

医薬第567号  
平成28年5月12日

640 研  
国立大学法人北海道大学 総長 様  
国立大学法人旭川医科大学 学長 様  
北海道公立大学法人札幌医科大学 学長 様  
北海道医療大学 学長 様

北海道保健福祉部地域医療推進局医務薬務課長

「核酸 (siRNA) 搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパー」について  
このことについて、厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課から、別添写しのとおり通知がありましたので、学内の関係者への周知をお願いします。

なお、北海道製薬協会及び北海道臨床開発機構には、別途通知していることを申し添えます。

連絡先 医務薬務グループ  
主査 (製薬・品質) 鎌田  
電話 011-231-4111 内線25-333  
FAX 011-232-4108



事 務 連 絡

平成 28 年 3 月 28 日

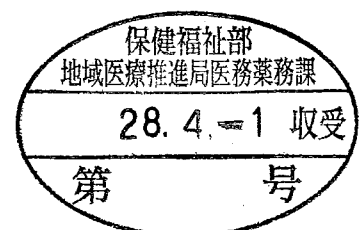
各都道府県衛生主管部（局）御中

厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課

「核酸（siRNA）搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパー」について

ナノテクノロジーを製剤技術に応用し、標的部位への医薬品の選択的な送達や生体内安定性の向上などにより、副作用の低減及び有効性の向上を目指した革新的医薬品の開発が世界的規模で進んでおり、その一つとして核酸（siRNA）搭載ナノ製剤の開発が進んでいます。

このため、厚生労働省では、核酸（siRNA）搭載ナノ製剤の開発にあたり品質及び非臨床評価等において配慮すべき事項について、「核酸（siRNA）搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパー」として別添のとおり取りまとめました。本リフレクションペーパーを今後の業務の参考とされるよう、貴管下関係業者等に対して周知方を願います。





# 核酸（siRNA）搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパー

## 目次

1. はじめに
2. 適用範囲
3. 品質に関わる留意事項
  - 3-1 体内動態や細胞内への送達に関わる品質上の留意事項
    - 3-1-1 体内動態に関わる留意事項
    - 3-1-2 細胞内への送達に関わる留意事項
  - 3-2 安全性に関わる品質上の留意事項
    - 3-2-1 キャリア構成成分の最適化
    - 3-2-2 製剤の特性最適化
    - 3-2-3 標的指向化
4. 非臨床試験に関わる留意事項
  - 4-1 非臨床薬物動態試験
  - 4-2 非臨床毒性試験
    - 4-2-1 siRNA に由来する毒性
    - 4-2-2 キャリアに由来する毒性
5. ヒト初回投与試験における留意事項

## 参考文献

## 1. はじめに

現在様々な核酸が医薬品として開発中である。siRNA (small interference RNA) は 21-23bp 程度の 2 本鎖 RNA 分子であり、標的 mRNA を特異的に切断することで遺伝子発現を抑制することができる。また、siRNA は高い mRNA 分解活性を有し配列特異性を有することから、過去 10 年以上にわたり医薬品開発への応用が期待されてきた。しかし、siRNA は低分子化学合成品と比較し、高分子量であること、負電荷を有すること、さらに高い親水性を有することなど、その物理的・化学的特性から標的となる細胞への取り込み効率の向上が課題となっている。また、siRNA を単独で血中に投与すると、酵素により速やかに分解されることや、親水性であり分子量が 2 万未満であることから腎排泄されやすいことにより、血中から速やかに消失することも医薬品応用への大きな壁となってきた。これらの課題を克服するための手法として、リポソームや高分子ミセルをはじめとするナノ技術を用いたキャリアの利用など、多くの送達技術が開発中である。

siRNA のキャリアへの結合には、キャリアに正電荷を帯電させることによる静電的相互作用や、共有結合などが用いられる。さらに、体内動態を改善するために脂質や高分子を用いて製剤化する場合もある。多くの siRNA はキャリア内に内包されるが、キャリアに内包されていない場合もある。また、多くの siRNA キャリアはナノサイズの粒子の状態ではエンドサイトーシスなどにより取り込まれる。その後、siRNA が細胞質内に移行するために、リソソームでの分解を避け、リソソームと融合する前に効率良くエンドソームから siRNA を脱出させる機構を有する製剤が開発されている。さらに、薬効や生体内安定性を増すために化学修飾した核酸の導入なども試みられている。[1、2]

