의 추진전략·방법 및 추진체계	
.....	
6. 정책연구 개발 결과의 활용방안 및 기대성과	
.....	
7. 주관연구책임자 인적사항 및 연구 및 컨설팅 실적	
.....	
8. 연구과제 Peer reviewer 편성표	
.....	

< 정책연구 개발 과제 >

연구기관 :	(주)캠온 컨설팅본부
연구책임자 :	박영철

1. 요약문

과 제 명		이산화티타늄의 관리방안 마련을 위한 과학적 규제 기반 연구			
주관연구 책 임 자		성 명	박영철	주민등록번호 (앞번호만기재)	610515
		전 공	독성학	소 속	(주)켄온
색인 단어	국문	이산화티타늄, 독성, 규제			
	영문	Titanium dioxide, Toxicity, Regulation			
◆ 연구목표; 식품첨가물 이산화티타늄에 대한 위해평가 및 관리방안 도출을 위하여 EFSA 등 안전성 평가자료 분석 등 과학적 기초자료 마련한다.					
◆ 연구 내용					
○ 국내외 이산화티타늄에 대한 독성정보(유전, 생식독성 등) 수집 및 비교·분석한다.					
○ EFSA의 과학적 견해에 대한 타당성 분석·조사한다. 과제 수행 중 영국, 호수, 일본 등 제외국에서 이산화티타늄의 안전성에 대한 평가결과가 발표될 경우, 해당 결과에 대한 검토 포함한다. (다만, 과제 종료 1개월 전에 발표될 경우에는 해당없음)					
○ 이산화티타늄에 대한 위해평가 보고서(안) 마련 및 합리적 관리방안 제안한다.					
◆ 기대성과					
○ 이산화티타늄에 대한 식품첨가물로의 관리 방안 도출					
○ 국내 식품 수출기업의 사전 대응					

2. 정책연구의 필요성

- 2022년 1월 14일 EU 집행위는 'E171'로 불리는 이산화티타늄(Titanium dioxide, 티타늄디옥사이드, TiO_2)을 식품 첨가물로 사용하는 것을 금지한다고 발표했으며 6개월의 전환기간을 거쳐 시행될 예정이다.
- 이는 유럽 식품 안전청(EFSA: European Food Safety Authority)의 과학적 의견에 근거한 것으로, 이산화티타늄이 더 이상 식품 첨가물로 사용하기에 안전한 것으로 간주될 수 없다는 결론을 내린 데 따른 규제이다. 이산화티타늄은 유전 독성, 즉 화학 물질이 유전 세포 물질을 변화시키는 능력에 대한 우려를 배제할 수 없다고 한다.
- 이에 이산화티타늄을 대체할 수 있는 물질로 흰색을 나타내는 탄산칼슘 등 다양한 물질을 적용·시험하고 있으나, 색깔 변화, 차광성에 문제가 있어 제품 품질에 영향을 주는 것으로 문제점이 있는 것으로 확인되었다.
- 또한 시행까지 약 6개월의 전환기간이 남아 있지 않아 국내 식품 수출기업의 사전 대응 및 각별한 조치가 필요할 뿐만 아니라 이 기간 중 선제적인 대응이 필요하다. 특히 우리나라에서도 이산화티타늄을 식품첨가물로 사용하고 있어 유해성에 대해 긴급히 점검해야할 필요성이 제기되고 있다.

3. 국내외 규제 동향

1) 식품첨가물로의 규제 현황

- 최근 유럽식품안전청(EFSA, European Food Safety Authority)은 이산화티타늄을 식품첨가물로서 더 이상 안전하지 않다는 의견 제시하였으며 유럽연합은 '22년 8월부터 이산화티타늄을 식품에 사용금지 조치하였다. 반면에 의약품의 경우에는 유럽의약품청(EMA)에서 안전성을 평가하여 첨가물 목록에서 삭제 여부 결정을 2024년 4월에 할 예정이다.
- JECFA, 영국 FSA 등 제외국 안전성평가 전문기관에서는 별도로 이산화티타늄에 대한 안전성 자료 검토 추진 중이다.

- 그러나 CODEX, 미국 등에서는 여전히 식품첨가물로 허용하고 있는 식품첨가물로서 초콜릿 가공품, 건강기능식품 등에 흰색을 나타내는 색소로 사용하고 있다.

2) 의약품 및 화장품에서의 규제 현황

- 독일의약품연구소(BfArM)에 따르면, 이산화티타늄은 해열제에서 항생제에 이르기 까지 약 1만6000개의 의약품에 포함되어 있다고 한다. 즉, 차광효과가 우수하여 의약품의 및 건강기능식품의 정제, 캡슐에 사용되고 있다.
- 자외선차단제를 비롯해 화장품에 많이 사용하는 이산화티타늄을 흡입 시 발암위험이 있다고 제시되고 있다. 세계보건기구(WHO) 산하 국제암연구소(IARC)은 이산화티타늄 가루의 경우 흡입 시 발암 가능성이 있는 2군 발암물질B로 분류하고 있다. 유럽 화학물질청(ECHA)는 직경이 10마이크로미터 이하인 이산화티타늄 입자가 1% 이상 함유된 분말 형태의 혼합물을 발암성 2등급으로 지정하였다. 이에 ECHA는 이와 같은 성분이 혼합된 액체 혼합물에는 “위험! 분진을 흡입하지 말 것과 스프레이나 미스트를 흡입하지 말 것”이라는 경고 표시를 결정하였다.

4. 정책연구의 목표

- 식품첨가물 이산화티타늄에 대한 위해평가 및 관리방안 도출을 위하여 EFSA 등 안전성 평가자료 분석 등 과학적 기초자료 마련한다.

이산화티타늄에 대한 안전성 자료 조사, 제외국 위해평가에 대한 과학적 견해 분석 등 관리방안 설정을 위한 기초자료 마련	
1. 계약기간	
3/16~6/16	
2. 내용	
1) 국내외 이산화티타늄에 대한 안전성 자료 조사 및 분석	
	- 국내외 이산화티타늄에 대한 독성정보(유전, 생식독성 등) 수집 및 비교/분석
	- 유럽식품청의 검토 자료에 대한 적절성 및 적합성 검토
2) 식품첨가물 이산화티타늄에 대한 위해평가 및 관리 방안 도출	
	- 유럽식품청의 과학적 견해에 대한 타당성 분석 및 조사
	- 이산화티타늄에 대한 위해 평가 보고서(안)마련 및 합리적 관리방안 제안
	- 전문가 검토 및 자문회의 실시
* 총 7명 [㈜케온 내부 인원 7명 및 외부전문가 4명]의 전문가를	
구성하여 평가 결과(안)에 대한 자문	
3) 최종보고서 제출	

<최종보고서>

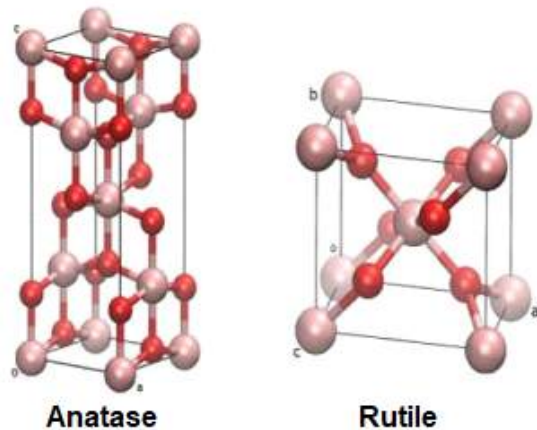
1. EFSA의 이산화티타늄에 대한 물리화학적 및 독성학적 특성

1) 식품첨가물로서 응용

- 이산화티타늄은 1916년 처음으로 대량 생산된 후(St. Clair, 2016) 현재까지 식품첨가물로 사용되어 왔다. 이산화티타늄은 무색인 식품에 색을 더한다든지 식품 원래의 모습을 복원하는 기능을 하는 착색료로, 제과제빵류와 수프, 육수, 소스, 샐러드, 샌드위치 스프레드, 가공견과류 등에 사용된다. 또한 알약(tablet) 또는 부형제가 포함되어 있는 약물 중 약 91,000 종에서 이산화티타늄이 포함된 것으로 알려졌다(Taylor, 2021; EMA 2021).

2) 식품첨가물로서 이산화티타늄의 물리-화학적 특성

- ① **결정구조(crystalline):** Titanium dioxide의 유럽 기존 상업 화학물질 목록(European Inventory of Existing Commercial Chemical substances, EINECS)의 번호는 236-675-5이며 컬러 인덱스 번호(Colour Index number)는 77891이다. 이산화티타늄은 전이금속인 타이타늄 원자 하나와 산소 원자 2개가 결합된 분자로서 분자량은 79.866g/mol이며, 무미무취의 흰색 가루이다. 이산화티타늄 자연형 결정구조(crystalline)에 따라 Anatase(아나타제)와 Rutile(루틸) 타입으로 구분한다. Anatase은 아래의 <그림>과 같이 결정단위와 결정단위가 꼭지점끼리(점접촉) 연결되어있는 결정모양이고, Rutile은 결정단위와 결정단위가 측면모서리끼리(선접촉) 연결되어있는 결정모양이며 CAS 번호는 각각 1317-70-0 및 1317-80-2이다. 유럽에서는 **anatase와 rutile 형태 모두 식품첨가물 또는 식용색소로 사용되며 E171로 불린다.**



<그림> 자연형 티타늄 디옥사이드 루틸(Titanium Dioxide, Rutile)와 이산화티타늄 아나타제(Titanium Dioxide Anatase)의 구조

② EFSA의 식품첨가물로서 이산화티타늄의 입자 크기별 구성: EFSA ANS Panel(2016)에 따르면 식품첨가물 E171의 이산화티타늄은 대부분 입자 직경이 100 nm 이상인 micro-sized TiO_2 이며 <100 nm 미만인 nano-sized TiO_2 는 3.2% 미만으로 구성되어 있다<원문: the food additive E 171 mainly consists of micro-sized TiO_2 particles, with a nano-sized (< 100 nm) fraction less than 3.2% by mass>. <표>는 Verleysen 등(2020, 2021)이 식품첨가물 등급 E171 상품의 12개 샘플에 대한 입자 크기에 따른 수적 및 질량적 비율을 조사한 것이다. 이들에 따르면 식품첨가물 E171의 이산화티타늄은 대부분 입자 직경이 100 nm 이상인 micro-sized TiO_2 이며 100 nm 미만인 nano-sized TiO_2 는 평균적으로 약 25% 정도이다. 그리고 입자 크기인 30 nm 이하 TiO_2 은 수적으로 1% 이하, 그리고 질량적 비율이 0이라는 것을 확인할 수 있다.

<표> 이산화티타늄 샘플에서 입자의 크기에 따른 구성 비율

Table W.1: Number percentage of particles

x (nm)	Number % of particles with minimum Feret diameter smaller than threshold x											
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	E 171-A ^(a)	E 171-B ^(a)	E 171-C ^(a)	E 171-D ^(a)	E 171-E ^(a)	E 171-F ^(a)
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
40	6	1	2	2	8	3	1	2	1	1	2	0
50	13	4	5	5	16	7	3	6	3	1	6	2
60	22	9	12	13	25	15	6	15	9	2	14	3
70	36	21	24	25	37	29	11	29	19	4	24	7
80	50	35	39	38	51	44	20	44	31	8	40	9
90	63	50	54	52	63	58	30	58	44	13	54	14
100	74	64	67	65	73	71	40	70	56	18	65	20
110	81	75	77	74	80	79	50	79	67	24	75	28
120	87	83	85	82	86	85	60	85	75	31	83	35
130	92	89	90	89	91	90	68	90	82	38	88	43
140	94	92	94	93	94	94	77	93	88	44	91	51
150	97	95	96	96	96	96	83	95	92	50	95	59
160	98	97	98	97	98	97	88	97	95	57	97	67
170	98	98	99	99	98	98	91	98	97	65	98	76
180	99	99	99	99	99	99	93	99	98	72	99	81
190	99	100	100	100	99	99	96	99	99	76	99	87
200	100	100	100	100	100	100	97	100	99	83	100	91
250	100	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100	99
300	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98	100	100
400	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
500	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

(a): Sample claimed to be the same of the E 171 for which data were evaluated in EFSA FAF Panel (2019).

<표> 이산화티타늄 샘플에서 입자의 질량에 따른 구성 비율

Table W.2: Mass percentage of particles

x (nm)	Mass % of particles with minimum Feret diameter smaller than threshold x											
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	E 171-A ^(a)	E 171-B ^(a)	E 171-C ^(a)	E 171-D ^(a)	E 171-E ^(a)	E 171-F ^(a)
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
60	3	1	2	2	3	2	0	2	1	0	2	0
70	7	4	5	5	7	6	1	6	3	0	4	0
80	14	9	11	10	13	12	3	12	7	0	10	1
90	23	18	20	18	22	21	6	20	13	1	18	2
100	33	29	32	29	31	32	10	30	20	2	27	3
110	44	41	43	39	41	43	15	41	30	3	38	6
120	54	52	56	50	52	52	23	50	39	5	49	9
130	64	63	66	64	61	62	30	59	49	8	58	13
140	71	70	75	72	70	73	40	68	59	11	66	19
150	80	79	81	82	78	78	49	73	69	15	75	27
160	84	84	88	87	84	84	58	80	77	20	82	35
170	88	90	92	91	88	88	65	85	84	27	86	47
180	92	93	95	95	92	92	70	90	89	34	90	55
190	94	96	96	96	95	95	77	94	92	40	93	65
200	95	98	99	98	96	97	82	96	95	49	96	74
250	100	99	100	100	100	100	95	100	100	75	99	96
300	100	100	100	100	100	100	98	100	100	88	100	100
400	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	100	100
500	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

(a): Sample claimed to be the same of the E 171 for which data were evaluated in EFSA FAF Panel (2019).

3) 이산화티타늄에 대한 EFSA의 독성학적 판단

○ <표>에서처럼 EFSA는 유전독성 이외 E171의 1,000 mg/kg/day 또는 입자크기 30 nm 이상 nano-sized 입자의 100 mg/kg/day까지는 일반독성 및 기관독성이 없는 것으로 문헌을 통해 결론을 내렸다(Concerning general and organ toxicity, the Panel concluded that the available information in the literature did not indicate adverse effects with either E 171 up to a dose of 1,000 mg/kg bw per day or with TiO₂ NP > 30 nm up to the highest dose tested of 100 mg/kg bw per day. EFSA Panel, 2021). 그러나 유럽식품안전청(EFSA, European Food Safety Authority)의 Panel은 E171을 식품첨가물(food additives)로서 더 이상 안전하지 않다는 의견 제시하였으며(EFSA Panel, 2021) 유럽연합은 2022년 8월부터 이산화티타늄을 식품에 사용금지 조치할 예정이다. EFSA의 이와 같은 결정은 <표>에서처럼 이산화티타늄은 유전독성 즉 DNA 나선절단 및 염색체 상해를 유도할 수 있다는 우려를 배제할 수 없다는 점에 기인한다. 유전독성은 화학물질이 세포의 유전물질인 DNA에 손상에 의한 발암 잠재성을 가진다는 것을 의미하기 때문에 안전성 평가에 중요한 지표가 된다.

<표> EFSA 보고서(2021)에서의 독성과 관련하여 요약 내용

	독성학적 요약	보고서 원문
1	체내 흡수는 낮지만 긴 반감기로 체내 축적	The absorption of TiO ₂ particles is low; however, they may accumulate in the body due to their long half-life.
2	독성시험 한계용량인 1000 mg/kg/day이 NOAEL. TiO ₂ NP(nanoparticles, 나노입자) > 30 nm이상에서 100 mg/kg/day까지는 독성이 없음	Studies on general and organ toxicity, including the newly performed EOGRT study with E 171, did not indicate adverse effects up to a dose of 1,000 mg/kg bw per day. Also, no effects were seen in studies retrieved from the literature with TiO ₂ NP > 30 nm up to the highest dose tested of 100 mg/kg bw per day;
3	독성시험 한계용량인 1000 mg/kg/day까지 생식발달독성 없음	No effects on reproductive and developmental toxicity up to a dose of 1,000 mg/kg bw per day, the highest dose tested, were observed in the EOGRT study E 171. No other reliable studies were found in the literature addressing these effects with E 171.
4	면역독성, 염증 그리고 신경독성이 TiO ₂ NP에 의한 지표 독성의 가능성	Some findings regarding immunotoxicity and inflammation with E 171 as well as neurotoxicity with TiO ₂ NPs may be indicative of adverse effects.
5	대장의 이상 증복병소인 ACF (aberrant crypt foci) 유도	There are indications of an induction of ACF with E 171.
6	TiO ₂ NP의 발암성 확인을 위해 적절하게 디자인되고 수행된 독성시험은 없음	No studies appropriately designed and conducted to investigate the potential carcinogenicity of TiO ₂ nanoparticles were available.

7	유전자-수준 돌연변이가 아니라 염색체-수준의 이상인 DNA 나선 절단과 염색체 손상을 유도하는 잠재성이 있음. 그러나 입자 크기 등의 입자 물리화학적 특성과 in vivo 및 in vitro 등의 다양한 유전 독성시험 결과 사이의 인과성은 없음	Combining the available lines of evidence on genotoxicity, TiO ₂ particles have the potential to induce DNA strand breaks and chromosomal damage, but not gene mutations. No clear correlation was observed between the physico-chemical properties of TiO ₂ particles – such as crystalline form, size of constituent particles, shape and agglomeration state – and the outcome of either in vitro or in vivo genotoxicity assays.
8	TiO ₂ 입자(particles)d 의한 유전독성을 배제할 수 없음	A concern for genotoxicity of TiO ₂ particles that may be present in E 171 could not be ruled out
9	유전독성의 작용기전(MOA, mode of action) 및 threshold에 대한 확인 불가능	Several modes of action for the genotoxicity may operate in parallel. The relative contributions of different molecular mechanisms elicited by TiO ₂ particles are unknown and there is uncertainty as to whether a threshold mode of action could be assumed.
10	유전독성과 관련하여 TiO ₂ particle size는 확인되지 않음	A cut-off value for TiO ₂ particle size with respect to genotoxicity could not be identified.

2. EFSA의 결정에 대한 검토의 필요성

- 이산화티타늄은 1916년 처음으로 대량생산된 후(St. Clair, 2016) 현재까지 식품첨가물로 사용되어 왔다. 이산화티타늄은 무색인 식품에 색을 더한다든지 식품 원래의 모습을 복원하는 기능을 하는 착색료로, 제과제빵류와 수프, 육수, 소스, 샐러드, 샌드위치 스프레드, 가공견과류 등에 사용된다. 또한 알약(tablet) 또는 부형제가 포함되어 있는 약물 중 약 91,000 종에서 이산화티타늄이 포함된 것으로 알려졌다(Taylor, 2021; EMA 2021). 이와 같은 상황에서 EMA(European Medicines Agency, 유럽의약품청)은 대체물질이 없이 단순히 in vivo 및 in vitro의 유전독성에 대한 양성만으로 이산화티타늄의 사용 금지는 설부른 측면이 있고 특히 산업적 측면에서 큰 혼란 초래할 수 있다고 경고하고 있다(EMA 2021). 또한 EMA를 비롯하여 JECFA 및 영국 FSA 등 재외국 안전성평가 전문기관에서는 별도로 이산화티타늄에 대한 안전성 자료 검토 추진 중이다.
- 우리나라에서도 식품첨가물로 사용되고 있는 이산화티타늄의 사용금지라는 EFSA 결정의 타당성 그리고 국민보건학적 영향에 대한 고찰의 필요성이 있다. 본 보고서에서는 기술독성학(descriptive toxicology), 기전독성학(mechanistic toxicology) 및 규제독성학(regulatory toxicology) 측면에서 이산화티타늄에 대한 안전성에 대한 고찰이 이루어졌다.

