

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7546563号  
(P7546563)

(45)発行日 令和6年9月6日(2024.9.6)

(24)登録日 令和6年8月29日(2024.8.29)

(51)国際特許分類 F I  
A 6 1 N 1/05 (2006.01) A 6 1 N 1/05  
A 6 1 B 18/14 (2006.01) A 6 1 B 18/14

請求項の数 17 (全35頁)

(21)出願番号	特願2021-528365(P2021-528365)	(73)特許権者	500039463
(86)(22)出願日	令和1年11月21日(2019.11.21)		ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ
(65)公表番号	特表2022-511738(P2022-511738 A)		ーシティ オブ テキサス システム
(43)公表日	令和4年2月1日(2022.2.1)		BOARD OF REGENTS, TH
(86)国際出願番号	PCT/US2019/062663		E UNIVERSITY OF TEX
(87)国際公開番号	WO2020/106986		AS SYSTEM
(87)国際公開日	令和2年5月28日(2020.5.28)		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス州
審査請求日	令和4年11月21日(2022.11.21)		, オースティン, ウェスト 7 番 ストリ
(31)優先権主張番号	62/770,540		ート 2 1 0
(32)優先日	平成30年11月21日(2018.11.21)		2 1 0 West 7 th Street
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(73)特許権者	Austin, Texas 7 8 7 0 1
			U . S . A .
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 金属化グラフェン繊維の作製方法および生体電子用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

埋め込み型電極であって、  
多層グラフェン繊維コアと、  
前記多層グラフェン繊維コアを囲む絶縁コーティングと、  
前記多層グラフェン繊維コアと前記絶縁コーティングとの間に配置された金属層と、を  
備える、埋め込み型電極。

【請求項 2】

前記多層グラフェン繊維コアが、結合剤材料を含まない、請求項 1 に記載の埋め込み型  
電極。

【請求項 3】

前記絶縁コーティングが、ポリマーベースのコーティングである、請求項 1 に記載の埋  
め込み型電極。

【請求項 4】

前記絶縁コーティングが、バリレン - C である、請求項 3 に記載の埋め込み型電極。

【請求項 5】

前記絶縁コーティングが、約 1 ~ 3 μ m の厚さを有する、請求項 3 に記載の埋め込み型  
電極。

【請求項 6】

前記金属層が、前記多層グラフェン繊維コアに隣接し、前記金属層が、前記多層グラフ

エン繊維コアの部分的なカプセル化で前記多層グラフェン繊維コアの表面部分を覆う、請求項 1 に記載の埋め込み型電極。

【請求項 7】

前記金属層が、前記多層グラフェン繊維コアの表面の約半分を覆う、請求項 6 に記載の埋め込み型電極。

【請求項 8】

前記金属層が、前記多層グラフェン繊維コアに隣接し、前記金属層が、前記多層グラフェン繊維コアの完全なカプセル化で前記多層グラフェン繊維コアの表面部分を覆う、請求項 1 に記載の埋め込み型電極。

【請求項 9】

前記金属層が、白金、イリジウム、酸化イリジウム、白金イリジウム、および窒化チタンのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の埋め込み型電極。

【請求項 10】

前記金属層が、約 10 nm ~ 約 500 nm の範囲の厚さを有する、請求項 1 に記載の埋め込み型電極。

【請求項 11】

前記多層グラフェン繊維コアが、約 10 μm ~ 約 200 μm の範囲の直径を有する、請求項 1 に記載の埋め込み型電極。

【請求項 12】

埋め込み型電極を作製するための方法であって、  
 液晶中の完全に秩序化された酸化グラフェンシートのその場還元を実行することにより、多層グラフェン繊維コアを形成することと、  
 前記多層グラフェン繊維コアの少なくとも一部を金属層でコーティングすることと、  
 前記多層グラフェン繊維コアおよび金属層を絶縁コーティングでコーティングすることと、を含む、方法。

【請求項 13】

その場還元を実行することによって多層グラフェン繊維コアを形成することが、酸を含有する凝固浴を使用して酸化グラフェンの液晶分散液を湿式紡糸するステップをさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記酸が、次亜リン酸である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記金属層が、白金、イリジウム、酸化イリジウム、白金イリジウム、および窒化チタンのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

前記金属層が、約 10 nm ~ 約 500 nm の範囲の厚さを有する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

前記絶縁コーティングが、パリレン - C を含む、請求項 12 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2018年11月21日に出願された「Methods of Making and Bioelectronic Applications of Metalized Graphene Fibers」と題する米国仮出願第62/770,540号の優先権および利益を主張し、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、金属化グラフェン繊維を含む微小電極アレイのバイオセンサーおよび生体電