本リフレクションペーパーは、ナノ技術を用いたキャリアを用いた siRNA 医薬品（以下、核酸 (siRNA) 搭載ナノ製剤）を評価する際に参考とすべき点をまとめたものである。

## 2. 適用範囲

本文書では、核酸 (siRNA) 搭載ナノ製剤の開発において留意すべき点を議論するが、本文書の考え方は siRNA 以外の核酸を搭載したナノ製剤の開発の際にも参考となるであろう。各キャリアに特有の留意事項は、関連する通知やガイドライン [3] を参照することが重要である。

なお、個々の医薬品についての試験の実施や評価に際しては、その時点の学問や技術の進歩、経験の蓄積を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースで柔軟に対応することが必要である。

## 3. 品質に関わる留意事項

ナノサイズのキャリアで siRNA を運搬する目的には、siRNA の生体内安定性向上及び標的臓器・組織への送達、さらに場合によっては、細胞内での動態の制御などがある。そのため、キャリア構成成分が様々な機能を有しており、構成成分の品質が製剤全体の品質に

影響を及ぼす可能性もある。したがって、構成成分の品質に関する情報は有効成分と同程度の水準で詳細に示す必要がある。さらに、有効性及び安全性に影響を与えうる重要品質特性（特に体内動態、薬力学的特性に影響を与えうる品質特性）を明らかにし、それらの品質特性を評価するための試験法を確立することが重要である。このように siRNA の体内動態はキャリアに依存するため、異なる構成成分を含むキャリアへの変更時など、体内動態の変化が予測される場合には、新たな非臨床評価とともに、詳細な品質特性の評価が必要となる。

### 3-1 体内動態や細胞内への送達に関わる品質上の留意事項

#### 3-1-1 体内動態に関わる留意事項

ナノサイズのキャリアを送達手段として用いる場合、一般的に siRNA の血中滞留性を向上させることは、標的臓器・組織への送達に影響するため、血中滞留性に影響する粒子径やポリエチレングリコール (PEG) などによるキャリア粒子表面の物性の制御が重要となる。一般的にキャリアを用いる場合には、キャリアと生体成分との相互作用が生じやすいため、生体成分と siRNA との置換、分解酵素による siRNA の分解などに起因する製剤の安定性に留意すべきである。siRNA のキャリアへの搭載率は、ゲル電気泳動法、蛍光標識法、蛍光色素を用いたインターカレーション法などでおおむね評価可能であろう。また、製剤が一定の生体内安定性及び siRNA の放出特性を有していることを保証するために、生理的条件を適切に反映した試験液中で *in vitro* 評価試験法を確立し、キャリアからの siRNA の放出を評価すべきである。

キャリアに機能性分子（例えば、リガンド（標的素子）・抗体など）を結合させることで、その機能を利用した能動的送達により、標的臓器・組織や標的細胞へ送達される製剤もある。機能性分子をキャリアに結合する際、リンカーが機能性分子の機能に影響を及ぼさないように最適化する必要がある。また、機能性分子及びリンカーの物性がキャリア全体の物性に影響を及ぼすことがあるので留意すべきである。さらにリンカーの安定性も重要である。

#### 3-1-2 細胞内への送達に関わる留意事項

siRNA を効率的に標的細胞内へ送達させるためには、キャリアの特性や動態の制御が重要な要素となりうる。

細胞内への取り込みを亢進するための手法として、粒子径の制御、siRNA キャリアへの正電荷や細胞膜融合性の付加、機能性分子の結合など表面物性の制御などが挙げられる。