3. 국내외 이산화티타늄의 일반적인 안전성 자료 조사·분석

1) 단회경구투여독성시험

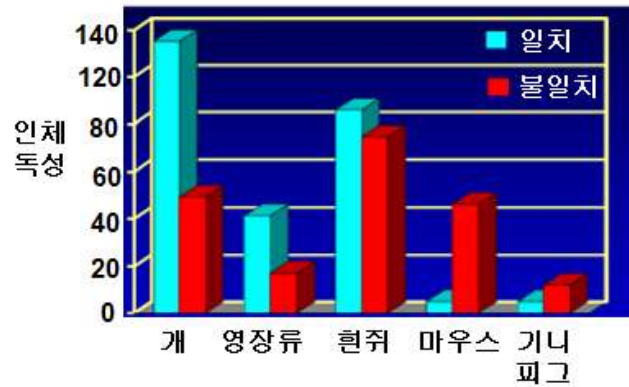
- ① 이산화티타늄에 대한 단회경구투여독성시험과 결과: <표>는 5000 mg/kg 이산화티타늄을 경구로 투여하는 단회투여독성시험의 결과이다. 단회투여독성시험의 목적은 1회 투여와 2주간의 관찰을 통해 개체군의 50% 치사를 유도하는 LD₅₀(lethal dose of 50%, 반수치사량)과 개체군 중 하나의 개체 치사를 할 수 있는 최소량인 ALD(approximate lethal dose, 개략치사량)를 추정하는 것이다. 두 시험 모두에서 ALD가 5000 mg/kg 이상으로 추정되었다. 일반적으로 독성시험에서 단일 화학물질의 투여 최대용량은 2000 mg/kg이며 이를 한계용량(limit dose)이라고 한다. 한계용량을 넘어 투여된 이산화티타늄 5000 mg/kg에서 사망이 없다는 것은 급성노출에 의한 사망을 유도할 수 있는 전신독성이 없다는 것을 의미한다. <표>에서 mice와 rat를 이용한 독성시험에서 시험물질에 의한 변화에서 차이가 있는데 이는 mice가 좀 더 민감하기 때문일 것으로 추정된다. 특히 대부분의 단회투여독성시험에서 mice를 사용하기도 하지만 대부분의 경우에 rat를 사용한다. 이는 <그림>에서처럼 독성시험을 통해 mouse보다 rat가 사람과의 일치성(concordance)가 높기 때문이다.

<표> 이산화티타늄에 대한 단회경구투여독성시험 및 결과

논문 및 시험방법	경구 용량 및 동물종	입자 크기(직경)	결과
Wang 등(2007), OECD test guideline 420	5000 mg/kg & mice	25, 80 and 155 nm	뇌, 간 그리고 신장에 조직병리학적 변화
Warheit 등(2015) OECD guideline 425	5000 mg/kg & rats	73 nm	변화 없음

- <그림>은 동물종에 따른 인체와의 일치율의 차이를 나타낸 것이다. 후보약물 114종에 대한 임상시험을 통해 확인된 인체 독성의 221종과 5종의 동물인 개, 영장류, 흰쥐, 마우스, 기니피그 등을 이용한 114종에 대한 비임상 독성시험에서 나타난 독성과의 비교를 통해 일치율 및 불일치율이 확인되었다(Olson, 2000). 설치류(흰쥐, 마우스, 기니피그)와 비설치류(개, 영장류) 등의 모든 종에서 나타난 독성과 인체에서 나타난 독성 일치율의 분석 결과, 비설치류의 일치율이 63%, 설치류 43% 일치율로 조사되었다. 또한 설치류 중 mouse는 일치율 5%에 불과하지

만 rat(흰쥐)의 경우에는 일치율이 55% 정도로 훨씬 높았다. 따라서 이산화티타늄에 대한 단회경구투여독성시험 중 mouse보다 rat를 이용한 실험 결과를 인용하는 것이 타당하다고 할 수 있다.



<그림> 동물종에 따른 임상시험 및 독성시험의 독성 일치율

- ② 5000 mg/kg 이산화티타늄에 대한 독성학적 평가: JECFA(FAO/WHO의 합동-식품첨가물-전문가위원회)는 국제적으로 사용하는 화학물질 유해성 및 위해성에 대한 분류체계인 국제조화시스템인 GHS(Global Harmonized System of classification and labelling of chemicals)에 따라 <표>에서처럼 LD₅₀ 용량에 따른 독성의 강도가 5 카테고리(category)로 분류되었다(JECFA, 2016). 즉 Category 1은 <5 mg/kg 및 extreme toxic, Category 2는 5-50 mg/kg 및 very toxic, Category 3은 50-300 mg/kg 및 toxic, Category 4는 300-2000 mg/kg 및 harmful 그리고, Category 5는 2000-5000 또는 5000 이상 mg/kg 및 거의 독성이 없는 수준으로 분류된다. WHO를 비롯하여 미국 및 유럽연합은 Category 5의 식품첨가물을 ADI(acceptable daily intake, 1일 섭취허용량)를 기준으로 ADI-not specified 및 ADI-not classified로 분류하였다. USFDA도 아산화티타늄을 GRAS(Generally Recognized As Safe)로 분류하여 질량의 1%를 허용하고 있다(Blue California, 2022). 이는 급성독성의 안전성에 대한 역치(threshold)로 특별히 분류할 필요가 없을 정도로 어느 분량까지는 독성이 없다는 것을 의미한다. 특히 <표>에서처럼 LD₅₀이 아닌 ALD가 5000 mg/kg 이상이기 때문에 이산화티타늄의 급성 노출에 의한 독성은 거의 없을 것으로 사료된다.

<표> 경구 LD₅₀ 기준에 따른 GHS의 카테고리

GHS category					
	Category 1	Category 2	Category 3	Category 4	Category 5
LD ₅₀ (mg/kg)	<5	5-50	50-300	300-2000	2000-5000 또는 5000 이상
독성 정도	extreme toxic	very toxic	toxic	harmful	non-harmful

- ③ 5000 mg/kg의 동물용량을 인체등가용량으로 환산: 생체의 크기가 형태와 기능, 현상과 어떤 관계가 있는지 수학적으로 규명하는 이론이 상대변화측정론(allometry)이고, 함수로 나타내는 것이 상대변화측정법(allometric scaling)이다. 동물에서 인체 용량으로 전환 시 체표면적에 따른 대사율 차이에 대한 보정지수(Correction factor) 기법으로 인체를 W^1 로 했을 때 동물 $W^{0.67}$ 로 산출된다(Nair, et al., 2016). 따라서 Animal 용량을 human 용량으로 전환하는 HED(human equivalent dose, 인체동등용량) 산출은 아래의 공식과 같다. 즉 사람에게 대한 ALD는 $5000 \text{ mg/kg} \times (0.2 \text{ kg} / 60 \text{ kg})^{0.33} = 1.622 \text{ mg/kg}$ 이상으로 추정되며 이 용량에서 급성적으로 경구로 노출되어도 사망을 포함한 어떠한 독성학적 변화가 없을 것으로 추정된다.

$$\text{HED (mg / kg)} = \text{Animal dose (mg / kg)} \times (\text{Weight}_{\text{animal}} [\text{kg}] / \text{Weight}_{\text{human}} [\text{kg}])^{(1-0.67)}$$

2) 90일 반복경구투여독성시험

- 반복경구투여독성시험은 단위인 mg/kg/day에서처럼 체중대비 일정한 시험물질을 식이에 함유 또는 존데에 의한 매일 강제투여하여 표적기관독성(target organ toxicity) 및 독성이 나타나지 않은 용량인 NOAEL(no-observed adverse effect level, 최대무독성용량)을 확인하는 시험이다. 식품첨가물의 반복적인 섭취를 통해 인체의 독성을 예측하는 독성이라고 할 수 있다. 단회투여독성시험과 마찬가지로 반복투여독성시험에도 최고 투여용량-가능 용량인 한계용량(limit dose)이 존재하여 단일 화학물질인 경우 1000 mg/kg/day이다. <표>는 OECD test guideline 408에 따라 수행된 90일 경구반복투여독성시험의 결과이며 두 시험 모두 한계용량이 최고용량으로 강제투여되어 시험이 이루어졌다. 이산화티타늄의 안전성과 기능에 대한 입자의 역치(threshold)는 100 nm 이며, 이하의 크기를 가진 이산화티

타늄의 나노입자(nano particles)로 불리고 있다. 직경이 역치 이상인 145 nm 사이즈 입자 및 이하인 26 nm 입자의 90일 경구투여독성시험 모두에서 시험물질에 의한 변화가 관찰되지 않아 NOAEL이 1000에서 1042 mg/kg/day로 추정된다. 특히 두 시험을 통해 경구 투여를 통한 이산화티타늄의 입자의 크기에 따른 독성학적 차이가 없는 것으로 추정된다.

<표> 이산화티타늄에 대한 90일 경구투여독성시험 및 결과

논문 및 시험방법	경구 용량 및 동물종	입자 크기(직경)	결과
Warheit 등(2015a) OECD test guideline 408	1000 mg/kg/day & rats	145 nm	변화 없음
Cho 등(2013) OECD test guideline 408	1042 mg/kg/day & rats	26 nm	변화 없음. 특히 간, 비장, 신장, 뇌 등에서 티타늄 축적이 없으며 이는 경구 투여에 의한 체내 흡수가 낮은 것인 원인으로 추정

3) 생식발생독성시험

- ① 이산화티타늄에 대한 생식발생독성시험 방법 및 결과: Warheit 등(2015b)은 식품 첨가물의 색소(pigment-grade) 등급인 입자크기 153-213 nm와 나노입자인 43-47 nm 등을 분리하여 이산화티타늄의 생식발달독성시험을 OECD test guideline 414에 따라 수행되었다. 이산화티타늄의 투여는 각각 랫드에 임신 후 6-20일 기간, 그리고 5-19일 기간 동안 이루어졌다. 투여용량은 100, 300 및 한계용량인 1000 mg/kg/day이 최고용량으로 강제 경구투여로 이루어졌다. 두 시험 중 이산화티타늄에 의한 어떠한 변화도 확인되지 않았으며 단지 수컷/암컷의 비(ratio)가 대조군의 0.6과 비교하여 0.46으로 유의하게 감소되었다. 그러나 일반적으로 가이드라인에 따른 생식발생독성시험에서 수컷/암컷의 비에 대한 historical data는 0.43-0.53이므로 0.46 값은 이산화티타늄에 의한 변화가 아닌 정상적인 수준이라고 할 수 있다. Mohammadipour 등(2014)도 초미세(ultrafine) 입자인 10 nm의 100 mg/kg/day 단일용량으로 임신 후 2-21일 기간 동안 투여하여 생식발생독성시험 수행하였다. 먼저 이 시험은 출생 후 뇌의 해마 조직에서의 변화와 출생 60일 후 기억 및 학습 장애에 대한 특정 목적의 비가이드라인에 따라 수행되었다. 특히, 단 2마리의 출생 새끼의 뇌조직을 관찰하여 대조군과 비교하여 인과성을 인

정하기에는 문제가 있다, 또한 대부분의 생물학적 시험에서 인과관계의 확인은 반드시 용량-반응관계(dose-response relationship)를 통해 이루어지기 때문에 저용량, 중용량 그리고 고용량 등의 적어도 3단계 용량군이 시험에 이용된다. 그러나, Mohammadipour 등(2014)의 생식독성시험은 단 하나의 용량군을 사용하여 인과관계를 증명하였다고 할 수 없다. EFSA ANS Panel(2016)에 따르면 식품첨가물 E171의 이산화티타늄은 대부분 입자 직경이 100 nm 이상인 micro-sized TiO₂이며 <100 nm 미만인 nano-sized TiO₂는 3.2% 미만으로 구성되어 있다. 따라서 대부분의 식품첨가물 등급의 이산화티타늄에서 초미세 직경 입자 크기인 10 nm는 아주 미량이거나 함유되지 않는 것으로 추정된다. 특히 micro-sized 및 nano-sized TiO₂의 섭취를 통한 전신혈관계로 흡수는 0.02 - 0.1%로 거의 무시할 정도이기 때문에 10 nm를 이용하여 수행된 Mohammadipour 등(2014)의 시험은 인체에서 생식발생독성의 잠재성은 없다고 할 수 있다.

<표> 이산화티타늄에 대한 생식발달독성시험 및 결과

논문 및 시험방법	경구 투여 용량과 동물종	투여 임신 기간 및 입자 직경	결과
Warheit 등(2015b) OECD test guideline 414	100, 300, 1000 mg/kg/day SD rats	153-213 nm: 임신 후 6-20일	시험물질 - 유래 변화없음
Warheit 등(2015b) OECD test guideline 414	100, 300, 1000 mg/kg/day Wistar rats	43-47 nm; 임신 후 5-19일	시험물질 - 유래 변화없음
Mohammadipour 등, 2014 (비가이드라인이며 해마 조직에 대한 영향)	100 mg/kg/day (단일용량) Wistar rats	10 nm: 임신 후 2-21일	학습 및 기억 장애

② 이산화티타늄의 생식발생독성에 대한 결론: OECD test guideline 414에 따른 이산화티타늄의 나노입자(43-47 nm) 및 식품첨가물 등급의 입자(153-213 nm) 등의 2회 생식발생독성시험에서 한계용량 1000 mg/kg/day이 NOEL(no observed effect level)로 추정되며 ADI-'not specified' 또는 GRAS로 분류되는 것으로 추정된다. EFSA ANS Panel (2016)에 따르면 일부 생식발생독성시험에서 확인된 독성은 비식품첨가물 등급이거나 부적절한 이산화티타늄의 사용에 기인하는 것으로

로 추정되었다(원문: The Panel noted that possible adverse effects in the reproductive system were identified in some studies conducted with material which was either non-food-grade or inadequately characterised nanomaterial). 실제로 EFSA (2021)에 따르면 직경 10 nm를 가진 이산화티타늄은 없는 것으로 확인되었다(EFSA, 2021, Appendix W). 또한 이산화티타늄이 생식발달독성이 없다는 것은 EFSA Panel on Food Additives and Flavourings(2021)에서도 확인되었다.

4) 발암성시험과 Group 2B 분류

○ IARC(International Agency for Research on Cancer, 국제암연구회)는 이산화티타늄을 2006년 인체-발암 가능물질군인 2B군으로 분류하였다(IARC Monographs, 2010). IARC 2B군의 물질은 일부 동물실험에서는 발암성이 있지만 인체에서는 확인되지 않은 물질이다(Possibly carcinogenic to humans). IARC의 결정은 20 여년 전 랫드를 이용한 발암성시험 3건에 대한 평가를 통해 이루어졌다. 이산화티타늄 흡입을 통해 이루어진 2건의 발암성시험에서 1건에서는 암수 모두에서 폐암 발생이 증가하였고 다른 1건에서는 암컷에서만 폐암 발생이 증가하였다. 반면에 마우스와 햄스터에서 흡입 노출을 통해 폐암이 증가하지 않았거나 다른 경로의 노출을 통해서는 암 발생이 증가하지 않았다(IARC Monographs, 2010). 동물실험을 통해 부분적으로 이산화티타늄의 발암성이 확인되어 Group 2B를 IARC는 분류하였다. 반면 ECHA(European Chemicals Agency, 유럽화학물질청)은 2017년 이산화티타늄을 흡입에 한해 category 2로 발암성물질로 분류하였다(ECHA, 2017). 이 분류는 직경 10 마이크로미터(μm) 이하의 이산화티타늄 입자가 1 % 이상 포함되어 있는 물질 및 혼합물에 적용되지만 이산화티타늄을 포함하는 액체 혼합물은 발암성으로 분류되지 않는다(ECHA, 2021).

5) 이산화티타늄의 ADI 및 GRAS

○ 식품첨가물의 1일섭취허용량(ADI)(acceptable daily intakeADI 산출은 <표>에서의 공식처럼 동물의 안전용량인 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대무독성용량)에 중간 및 종내 민감도 차이를 반영하는 안전계수인 SF(safety factor)로 나누어지는 외삽을 통해 이루어진다. ADI는 주로 식품첨가물에 대한 인체노출

안전기준(health based guidance value, HBGV)이며 안전용량으로 특정하지 않는 식품첨가물에 대해서는 ADI 'Not specified' 또는 'NS'로 분류된다. ADI 'Not specified' 분류는 국제전문기구인 JECFA(FAO/WHO 합동식품첨가물전문가위원회)에 의해 설정되었으며 JECFA는 독성평가결과를 통해 NOEL(No observed effect level, 최대무작용용량) 또는 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대무독성용량) 등의 값이 너무 커서 산출이 어렵거나 안전성이 확인되어 특별히 숫자로 ADI를 설정할 필요가 없는 식품첨가물에 대해 ADI 'Not specified'로 판정한다(JECFA, 1975). 미국의 FDA인 경우에는 일반적으로 안전한 식품첨가물로 인정되는 화학적 물질의 목록인 GRAS(Generally Recognized As Safe)와 동일한 개념이다. 미국 FDA는 캔디 햄 그리고 기타 식품 등에 식품첨가물로 0.5% 이산화티타늄의 함유가 허용되고 있는 GRAS로 분류하고 있다(USFDA, 2022). 따라서 이산화티타늄은 안전성이 높아 특별히 ADI로 특정되지 않는 'not specified' 또는 GRAS로 분류되는 식품첨가물이다. 특히 앞서 <표>에서 수행된 90일 반복경구투여독성시험의 NOAEL이 한계용량 1000 mg/kg/day라는 것은 입자의 크기에 무관하게 'not specified' 또는 GRAS로 분류에 대한 정당성을 부여한다고 할 수 있다.

<표> ADI 산출에 적용된 기본안전계수(SF, safety factor)와 공식

인체노출 안전기준 (단위)	안전계수 종류	명칭 및 수치	내용
ADI (mg/kg/day)	Default safety factors (기본안전계수)	10	동물과 사람 간의 민감도 차이
		10	사람들 사이의 민감도 차이
ADI 공식		$ADI = \frac{NOAEL}{SF(10 \times 10)}$	

4. EFSA의 이산화티타늄 사용금지까지의 유전독성에 대한 평가 과정

- EFSA ANS Panel(Panel on Food additives and Nutrient Sources added to Food, 유럽 식품안전청 산하 식품첨가물·식품첨가영양소 패널)은 2016년, 2018년 그리고 2021년 등 3번 걸쳐 이산화티타늄 안전성에 대한 보고서를 작성하였다. EFSA ANS Panel에 의한 2016년 및 2018년에는 in vivo 유전독성에 대한 우려가 없는 것다는 결론을 내렸다. 그러나 프랑스는 2020년부터 식품첨가제로의 이산화티타늄이 인체에 안전하다는 증거가 충분하지 않다는 식품환경위생노동청(French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, ANSES)의 결론을 통해 사용 금지 결정을 내렸다. 이와 같은 결정과 더불어 EFSA Panel은 2021년에 DNA 나선절단과 염색체 손상 등과 같은 유전독성을 배제할 수 없다는 결정을 내렸으며 그 과정을 다음과 같이 요약할 수 있다.

1) EFSA Panel (2016)

- 이산화티타늄에 대한 EFSA의 유전독성 평가는 2016년 ‘Re-evaluation of titanium dioxide (E171) as a food additive’ 이루어졌다(EFSA ANS Panel, 2016). 이 보고서에서 이산화티타늄의 나노물질(nanomaterial)에 대한 고려가 없었다. EU의 나노물질 정의는 자연적(natural)으로, 또는 가공 중 부수적(incidental)으로 발생한 입자 직경이 1-100 nm 범위의 이산화티타늄이 50% 이상 함유한 경우를 의미한다. 물론 이들 사이즈의 이산화티타늄 비율이 단독으로 또는 덩어리로 존재할 경우를 포함한다. 당연히 보고서의 유전독성에 대한 평가는 이산화티타늄의 나노물질에 대한 고려가 없이 혼합물(mixture)로의 평가가 이루어졌다. 보고서에서 유전독성에 대한 평가는 2016년 발표된 OECD의 보고서에서의 이산화티타늄에 대한 in vitro 및 in vivo 연구(OECD, 2016)뿐만 아니라 그동안 새롭게 이루어진 in vitro 및 in vivo 유전독성 자료를 근거하여 이루어졌다. ANS Panel은 이산화티타늄에 의한 대부분의 유전독성에 대한 양성 반응이 다음과 같은 특성이 확인되었다.