10

20

30

40

50

子用途の作製に関連している。

【背景技術】

【0003】

慢性的に埋め込み可能な微小電極は、人工デバイスと神経系との間の通信を可能にする。電気刺激または活動電位記録に基づく神経プロテーゼおよび治療法は、中枢および末梢神経系にインターフェースされた電極を伴う。機能的な微小電極は、生体信号を記録するために個々のニューロンと通信する必要があるが、神経組織を脱分極して応答を開始するのに十分な量の電荷を送達する。既存の微小電極技術は、重大な課題および制限に直面している。

【0004】

例えば、機械と神経系との間の効果的な双方向通信は、個々のニューロンに匹敵する先端サイズ ( $D < 50 \mu\text{m}$  および幾何学的表面積  $< 2000 \mu\text{m}^2$ ) の低インピーダンスの柔らかい微小電極へのアクセスが必要であるが、貴金属 (つまり、金、白金 (Pt)、および白金/イリジウム) ならびに結晶性シリコンで構成される従来の微小電極の性能は、それらの高インピーダンス、低電荷注入容量 ( $0.05 \sim 0.26 \text{mC}/\text{cm}^2$ )、低表面積、ならびにデバイスの癒痕化および故障を引き起こす電極と周囲の組織との間の機械的不一致により制限される。

【0005】

したがって、神経刺激および記録のためのインターフェースでの電極用材料の選択は、神経インターフェースの有効性、信頼性、および寿命に影響を与える。さらに、刺激および記録中、電極は、十分な量の電荷を送達および記録する必要があるが、周囲の媒体の電気分解をトリガーするためのしきい値を超えてはならない。従来の金属ベースの電極の表面積が小さいため、高い電荷密度を送達するそれらの能力が本質的に制限され、個々のニューロン信号記録の感度に悪影響を与える。

【0006】

これらの制限により、生体適合性を備えた強化された電気化学的特性を提供するために、ナノ構造化炭素、ナノ構造化繊維、金属酸化物、金属窒化物、および有機導体などの他の材料の評価が動機付けられてきた。しかしながら、そのような材料は、追加の課題を提供する。例えば、窒化チタン (TiN) でコーティングすると、容量性メカニズムよりも Pt 電極の電荷注入容量が  $0.05 \sim 0.26 \text{mC}/\text{cm}^2$  から  $0.87 \text{mC}/\text{cm}^2$  に改善し、これは、生体内研究に好都合である。活性化された酸化イリジウム ( $\text{IrOx}$ ) は、ファラデーメカニズムによって Pt 電極の電荷注入容量を  $1 \sim 5 \text{mC}/\text{cm}^2$  にさらに高めるが、神経刺激のための安定性および安全マージンは制限される。PEDOT: PSS、PEDOT: pTS、PEDOT: C1O4、PEDOT: CNT などの導電性ポリマーの堆積により、Pt ( $0.05 \sim 0.26 \text{mC}/\text{cm}^2$ ) と比較して、電荷注入容量がそれぞれ 2.92、2.01、2.09、および  $1.25 \text{mC}/\text{cm}^2$  にさらに増加する。これらのポリマーはまた、Pt (約  $390 \text{M} \mu\text{m}^2$ ) と比較して、電極インピーダンスがそれぞれ 8、26.5、203、および  $42 \text{M} \mu\text{m}^2$  に低減する。しかしながら、コーティングされた微小電極の不均一な性質は、副反応、腐食、層間剥離、およびその結果として早期の故障をもたらす可能性のあるガルバニックカップリングを起こしやすい。選択した材料および製作プロセスは、堅牢で信頼性の高い動作を保証するために、電極の層間剥離も最小限に抑える必要もある。

【0007】

加えて、従来の低インピーダンス微小電極は、軟神経組織を貫通するのに十分な剛性ではないが、組織との機械的不一致を最小限に抑え、かつ埋め込み後の微小運動に適合するために柔軟または伸縮性である。

【0008】

グラフェンを含むナノ構造化炭素質材料は、柔軟性および強度を可能にしながら、優れた電気化学的特性を提供することができる。ナノチューブおよびグラフェン微小繊維は、優れた電気化学的性質、高表面積、機械的強度、高い柔軟性、および生体適合性を提供す