### 3-2 安全性に関わる品質上の留意事項

キャリアに由来する安全性上のリスクを低減するために、キャリア構成成分及び製剤の特性の最適化が重要となる。特に留意すべき事項を以下に例示する [4]。

### 3-2-1 キャリア構成成分の最適化

- ・ 生分解性の向上
- ・ 安全性プロファイル既知の構成成分の利用
- ・ カチオン性脂質やポリマーの設計、最適化

### 3-2-2 製剤の特性最適化

- ・ 粒子サイズの最適化
- ・ 正電荷の遮蔽
- ・ PEG修飾によるキャリアの血中滞留性の向上及び標的臓器や組織への移行性の向上
- ・ キャリア安定性の向上
- ・ 投与経路に適した特性最適化

### 3-2-3 標的指向化

- ・ リガンド分子によるターゲティング（例えば、上皮成長因子受容体（EGFR）、葉酸受容体、トランスフェリン受容体）
- ・ 細胞膜透過性ペプチドの利用 など

## 4. 非臨床試験に関わる留意事項

### 4-1 非臨床薬物動態試験

キャリアで通常送達するsiRNAについて、有効性や安全性を適切に評価するためには、製剤を用いて血中濃度及び臓器・組織への分布を定量することが重要である。

- ・ 定量法には蛍光標識法、放射性同位体標識法、polymerase chain reaction (PCR) 法、質量分析法などがある。標識法の特性や分析手法の感度などに留意し、選択する。
- ・ 遊離siRNAの濃度、キャリアに搭載されたsiRNAの濃度及び総量を測定対象として検討する。ただし、天然型のsiRNAのように、血中でのsiRNAの安定性によっては遊離有効成分の濃度の測定が困難な場合もある。

### 4-2 非臨床毒性試験

基本的には製剤を用いて低分子化合物に準じた毒性試験が必要である。特に、標的臓器への影響や*in vivo*におけるサイトカイン類産生など、核酸（siRNA）搭載ナノ製剤に関連した毒性を評価する必要がある。なお、動物種の選定や試験デザインなどについては、siRNAやキャリアの特性に応じて検討すべきである。生体内での安定性を向上させた修飾型siRNAは、キャリアから遊離した状態では腎臓などへの蓄積が懸念されるため、必要に応じてsiRNA単独による毒性試験を実施するなど留意すべきである。

以下に、siRNA、キャリアそれぞれにおいて留意すべき点を記載する。

#### 4-2-1 siRNAに由来する毒性 [5]



siRNAの体内動態改善を目的に、siRNAの化学的修飾やキャリアの利用による生体内安定性・標的化の向上が試みられているが、血中や臓器・組織における滞留性の持続に伴う、siRNA由来の毒性増悪やキャリアと生体成分の相互作用などの懸念も生じうることに留意すべきである。一般的には以下の毒性を考慮することが必要である。

- ・ 免疫毒性：Toll-like receptor (TLR)などを介した免疫系の活性化、補体活性化、免疫系細胞の変動
- ・ 血液毒性：溶血性、血液凝固、血小板凝集など

そのほか、siRNAに由来する毒性として以下が挙げられる。

- ・ 標的配列へ作用することに起因する毒性
- ・ 標的配列以外に作用することに起因する毒性

これらの毒性を評価する適切な試験法を検討する。

#### 4-2-2 キャリアに由来する毒性 [4]

キャリアに由来する安全性上の問題として、キャリアと生体成分との相互作用に由来する毒性が挙げられるため、これらの毒性に配慮する必要がある。<sup>注1</sup> また、頻回投与や長期投与による蓄積性が問題となることも考えられる。

#### 5. ヒト初回投与試験における留意事項

「ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省/欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパーの公表について」薬食審査発0110第1号（平成26年1月10日）の「3.3ヒト初回投与試験において考慮すべき事項」に準じた考え方を考慮する。

---

<sup>注1</sup> キャリアに由来する問題点として、以下の事例が報告されている。

- ・ カチオン性キャリア成分と細胞膜や細胞小器官との相互作用による炎症性反応や細胞毒性、また、キャリア成分による活性酸素産生に起因する炎症性反応や細胞毒性 (Ballarín-González B, Howard KA. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:1717-1729., Akhtar S. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6:1347-1362., Lappalainen K, Jääskeläinen I, Syrjänen K, Urtti A, Syrjänen S. *Pharm Res.* 1994;11:1127-1131., Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. *J Control Release.* 2006;114:100-109.)
- ・ 特定の dendrimer による遺伝子発現への影響 (Akhtar S, Benter I. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:164-182., Omid Y, Hollins AJ, Drayton RM, Akhtar S. *J Drug Target.* 2005;13:431-443.)
- ・ 特定のカーボンナノチューブによる遺伝毒性 (Tsukahara T, Haniu H. *Mol Cell Biochem.* 2011;352:57-63.)
- ・ 免疫学的毒性  
血液毒性、過敏症反応、炎症反応など (Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. *Endocrinology.* 2010;151:458-465.)