1. In vivo가 아닌 in vitro에서만 양성반응
2. ROS(reactive oxygen species, 유해활성산소) 및 지질과산화 (lipid peroxidation) 등에 의한 산화 스트레스(oxidative stress)와의 관련성
3. 염기 산화에 의한 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) 형성
4. 염색체이상시험이나 소핵시험과 같이 눈으로 염색체 상해(chromosome damage)를 직

접 관찰할 수 있는 방법이 아닌 코멧시험(comet assay)이나 염색체의 히스톤 단백질인 H2AX의 인산화(H2AX histone phosphorylation) 등과 같은 표식분석(indicator assay) 방법을 통해 양성이 확인됨

그러나 대부분의 in vivo 유전독성시험에서 micro-sized TiO_2 에 대해서는 음성으로 확인되었다. Nano-sized TiO_2 에 대한 유전독성시험 결과는 상당히 부족하지만 고용량 이산화티타늄의 정맥 투여를 통한 유전독성시험에서 음성으로 확인되었다. 이와 같이 비록 in vitro에서 양성이 확인되었지만 대부분의 in vivo 시험에서 음성으로 확인되어 ANS Panel에 의해 이산화티타늄에 의한 유전독성은 우려할 정도는 아닌 것으로 판단하였다. EFSA Panel에 의한 이러한 판단은 micro-sized 및 nano-sized TiO_2 의 흡수, 분포, 그리고 배출 등에 대한 자료도 참고가 되었다. 즉, micro-sized 및 nano-sized TiO_2 의 섭취를 통한 전신혈관계로 흡수는 0.02 - 0.1%로 거의 무시할 정도 무시할 정도이며 두 물질의 흡수율 차이는 없다는 점이 고려되었다. <원문: The Panel concluded that, based on the available genotoxicity database and the Panel's evaluation of the data on absorption, distribution and excretion of micro-sized and nano-sized TiO_2 particles, orally ingested TiO_2 particles (micro- and nano-sized) are unlikely to represent a genotoxic hazard in vivo: ① the absorption of orally administered TiO_2 particles (micro- and nanosized) in the gastrointestinal tract is negligible, estimated at most as 0.02-0.1% of the administered dose, ② no difference is observed in the absorption, distribution and excretion of orally administered micro- and nanosized TiO_2 particles>

2) EFSA Panel (2018)

- EFSA는 2018년 'Evaluation of four new studies on the potential toxicity of titanium dioxide used as a food additive (E 171)' 보고서 통해 유전독성에 대한 논문 한편(Proquin 등, 2017)을 포함하여 이산화티타늄의 독성에 새로운 논문 3편에 대한 분석이 이루어졌다. 유전독성시험은 2종류의 인체 결장암 세포주(human colon cancer cell lines)를 이용하여 in vitro로 이루어졌지만 EFSA Panel은 in vivo 유전독성에 대한 우려가 없는 것으로 EFSA ANS Panel (2016) 보고서의 결론을 재확인하였다. <원문: The new in vitro findings in the Proquin et al. (2017) study did not modify the conclusion on the

genotoxicity of TiO₂ as stated in the previous EFSA opinion of 2016 on the safety of TiO₂ (E 171) as a food additive>

3) EFSA Panel (2021)

- Panel은 TiO₂ 입자는 DNA 나선절단(DNA strand break)과 염색체 손상(chromosomal damage)을 유발할 잠재성은 있으나 유전자 돌연변이(gene mutation)는 유발하지 않는 것으로 결정을 내렸다. 또한 in vivo 및 in vitro 유전독성시험의 결과와 물리-화학적 특성(physico-chemical properties)인 결정형태(crystalline form), 입자의 크기, 모양과 응집상태(size of constituent particles, shape and agglomeration state) 등과 무관한 것으로 추정되었다. 이와 같은 결과를 통해 Panel은 이산화티타늄에 의한 DNA 나선절단과 염색체 손상은 분자생화학적 측면에서 다양한 작용기전(mode of action, MOA)에 의한 것으로 추정되지만 정확한 MOA 규명을 알려지지 않았다. 이러한 불확실한 MOA에 근거하여 EFSA Panel은 이산화티타늄에 의한 유전독성 유발에 있어서 용량과 입자 크기에 대한 역치(threshold)를 제시하기도 어렵지만 DNA 나선절단과 염색체 손상 등과 같은 유전독성을 배제할 수 없다는 결정을 하였다. <원문: Concerning the genotoxicity studies, combining the available lines of evidence, the Panel concluded that TiO₂ particles have the potential to induce DNA strand breaks and chromosomal damage, but not gene mutations. No clear correlation was observed between the physico-chemical properties of TiO₂ particles – such as crystalline form, size of constituent particles, shape and agglomeration state – and the outcome of in vitro or in vivo genotoxicity assays. The Panel concluded that several modes of action (MOA) may operate in parallel and the relative contributions of the different molecular mechanisms resulting in the genotoxicity of TiO₂ particles are unknown. Based on the available data, no conclusion could be drawn as to whether the genotoxicity of TiO₂ particles is mediated by a mode(s) of action with a threshold(s). Therefore, the Panel concluded that a concern for genotoxicity of TiO₂ particles cannot be ruled out>.

5. 유전독성시험의 질적 평가와 이산화티타늄 노출 평가에 대한 기준

1) 크리미쉬 독성자료평가시스템(Klimisch Scoring System)

○ **Reliability와 Relevance:** 독성시험 데이터 질의 평가(evaluation)는 정보의 타당성(adequacy) 평가(assessment)가 핵심이며 이를 위한 2가지 요소는 ‘유관성(Relevance)과 신뢰성(Reliability)이다. 데이터의 질을 객관적이고 정확하게 판단하기 위해 ‘크리미쉬 독성자료평가시스템(Klimisch Scoring System)’이 제안되었다(Klimisch, 1997). 유럽화학물질청(European Chemicals Agency, ECHA)이 전 세계적 화학물질의 안전사용을 위한 목적으로 물질에 대한 특정 부분을 데이터베이스화한 소프트웨어 IUCLID 6(International Uniform Chemical Information Database 6; <https://iuclid6.echa.europa.eu/>)에 자료 **신뢰성(Reliability)**에 대한 분류기준을 <표>와 같이 제시하였다. 신뢰성(reliability)은 실험절차와 결과들이 발견한 사실의 개연성과 투명성에 대한 증거를 제공하기 위해 서술되는 방식을 평가하고 표준화된 방법과 관련된 시험보고서와 논문의 근본적인 질에 대한 평가를 의미한다. 데이터의 신뢰성은 데이터 생산에 사용되는 시험방법의 신뢰성과 밀접한 관계가 있다. 독성자료의 신뢰성은 크리미쉬 독성자료평가시스템은 제약이 없는 최상의 신뢰성 자료(reliable without restriction), 제약을 가진 신뢰성 자료(reliable with restriction), 신뢰성이 없는 자료(not reliable), 그리고 사용 불가능한 자료(not assignable)로 구분하여 1점, 2점, 3점, 4점 등으로 점수화하는 기능이 있다. 낮을수록 신뢰성이 높는데 1점과 2점은 신뢰성이 있는 자료로 분류되며 3점과 4점은 신뢰성이 없는 것으로 분류된다. 그리고 **유관성(relevance)**은 자료와 독성시험이 특정한 유해성확인(hazard identification)과 위해성결정(risk characterization)에 대하여 적절한 정도를 나타내는 용어이다. 독성시험 자료의 유관성은 높음(high), 부분적 또는 제한적(limited), 낮음(low) 등 3가지로 분류된다.

<표> 독성시험의 자료에 대한 신뢰성에 대한 크리미쉬 독성자료평가시스템

점수	자료 특성	분류 기준
1	제한이 없는 최상의 신뢰성 자료(reliable without restriction)	- GLP-기반 및 가이드라인 독성시험으로부터의 자료 - 가이드라인 상당의 독성시험으로부터의 자료 - 정부 고시의 독성시험으로부터의 자료 - 과학적 원리에서 수용이 가능한 방법 및 상세한 설명이 동반된 방법으로 수행된 독성시험의 자료(국내 및 국제 학술지에 발표된 자료)
2	제한을 가진 신뢰성 자료(reliable with restriction)	- 국제 및 국내 기관에 의해 상세하게 문서화가 되지 않은 가이드라인에 따라 수행된 독성시험의 자료 - 수용할 만한 제약을 가지거나 이에 상당한 독성시험으로부터 자료 - 수용할 만한 제약을 가지거나 이에 상당한 정부 고시의 독성시험으로부터의 자료 - 과학적 원리 측면에서 수용할 수 있을 정도의 문서화된 독성시험으로부터의 자료 - 수용할 만한 수리적 방법이 제시된 독성시험으로부터 자료 - 독성자료를 서술한 책이나 자료집에 얻은 독성자료
3	신뢰성이 없는 자료(reliable with restriction)	- 방법론적으로 심각한 문제를 가진 독성시험으로부터의 자료 - 적절하지 하지 않는 시스템을 이용한 독성시험으로부터의 자료
4	사용-불가능 자료(not assignable)	- 초록에만 존재하는 독성시험 결과로부터의 자료 - 인용된 독성자료 - 평가에 부적절하거나 부족한 자료

2) Nano-sized 이산화티타늄의 internal exposure(체내 노출)에 평가

○ Scoring for nanoscale considerations(NSC)은 Nano-sized 이산화티타늄이 유전독성시험에 있어서 독성동태학(toxicokinetics)을 통한 체내 노출(internal exposure) 검증을 평가한 것이다. 평가 점수는 1-4로 낮을수록 체내 노출을 확신성이 높다는 것을 의미하며 다음과 같은 기준과 <표>와 같이 설정된다.

- Scoring 1 for NSC: the study is suitable.(적절함)
- Scoring 2 for NSC: the study has some limitations. (다소 제한)
- Scoring 3 for NSC: the relevance of the results cannot be verified.
(결과의 유관성 증명이 쉽지 않음)
- Scoring 4 for NSC: the relevance of the results is low.(유관성 낮음)

<표> Nano-sized 이산화티타늄의 체내 노출증명에 대한 등급 예시

Appendix G – Description of test materials, scoring for nanoscale consideration and internal exposure for toxicokinetic studies

Reference	Test material	Scoring for nanoscale considerations (dispersion and/or confirmation of internal exposure), assigned according to Appendix E	Internal exposure
Talamini et al. (2019)	E 171 (35% nano), anatase, 201 nm in suspension (NTA)	1	Quantitative analysis in tissues with methodology reliable with some limitations
Coméra et al. (2020)	E 171, anatase, 20–340 nm (118 nm) (TEM); 44.7% particles < 100 nm	1	Quantitative analysis in tissue; methodology reliable with some limitations
Riedle et al. (2020)	E 171, anatase, 119 nm (TEM)	1	Qualitative analysis in tissues, methodology reliable with some limitations
Pele et al. (2015)	E 171, anatase, d50 = 260 nm	1	Qualitative analysis in blood, methodology highly reliable
Guillard et al. (2020)	E 171, anatase, 20–440 nm (mean 104.9 nm (SEM-EDX), 55% nanoparticles)	1	Quantitative analysis in tissues, methodology reliable with some limitations
Disdier et al. (2015)	TiO ₂ NPs, P25 (15–24 nm)	1	Quantitative analysis in blood and tissues, methodology reliable with some limitations
Kreyling et al. (2017a)	TiO ₂ NPs, anatase, 50 nm (TEM), purity unknown	1	Quantitative analysis in blood and tissues; methodology highly reliable
Geraets et al. (2014)	NM-100 (50–150 nm) and NM-102 (21–22 nm)	1	Quantitative analysis in tissues; methodology highly reliable
Tassinari et al. (2014)	TiO ₂ NPs, anatase, two different morphologies: spherical shape with a size 20–60 nm (TEM) and irregular 60–40 nm (TEM)	1	Quantitative analysis in tissues; methodology highly reliable
Hendrickson et al. (2016)	TiO ₂ NPs, anatase, 20–25 nm (TEM)	1	Quantitative analysis in blood and tissue, methodology reliable with some limitations
Ammendolia et al. (2017)	TiO ₂ NPs, anatase, spherical shape 20–60 nm and irregular shape 40x60 nm (TEM)	1	Quantitative analysis in tissues, methodology highly reliable
Kreyling et al. (2017b)	TiO ₂ NPs, anatase, 50 nm (TEM), purity unknown	1	Quantitative analysis in blood and tissue, methodology highly reliable
Hendrickson et al. (2020)	TiO ₂ NPs, rutile, needle- or rod-like shape, 5 × 30 nm (TEM)	1	Particles identified in tissues by EM, methodology reliable with some limitations
Chen et al. (2020a,b)	TiO ₂ NPs, anatase, 29 nm (SEM)	1	Quantitative analysis in blood and tissue, methodology reliable with some limitations
Heringa et al. (2018)	TiO ₂ particles	Not experimental study	Quantitative analysis in tissue, methodology highly reliable
Peters et al. (2020)	TiO ₂ particles	Not experimental study	Quantitative analysis in tissue, methodology highly reliable

NTA: nanoparticle tracking analysis; SEM: scanning electron microscopy; TEM: transmission electron microscopy.

6. EFSA 2021년의 사용금지에 대한 유전독성시험 근거와 독성학적 견해

- EFSA는 다양한 보고서와 문헌(EFSA ANS Panel, 2016; OECD, 2016)을 참고하여 전통적인 방법인 유전자 돌연변이(gene mutation), 염색체 수준의 이상(micronuclei/chromosomal aberrations) 그리고 기타 새롭게 도입된 방법인 comet assay, DNA Binding 등에서의 결과를 구분하여 이산화티타늄에 대한 in vitro 및 in vivo 유전독성을 평가하였다.

1) 유전자 돌연변이(gene mutation)에 대한 연구 분석 및 견해

① In vitro 유전자 돌연변이

- 일부 양성반응이 있었지만 시험계인 박테리아의 세포벽 통과와 내부 도달의 한계성으로 유전독성과는 연관성이 낮은 것으로 평가되었다.

② In vivo 유전자 돌연변이

- <표>에서처럼 마우스 및 랫드 등의 시험계에 경구(oral), 복강(intraperitoneal), 정맥(intravenous) 투여 그리고 기관삽관흡입(intracheal instillation) 등의 방법으로 in vivo 유전자 돌연변이시험이 이루어졌다. **마우스 경구로 투여된 시험에서 DNA 소실(deletion)이 확인**되었고 나머지 시험에서는 모두 음성으로 확인되었다. 모든 시험에서 사용된 이산화티타늄 입자의 직경이 30 nm 미만의 nano-sized TiO₂ 입자이다.

<표> in vivo 유전자 돌연변이 시험

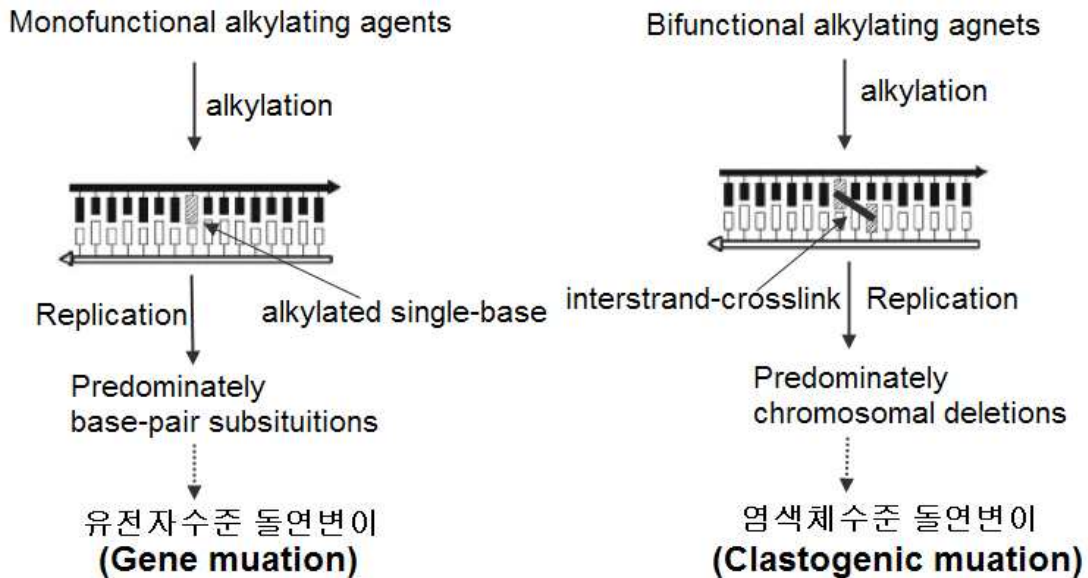
Study design	Test material	Results	Reliability/Relevance	Reference
Oral				
C57BL/6J p^{un}/p^{un} mice <i>In vivo</i> DNA deletion assay in the p^{un} locus Drinking water for 10 days to pregnant mice; 500 mg/kg	NSC: 2, TiO ₂ NPs (P25), 15–24 nm	Positive	2/limited	Trouiller et al. (2009)
Intraperitoneal injection				
Male B6C3F1 mice Pig-a gene mutation assay in peripheral blood reticulocytes and in total red blood cells; 0.5, 5.0 and 50 mg/kg bw per day for 3 days	NSC: 1, TiO ₂ NPs, anatase, ellipsoidal shape (TEM), minor axes 12.1 ± 3.2 nm	Negative	2/limited	Sadiq et al. (2012)
Intravenous injection				
Gene mutation in <i>gpt</i> , Spi ⁻ (liver) and pig-a (erythrocytes) Delta transgenic C57BL/6J mice; 2, 10 and 50 mg/kg bw for 4 weeks	NSC: 1, TiO ₂ NPs (P25), 15–24 nm	Negative	1/limited	Suzuki et al. (2016)
Gene mutation in <i>gpt</i> , Spi ⁻ (liver) Delta transgenic C57BL/6J mice; 0, 2, 10 and 50 mg/kg bw for 4 weeks	NSC: 1, TiO ₂ NPs (P25), 15–24 nm	Negative	2/limited	Suzuki et al. (2020)
<i>LacZ</i> mutation assay in liver and spleen C57BL/6 transgenic mice; 0, 10 and 15 mg/kg bw, i.v. on 2 days	NSC: 1, TiO ₂ NPs (NM-102), 21–22 nm	Negative	1/limited	Louro et al. (2014)
Intratracheal instillation				
Male Sprague-Dawley rats Pig-a gene mutation assay in peripheral blood reticulocytes and in total red blood cells; 3 endotracheal instillation over 8 days; 0.5, 2.5 and 10 mg/kg (a total particle surface area lung deposition of 87, 437 and 1,700 cm ² /lung)	NSC: 1 TiO ₂ NPs (P25), 15–24 nm	Negative	2/limited	Relier et al. (2017)

NSC: nanoscale considerations; NP: nanoparticle; i.v.: intravenous.

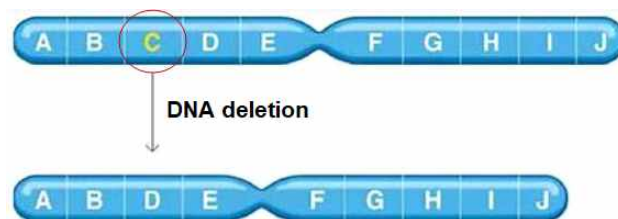
③ 결론 및 견해

가) 돌연변이 측면: EFSA는 in vitro 양성에 대해서는 세포 내 흡수의 한계점, 그리고 in vivo에서는 유전자 수준의 돌연변이가 아닌 염색체 수준의 돌연변이인 DNA 소실(deletion)에 기인하여 이산화티타늄의 유전자 돌연변이성은 없는 것으로 판정하였다. 이와 같은 결론은 타당하며 이는 <그림>에서처럼 유전자 수준의 돌연변이가 아닌 염색체 수준의 돌연변이 모두 DNA에 영향을 주지만 염기 수준에 변화를 유전자 수준의 돌연변이, 그리고 DNA 나선 수준에서 손상을 유도하는 것을 염색체 수준의 돌연변이로 정의되기 때문이다. <그림>에서처럼 DNA 소실이란 DNA 이중나선의 절단으로 염색체 일부가 없어지는 것을 의미하기 때문에 염색체 수준의 돌연변이라고 할 수 있다. 특히 섭취 시험의 유전독성의 질이 2등급의

신뢰성(Reliability)과 제한적 유관성(relevance)으로 이산화티타늄에 의한 유전자 수준의 유전독성이 유도될 가능성은 희박하다.



<그림> 유전자 수준의 돌연변이와 염색체 수준의 돌연변이(박영철, 2010)



<그림> 염색체 수준의 돌연변이 - DNA 소실

나) 입자 크기의 문제: <표> in vivo 유전자 돌연변이 시험에서 사용된 이산화티타늄의 입자 직경은 모두 30 nm 이하이다. <표>는 Verleysen 등(2020, 2021)이 식품첨가물 등급 E171 상품의 12개 샘플에 대한 입자 크기에 따른 수적 및 질량적 비율을 조사한 것이다. 이들에 따르면 식품첨가물 E171의 이산화티타늄은 대부분 입자 직경이 100 nm 이상인 micro-sized TiO_2 이며 100 nm 미만인 nano-sized TiO_2 는 평균적으로 약 25% 정도이다. 그리고 in vivo 유전독성을 유발한 입자 크기인 30 nm 이하 TiO_2 은 수적으로 1% 이하, 그리고 질량적 비율이 0이라는 것을 확인할 수 있다. 즉, micro-sized 및 nano-sized TiO_2 등의 크기에 상관없이

경구 섭취를 통한 전신혈관계로 흡수가 불과 0.02 - 0.1%이라는 점을 고려하면 이산화티타늄 섭취에 의한 유전자 돌연변이가 인체에서 발생할 잠재성은 희박하다고 할 수 있다.