10

20

30

40

50

るため、電極の製作に最適である。確かに、カーボンナノチューブ繊維は、金属電極および従来のカーボン繊維と比較して、埋め込み時に有意な電気化学的活動、感度、およびバイオフィアウリングに対する耐性を実証した。しかしながら、ニートのカーボンナノチューブベースの繊維微小電極は、安定しており、比較的長期間神経活動を記録することができるが、ナノチューブを製造するために使用される紡糸プロセスは、困難である。さらに、超整列カーボンナノチューブアレイ（乾式紡糸）を生産するために高いコストがかかるだけでなく、高温（ $> 1000$ ）ならびに腐食性溶媒（例えば、発煙硫酸およびクロロスルホン酸）の使用を含むそれらの製造に必要な極めて厳しい条件により、カーボンナノチューブベースの微小繊維の生産が大幅に制限される。

#### 【0009】

さらに、従来の自立型カーボンナノチューブおよびグラフェン微小繊維の追加の大きな欠点は、それらの金属対応物と比較して高い抵抗率にある。微小電極が数ミリメートルより長い場合、抵抗率が大幅に増加し、これは低ノイズの記録に重大な課題をもたらす。

#### 【0010】

##### 発明の概要

本開示は、金属化グラフェン繊維を含む微小電極アレイのバイオセンサーおよび生体電子用途の作製に関連している。いくつかの実施形態では、集電体として薄い白金コーティングを備えた柔軟で自立型のグラフェン繊維ベースの微小電極アレイの製作は、低インピーダンス、高表面積、および優れた電気化学的性質を備えた構造をもたらす。グラフェン繊維は、酸化グラフェンの液晶分散液（LCGO）を使用して製造され得る。グラフェン繊維は、その自然な生体適合性に加えて、独特の機械的および電気化学的性質を有する。得られた微小電極アレイは、従来のグラフェンまたはPt電極と比較した場合、より良い性能を提供する。特に、いくつかの実施形態では、グラフェン繊維の低インピーダンスおよび多孔質構造は、比類のない電荷注入容量ならびにニューロン活動を記録および検出する改善された能力をもたらし、一方、薄いPt層は、収集された電子を微小電極に沿って効率的に伝達する。さらに、得られた微小電極アレイは、従来の微小電極アレイと比較した場合、信号対雑音比が改善された神経活動を検出することもできる。

#### 【0011】

いくつかの実施形態では、埋め込み型電極は、多層グラフェン繊維コア、多層グラフェン繊維コアを取り囲む絶縁コーティング、および多層グラフェン繊維コアと絶縁コーティングとの間に配置された金属層を含む。いくつかの実施形態では、多層グラフェン繊維コアは、結合剤材料を含まない。任意選択で、絶縁コーティングは、パリレン-Cまたはシリコーンなどのポリマーベースのコーティングであり得る。いくつかの実施形態では、絶縁コーティングは、約 $2\ \mu\text{m}$ の厚さを有する。いくつかの実施形態では、金属層は、多層グラフェン繊維コアに隣接し得、金属層は、多層グラフェン繊維コアの全体的または部分的なカプセル化により、グラフェン繊維コアの表面部分を完全にまたは覆う。いくつかの実施形態では、金属層は、多層グラフェン繊維コアの表面の約半分を覆う。いくつかの実施形態では、金属層は、多層グラフェン繊維コアに隣接しており、金属層は、多層グラフェン繊維コアの完全なカプセル化により、グラフェン繊維コアの表面部分を覆う。いくつかの実施形態では、金属層は、白金、イリジウム、酸化イリジウム、白金イリジウム、および窒化チタンのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、金属層は、約 $10\ \text{nm}$ ~約 $500\ \text{nm}$ の範囲の厚さを有する。いくつかの実施形態では、多層グラフェン繊維コアは、約 $10\ \mu\text{m}$ ~約 $200\ \mu\text{m}$ の範囲の直径を有する。

#### 【0012】

いくつかの実施形態では、埋め込み型電極を作製するための方法は、液晶中の完全に秩序化された酸化グラフェンシートのその場還元を実行することにより、多層グラフェン繊維コアを形成するステップと、多層グラフェン繊維コアの少なくとも一部を金属層でコーティングするステップと、多層グラフェン繊維コアおよび金属層を絶縁コーティングでコーティングするステップと、を含む。その場還元を実行することによって多層グラフェン繊維コアを形成することは、酸を含有する凝固浴を使用して酸化グラフェンの液晶分散液

10

20

30

40

50

を湿式紡糸するステップを含み得る。任意選択で、酸は、次亜リン酸を含む。任意選択で、金属層は、白金、イリジウム、酸化イリジウム、白金イリジウム、および窒化チタンのうちの少なくとも1つを含む。任意選択で、金属層は、約10nm~約500nmの範囲の厚さを有する。任意選択で、絶縁コーティングは、パリレン-Cを含む。