#### 参考文献

- [ 1 ] Castanotto D, Rossi JJ. *Nature*. 2009;457:426-433.
- [ 2 ] Cabral H, Kataoka K. *J Control Release*. 2014;190:465-476.
- [ 3 ] 「ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省/欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパーの公表について」薬食審査発0110第1号（平成26年1月10日）
- [ 4 ] Xue HY, Liu S, Wong HL. *Nanomedicine (Lond)*. 2014 ; 9:295-312.
- [ 5 ] 宮川伸. *医学のあゆみ*. 2011; 238:519-523.

# Reflection paper on nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug products

(March 2016, MHLW, Japan)

## Table of Contents

1. Introduction
2. Scope
3. Quality considerations
  - 3-1 Quality considerations related to pharmacokinetic behavior and delivery to target cells
    - 3-1-1 Considerations related to pharmacokinetic behavior
    - 3-1-2 Considerations related to delivery to target cells
  - 3-2 Quality considerations related to safety
    - 3-2-1 Optimization of carrier components
    - 3-2-2 Optimization of properties of the drug product
    - 3-2-3 Targeting delivery
4. Nonclinical considerations
  - 4-1 Nonclinical pharmacokinetic study
  - 4-2 Nonclinical toxicity study
    - 4-2-1 Toxicity of the siRNA
    - 4-2-2 Toxicity of the carrier
5. Considerations for first-in-human studies

References

## 1. Introduction

Currently, various nucleic acid-based compounds are being developed as medicines. Small interfering RNAs (siRNAs) comprise a class of double-stranded RNA molecules, with 21 to 23 base pairs, which enable sequence-specific gene silencing by promoting specific degradation of target mRNAs. Due to their potent mRNA degradation activity and sequence-specificity, siRNAs have been considered potential candidates of pharmaceutical application for over 10 years. In contrast to low-molecular-weight chemical entities, siRNAs have a high molecular weight, are negatively charged, and are highly hydrophilic. These physicochemical properties make the efficient delivery of siRNAs to target cells difficult, which poses a challenge to their pharmaceutical development. In addition, when injected into the blood by itself, siRNA is readily eliminated from the blood by rapid degradation and glomerular filtration through the kidneys, because of its hydrophilic nature and relatively low molecular weight (less than 20 kDa); these properties are also considered major barriers to its pharmaceutical application. To overcome these challenges, many novel delivery techniques such as nanotechnology-based carriers (e.g., liposomes and polymeric micelles) are under development.

Electrostatic interactions with a positively charged carrier or covalent binding are used to bind siRNAs to a carrier. Moreover, lipids and polymers are used in some formulations to improve their pharmacokinetic behavior. In most cases, siRNAs are encapsulated in carriers, while others are not. Most siRNA carriers are incorporated into the cells in the form of nanoparticles through endocytosis. For subsequent transport of siRNAs into the cytoplasm, attempts have been made to engineer the drug product to have an endosomal release mechanism. This must take place before fusion with the lysosome in order to avoid lysosomal degradation. Other attempts have included the introduction of chemically modified nucleic acids with enhanced pharmacodynamic properties and *in vivo* stability. [1, 2]

This reflection paper addresses some points for consideration when assessing siRNA drug products made using nanotechnology-based carriers (hereinafter referred to as nucleic acids [siRNA]-loaded nanotechnology-based drug product).

## 2. Scope

While this reflection paper discusses the points to be considered for pharmaceutical development of nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug product, the principles outlined here may be applicable to the pharmaceutical development of nucleic acids other than siRNA-based products that use nanotechnology-based carriers. With regard to carrier-specific considerations, the relevant notifications and guidelines [3] should be consulted.