<표> 이산화티타늄 샘플에서 입자의 크기에 따른 구성 비율

Table W.1: Number percentage of particles

x (nm)	Number % of particles with minimum Feret diameter smaller than threshold x											
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	E 171-A ^(a)	E 171-B ^(a)	E 171-C ^(a)	E 171-D ^(a)	E 171-E ^(a)	E 171-F ^(a)
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
40	6	1	2	2	8	3	1	2	1	1	2	0
50	13	4	5	5	16	7	3	6	3	1	6	2
60	22	9	12	13	25	15	6	15	9	2	14	3
70	36	21	24	25	37	29	11	29	19	4	24	7
80	50	35	39	38	51	44	20	44	31	8	40	9
90	63	50	54	52	63	58	30	58	44	13	54	14
100	74	64	67	65	73	71	40	70	56	18	65	20
110	81	75	77	74	80	79	50	79	67	24	75	28
120	87	83	85	82	86	85	60	85	75	31	83	35
130	92	89	90	89	91	90	68	90	82	38	88	43
140	94	92	94	93	94	94	77	93	88	44	91	51
150	97	95	96	96	96	96	83	95	92	50	95	59
160	98	97	98	97	98	97	88	97	95	57	97	67
170	98	98	99	99	98	98	91	98	97	65	98	76
180	99	99	99	99	99	99	93	99	98	72	99	81
190	99	100	100	100	99	99	96	99	99	76	99	87
200	100	100	100	100	100	100	97	100	99	83	100	91
250	100	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100	99
300	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98	100	100
400	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
500	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

(a): Sample claimed to be the same of the E 171 for which data were evaluated in EFSA FAF Panel (2019).

<표> 이산화티타늄 샘플에서 입자의 질량에 따른 구성 비율

Table W.2: Mass percentage of particles

x (nm)	Mass % of particles with minimum Feret diameter smaller than threshold x											
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	E 171-A ^(a)	E 171-B ^(a)	E 171-C ^(a)	E 171-D ^(a)	E 171-E ^(a)	E 171-F ^(a)
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
60	3	1	2	2	3	2	0	2	1	0	2	0
70	7	4	5	5	7	6	1	6	3	0	4	0
80	14	9	11	10	13	12	3	12	7	0	10	1
90	23	18	20	18	22	21	6	20	13	1	18	2
100	33	29	32	29	31	32	10	30	20	2	27	3
110	44	41	43	39	41	43	15	41	30	3	38	6
120	54	52	56	50	52	52	23	50	39	5	49	9
130	64	63	66	64	61	62	30	59	49	8	58	13
140	71	70	75	72	70	73	40	68	59	11	66	19
150	80	79	81	82	78	78	49	73	69	15	75	27
160	84	84	88	87	84	84	58	80	77	20	82	35
170	88	90	92	91	88	88	65	85	84	27	86	47
180	92	93	95	95	92	92	70	90	89	34	90	55
190	94	96	96	96	95	95	77	94	92	40	93	65
200	95	98	99	98	96	97	82	96	95	49	96	74
250	100	99	100	100	100	100	95	100	100	75	99	96
300	100	100	100	100	100	100	98	100	100	88	100	100
400	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	100	100
500	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

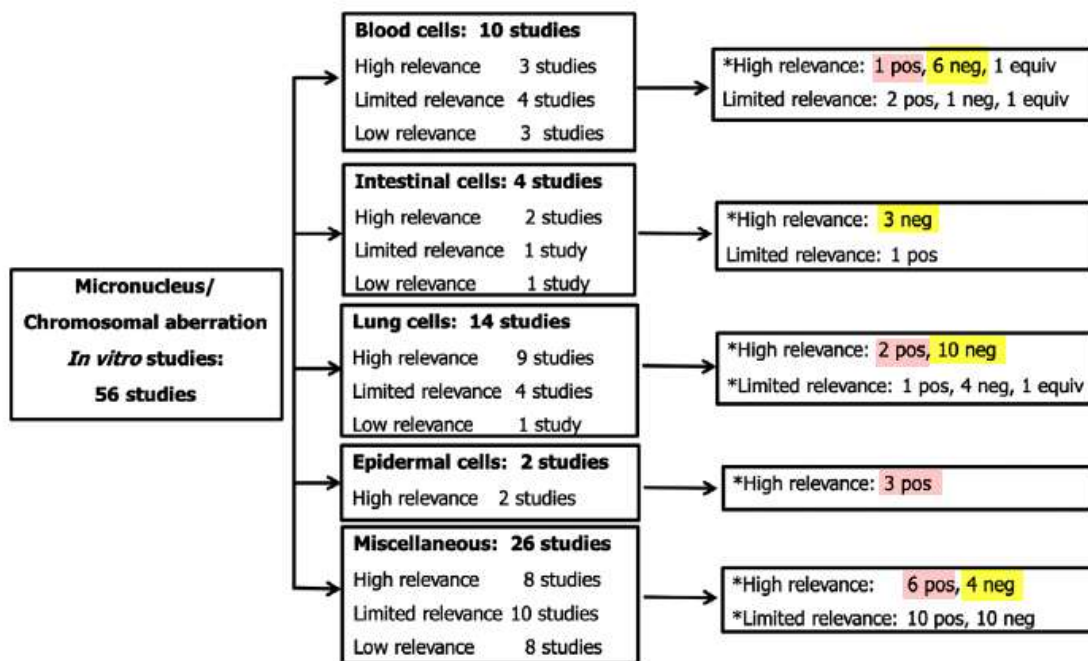
(a): Sample claimed to be the same of the E 171 for which data were evaluated in EFSA FAF Panel (2019).

2) 소핵시험과 염색체 이상에 대한 연구 분석 및 견해

- 소핵시험(micronuclei test)은 세포분열 시에 주핵인 딸핵에 들어가 있지 않고, 세포질 내에 독립된 염색체 혹은 염색체의 단편으로 형성되는 소핵을 지표로 하는 변이원성 시험이다. 염색체 이상(chromosome aberration) 시험은 염색체의 절단 및 교환 등의 염색체 수준에서 변이원성 시험이다. 따라서 두 시험 모두 염기의 이상의 확인하는 유전자-수준 돌연변이와는 다른 염색체-수준에서 이상이라는 측면에서 동일하게 분석 및 평가된다.

① In vitro 소핵시험과 염색체이상 시험

- EFSA의 평가: 이산화티타늄에 대한 소핵 및 염색체 구조적 이상의 In vitro 시험 <그림>에서처럼 다양한 세포주(혈액세포, 소장세포, 폐세포, 표피세포를 비롯하여 그 외 다양한 세포주를 이용하여 56회가 수행되었다. 시험 결과에 대한 유전독성의 정도를 High relevance(높은 유관성), Limited relevance(제한적 유관성), 낮은 유관성(Low relevance) 등으로 <그림>에서처럼 분류되었다. 총 56회 중 43회에서 높은 및 제한적 인과성이 확인되었고 나머지는 이산화티타늄에 의한 염색체 수준의 이상과 인과성이 낮은 것으로 확인되었다. 그러나 시험마다 결과적 차이가 결정형태, 입자크기, 응집성, 세포배양액, 시험물질의 처리 농도 및 시간과 상관이 없는 것으로 확인되었다. EFSA는 확인이 가능한 자료에서 약 60%의 시험물질이 30 nm 이하의 nano-sized 이산화티타늄으로 파악하였다. 그러나 EFSA는 음성 및 양성에 대한 높은 및 제한적 유관성이 있음에도 불구하고 대부분의 소핵시험 및 염색체이상시험의 유관성이 없는 음성으로 판단하였다. 그러나 Proquin 등 (2017)에 의해 소장세포에서 확인된 염색체 손상에 대해 양성으로 판단하였다.



*: Some of the studies used more than one test material and in these cases, the results are reported separately.

Figure 1: *In vitro* micronucleus and chromosomal aberrations studies. Summary of test results from 56 studies reported in 44 papers, NANOGENOTOX Project, 2013 (Documentation provided to EFSA No 7 and 8) and Documentation provided to EFSA No 15

<그림> EFSA 보고서(2021)에서의 in vitro 소핵시험과 염색체이상 시험의 결과

○ Proquin 등(2017)의 결과에 대한 분석: <그림>은 Proquin 등(2017) 논문에서 발췌한 것으로 HCT-116(결장암 세포)에 5, 10과 50 $\mu\text{g}/\text{cm}_2$ TiO_2 를 24시간 처리하는 소핵시험을 통해 염색체 이상에 대한 결과이다. <그림>의 A)에서 상위 하얀 사진은 10과 50 $\mu\text{g}/\text{cm}_2$ TiO_2 투여군에서 세포의 응집체(agglomerates), 그리고 하단에서 붉은색 화살 표시와 같이 소핵성(micronucleated) 및 이핵성(binucleated cells) 등의 염색체이상이 확인되었다. 물론 이러한 소핵의 양성반응은 대조군에서도 확인되었지만 <그림>의 B)에서처럼 소핵 발생빈도가 시험군에서 용량-의존적으로 유의하게 증가되는 것이 확인되었다.

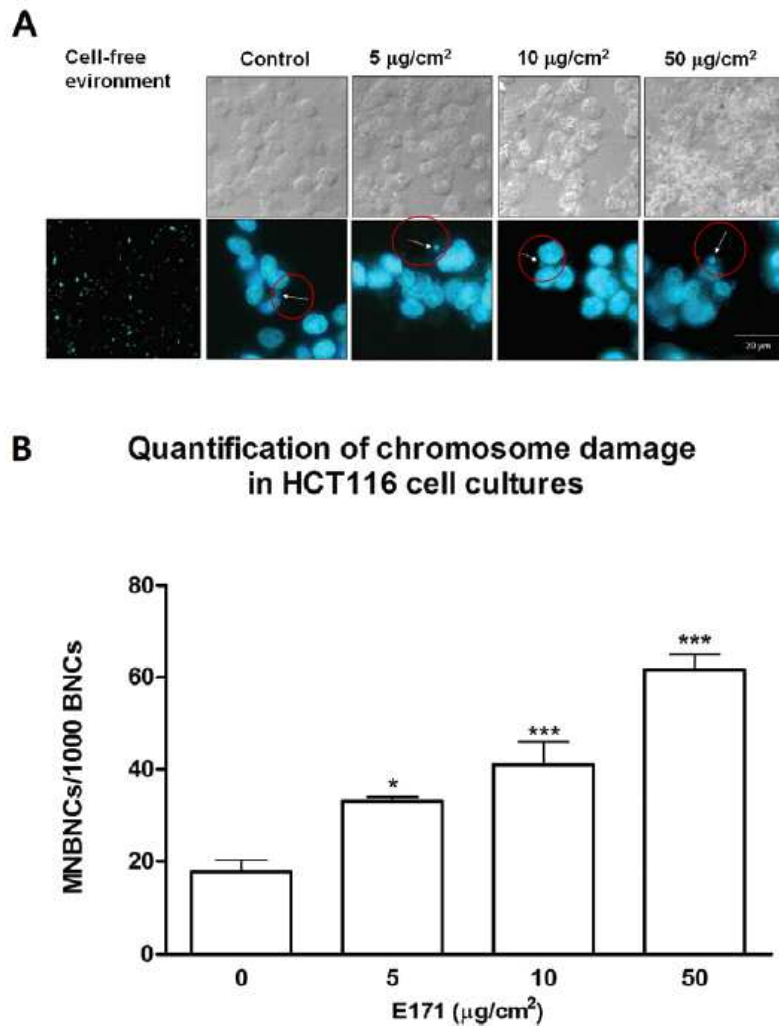


Figure 7. E171 induced chromosome damage in HCT116 cell cultures.

<그림> HCT-116(결장암 세포)에서 A) 소핵염색(화살표)과 발생빈도

② In vivo 소핵시험과 염색체이상 시험

- EFSA의 평가: 소핵과 염색체 이상의 생성을 확인하기 위해 이산화티타늄의 크기를 고려한 26 in vivo 시험이 <표>에서처럼 구강투여, 복강 그리고 정맥주사 등으로 평가되었다. 이중 유전독성시험의 신뢰성과 유관성에 대한 탐색 후 15 연구 결과에서 단 하나 연구에서만 높은 유관성 그리고 14개 연구에서는 부분적 또는 제한적 유관성이 확인되었다. 투여경로에 따르면 14일에서 90일 경구투여의 전체 시험에서 100 nm 미만의 nano-sized 이산화티타늄이 사용되었고 5개 중 4개에서 소핵시험 및 염색체이상의 양성반응이 확인되었다. 복강 및 정맥의 1회 또는 수회를 통해 주사되었는데 nano-sized 이산화티타늄 주사에서는 양성 및 음성 반

응의 비율이 비슷하였다. 반면에 100 nm 이상에서는 소핵 및 염색체 이상에서 음성반응으로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 EFSA는 30 nm 미만의 nano-sized 이산화티타늄은 소핵 및 염색체이상을 유발할 잠재성을 가지고 있는 것으로 추정하였다. 그러나 30 nm 이상의 nano-sized 이산화티타늄에서 일부 양성반응이 있지만 입자의 크기에 따른 소핵 및 염색체이상의 양성반과는 비례성확인이 어렵다고 결론을 내렸다.

<표> in vivo 소핵 및 염색체이상 시험 및 결과

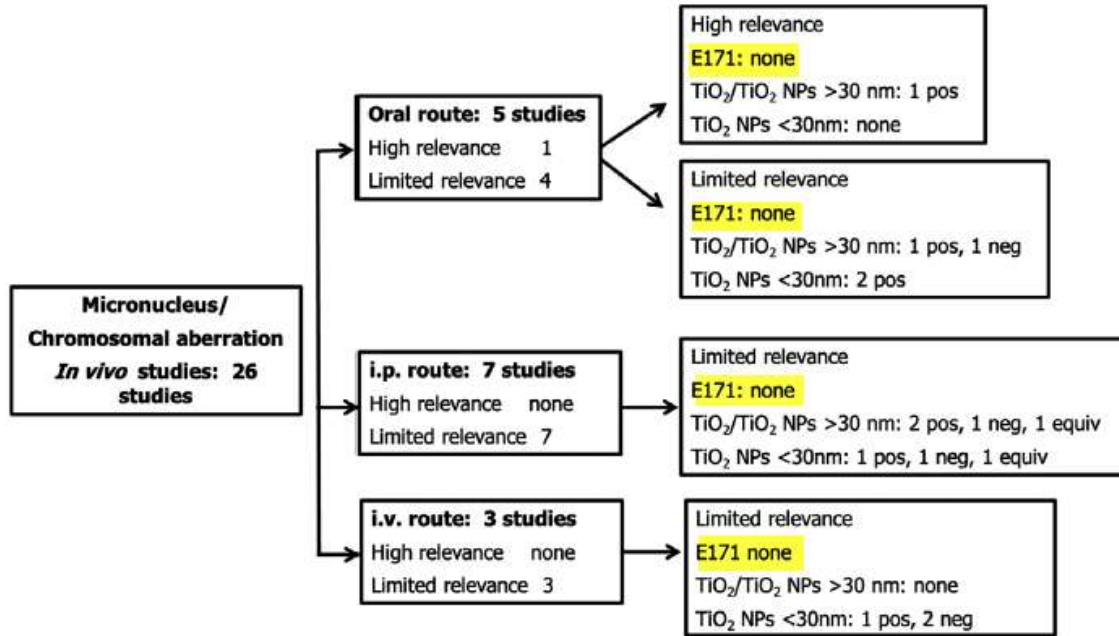


Figure 2: *In vivo* micronucleus and chromosomal aberration studies – Summary of test results

③ 결론 및 견해

가) 소핵 및 염색체 이상 측면: 소핵 및 염색체 이상시험의 질적인 1의 신뢰성 높은 (high) 유관성 연구는 Shukia 등(2014) 논문에서 소핵에 대한 양성반응이며 기타 시험에서는 신뢰성 및 유관성에서 2 또는 제한적이다. 다음의 Shukia 등(2014) 논문에서 10, 50 그리고 100 mg/kg/day 이산화티타늄을 14일 동안 구강을 통해 투여한 결과, 100 mg/kg/day에서 간조직에서 DNA 손상이 확인되었다. 연구자에 의하면 이산화티타늄이 직접적으로 DNA에 작용하여 유발하는 것이 아니라 간 조직의 이산화티타늄 누적, 이에 의한 ROS(reactive oxygen species, 활성산소종) 생성과 산화적 스트레스(oxidative stress)에 기인하는 것으로 추정하였다. ROS 및 산화적 스트레스는 인체에서 음식섭취에 의해서도 생성되고 생리학 및 독성학적 다양한 해석이 이루어지기 때문에 이와 같은 기전에 의한 DNA 손상에 대해 종합적인 결론에서 재논의가 된다. 특히 식품첨가물 등급인 E 171에 대한 소핵 및 염색체이상의 시험이 수행되지 않아 섭취에 의한 유관성 유무를 결정하

기에는 미흡하다.

- Shukia 등(2014) 논문: Background: The use of metal oxide nanoparticles (titanium dioxide) in consumer and industrial products improves their quality but also underscores the possible adverse effects to human and environmental health. Materials & methods: Mice were exposed orally for 14 consecutive days and analyzed for alteration in different hepatic enzymes, histopathological changes, oxidative stress, DNA damage, tumor suppressor and proapoptotic protein expression in liver cells. Results: We observed a significant alteration in the level of hepatic enzymes and liver histopathology at a dose of 100 mg/kg body weight. Significant oxidative DNA damage was observed in liver cells, which could be attributed to oxidative stress. In addition, the increased expression of p53, BAX, caspase-3 and -9 proteins and decreased expression of antiapoptotic protein Bcl-2, suggest activation of the intrinsic pathway of apoptosis. Conclusion: High accumulation of titanium dioxide nanoparticles in the liver tissue would cause DNA damage and apoptosis through the intrinsic pathway.

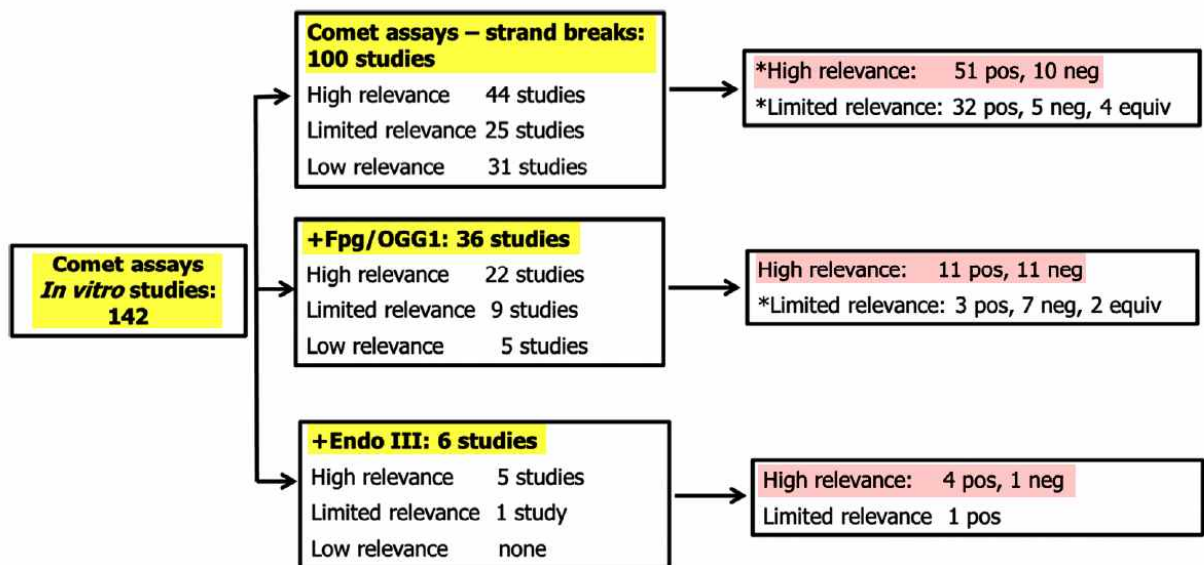
나) 입자 크기의 문제: Nano-sized 이산화티타늄에서 일부 양성반응이 있지만 입자의 크기에 따른 소핵 및 염색체이상의 양성반응이 확인되었지만 100 nm 이상의 micro-sized 입자에서는 소핵 및 염색체 이상에서 음성반응으로 확인되었다. Nano-sized 이산화티타늄의 범위 내에서는 입자크기에 따른 DNA 손상과의 의존성이 없지만 100 nm 이상의 micro-sized 입자에 대한 소핵 형성 및 염색체 이상 등의 in vivo DNA 손상에 대한 잠재성은 아주 낮을 것으로 사료된다. 그러나 micro-sized 입자에 대한 in vivo DNA 손상에 대한 연구는 좀 더 필요할 것으로 사료된다.