#### 【0013】

いくつかの実施形態では、末梢を記録および刺激する方法は、末梢神経に係合することによって埋め込み型電極を埋め込むことであって、埋め込み型電極が、多層グラフェン繊維コア、多層グラフェン繊維コアを取り囲む絶縁コーティング、および多層グラフェン繊維コアと絶縁コーティングとの間に配置された金属層をさらに備える、埋め込むことと、末梢神経からの記録および刺激のうちの少なくとも1つと、を含む。任意選択で、末梢神経に係合することは、埋め込み型電極を、末梢神経の内側、末梢神経を通して縫合して、または末梢神経の上に埋め込むことを含み得る。任意選択で、末梢神経は、とりわけ、心臓、肺、胃、肝臓、膵臓、腎臓、ならびに骨盤および会陰領域中の器官を含む1つ以上の器官を神経支配し得る。いくつかの実施形態では、システムを使用して、結節、間葉、および頸動脈が含まれるが、これらに限定されない自律神経節または感覚神経節から記録および/または刺激し得る。さらに、いくつかの実施形態では、本開示に従って構築されたシステムおよび方法を使用して、神経血管叢から記録および/またはそれを刺激し得、神経枝は、とりわけ脾臓神経または腎神経におけるものなどの動脈と静脈複合体との間を移動する。

#### 【0014】

いくつかの実施形態では、末梢神経を記録および刺激する方法は、標的神経を周囲組織から露出および隔離することと、露出した標的神経の周りに埋め込み型電極を通過させることおよび埋め込み型電極との結び目を形成することのうちの少なくとも1つ、かつ露出した標的神経の神経外膜を通して埋め込み型電極を挿入することによって、埋め込み型電極を標的神経に係合させることであって、埋め込み型電極が、多層グラフェン繊維コア、多層グラフェン繊維コアを取り囲む絶縁コーティング、および多層グラフェン繊維コアと絶縁コーティングとの間に配置された金属層をさらに含む、係合させることと、末梢神経からの記録および刺激のうちの少なくとも1つと、を含み得る。任意選択で、末梢神経に係合することは、埋め込み型電極を、末梢神経の内側、末梢神経を通して縫合して、または末梢神経の上に埋め込むことを含み得る。任意選択で、末梢神経は、心臓、肺、胃、肝臓、膵臓、脾臓、および骨盤器官のうちの少なくとも1つに対して末梢であり得る。

#### 【0015】

本開示は、添付の図面と併せて以下の説明からより完全に理解されると考えられる。一部の図は、他の要素をより明確に示すために、選択した要素を省略して簡略化されている場合がある。いくつかの図におけるそのような要素の省略は、対応する書面による説明に明示的に描写され得る場合を除いて、例示的な実施形態のいずれかにおける特定の要素の存在または不在を必ずしも示すものではない。図面のいずれも必ずしも縮尺どおりではない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0016】

【図1A】本開示のいくつかの実施形態に従って金属化グラフェン繊維を作製および適用するための概略図である。

【図1B】本開示のいくつかの実施形態に従って金属化グラフェン繊維を作製するプロセスのためのフローチャートである。

【図2】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の走査電極特性評価を提供する図である。

【図3】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の電気化学的特性評価を提供する図である。

【図4】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の機械的および加速劣化特性評価を提供する図である。

10

20

30

40

50

【図5】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によってラット脳から記録された神経活動を提供する図である。

【図6】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

【図7】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の特性評価を提供する図である。

【図8】本開示のいくつかの実施形態に従って構築されたグラフェン繊維電極上の金属化された厚さのコーティングの特性評価を提供する図である。

【図9】本開示のいくつかの実施形態に従って金属化グラフェン繊維を作製および適用するための概略図である。

10

【図10】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の特性評価を提供する図である。

【図11】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の特性評価を提供する図である。

【図12】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

【図13】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

【図14】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

20

【図15】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

【図16】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の埋め込み特性評価を提供する図である。

【図17】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

【図18】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

【図19】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の特性評価を提供する図である。

30

【図20】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の特性評価を提供する図である。

【図21】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の特性評価を提供する図である。

【図22】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の特性評価を提供する図である。

【図23】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の埋め込み特性評価を提供する図である。

【図24】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

40

【図25】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

【図26】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の特性評価を提供する図である。

【図27】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の埋め込み特性評価を提供する図である。

【図28】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

【図29】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

50

【図30】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極によって記録された神経活動を提供する図である。

【図31】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の特性評価を提供する図である。

【図32】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の特性評価を提供する図である。

【図33】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の埋め込み特性評価を提供する図である。

【図34】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の埋め込み特性評価および神経記録を提供する図である。