The studies and evaluations required for each drug product should be determined on a

case-by-case basis, justified by a reasonable rationale that reflects the current academic and technological advances and the manufacturer's accumulated experience.

### **3. Quality considerations**

The aims of loading siRNAs on a nanotechnology-based carrier are to improve the *in vivo* stability of the siRNA, to deliver the siRNA to the target organ and/or tissue, and, in some cases, to control the intracellular behavior of the siRNA. As carrier components have various functions, the quality of each component may affect the overall quality of the drug product. Therefore, information on the quality of the components should be provided at the same level of detail as expected for the active substances. Furthermore, it is important not only to identify the critical quality attributes that would affect the safety and efficacy of the drug product, (particularly the *in vivo* pharmacokinetic and pharmacodynamic properties) but also to establish test methods for evaluating these quality attributes. If the pharmacokinetic properties are expected to vary (e.g., in the case of change in the carrier components), detailed evaluation of quality attributes, as well as nonclinical evaluation, should be performed again after the change has been made, because the pharmacokinetics of the siRNA depend on the carrier as mentioned above.

#### **3-1 Quality considerations related to pharmacokinetic behavior and delivery to target cells**

##### **3-1-1 Considerations related to pharmacokinetic behavior**

When nanotechnology-based carriers are used as a means of delivery, it is important to control particle size and surface properties made via modification with, for example, polyethylene glycol (PEG), both of which can affect the retention of siRNAs in the blood because enhanced blood retention would generally affect its delivery to the target organs and/or tissues. In general, the carrier is likely to interact with biological components, and thus, attention should be paid toward the change in stability of the drug product caused by the substitution of the siRNA with a biological component, and with subsequent enzymatic degradation of the siRNA. Loading efficiency of siRNAs onto a carrier can be evaluated by methods such as gel electrophoresis, fluorescent labeling, or intercalation using fluorescent dye. In addition, to ensure that the drug product has a consistent *in vivo* stability and siRNA release profile, *in vitro* test methods using a test solution that appropriately reflects physiological conditions should be established to evaluate the release of siRNA from the carrier.

Certain products are designed to deliver siRNAs to the target organ, tissue, or cells by active targeting delivery using functional molecules (e.g., a ligand [targeting moiety] or an antibody) conjugated to a carrier. In that case, the conjugation of the functional molecule to the carrier

should be optimized so that the linker does not affect the function of the functional molecule. In addition, it should be noted that the properties of the functional molecule or linker could affect the overall properties of the carrier. Therefore, the stability of the linker is also important.

### **3-1-2 Considerations related to delivery to target cells**

To ensure efficient delivery of the siRNA to the target cells, it is important to control the quality attributes and the pharmacokinetic influence of the carrier.

Techniques to enhance intracellular uptake include control of particle size as well as surface properties, including the addition of positive charge to the siRNA carrier, enhancement of cellular membrane fusion, and conjugation of functional molecules.

## **3-2 Quality considerations related to safety**

To reduce the risk derived from carrier-related safety issues, the carrier components and the properties of drug product should be optimized. Examples to be specifically considered are described below: [4]

### **3-2-1 Optimization of carrier components**

- Enhancement of biodegradability
- Use of components with known safety profiles
- Design and optimization of cationic lipids and/or polymers

### **3-2-2 Optimization of properties of the drug products**

- Optimization of particle size
- Masking of the positive charge
- PEGylation of the carrier to improve retention of siRNA in the blood and consequent distribution to the target organ and/or tissue
- Improvement of stability of siRNA-loaded carrier
- Optimization of the product properties relevant to the intended route of administration

### **3-2-3 Targeting delivery**

- Targeting with a ligand molecule (e.g., epidermal growth factor receptor [EGFR], folate receptor, or transferrin receptor)
- Use of cell membrane-permeable peptides etc.

## **4. Nonclinical considerations**

### **4-1 Nonclinical pharmacokinetic study**

To appropriately evaluate the efficacy and safety of siRNAs which are generally delivered with a carrier, it is important to quantify the blood concentration and organ and/or tissue

distribution using the drug product.