3) In vitro 및 in vivo 코밋분석(comet assay)

- Comet assay는 단일세포 전기영동(SCGE, single cell gel electrophoresis)으로 불리며 개별세포의 DNA 손상 정도를 in vitro 및 in vivo 수준에서 확인이 가능한 유전독성시험법이다. Comet Assay는 strand breaks (DSBs), single strand breaks (SSBs), alkali labile sites, oxidative DNA base damage, DNA-DNA/DNA-protein/DNA-Drug crosslinking, DNA repair 등에 대한 확인이 가능하다.

① In vitro 코밋분석

○ EFSA의 평가: 논문으로 발표된 68편을 포함하여 142 in vitro comet assay가 여러 종류의 세포주를 이용하여 수행되었다. <그림>은 직접적인 DNA 나선손상을 측정하는 alkaline comet assay뿐만 아니라 산화된 염기 부위를 인지하는 수복효소(repair enzyme)인 FPG(formamidopyrimidine DNA-glycosylase), OGG1(8-hydroxyguanine DNA-glycosylase) ENDIII(endonuclease III) 등을 이용한 효소처리분석방법으로 수행된 142 시험의 결과를 요약한 것이다. 이중 발표된 논문 43편을 포함하여 106 시험에서 높은 및 부분적 유관성이 확인되었다. 약 57%의 시험결과가 30 미만 nano-sized TiO_2 를 처리한 시험에서 추정되었다. EFSA panel에 따르면 시험에 이용된 이산화티타늄의 직경이 2.3 nm에서 5 μm 범위로 확인되었다. 높은 및 부분적 유관성이 있는 결과에서 입자 직경 30 미만 nano-sized TiO_2 는 78% 양성율, 그리고 30 이상 nano-sized TiO_2 는 87% 양성율이 확인되었다. 따라서 대부분의 Comet assay에서 양성 반응의 양성이며 입자의 크기와 양성반응의 관계는 없는 것으로 추정하였다. 식품첨가물 등급인 E171에 대한 in vitro comet assay의 다섯 시험에서 DNA 나선절단(DNA strand break)의 양성이 4시험, 그리고 음성이 1 시험에서 확인되었다.



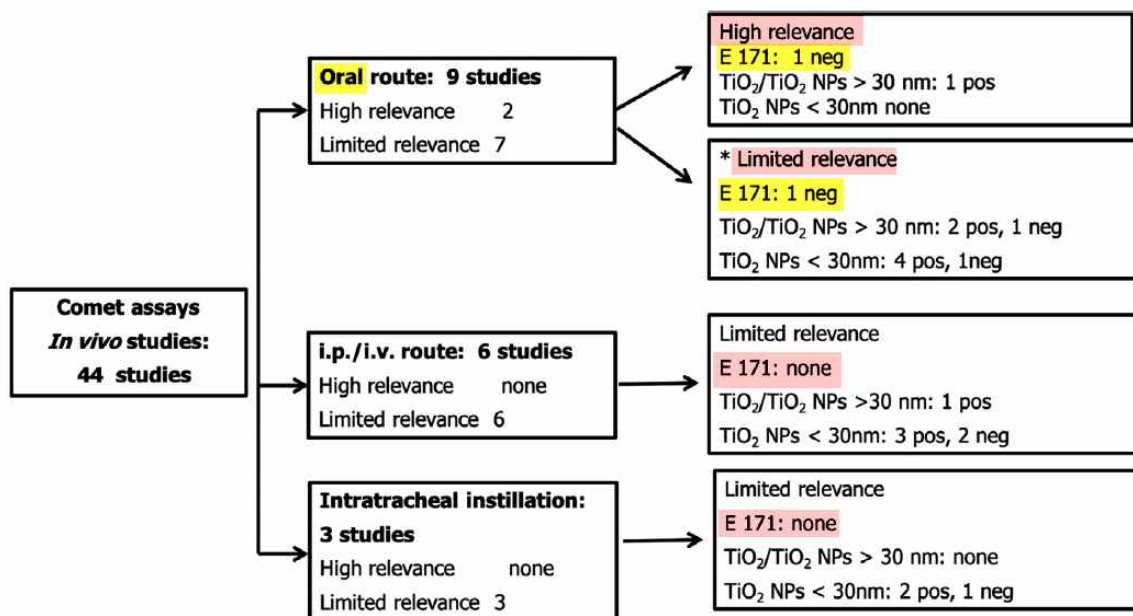
*: Some of the studies used more than one test material and in these cases, the results are reported separately.

Figure 3: In vitro Comet assays – Summary of study results from 142 studies reported in 68 publications

<그림> Comet assay의 다양한 방법에 따른 DNA 손상에 대한 유관성(relevance)

② In vivo 코밋분석

- EFSA의 평가: <표>는 마우스 및 랫드에서 단일나선절단(single-strand breaks, SSBs)과 수복효소 Fpg-민감 부위(Fpg-sensitive sites)에 comet assay의 결과를 나타낸 것이다. 결과는 2020까지 수행된 44 시험으로 분석된 것으로 이중 18 시험에서 높은 또는 제한적 유관성이 확인되었다. 이들 시험 중 식품첨가물로 이산화티타늄 노출경로인 섭취(oral) 경우에는 9건 시험이 수행되었다. 이들 중 6건은 양성, 그리고 3건은 음성으로 확인되었다. 식품첨가물 등급의 E 171에 대한 comet 분석은 2건이며 모두 음성으로 판정되었다.



*: Some of the studies used more than one test material and, in these cases, the results are reported separately.

Figure 4: In vivo Comet assays – Summary of test results

<그림> 다양한 노출경로에 따른 Comet assay의 결과 분석

<표> 다양한 노출경로에 따른 Comet assay의 결과 분석

Table 9: Summary table of test results *in vivo* Comet assay. Studies within the same route of exposure are ordered by the size of the tested material

Study design	Test material	Results	Reliability/Relevance	Reference
Oral				
Rat; 50 and 500 mg/kg bw; once/week, 10 weeks; analysis: 24 h	NSC: 2, E 171 Anatase, three size groups of particles: 135, 305, 900 nm (TEM image)	Negative liver, lung	1/high	Jensen et al. (2019)
Mice; 40 and 200 mg/kg bw per day; 7 days; analysis 24 h after the last dose	NSC: 3, TiO ₂ , Anatase 160 nm	Positive BM Negative liver, brain	2/limited	Sycheva et al. (2011)
Rat; 10 mg/kg bw per day; 7 days	NSC: 1, E 171 , 118 nm Anatase (range 20–340 nm) and TiO ₂ NPs NM-105) 15–24 nm	Negative Peyer's patch cells (both materials)	2/limited	Bettini et al. (2017)
Mice; 10, 50, 250 µg/mouse; analysis: 3 days after treatment	NSC: 1, TiO ₂ , Anatase 117 nm ; and TiO ₂ NPs, anatase 17 nm	Positive Blood leucocytes	2/limited	Murugadoss et al. (2020)
Mice; 10, 50, 100 mg/kg bw per day; 14 days; analysis: 24 h	NSC: 1, TiO ₂ NPs, Anatase, 20–50 nm	Positive Liver	1/high	Shukla et al. (2014)
Rat; 0.5 mg/kg bw per day; 45 days; analysis: immediate	NSC: 1, TiO ₂ NPs, crystalline form unknown, 42 nm	Negative Blood and liver	2/limited	Martins et al. (2017)
Mice; 0.2, 0.4, 0.8 mg/kg bw per day; 28 days; analysis: immediate	NSC: 2, TiO ₂ NPs, Rutile, 25 nm	Positive Liver, BM, spleen, thymus, lymph nodes	2/limited	Manivannan et al. (2020)
Mice; 500, 1,000, 2,000 mg/kg bw per day; 7 days; analysis: day 8	NSC: 4, TiO ₂ NPs, Anatase, 10–25 nm	Positive Liver and kidney	2/limited	Shi et al. (2015)
Rat; 50, 100, 200 mg/kg bw per day; 60 days; analysis: 24 h	NSC: 2, TiO ₂ NPs, Anatase, 5–12 nm	Positive Leucocytes	2/limited	Grissa et al. (2015)

Study design	Test material	Results	Reliability/Relevance	Reference
Intraperitoneal injection				
Mice; 500, 1,000, 2,000 mg/kg bw per day 5 days; analysis: 24 h	NSC: 1; TiO ₂ NPs, Anatase/ rutile 44 nm	Positive BM, liver, brain	2/limited	El-Ghor et al. (2014)
Mice; 50 mg/kg bw per day; 3 days; analysis: immediate	NSC: 1; TiO ₂ NPs Anatase 8.9–15.3 nm	Positive Liver +OGG1/ EndoIII: lung and liver	2/limited	Li et al. (2017b)
Intravenous injection				
Rat; 5 mg/kg bw; single dose; analysis: 24 h, 1 and 2 weeks	NSC: 2, TiO ₂ NPs (NM-105), 15–24 nm	Negative Leucocytes (BM)	2/limited	Dobrzynska et al. (2014)
Mice; 2,10, 50 mg/kg bw per week; 4 weeks; analysis: 3 days	NSC: 1, TiO ₂ NPs (P25), 15–24 nm	Negative Liver	2/limited	Suzuki et al. (2016)
Rats; 0.59 mg/kg bw (single); analysis: 24 h, 1, 2, 4 weeks	NSC: 1, TiO ₂ NPs (NM-105), 15–24 nm	Positive PBMC (only at 24 h)	2/limited	Kazimirova et al. (2019)
Rat; 5, 25, 50 mg/kg bw per week; once/week, 4 weeks; analysis: immediate	NSC: 1, TiO ₂ NPs, Anatase 10–20 nm	Positive Brain	2/limited	Meena et al. (2015b)
Intratracheal instillation				
Rat; 0.5, 2.5, 10 mg/kg bw (3 times every 4 days, over 8 days); analysis 2 h and 35 days	NSC: 1, TiO ₂ NPs (P25), 15–24 nm	Positive Lung (2 h, 35 days), liver (2 h, 35 days), blood (35 days)	2/limited	Relier et al. (2017)
Mice; 18, 54, 162 µg/mouse (single); analysis: 1, 3 and 28 days	NSC: 1, TiO ₂ NPs, Rutile, 10 nm	Positive , Lung (28 days), liver (3 –28 days); (negative: BAL)	2/limited	Wallin et al. (2017)
Rat; 1, 5 mg/kg bw (single); 0.2, 1 mg/kg bw (once/week) x 5 weeks; analysis: 3 and 24 h	NSC: 1, TiO ₂ NPs, Anatase, 5 nm	Negative Lung	1/limited	Naya et al. (2012b)

BAL: bronchoalveolar lavage cells; NSC: nanoscale considerations, NP: nanoparticle; PBMC: peripheral blood mononuclear cells.

③ 결론 및 견해

가) DNA 손상 측면: Comet assay는 염색체이상시험 및 소핵시험과 달리 세포분열을 요구하지 않으면서 간편하고 민감하게 세포핵 내 DNA 손상 정도를 정량할 수 있다는 장점이 있다. In vitro 및 in vivo 모두에서 양성 및 음성이 혼재하여 확인되었다. 그러나 Comet assay 결과는 DNA 손상에 대한 생물학적 상관성을 해석하기 위해 다른 유전독성 시험법(예, 소핵시험, 돌연변이성 시험, adduct levels,

염색체이상 또는 cytotoxicity)과의 결과를 비교하는 것이 필요하다(Fairbairn 등, 1995). 이러한 점을 고려하여 종합적인 유전독성의 결론을 통해 재분석이 요구된다.

나) 입자 크기의 문제: Nano-sized 이산화티타늄의 in vitro 및 in vivo comet assay에서는 양성 및 음성 결과가 혼재되어 확인되었다. 반면에 비록 식품첨가물 등급인 E171에 대한 in vitro comet assay에서는 양성이 확인되었을지라도 지금까지 수행된 in vivo comet assay의 2건 모두에서 음성이 확인되었다. 결과의 대한 증거비중법(weight of evidence) 측면에서 in vitro보다 in vivo에 더 무게감이 더 있기 때문에 생체에서 식품첨가물 등급의 E 171에 의한 in comet assay의 양성 반응은 없을 것으로 추정된다. 특히 이러한 추정은 아래의 2019년 Jensen 등(2019)의 논문에서 식품첨가물 등급의 E 171에 대한 간과 폐에서의 음성 반응에서 시험의 신뢰성 1등급, 그리고 높은 유관성이 뒷받침해 준다고 할 수 있다.

○ Jensen 등(2019)의 논문(Telomere length and genotoxicity in the lung of rats following **intragastric exposure to food-grade titanium dioxide** and vegetable carbon particles. Mutagenesis, 34, 203–214): Abstract: Vegetable carbon (E153) and titanium dioxide (E171) are widely used as black and white food colour additives. The aim of this study was to assess gastrointestinal tight junction and systemic genotoxic effects in rats following exposure to E153 and **E171 for 10 weeks by oral gavage once a week**. The expression of tight junction proteins was assessed in intestinal tissues. Levels of DNA strand breaks, oxidatively damaged DNA and telomere length were assessed in secondary organs. Hydrodynamic suspensions of E153 and E173 indicated mean particles sizes of 230 and 270 nm, respectively, and only E153 gave rise to intracellular production of reactive oxygen species in colon epithelial (Caco-2) cells. Rats exposed to E153 (6.4 mg/kg/week) or E171 (500 mg/kg/week) had decreased gene expression of the tight junction protein TJP1 ($P < 0.05$). E153 (6.4 mg/kg/week) also decreased OCLN ($P < 0.05$) in the colon and occludin protein expression in the small intestine ($P < 0.05$). Furthermore, E153 or E171 exposed rats had shorter telomeres in the lung ($P < 0.05$). Plasma from particle-exposed rats also produced telomere shortening in cultured lung epithelial cells. **There were unaltered levels of oxidatively damaged DNA in the liver and lung and no changes in the DNA repair activity of oxidatively damaged DNA in the lung.** Altogether, these results indicate that intragastric exposure to E153 and E171 is associated with reduced tight junction protein expression in the intestinal barrier and telomere length shortening in the lung in rats.

4) DNA 결합 시험

○ **EFSA 평가 및 견해:** DNA 결합(DNA Binding) 유전독성시험이란 DNA와 물질 간 결합 복합체 형성을 흡광도(optical density)로 확인하는 유전독성시험법이다. 가장 최근에 이루어진 Hekmat 등(2020)에 의한 연구에서 TiO_2 Nano-particles anatase (< 10 nm)와 DNA가 결합하는 것이 확인되었다. 그러나 식품첨가물 등급에서는 10 nm 미만의 입자가 존재하지 않고 이 결합이 공유결합 또는 비공유결합인지 확인이 불가능하다는 점이 있다. DNA와의 공유결합을 통해 DNA 손상이 발생한다는 점에서 DNA 결합 유전독성시험을 통한 이산화티타늄의 유전독성 확인에는 제한점이 있다고 사료된다. EFSA panel도 이점을 지적하고 있어 이산화티타늄의 DNA 결합 유무를 통한 DNA 손상을 추정하는 것은 신뢰성이 없다고 결론을 내렸다.

5) 기타 유전독성시험

① **시험 종류:** 이산화티타늄의 유전독성을 확인하기 위해 염기산화(Oxidised DNA bases)에 의해 유도된 DNA 손상의 지표인 8-oxodG 측정, 유전자 손상 신호(γ H2AX foci)와 DNA 손상의 간접적인 지표(other markers of DNA Damage)인 유해활성산소(Reactive oxygen species, ROS) 생성, DNA 메틸화(Epigenetic DNA methylation)를 비롯하여 형질전환(Cell transformation) 등이 확인되었다. <표>는 EFSA에서 소개된 내용과 EFSA panel의 평가, 그리고 이에 대한 견해를 밝힌 내용을 포함하고 있다.

② **결과와 EFSA 평가:** <표>에서 수행된 이산화티타늄과 관련하여 유전독성 및 작용기전(mode of action) 측면에서 고려할 만한 시험과 측정은 염기산화(Oxidised DNA bases)와 ROS 생성 부분이다. 염기산화 측면에서 In vitro 결과를 기반으로 nano- 및 micro-sized 입자 모두가 8-oxodG 형성을 통해 염기 산화의 유도에 대한 잠재성이 있는 것으로 추정하였다. 이산화티타늄에 의한 ROS 생성은 평가없이 단순히 ROS 생성 유무에 대한 언급만 하였다.

<표> 기타 여러 유전독성시험과 결과에 대한 평가

종류 및 기전	EFSA의 자료 및 평가	의견
산화된 염기 (Oxidised DNA bases): 산화에 의해 유도된 DNA 손상의 지표인 8-oxodG를 측정	<In vitro> - 입자 크기 20-60, 21±9 nm 등의 nano-sized 입자에 의해 양성반응 (Zijno 등, 2015). - Anatase 12 nm, P25과 rutile 21 nm의 nano-sized 입자에 의한 oxodG 증가 유도, 그러나 입자 140 nm의 이산화티타늄에서는 음성 (Jugan et al., 2012) - Anatase와 rutile의 혼합 그리고 nano- 및 micro-sized 입자의 혼합의 실험에서 양성 반응 (Andreoli 등, 2018) <In vivo> - 음용수에 혼합하여 입자 크기 20~30 nm (상품명: P25) 입자 크기에 대조군보다 1.5배 증가 (Trouiller 등, 2009). <EFSA 평가>: In vitro 결과를 기반으로 nano- 및 micro-sized 입자 모두가 8-oxodG 형성을 통해 염기 산화의 유도에 대한 잠재성이 있는 것으로 추정	In vitro 및 in vivo에서 양성은 nano-sized 입자에서만 확인되었다. 특히 < 표 > 에서 처럼 nano-sized 입자에서는 용량-의존적으로 증가하였지만 macro-sized 입자에서는 고용량군에서 편차가 큰 유의성이 확인되었다.
유전자 손상 신호 (γH2AX foci)와 DNA 손상 지표 (other markers of DNA Damage)	- γH2AX foci는 DNA 이중나선 절단(DNA double-strand breaks)에 대한 유전자 손상 신호로 in vitro 및 in vivo에서 양성반응이 확인 됨. - 그러나 유전독성의 작용기전(mode of action) 분석 방법인 ToxTracker assay를 통해 음성으로 확인됨 (Brown 등, 2019) <EFSA 평가>: 제한적 연관성	손상 DNA의 발현에 이상이 없었고 또한 산화적 스트레스도 발생하지 않아 유육관성이 없다는 것에 적절한 판단이라고 사료됨,
유해 활성 산소 (Reactive oxygen species, ROS)	- Nano-sized 입자인 경우 in vitro 및 in vivo 등에서 ROS 생성 유무에 대한 대립되는 결과 - 또한 micro-sized 입자에서보다 nano-sized 입자에서 ROS 생성이 유의하게 높았음 (Guichard 등, 2012). - E171은 세포가 없는 시험조건에서 ROS 생성함 (Proquin 등, 2017). <EFSA 평가>: 평가없이 단순히 ROS 생성 유무에 대한 언급만 하였음	E171에 의한 ROS 생성과 관련된 Proquin 등(2017) 등의 논문을 파악한 결과, E171과 ROS 생성의 연관성에는 다소 무리가 있는 실험과 분석으로 사료됨.
DNA 메틸화(Epigenetic DNA methylation)	- DNA의 메틸화는 유전자 형질 발현을 조절하는 화학적 변형 중 하나로 과다한 메틸화는 유전자 발현 억제. 따라서 DNA 메틸화는 직접적인 DNA 손상과는 무관한 유전자 외적 요인 손상 지표 - Nano-sized 입자가 DNA 메틸화에 영향을 줌 <EFSA 평가>: 이들 결과는 유전자 외적 요인에 의한 간접적인 DNA 손상을 확인하는데 의미가 있다고 추정	DNA의 고 메틸화는 유전자 발현 억제, 저 메틸화는 발현 촉진 등의 조절 기전이므로 이를 통해 이산화티타늄에 의한 DNA 손상을 추정하는 것은 무리가 있음.
형질전환(Cell transformation)	<EFSA 평가>: 형질전환 유무는 암세포로의 전환에 관련이 있지만 유전독성과의 연관성을 추정하는 것은 어렵기 때문에 권장할 만한 시험법이 아님	EFSA 평가에 동의함

③ 결론 및 견해

○ <표>와 같이 5가지 방법은 간접적인 방법으로 유전독성의 잠재성만을 확인하는 것이다. 그러나 다섯 가지 방법 중 중요하게 고려할 부분은 ROS(reactive oxygen species, 유해활성산소)이다. 이는 이산화티타늄에 의한 ROS 생성이 염색체 수준의 DNA 손상의 MOA(mode of action, 작용기전)로 추정되기 때문이다.

가) 입자 크기의 문제: 다음은 Andreoli 등(2018)의 논문에서 확인된 입자 크기별 DNA tail를 분석하는 comet assay이다. Nano-sized 입자는 모든 용량군에서 확인되었지만 micro-sized 입자는 평균의 편차가 크며 고용량군에서만 유의성이 확인되었다. 이는 입자 크기별 및 노출 농도에 따른 유전독성 측면에서 threshold 가능성을 제시하는 추정도 가능하다. 또한 H₂O₂와 추가하여 산화적 스트레스와 DNA 손상의 관계를 이산화티타늄에 의한 산화적 스트레스와 DNA 손상 유도하는 MOA의 가능성도 제시되었다. 그러나 nano-sized 및 micro-sized 입자 모두에서 DNA tail를 보인 비율이 고용량 투여에도 불구하고 H₂O₂과 비교하여 상당히 낮다고 할 수 있다.

○ Andreoli 등(2018)의 논문 Abstract: In the last years, a number of in vitro studies have been performed to assess the genotoxic activity of titanium dioxide (TiO₂). To resolve the contradictory results, in this study, we investigated the genotoxic activity of commercial TiO₂ nanoparticles (NPs) and microparticles of different forms (anatase, rutile and mix of both). We evaluated micronucleus formation in stimulated lymphocytes, as well as DNA strand breaks and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), a mixed population of lymphocytes and monocytes. Different responses to TiO₂ exposure were obtained depending on the assay. Both TiO₂ NPs and microparticles and all the crystalline forms elicited a significant increase in 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and DNA strand breaks in the whole PBMC population, without a concurrent increase of micronuclei in proliferating lymphocytes. The distribution of DNA damage in PBMCs, detected by the comet assay, that measures DNA damage at level of single cells, indicated the presence of a more susceptible cell subpopulation. The measurement of side scatter signals by flow cytometry highlighted the preferential physical interaction of TiO₂ particles with monocytes that also displayed higher reactive oxygen species generation, providing a mechanistic explanation for the different responses observed in genotoxicity assays with PBMCs and lymphocytes. This study confirmed the suitability of human PBMCs

as multi-cell model to investigate NP-induced DNA damage, but suggested some caution in the use of stimulated lymphocytes for the assessment of NP clastogenicity.

<표> Andreoli 등(2018)의 논문에서 입자 크기별

TABLE 2 Percentage of tail DNA after treatment with TiO₂ anatase, rutile and mixture anatase/rutile

TiO ₂ μg ml ⁻¹	Nanoparticles			Microparticles	
	Anatase	Rutile	Mix	Anatase	Rutile
0	0.52 ± 0.12	0.44 ± 0.05	0.34 ± 0.01	0.73 ± 0.29	0.44 ± 0.05
10	1.14 ± 0.23	1.19 ± 0.19	1.30 ± 0.04	2.82 ± 2.03	0.74 ± 0.46
50	1.62 ± 0.47*	2.33 ± 0.68	2.51 ± 0.96**	3.16 ± 1.28	1.22 ± 0.54
100	2.01 ± 0.66**	2.62 ± 0.54*	4.44 ± 0.18**	2.18 ± 1.11	1.01 ± 0.41
200	1.54 ± 0.52**	3.48 ± 1.59*	4.45 ± 0.09**	3.80 ± 1.78*	1.83 ± 0.80*
H ₂ O ₂	28.79 ± 2.81**	29.80 ± 3.16**	27.16 ± 0.15**	29.55 ± 3.52**	29.80 ± 3.16**

Mean on >100 comets ± SD for each experimental point.

Results are from two independent experiments performed on two different donors.

*P < .05;

**P < .01 by ANOVA and LSD post hoc analysis.

나) ROS 생성에 대한 견해: <그림>은 Proquin 등(2017)이 E171, nano-sized 그리고 micro-sized 입자의 크기별 ROS 생성을 세포 유무에 따라 확인한 결과를 나타낸 것이다. 본 논문에서 E171은 ROS 생성을 통해 DNA 손상을 유도하는 능력을 가지고 있으며 식품에서 사용은 유해성 우려를 야기할 수 있다(The capacity of E171 to induce ROS formation and DNA damage raises concerns about potential adverse effects associated with E171 (TiO₂) in food)는 것으로 추론되었다. <그림>의 A)는 세포가 없이 단순한 배양액에서 1 mM 투여군에 각 입자 및 용량별 H₂O₂를 측정된 것이다. 용량 143 μg/cm₂ 및 H₂O₂가 존재 하 E171에 의해 ROS가 가장 많이 생성되었고 다음으로 nano-sized 입자 그리고 micro-sized 입자 순으로 생성되었다. 또한 nano-sized 입자는 용량 14.3 μg/cm₂에서는 대조군과 비교하여 ROS가 증가하였지만 143 μg/cm₂에서 증가하지 않았다. 이는 표준편차의 차이가 크기 때문이다. 따라서 이러한 점은 용량-상관성이 입증하지 못하였기 때문에 이산화티타늄 자체 그리고 입자 크기별 ROS 생성과의 연관성으로 결정하기에는 무리가 있다. <그림>의 B)는 대장암 유도 물질인 아족시메탄(AOM, Azoxymethane)를 추가하여 입자별 ROS 생성을 확인한 것이다. 입자 크기별 모든 군에서는 micro-sized 입자에서 0.143 μg/cm₂ 및 1.43 μg/cm₂ 등 용량에서 산발적으로 발생하여 이산화티타늄에 의한 ROS 생성과의 연관성에 대한 유의성은 없는 것으로 추정된다.

A) 세포없는 배양액에서 ROS 생성

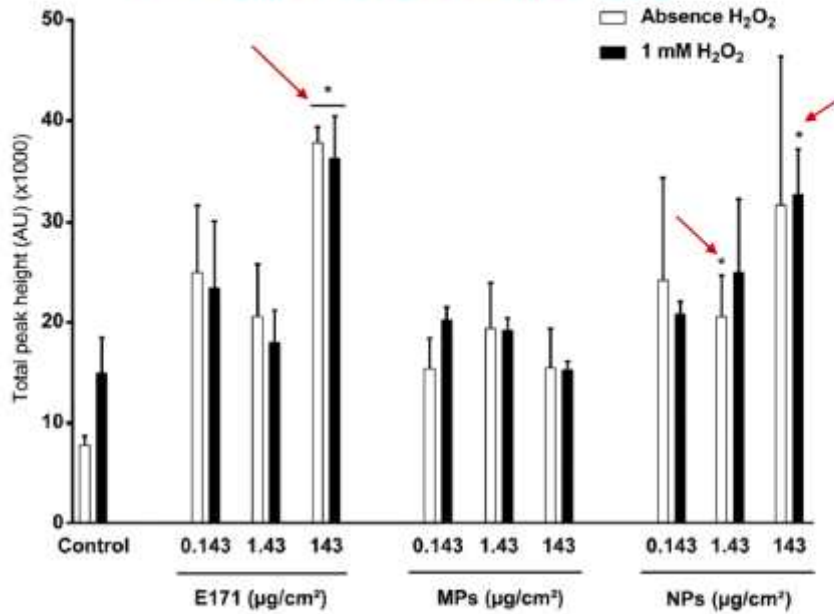


Figure 4. Intensity of cell-free radical formation with various concentrations E171, MPs and NPs in HBSS in the presence (1 mM) or absence of H₂O₂ shown on x-axis. The y-axis represents the average total peak height of obtained ESR spectra calculated per sample. Results include background levels. * $P < 0.05$; significant difference compared with the control (mean $\pm$ SE). No significant difference was found when the presence and absence of H₂O₂ were compared. Three independent experiments were performed.

B) (세포 및 AOM)의 배양액에서 ROS 생성

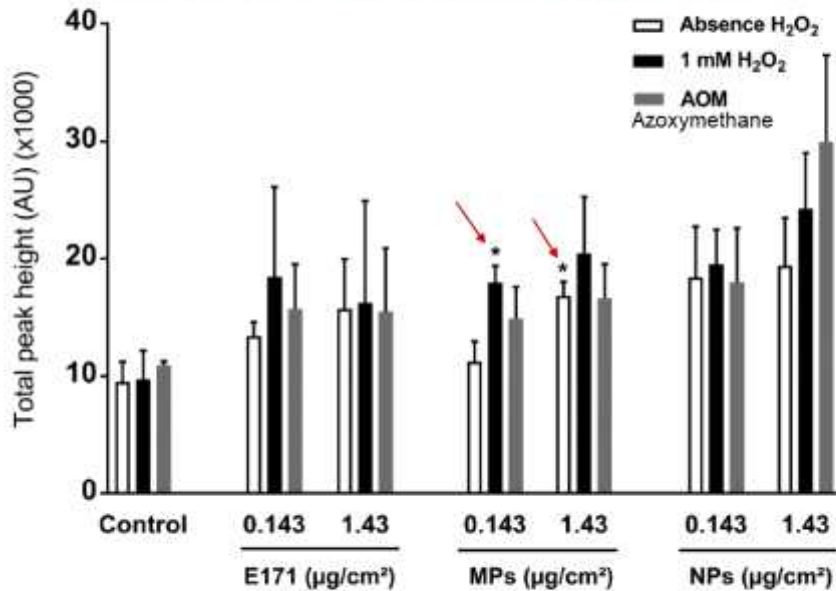


Figure 5. Intensity of cellular radical formation at non-cytotoxic concentrations E171, MPs and NPs in HBSS in cellular (Caco-2) co-exposed to 1 mM of H₂O₂ or 20 µg/mL AOM shown on x-axis. The y-axis represents the average total peak height of obtained ESR spectra calculated per sample. Significant difference compared with the control (* $P < 0.05$, mean $\pm$ SE). Three independent experiments were performed, each of them was performed in duplicate, $n = 12$.

7. 이산화티타늄 유전독성의 EFSA 요약과 이에 대한 정책의 방향성

- EFSA Panel은 2021년 이산화티타늄이 유전자 돌연변이를 유발하지 않지만 DNA 나선 절단(DNA strand breaks)과 염색체 손상(chromosomal damage)을 유도하는 잠재성을 가지고 있다고 결론을 내렸다. 또한 문헌을 통해 이산화티타늄에 의한 유전독성 특성 및 유전독성 작용기전(mode of action, MOA)에 대한 추정 및 결론을 다음과 같이 서술하였다(EFSA Panel, 2021).

1) 유전독성 MOA에 대한 EFSA 추정

- ① 결정형태, 입자의 크기와 모양, 응집 정도 등과 같은 이산화티타늄의 물리-화학적 특성과 유전독성시험의 종류인 in vivo 및 in vitro 사이에 연관성은 확실하지 않다.
- ② Nano-sized 입자의 이산화티타늄이 DNA가 존재하는 핵 그리고 미토콘드리아에 발견된다는 것은 확인되었지만, 30 nm 이하의 입자와 in vitro를 통해 흡수가 확인되었다(Jugan 등, 2012; Ahlinder 등, 2013; Shukla 등, 2013; Louro 등, 2014; Jain 등, 2017). 그러나 나노입자 아닌 E171 및 이산화티타늄 입자의 핵 내로의 내면화(internalisation)에 대해서는 불가능(Singh 등, 2007; Di Virgilio 등, 2010) 및 가능(Bettini 등, 2017) 등의 연구 결과가 공존한다.
- ③ DNA 손상을 유도하기 위해서는 DNA 구성하는 요소와 이산화티타늄이 공유결합(covalent binding)이 가능한 기전이 설명되어야 하는데 이에 대한 증명은 없다.
- ④ Nano-sized TiO_2 의 본질적 특성에 기인하여 직접적으로 유해활성산소 생성을 유도할 수 있다.
- ⑤ TiO_2 입자는 염증을 유도하여 유해활성산소 생성을 유도한다.
- ⑥ Nano-sized TiO_2 는 미토콘드리아 기능을 방해하여 유해활성산소를 생성한다.
- ⑦ DNA 수선 경로와 관련된 유전자 발현에 영향을 주는 유전자외적 변형(epigenetic modification)을 유도한다.
- ⑧ 분열시 염색체 분리(chromosome segregation) 및 방추사 장치 등과 관련된 단백질과 상호작용한다.

2) EFSA의 threshold MOA에 대한 견해와 정책의 방향성

- ① Threshold MOA: 반응을 나타내지 않는 대조군 경계점을 역치(threshold)이라고 하는데 일반적으로 용량-반응에 의한 직접적인 MOA의 인과관계가 성립할 때 역치 용량(threshold dose) 설정이 가능하다. 앞서 제시된 이산화티타늄 입자(TiO_2 particles)에 의한 유전독성 유발에서 각각 MOA의 잠재적 기여 정도는 알 수 있는 자료가 없다. 또한, 유전독성의 MOA가 이산화티타늄에 의한 DNA를 직접 손상하는 것이 아니고 유해활성산소 생성 및 효소 불활성 등 간접적인 기전에 의한 DNA 손상이기 때문에 역치 설정에 적절한 자료가 없다. 이와 같은 이유로 EFSA Panel은 식품첨가물 E171에 존재할지도 모르는 이산화티타늄 입자(TiO_2 particles)에 의한 유전독성 우려를 배제할 수 없다고 결론을 내렸다. 또한, 유전독성과 관련하여 이산화티타늄 입자(TiO_2 particles)의 크기를 컷오프 값(cut-off value)을 특정할 수도 없다(EFSA Panel, 2021)고 결론을 내렸다.

The relative contribution of the modes of action mentioned above to the genotoxicity elicited by TiO_2 particles is unknown and there is uncertainty on whether a threshold mode of action could be assumed. Even if it was assumed that all modes of action would be indirect, the available data would not allow identification of a threshold dose. Therefore, the Panel concluded that a concern for genotoxicity of TiO_2 particles that may be present in E 171 cannot be ruled out. A cut-off value for TiO_2 particle size with respect to genotoxicity could not be identified.

- ② 대응의 방향성: 직접적으로 DNA 손상 유발의 MOA를 가진 돌연변이원(mutagen) 뿐만 아니라 발암물질을 직접 유전독성 작용기전(direct MOA)을 가진 물질로 분류된다. 반면에 산화적 스트레스(oxidative stress) 유도를 통한 DNA 산화적 손상, 유전체 불안전성(genomic instability)을 유도하는 DNA 수선 시스템의 저해, 그리고 발암억제유전자(tumour suppressor genes)와 같은 복제조절 인자 불활성을 통한 세포분열의 조절기전 상실 등을 통한 DNA 손상을 간접적 유전독성 작용기전(indirect mode of genotoxic action)이라고 한다(Beyersmann 등, 2008; COM, 2010). 대부분의 돌연변이원성 메탈이온(예: arsenic, antimony, beryllium, cadmium, chromium, cobalt, lead, nickel and vanadium) indirect MOA이다. EFSA는 식품첨가물 E171의 유전독성에 대해 다음과 같은 결론을 통해 사용금지를 결정하였다.

1. 식품첨가물 E171 내의 이산화티타늄 입자가 유전자 돌연변이원(mutagen)은 아니지만, DNA 나선 절단 또는 염색체 손상을 유발하는 염색체 이상(aberration) 유발원(clastogen)의 유전독성 잠재성이 있다고 결론을 내렸다.

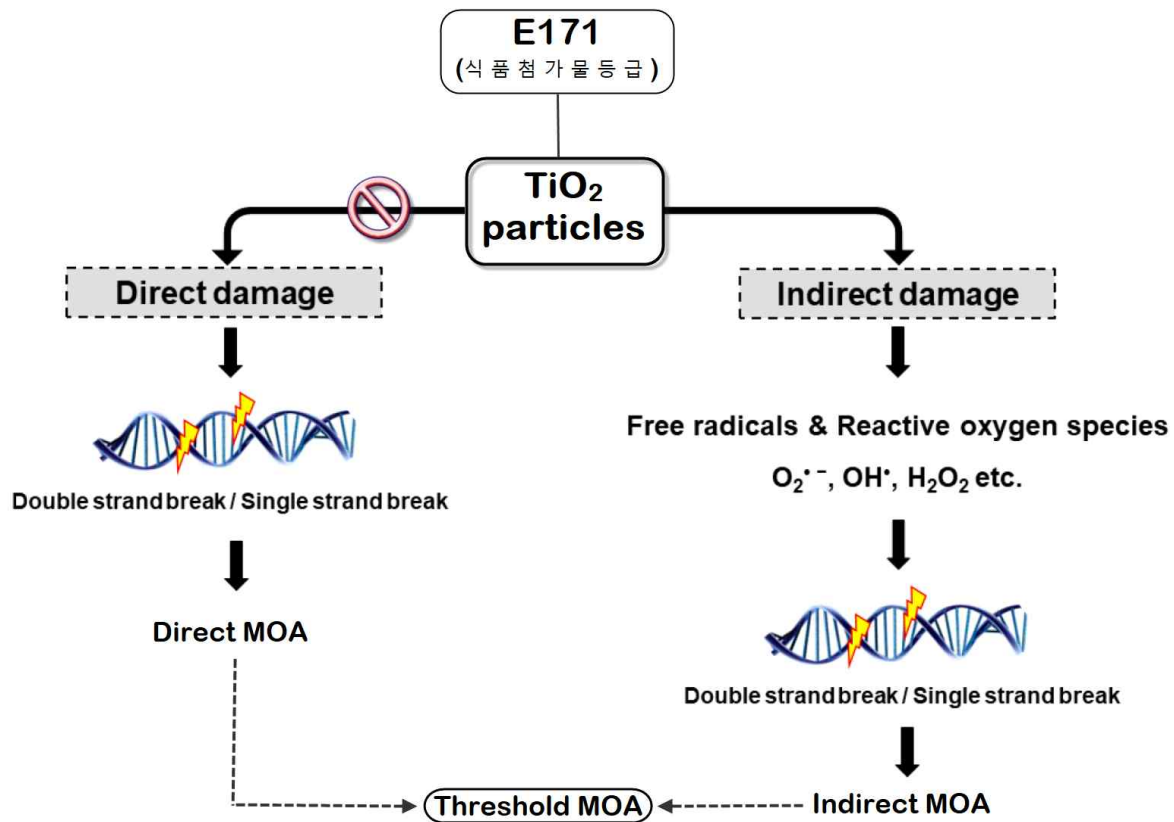
2. 이산화티타늄 입자에 의한 유전독성은 간접적 작용기전(indirect mode of action)에 의해 발생하며 그 기전이 명확하지 않고 자료도 부족하여 MOA에 따른 역치인 'threshold mode of action(작용기전 역치)도 불확실하다.

이와 같은 EFSA의 간접적인 작용기전과 자료 부족으로 인하여 이산화티타늄에 의한 threshold mode of action(작용기전 역치)가 불확실하다는 것은 이를 이용한 식품첨가물의 ADI(acceptable daily intake, 1일섭취안전용량) 설정이 어렵다는 것을 의미한다. 일반적으로 비유전독성물질에만 역치 용량만 존재한다. 그래서 유전독성 및 발암물질에 대해서는 단 하나의 물질에 의해 발생하는 돌연변이 및 DNA 손상이 발암을 유도할 수 있어 'zero threshold(제로 역치)'이라고 한다. 그러나 DNA 수선효소에 의한 손상된 DNA의 복구도 가능하다. 이와 같은 양면적인 측면에서 유전독성 물질에 대한 역치의 유무는 항상 논란이 되어 왔다(Fukushima 등, 2010). 그러나 최근에는 비유전독성물질뿐만 아니라 DNA의 복구도 가능하다는 전제 하에 유전독성물질뿐만 아니라 유전독성-유도 발암물질(genotoxic carcinogen) 자체에 대해서도 역치 존재에 대한 연구결과 및 방법도 제시되었다(Kakehashi 등, 2014; Nohmi 등, 2018). 실제로 유전독성에 대한 작용기전인 MOA를 통한 역치를 threshold MOA(threshold mode of action, 역치 MOA)이라고 하는데 이에 의한 threshold 접근법도 국가적 차원의 가이드스가 제시되고 있기도 하다(UKCOM. 2010 & 2018). 특히 Metruccio 등(2018)은 'Genotoxicity in risk assessment: is it time to use a threshold approach?'이라는 논문을 통해 유전독성물질에 대해서도 역치를 인정하고 이를 ADI 설정을 위한 위해성평가가 이루어져야 한다고 주장하고 있다. 따라서 E171 또는 이산화티타늄에 대한 기전을 알 수 없는 유전독성에 대한 간접적 MOA 이해와 더불어 threshold MOA에 대한 연구가 필수적이라고 할 수 있다.

usable biological explanation of a threshold dose for mutagenicity (most often for an

experimentally derived threshold dose)

따라서 이산화티타늄 입자 또는 식품첨가물 E171에 대한 MOA에 대한 결과와 더불어 threshold MOA를 통해 ADI 설정이 가능할 수 있다.