- Available assay methods include fluorescent labeling, radioisotope labeling, polymerase chain reaction (PCR), or mass spectrometry. The appropriate assay should be chosen based on the characteristics of the labeling method or sensitivity of the analytical technique.
- The concentrations of unloaded siRNA, siRNA loaded on the carrier, and total siRNA should be measured. Depending on the stability of siRNA in the blood, it may be difficult to measure concentrations of unloaded siRNA (e.g., in case of natural siRNAs).

#### 4-2 Nonclinical toxicity study

In principle, toxicity studies of nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug products should be equivalent to those of low-molecular-weight chemical compounds. More specifically, the effects on the target organ and the toxicity effects of nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug products, such as *in vivo* cytokine production, should be evaluated. The selection of animal species and study design should be based on the specific characteristics of the properties of the siRNA or the carrier. When released from the carrier, siRNAs chemically modified to improve *in vivo* stability are likely to accumulate in the kidney, which raises toxicity concerns. Therefore, toxicity studies of siRNA alone should be conducted where necessary.

Furthermore, the following factors should be considered regarding siRNAs and their carriers:

##### 4-2-1 Toxicity of the siRNA [5]

To improve the pharmacokinetic behavior of siRNAs, attempts have been made to modify the siRNA chemically and/or to use the carrier to improve both its *in vivo* stability and enhance its targeting delivery. On the other hand, it must be noted that prolonged retention of siRNA in blood and organs and/or tissues could increase siRNA-associated toxicity, and toxicological concerns of interactions between the carrier and the biological components. In general, the following types of toxicity should be considered.

- Immunotoxicity: Activation of the immune system mediated by certain types of Toll-like receptors (TLRs), complement activation, and variations in immune cells
- Hematotoxicity: Hemolysis, blood coagulation, and platelet aggregation

In addition, siRNAs may cause other types of toxicity:

- Toxicity caused by their action on the target sequence
- Toxicity caused by their action on non-target sequences

Appropriate test methods to evaluate these toxicities should be employed.

#### 4-2-2 Toxicity of the carrier [4]

Safety issues relevant to carriers, such as the toxicity derived from interactions between the carrier and biological components, should be addressed.<sup>1</sup> In addition, accumulation following multiple doses and/or long-term administration may raise safety issues.

### 5. Considerations for first-in-human studies

For first-in-human studies of nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug products, the principles described in “Section 3.3 Considerations for first-in-human studies” in the PFSB/ELD Notification No. 0110-1 “Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products” (dated January 10, 2014) should be considered.

### References

- [1] Castanotto D, Rossi JJ. *Nature*. 2009;457:426-433.
- [2] Cabral H, Kataoka K. *J Control Release*. 2014;190:465-476.
- [3] Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products, January 10, 2014, PFSB/ELD Notification No.0110-1
- [4] Xue HY, Liu S, Wong HL. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9:295-312.
- [5] Miyakawa S. *J Clin Exp Med*. (in Japanese). 2011;238:519-523.

---

<sup>1</sup> The following cases have been reported as issues relevant to carriers

- 1) Inflammatory reactions and cytotoxicity caused by interactions of cationic carrier components with plasma membranes and organelles, or inflammatory reactions and cytotoxicity caused by oxygen radical production induced by the carrier components (Ballarín-González B, Howard KA. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:1717-1729., Akhtar S. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010;6:1347-1362., Lappalainen K, Jääskeläinen I, Syrjänen K, Urtti A, Syrjänen S. *Pharm Res*. 1994;11:1127-1131., Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. *J Control Release*. 2006;114:100-109.)
- 2) Effects on gene expression caused by specific dendrimers (Akhtar S, Benter I. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59:164-182., Omid Y, Hollins AJ, Drayton RM, Akhtar S. *J Drug Target*. 2005;13:431-443.)
- 3) Genotoxicity caused by specific carbon nanotubes (Tsukahara T, Haniu H. *Mol Cell Biochem*. 2011;352:57-63.)
- 4) Immunotoxicity: hematotoxicity, hypersensitivity reactions, and inflammatory reactions etc. (Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. *Endocrinology*. 2010;151:458-465.)