기전이와 같은 오래 전부터 돌연변이원에 대한 역치뿐만 아니라

The relative contribution of the modes of action mentioned above to the genotoxicity elicited by TiO₂ particles is unknown and there is uncertainty on whether a **threshold mode of action** could be assumed.

(COM. 2018).

Thresholds for in-vivo mutagens Definitions. A number of definitions are used in this document and in the published literature regarding thresholds for in vivo mutagens.(Kirsch-Volders et al., 2009) .

True Threshold: A point in the dose response relationship for mutagenicity where a slope of zero changes into a slope of greater than zero.

Threshold dose: The actual dose below which there is no increase in effect over the background level. (Severe practical issues make the unequivocal experimental identification of the threshold dose difficult and a practical threshold is often derived.)

Practical Threshold: The point where the experimentally derived dose response relationship first exceeds the background variability in a suitably designed well conducted study.

Threshold: The threshold dose (most often an experimentally derived practical threshold dose) for a substance where there is also appropriate supporting evidence to conclude that a threshold mode of action occurs. A Biologically meaningful threshold dose can be used in subsequent hazard/risk assessment evaluations.

True Threshold

Threshold mode of action. The plausible biological explanation of a threshold dose for mutagenicity (most often for an experimentally derived threshold dose).

Threshold mode of action Practical Threshold Threshold dose True Threshold

이에 threshold mode of action을 이용한 식품첨가물의 ADI(acceptable daily intake, 1일섭취안전용량) 설정이 어렵다.

Conventional approaches to assessing the risk of chemicals which are toxic /non-genotoxic are generally based on establishing a non-toxic level in in vivostudies (the reference dose (RfD), derived from the point of departure (POD) and applying uncertainty factors to estimate an exposure which represents a Healthbased Guidance Value (HBGV) such as a maximum acceptable daily intake (ADI)) (IPCS 2009). In general, for genotoxic carcinogens, the view is that there is no threshold. A margin of exposure (MOE) approach based on a POD derived from a carcinogenicity study can be utilised for carcinogens that are genotoxic and for which there is unavoidable exposure (EFSA 2005; Barlow et al 2006; Benford et al 2010; COC 2012). Currently, there is considerable interest in the development and evaluation of methodologies which would

enable the analysis of genotoxicity doseresponse data to be carried out in a quantitative manner.3) Modification of the traditional [yes/no] approach to genotoxicity is a substantial departure from current practices. Development of a strategy based more on quantitative analyses would require extensive evaluations of the dose response methodologies employed and a more detailed understanding of the relationship of the genotoxicity endpoint to a human health effect, before it would be possible to

8. 제외국의 EFSA 평가 결과에 대한 의견 분석

EFSA dioxide titanium FSA BfR

라. 제외국의 EFSA 평가 결과에 대한 의견 분석

- 현재까지 발표된 제외국의 EFSA의 평가결과에 대한 입장의 타당성 분석
 - 대상 국가 : 영국(FSA), 독일(BfR), 호주/뉴질랜드(FSANZ), 일본(후생노동성) 등
 - EFSA의 평가결과와 다른 입장을 주장하는 부분에 대하여 과학적 근거 분석 및 타당성 평가
- 추가적으로 발표되는 내용에 대하여 지속적으로 모니터링하고 업데이트 실시
 - 과제 종료 1개월 전까지 발표되는 내용에 한하여 자료 수집

5. 주요 연구 내용

- 국내외 이산화티타늄에 대한 안전성 자료 조사·분석
 - 유럽식품안전청(EFSA)의 평가자료를 포함하여, 최근 발표된 이산화티타늄에 대한 안전성 정보 조사
 - 독성 연구결과의 타당성 및 결과의 차이점 등 비교·분석
- 식품첨가물 이산화티타늄에 대한 위해평가 및 관리방안 도출
 - 최근 발표논문 등을 근거로 EFSA의 평가결과에 대한 타당성 분석
 - 유럽의 이산화티타늄 사용금지 및 EFSA 평가에 대한 제외국 의견 분석
 - 식품첨가물로서 사용되는 이산화티타늄의 안전성에 대한 종합 평가
 - 안정성 평가 결과에 따른 식품첨가물로서 관리방안 도출

○ 연구결과에 대한 전문가 자문

- 내부 및 외부 독성 전문가를 중심으로 총 7인으로 자문단 구성
- 이산화티타늄 평가결과 및 관리방안 등 연구결과에 대한 자문 실시

6. 정책연구의 추진전략·방법 및 추진체계

1) 추진 전략 및 방법

가. 국내외 이산화티타늄에 대한 안전성 자료 조사

- 이산화티타늄을 식품첨가물로서 더 이상 안전하지 않다는 의견 제시한 EFSA의 논문 <EFSA Panel on Food Additives and Flavoring et al., Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive.” EFSA Journal. 2021;19(5):6585>은 EFSA 홈페이지로부터 확보한다.
- 비교 및 분석을 위한 자료는 아래의 웹사이트를 이용하여 확보한다. 특히 세계 각국 및 국제기구의 규제 가이드라인 비교를 위해서는 야후 및 구글의 웹사이트 가 필수적이다. 또한 EFSA가 평가 대상으로 한 2019년 이후에 발표된 최신 연구결과를 중심으로 검색하여 자료를 확보한다.

<표> 조사 대상 웹사이트의 특성

웹 사이트	특성
국회도서관 (https://www.nanet.go.kr/main.do)	한국학술정보, KISTI, KERIS, 한국연구재단, 국립중앙도서관, WEB DB 등 학술·정보 기관들과 연계하여 각 기관에서 제공하는 정보를 통합검색이 가능한 웹 사이트
사이언스 다이렉트 (https://www.sciencedirect.com/)	대규모 과학 및 의학 연구 데이터베이스에 대한 구독 기반 액세스를 제공하는 웹 사이트
야후 (https://us.yahoo.com/) 및 구글(https://www.google.co.kr/)	세계 각국 및 국제기구의 규제 가이드라인 및 독성 및 식품-관련 다양한 논문 및 보고서 검색이 가능한 사이트

- 식약처와 협의하여 이산화티타늄 관련 자체 연구사업 등 결과를 수집하여 이산화티타늄 특성 파악을 위한 자료를 확보한다.
- 미국 FDA, 영국 FSA, 호주/뉴질랜드 FSANS 등 제외국 식품 관련 안전성 평가 국가기관에서의 이산화티타늄 관련 의견 발표 여부를 정기적으로 점검한다.

나. 수집된 연구결과의 타당성 검토 및 비교·분석

- 연구결과의 타당성 검토할 사항
 - 수행된 독성 연구방법이 OECD 가이드라인에 등재된 방법으로 수행되었는지 여부
 - 통상적으로 식품첨가물로서 식품에 사용할 수 있는 농도범위 보다 과도하게 사용되었는지 여부
 - 섭취방법이 경구에 의한 것인지 여부
- 연구결과의 비교·분석 방안
 - 이산화티타늄의 일반 독성 발생 여부 등 분석
 - 유전독성 결과 음성/양성으로 구분하고 양성이 발생하는 원인 분석
 - 이산화티타늄의 유전독성 발생 메카니즘 추정
 - 인간 섭취에 따른 독성발생 여부 등 역학(epidemiology)조사의 결과 확인 및 분석

다. EFSA 평가 결과의 타당성 분석

- 앞 단계에서 조사·분석한 최근 논문, 식약처 연구결과 등을 바탕으로 EFSA의 평가 결과의 타당성을 항목별로 분석한다.
 - 식품첨가물의 관점에서 EFSA의 평가에 사용된 논문 및 평가결과를 분석

- 필요한 경우, 입자 크기의 영향 등 나노입자와 관련된 사항에 대해서도 분석
- * 단, 실제 이산화티타늄 중 나노입자의 함유 비율, 식품에 사용시 존재 형태 등 식품첨가물로서 사용과 연계하여 종합적으로 분석

< 이산화티타늄 중 나노입자 관련 내용 >

- 나노화의 문제점
 - 이산화티타늄이 식품에서 나노 입자 형태로 점점 더 많이 발견된다는 것이다.
 - 나노(nano)는 사전적으로 10억분의 $1(10^{-9})$ 을 의미하며, 1나노미터(nm)는 10억분의 1미터에 해당된다.
 - 독일환경 및 자연보호연합(BUND)에 따르면, 이 작은 입자는 다른 물질과 훨씬 더 빠르게 반응하고, 수용성이며, 크기가 작기 때문에 신체의 장 내벽, 폐포 또는 세포 핵막을 통과할 수 있다고 한다. 즉, 이는 나노 입자로 쉽게 피부를 통과해 뇌 안의 독성 효과를 유발하고 신경 손상을 초래할 수도 있으며, 더 나아가 발암 물질이 될 수도 있다.
 - 독일의 BUND는 음식을 통해 섭취되는 이산화티타늄 및 기타 나노물질이 예를 들어 위장관에서 염증 반응을 일으킬 수 있다고 오랫동안 지적되어 있음.
- 일부 연구에서는 이산화티타늄의 안전성과 기능은 생산 과정에서 입자 직경(diameter)의 크기와 연관성이 있다고 발표하고 있다(Peters 등, 2014).
 - 이산화티타늄의 안전성과 기능에 대한 입자의 역치(threshold)는 100 nm이며, 이하의 크기를 가진 이산화티타늄의 나노입자(nano particles)로 불리고 있다.
 - 따라서 Food-grade 이산화티타늄은 100 nm의 함유 비율이 10% 이하로 추정되고 있다.

라. 제외국의 EFSA 평가 결과에 대한 의견 분석

- 현재까지 발표된 제외국의 EFSA의 평가결과에 대한 입장의 타당성 분석
 - 대상 국가 : 영국(FSA), 독일(BfR), 호주/뉴질랜드(FSANZ), 일본(후생노동성) 등
 - EFSA의 평가결과와 다른 입장을 주장하는 부분에 대하여 과학적 근거 분석 및 타당성 평가
- 추가적으로 발표되는 내용에 대하여 지속적으로 모니터링하고 업데이트 실시
 - 과제 종료 1개월 전까지 발표되는 내용에 한하여 자료 수집

마. 이산화티타늄의 안전성에 대한 종합적 평가

- 앞 단계에서 조사, 비교, 분석한 결과를 근거로 이산화티타늄의 독성 등 안전성에 대하여 종합적으로 평가
 - EFSA의 안전성 평가 결과의 타당성 중심으로 진행
- 종합적 평가를 위한 활용 자료
 - 최신 독성 연구자료, 제외국 평가결과, 비교·분석 자료, 식품첨가물로서 사용량 등
- 이산화티타늄을 식품첨가물로서 사용할 경우에 대한 유전독성 등 안전성 결론 도출

바. 이산화티타늄의 관리방안 도출

- 이산화티타늄의 안전성 평가 결과를 고려하여, 식약처 담당부서와 협의하여 식품첨가물로서 이산화티타늄 관리방안 논의
- 주요 고려사항
 - 식품 제조시 이산화티타늄을 사용 필요성
 - * 주로 흰색을 나타내는 색소로 사용되며, 건강기능식품에서는 빛 투과를 막아 내용물의 변질방지 역할을 함
 - 현재의 사용기준 유지 및 변경 여부(변경이 필요한 경우, 사용 대상 식품 제한 여부, 최대 사용량 설정의 필요성 등 고려)
 - 유럽연합을 제외한 제외국 사용기준 변경 현황

마. 연구결과에 대한 전문가 자문

- 자문단(peer reviewer) 전단계를 검토하는 자문단은 내부 3명 그리고 외부 4명으로 독성 및 규제와 관련된 전문가로 구성한다.
 - 전문성의 기준은 관련된 분야에서 최소한 10년 이상의 경험을 가진 대학교수, CRO 기관의 독성전문가, 독성 및 인허가 컨설팅 전문가이며 다음과 같다.

연구책임자 및 자문단		소속	전화번호 & 이메일 주소	전문 분야 및 경력 기간
내부	박영철 (연구책임자)	(주)켄온	010-5502-3388 ycpark@chemon.co.kr	독성학, 32년
	송시환	(주)켄온	010-2307-1571	독성 및 규제 분야 35년

			swsong@chemon.co.kr	
	이현걸	(주)켄온	010-3466-4537 leehk@chemo.co.kr	유전독성 및 일반독성, 34년
외부	김길수	대구경북첨단의료산업 진흥재단. 전임상센터 장	010-9007-0683 kskim728@knu.ac.kr	수의독성학, 수의약리학 (1991~현재)
	송창우	안전성평가연구소 전북분소 중개독성연 구부	010-8820-7394 cwsong@kitox.re.kr	독성학, 실험동물학 (흡입독 성, 독성유전체학, 질환모델) 총 33년
	신희준	안전성평가솔루션(주)	010-6612-3020 toxoid@safety-as.com	화학물질 & 화학제품 규제 및 유*위해성 평가 (경력 13 년)
	정상희	호서대학교 임상병리학과	010-3394-5224 jeongsh@hhoseo.edu	화학물질의 독성평가 및 인체위해성 평가 해당분야 32년 경력

○ 자문 추진 방법

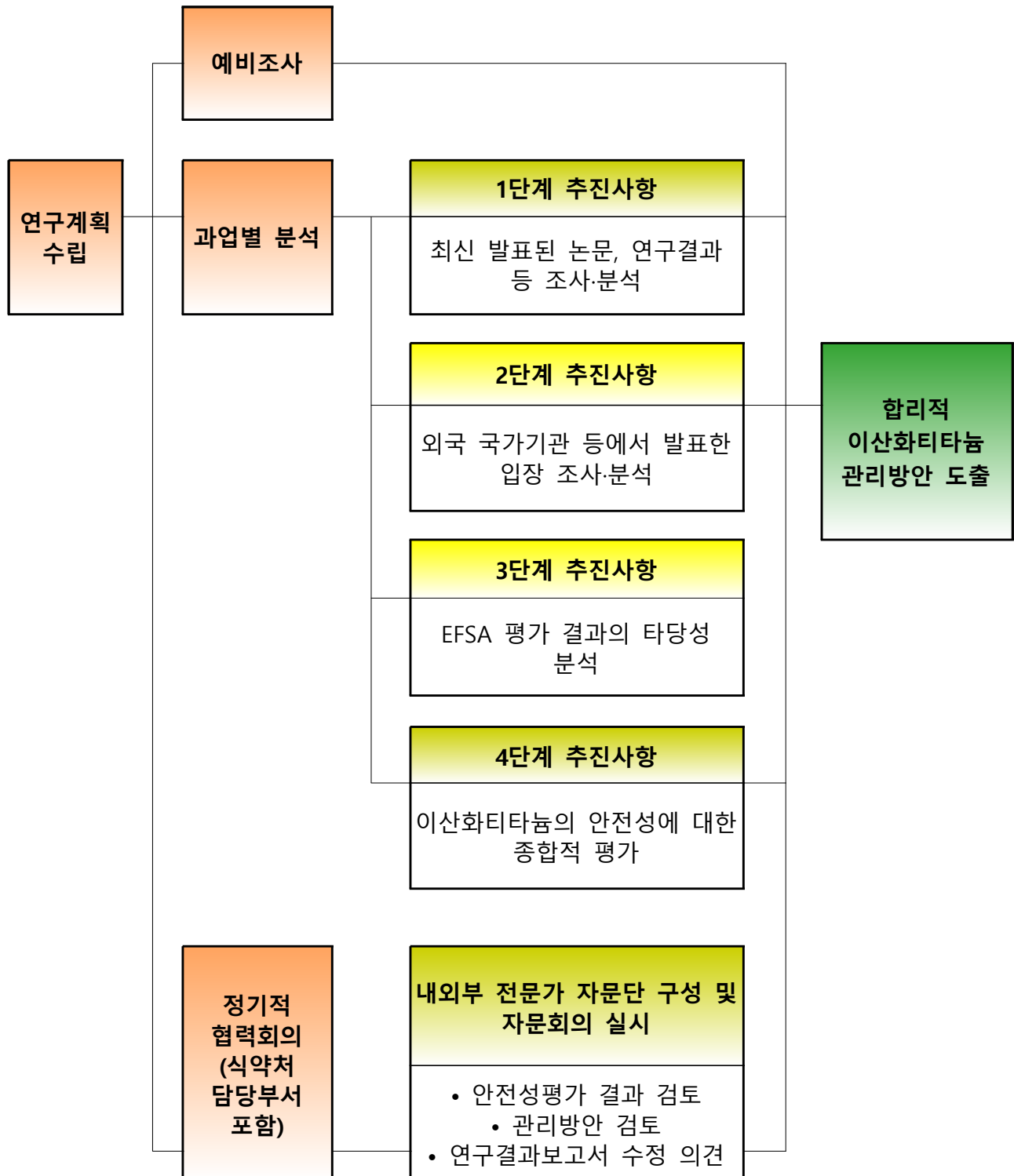
- 이산화티타늄에 대한 안전성 평가, 관리방안 등이 도출되면, 보고서(안)을 작성
하고, 이를 제공하여 검토 후 의견을 제출
- 대면회의 2회 실시 : ① 연구의 취지 등을 소개하기 위하여 사전 회의
② 연구결과를 설명하기 위한 본회의

○ 주요 자문 내용

- 여러 논문 등으로부터 도출된 이산화티타늄 안전성 평가 결과의 타당성
- 연구결과 도출과정의 객관성
- 도출된 이산화티타늄 관리방안의 타당성
- 추가적으로 검토가 필요한 이산화티타늄 관련 연구 결과 유무

2) 추진 체계

- 정책개발 목표 달성을 위하여 연구개발내용에 대한 기술적 측면에서의 추진체계를 도식적으로 다음과 같이 표현할 수 있다.



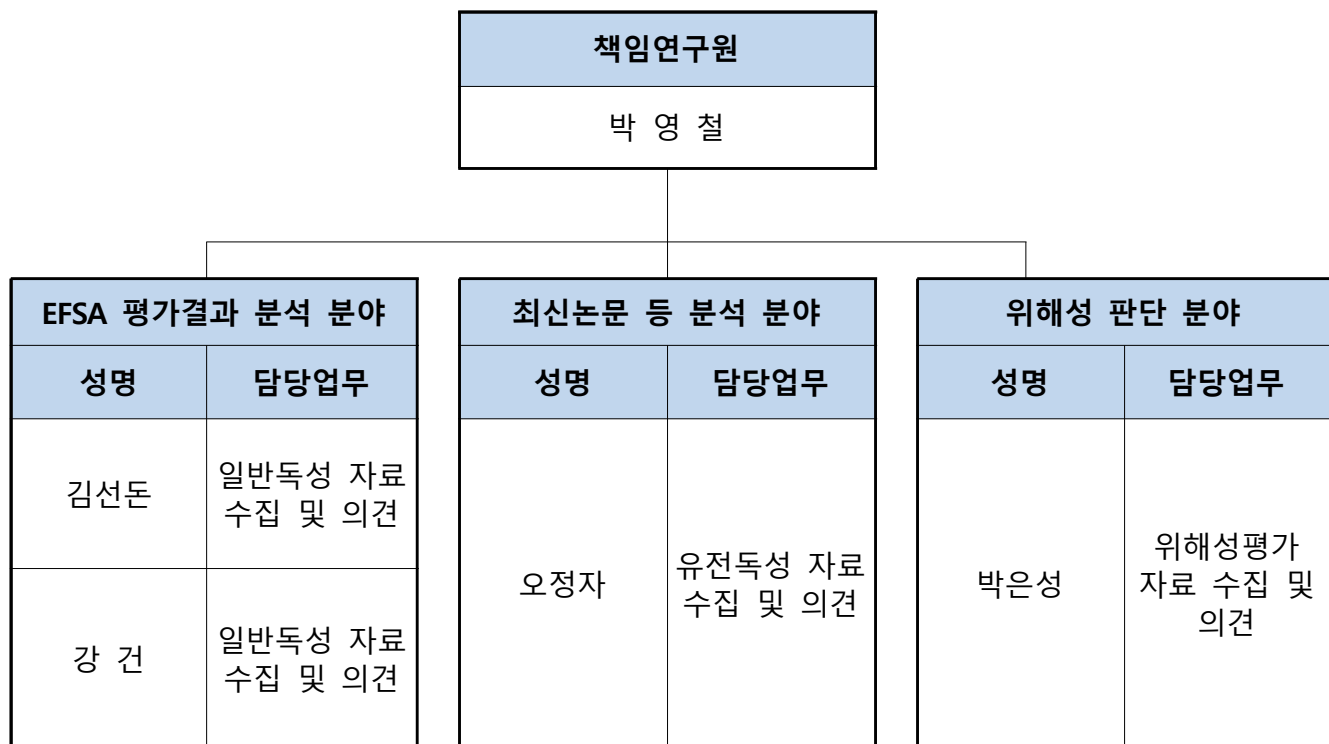
7. 내용별 추진일정

세부연구내용	기간	일정(3개월간)		
		M	M+1	M+2
○ 자료 및 분석에 대한 보고서(안) 1차 완료: 단계별 각 2주간 소요				
제1단계: EFSA 보고서에서 문제되는 독성 및 입자의 크기에 대한 분석				
제2단계: EFSA 보고서에 제시한 문제점과 관련된 독성시험 가이드라인의 적절성과 해석에 대한 점검. EFSA의 논문 이후 발표된 자료 대한에 검토				
제3단계: 입자의 크기, 독성시험의 NOAEL, 유전독성 유무, ADI 등을 고려한 유해성 및 위해성에 대한 종합적인 판단				
○ 자문단 검토: 보고서 초안에 대한 자문단의 의견 및 반영				
○ 최종보고서 작성 및 제출: Risk assessment 기반 최종보고서 제출				
연구진도(%)		70%	30%	100%

8. 연구 수행 조직 및 인력

1) 수행 조직도

※ 그리고 박은성 팀장님이 보내주신 예산산출내역서 상에서는 책임연구원급으로 3명의 인건비가 책정되어 있습니다. 사업계획서 상의 참여인력과 차이가 있어서 이 부분도 확인하여 맞춰 주셔야 할 것 같습니다. 확인하여 저에게 알려주십시오.



2) 참여인력 구성표

- 책임연구원을 비롯하여 참여연구원은 (주)캠온 단계별 전문가로 구성하며 기본적으로 박사학위 소지자로 한다.

구분	성 명	주민등록번호 (앞번호만기재)	소속기관	부 서	직 위	최종 학위	전 공	인건비 지급	참여율 (%)	참여 단계
책임연구원 및 참여연구원	박영철	610515	캠온	컨설팅 본부	센터장	박사	독성학			전단 계
	김선돈									1단계
	강건									1단계
	오정자									2단계
	박은성									3단계

9. 주관연구책임자 인적사항 및 연구 실적

성명	(한글) 박영철	주민등록번호		
	(한자) 朴英澈	610515-1804339		
	(영문) Yeong-Chul Park			
직장 및 직책	경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240. (주)켄온 컨설팅본부 센터장			
주소	경북 경산시 백자로 10-11 612동 203호			
E-mail	ycpark@chemon.co.kr		전화	(사무실) 031-526-9345 (핸드폰) 010-5502-3388
학 력	기 간		학 교 명	
	1980년3월2일 - 1987년2월10일		영남대학교 이과대학 생물학과(이학사)	
	1987년3월2일 - 1989년2월20일		서울대학교 보건대학원 (보건학석사, 역학전공)	
	1990년1월4일 - 1994년2월10일		미국 Oregon state university (전공: 독성학박사, 부전공: 보건학)	
경력	1994년 4월 - 1999년 8월		서울대학교 의과대학 및 인구의학연구소 선임 및 특별연구원	
	2003년 7월 - 2020년 2월		대구가톨릭대학교 GLP센터 센터장, 화학물질독성평가학과 학과장, 독성학과 학과장	
	2020년 4월 - 현재		(주) 켄온 컨설팅센터 센터장	

<컨설팅 보고서-저서-논문 경력>

■ 독성-관련 컨설팅 계약 및 수행 연구보고서

순번	의뢰자	내용	연도	비고
1	아그로카네쇼코리아	Chlorpyrifos에 대한 위해성평가 및 대응자료개발	2020년 10월	완료
2	호미영농	파비플로라 생물의 독성학적 동질성에 관한 컨설팅	2020년 11월	완료
3	더몰론 코리아	코팅제 및 기타 코팅제관련 원자재 독성컨설팅	2021년 1월	완료
4	한국코러스	코라스타(PEG-GCSF)의 바이오시밀러로의 개발을 위한 대조약과의 독성시험에 있어서 비교 동등성(Comparative Biosimilarity)에 대한 연구보고서	2021년 2월	완료
5	동의대학교	독성시험을 위한 용량결정 컨설팅	2021년 1월	완료

6	에스앤디	사철쭉 유전독성에 대한 컨설팅	2021년 1월	완료
7	(주) 바이오매트릭스 테크놀러지	COVID-19바이러스 감염증 치료제 개발 관련 컨설팅	2021년 8월	완료
8	유바이오로직스	NDA 비임상시험 분야 작성 보고서 컨 설팅	2021년 12월	완료
9	대봉엘에스	에피나코나졸 DDI관련 컨설팅	2022년 1월	진행
10	더올론 코리아	코팅제 및 기타 코팅제관련 원자재 독 성컨설팅의 연간 계약	2022년 1월 2022년 12월	진행

■ 저서

① 단독저서

2010년: 박영철. 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

2011년: 박영철 금연보건학개론. 이담 Books, ISBN: 978-89-268-1916-6

2019년: 박영철 위해성평가를 위한 독성학. ISBN: 978-89-268-9827-7

② 2인공저

2012년: 이선동, 박영철. 한약독성학 I. 한국학술정보(주). ISBN 978-89-268-3190-8.

2013년: 이선동, 박영철. 한약독성학 II. 한국학술정보(주). 2013. ISBN. 978-89-268-4190-7

2017년 박영철, 이선동. 한약독성학 III, 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-8070-8

■ SCI-논문

1. Kim H, S. Chae, S. Lee, **Y. Park**, B. Chramy, W. Klein, G. Kraft, and S. Hong, Selective Neuronal Degeneration Induced by Soluble Oligomeric Amyloid β -Protein (A β). The FASEB Journal. 17, 118-120, 2003

2. Hyoungh-Ah Kim, Eun-Mi Kim, **Yeong-Chul Park**, Ji-Yeon Yu, Seung-Kwon Hong, Seong-Hoon Jeon, Kui-Lea Park, Sook-Jin Hur, Yong Heo, Immunotoxicological effects of agent orange exposure to the vietnam war korean veterans. Industrial Health. 41-2, 158-166. 2003.

3. Hyeon-Jin Kim, Jeong-Hak Kim, Soo-Cheon Chae, **Yeong-Chul Park**, Keun-Sang Kwon, Seong-Tshool Hong, Souble oligomeric A-beta disrupts the protein kinase C signaling pathway, *Neuroreport*, 15-3, 503-507, 2004

4. **Yeong-Chul Park**, Jong-Bong Kim, Yong H대, Dong-Cheol Park, In-Sun Lee, Hai-Won Chung, Jung-Ho Han, Woon-Gye Chung, S.C. Vendeland, Philip D. Whanger, Metabolism of subtoxic level of selenite by double-perfused small intestine in rats, *Biological trace element research*, 98, 143-157, 2004

5. Eun-Hee Jang, **Yeong-Chul Park**, Woon-Gye Chung, Effects of dietary supplements on induction and inhibition of cytochrome P450s protein expression in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1749-1756, 2004

6. Jin Sik Kim, Yang Jee Kim, Tae Yon Kim, Joo Yong Song, Yoon Hee Cho, **Yeong-Chul Park**, and Hai Won Chung. Association of ALDH2 Polymorphism with Sensitivity to Acetaldehyde-Induced Micronuclei and Facial Flushing after Alcohol Intake, *Toxicology*. 2005;210(2-3):169-74.

7. Seung-Duk Ryu; Chang-Shin Park; Sung-Yeoun Hwang; **Yeong-Chul Park**; Woon-Gye Chung. Spasmogenic activity and acute toxicity of Yumijangquebo, a herbal laxative formulation. *Journal of ethnopharmacology* 2005;101(1-3):197-203.

8. **Yeong-Chul Park** and Myung-Haing Cho, A new way in deciding NOAEL based on the findings from GLP-based Toxicity Test, *Toxicological Research*, 2011, 27(3): 133-135.

9. Joungh-Hyun Park, **Yeong-Chul Park**, Heon Lee, Geun-Yong Lee, Hye-Ran Kim, Young-Woo Kim, Mihyang Kim, and Yang-Bong Lee. Safety Evaluation of Refined Cuttlefish (*Todarodes pacificus*) Oil. *Food Sci. Biotechnol.* 2011;20(4): 905-912.

10. **Yeong-Chul Park**, Sundong Lee and Myung-Haing Cho. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? *Toxicol. Res.* 30(3): 179-184 (2014)

11. **Yeong-Chul Park**, Min Hee Kim, Jung Woo Kim et al., Genotoxicity Study of Polysaccharide Fraction from *Astragalus membranaceus*'s Aerial Parts. *Toxicol. Res.* 30(2): 1-8 (2014).

12. Ilyoung Ahn, Tae-Sung Kim, Eun-Sun Jung, Jung-Sun Yi, Won-Hee Jang, Kyoung-Mi Jung, Miyoung Park, Mi-Sook Jung, Eun-Young Jeon, Kyeong-uk Yeo, Ji-Hoon Jo, Jung-Eun Park, Chang-Yul Kim, **Yeong-Chul Park**, Won-Keun Seong, Ai-Young Lee, Young Jin Chun, Tae Cheon Jeong, Eui Bae Jeung, Kyung-Min Lim, SeungJin Bae, Soojung Sohn, Yong Heo. Performance standard-based validation study for local lymph node assay: 5-bromo-2-deoxyuridine-flow cytometry method. Regulatory Toxicology and Pharmacology 80 183e194 (2016)

13. 90-Day repeated oral toxicity test of D-allulose produced from *Microbacteriumfoliorum*. MinJi An, JiSun Lee, **Yeong-Chul Park**, ChongJin Park, Hye-Jung Kim.

■ 한국연구재단 등재 및 등재후보 학술지

○ 2004년

박영철, 세포 노화에 있어서 복제 세네센스 현상과 산화적 스트레스의 영향, 한국독성학회지. 2004:19(3):161-172

○ 2005년

김영옥, 김광호, 박현지, **박영철**, 박성욱, 허용, 마우스를 이용한 송화분 섭취의 면역원성 및 안전성 탐색, 2005, Journal of Toxicology and Public Health, Korea, 21:3

○ 2006년

Yeong-Chul Park, Sundong Lee, Haemo Park, Jongbong Kim Urine and hair metal concentrations in subjects with long term intake of herbal medicine, 2006, Journal of Toxicology and Public Health, Korea, 22:1, 47-54

Yeong-Chul Park, HM Park, SG Ko, SD Lee, HD Park, An Exploratory study comparing blood metal concentrations between stroke and non stroke patients in koreans, Kor. J. Env. Hlth. 32-3: 1999-206 (2006).

Yeong-Chul Park, YD Ko, JH Han MK Kim, Effects of estrogen, aging and oxidative stress on bone remodelling in a view of molecular mechanisms. J.Toxicol. Pub. Health 22-3: 253-266 (2006)

○ 2007년

박영철, 김민희, 김종봉. 혈청호모시스테인 농도와 호모시스테인 유도성-세포 세네센스에 대한 표고버섯분말의 영향. J. Toxicol. Pub. Health. 23(4), 331-319 (2007).

박영철, 신헌태, 박해모, 이선동. 엽산투여에 의한 니코틴-유도 혈장 homocysteine 농도에 대한 영향과 금단증상 완화를 위한 한의학적 처방에 대한 고찰. 대한예방한의학회지, 11(1), 45-53 (2007)

이순이, **박영철**, 김종봉. STZ 및 고지방식이에 의해 유도된 흰쥐의 고혈당 및 고지혈에 대한 함박잎새버섯분말의 효능. 생명과학지, 17(10), 1387-1393 (2007).

이순이, 이창윤, **박영철**, 김종봉. 당뇨유발 흰쥐에 있어서 산화적 스트레스에 대한 함박잎새버섯의 효과. 생명과학지. 17(11), 11571-1575 (2007).

○ 2008년

박영철, 김종봉, 이선동. 한약재의 대사 및 독성의 기전과 예방. 대한예방한의학회지, 12(1), 73-87 (2008)

○ 2009년

박영철, 이선동. “Cross-sectional Study for Blood Metal Concentration in Subjects with Herbal Medicine Intake” 대한예방한의학회지, 2009 ; 13(1) : 93-103

○ 2010년

Yeong-chul Park, Myung-dong Kim, Sung kyun Park, Hyundo Kim and Sundong Lee, Comparison of heavy metal concentrations in hairs of a small sample of Korean patients taking traditional herbal medicine. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine 2010 10(3), 141-149

Yeong-Chul Park, Mi-Sook Yoon, Jong-Bong Kim Absorption and Distribution for Subtoxic Level of Selenite by Vascularly Perfused Small Intestine in Rats. 생명과학회지 2010:20(2):169-175.

○ 2011년

박영철, 김명동, 이선동, **한약의 약물상호작용 기전과 연구방향**, 대한예방한의학회지, 2011, 15(1): 1-16.

박영철, 이기용, 백낙민, 손혜영, 국윤범, 이선동, **속지황(Rehmannia glutinosa)의 약리작용과 독성**, 대한한의약방제학회지, 2011, 19(1):145-160.

박영철, 박해모, 이선동, 독성학적 측면에서의 한약에 의한 간독성 유발과 기전, 대한 한의학회지, 2011, 32(4):48-67

박영철, 신헌태, 이선동, 한약의 독물동태학적 특성, 대한예방한의학회, 2011, 15(2): 1-19.

박영철 · 윤미숙. 흡연에 의한 발암에 있어서 독성학적 기전 - 왜 흡연은 암의 가장 강력한 위험요인으로 작용하는가? 대한금연학회지 JKSRNT 2011;2(1):8-22

○ 2012년

박영철, 임정대, 김종봉, 이선동. 홍삼의 약리와 독성 기전에 대한 고찰. J Korean Oriental Med 2012;33(3):203-233.

박영철, 임정대, 박용기, 윤미숙, 이선동. 동물모델에서 cytokine 조율을 통한 한약의 항아토피피부염 효능과 임상적 응용. Kor. J. Herbology 2012;27(4):33-43.

박영철, 박용기, 이선동. 한약의 다양한 항암기전. Kor. J. Herbology 2012;27(3):39-55.

박영철, 김종봉, 국윤범, 이선동. 육미지황탕(환)의 약리와 독성에 대한 문헌고찰. The korean journal of oriental medical prescription, 2012;20(1):13-24.

○ 2013년

박영철. 이선동. 한약의 안전성 등급화를 위한 evidence-based approach: Human equivalent dose-based the margin of safety. 대한예방한의학회지. 2013;17(3):1-12

강석용, 박영철, 박용기, 알러지성 비염 한약제제 KOB의 랫드에서의 13주 반복 경구투여에 의한 독성 연구 Kor. J. Herbology 2013 ; 28(1) : 15-21

박영철. 이지선, 김동윤, 손혜영, 이정우, 최유순, 김광기, 유창연, 정일민, 임무혁, 이경재, 최리나, 심훈섭, 임정대. 랫드를 이용한 황기의 지상부 추출물에 대한 90일 반복경구투여 독성시험. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2013;21(6):474-485.

○ 2014년

박영철, 이선동. 한약의 안전성 등급화를 통한 근거중심실용의학적 연구(1). - Aristolochic acid 함유 한약재를 중심으로 - J Korean Med. 35(1):114-123 (2014)

(국제)**Yeong-Chul Park**, Min Hee Kim, Jung Woo Kim, Jong-Bong Kim, Jae Geun Lee, Chang Yeon Yu, Seung-Hyun Kim, Ill Min Chung, Jae Kwang Kim, Ri Na Choi and Jung Dae Lim. Genotoxicity Study of Polysaccharide Fraction from Astragalus membranaceus's Aerial Parts. Toxicol. Res. 30(2):1-8. (2014)

(국제)**Yeong-Chul Park**, Sundong Lee and Myung-Haing Cho. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a “Central Dogma” for Toxic Mechanisms?. Toxicol. Res. 30(3): 179-184 (2014)

최리나, **박영철**, 이지선, 김정우, 김종봉 등. 황기 지상부로부터 장관면역 활성 다당체의 분리 및 단회 경구 투여 독성시험. Korean J. Medicinal Crop Sci.) 22(4) : 276 - 288 (2014)

이종숙·이지선·**박영철**·최선미·이상훈. 초오 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 28일 반복 경구투여독성시험. 약학회지. 58(1):62~70. (2014)

<2015년>

박영철·이선동. 독성대사체를 생성하는 다빈도사용 한약재의 안전성등급화 - 천궁, 당귀, 감초, 숙지황을 중심으로 - 대한예방한의학회지. 19(2) : 123-133. (2015)

<2016년>

박영철 · 이선동. 시스템생물학의 한의학적 응용. 대한예방한의학회지. 20(1) : 99-110. (2016).

박영철 · 이선동. 일부 동물성 한약재의 독성과 안전성등급화 - 봉독, 사독, 반묘와 오공을 중심으로 - 대한예방한의학회지. 20(1) : 125-144. (2106)

안민지·허혜선·이지선·손혜영·임해옥·박강백·이준현·지재규·**박영철**. Thermitomyces albuminosus powder의 랫드를 이용한 90일 경구투여독성시험. Journal of Life Science 26(10). 1153~1162 (2016)

이기범, **박영철**, 이선동. 한방의료기관이용환자의 부작용 및 독성발생의 특성 - 2011년 한방의료이용실태조사(보건복지부)를 중심으로 - 대한한의학회지. 37(1):135-150 (2016).

양수진·이시영·이하나·**박영철**·최선강·유창연·정일민·임정대. 황기 지상부 다당체의 면

역 및 백신보조 효과. Korean J. Medicinal Crop Sci. 24(5): 408 – 419 (2016)

<2017>

김하영, 정용현, 박영철. 마우스의 기도 내 점적을 통한 가습기살균제 CMIT/MIT와 사망 간의 원인적 연관성에 관한 연구. 한국환경보건학회지, 2017; 43(4): 247-256.

안민지, 박영철. 백부자-대체 가능 한약재의 계종버섯에 대한 급성독성시험과 안전성등급화. 대한본초학회. 33-38

<2018>

Hye Seon Heo, MinJi An, Ji Sun Lee, Hee Kyong Kim, Yeong-Chul Park. (2018) Repeated dose 90-day oral toxicity test of G-7% NANA in rats: An application of new criterion for toxicity determination to test article-induced changes. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 95 (2018) 260-269

Ha-Young Kim¹, Min-Hee Kim¹, Hee-Kyong Kim and Yeong-Chul Park. Genotoxicity Study of Glycopeptide (G-7%NANA). *Toxicol. Res.* Vol. 34, No. 3, pp. 259-266 (2018)

강병훈 · 김민선 · 박영철. 가습기살균제 CMIT/MIT의 기도 점적투여를 통한 임신마우스의 사산에 대한 영향. J Environ Health Sci. 2018; 44(5): 468-479

한영훈, 박영철. 흑생강의 단회투여독성시험과 안전성등급화. Kor. J. Herbol. 2018 ; 33(4) : 53-58

<2019>

박영철, 윤미숙. 한국화장품미용학회지 화장품 원료의 위해성 평가 과정과 예시에 대한 고찰. 2019:9(2):193-210.

8. 참고문헌

EFSA Panel on Food Additives and Flavoring et al., Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive.” EFSA Journal. 2021;19(5):6585

Peters RJB, van Bommel G, Herrera-Rivera Z, Helsper HPFG, Marvin HJP, Weigel S, Tromp PC, Oomen AG, Rietveld AG, Bouwmeester H. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. J Agric Food Chem. 2014;62:6285-.93.