10

【図35】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の埋め込み特性評価および神経記録を提供する図である。

【図36】本開示のいくつかの実施形態に従って構築された金属化グラフェン繊維電極の埋め込み特性評価を提供する図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本開示は、金属化グラフェン繊維の作製および生体電子用途に関する。いくつかの実施形態では、グラフェン繊維は、白金でコーティングされ得、かつ1つ以上の組織および器官から記録および刺激するために使用され得る。いくつかの実施形態では、電荷コレクターとして薄い金属（つまり、白金）コーティングを備えた柔軟で自立型のグラフェン繊維ベースの微小電極アレイの製作は、低インピーダンス、高表面積、および優れた電気化学的性質を備えた構造をもたらす。従来のグラフェン電極または白金（Pt）電極と比較して、本明細書で説明するハイブリッド白金化グラフェン繊維は、堅牢であり、より優れた性能を提供し得る。特に、本明細書の開示に従って構築された微小電極アレイの実施形態は、その上に薄い白金層を備えたグラフェン繊維の低インピーダンスおよび多孔質構造を含み得る。グラフェン繊維は、比類のない電荷注入容量ならびに神経活動を記録および検出する能力を提供し得、一方、薄いPt層は、収集された電子を微小電極に沿って効率的に伝達する。したがって、微小電極は、高い信号対雑音比で神経活動を検出することができ得る。

20

【0018】

従来の自立型カーボンナノチューブおよびグラフェン微小繊維の主な欠点は、それらの金属対応物と比較して抵抗率が高いことにある。微小電極が数ミリメートルより長い場合、抵抗率が大幅に増加し、これは低ノイズの記録に重大な課題をもたらす。対照的に、本開示に従って構築されたシステムは、湿式紡糸グラフェン微小繊維上の集電体として金属の薄いコーティング（例えば、200nmの範囲の白金）を適用することによって、この制限を克服し得る。この修飾により、グラフェンの電気化学的特性および金属の電子的性質が、機械的な柔軟性および高い表面積を制限することなく、微小電極に統合される。グラフェン繊維の低インピーダンスで多孔質の構造により、神経活動を記録および検出する能力を備えた比類のない電荷注入容量が得られ、薄い金属層は、記録された電子を微小電極に沿って効率的に伝達する。

30

40

【0019】

図1Aは、金属化グラフェン繊維微小電極を製造し、かつ微小電極を脳に埋め込むためのプロセスの概略図を提供する。特に、101では、液晶グラフェン酸化物（LGO）プロセスを使用して、酸浴105内に堆積される酸化グラフェン繊維103を生成する。浴を回転させ得109、その結果、グラフェン繊維（GF）111が生産される。GFは、より小さな断片113に切断され、かつ金属によってコーティングされて、金属コーティングされたグラフェン繊維115を形成し得る。次いで、金属コーティングされたグラフェン繊維117は、絶縁材料で覆われ得る。次いで、絶縁材料は、記録および/または刺激のために1つの導電性表面および/または鋭い先端が露出されるように切断され得る。1つ以上の絶縁された金属コーティングされたグラフェン繊維を組み立て119、脳に

50

埋め込み得る 1 2 1。断面図 1 2 3 は、絶縁された金属コーティングされたグラフェン繊維の金属層を通る電子 1 2 5 の動きを示している。

#### 【 0 0 2 0 】

図 1 B は、金属化グラフェン繊維微小電極を製造するための方法を示すフローチャートを提供する。第 1 のステップ 1 1 2 5 では、グラフェン繊維 ( G F ) は、湿式紡糸液晶酸化グラフェン ( L C G O ) プロセスを使用して製作される。L C G O を使用して G F を製作するためのプロセスの説明、およびグラファイトのさらなる固体状態剥離は、E s r a f i l z a d e h , D . , J a l i l i , R . , S t e w a r t , E . M . , A b o u t a l e b i , S . H . , R a z a l , J . M . , M o u l t o n , S . E . & W a l l a c e , G . G . ( 2 0 1 6 ) に記載されている。高性能多機能グラフェン - P L G A 繊維：生体模倣および導電性 3 D 足場に対する。Advanced Functional Materials, 2 6 ( 1 8 ) , 3 1 0 5 - 3 1 1 7、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。第 2 のステップ 1 1 2 7 では、製作された G F は、酸浴中で還元される。第 3 のステップ 1 1 2 9 では、金属層は、個々の G F フィラメントの少なくとも一部の上に堆積される。第 4 のステップ 1 1 3 1 では、( 堆積された金属層を有する ) G F フィラメントは、個々の断片に切断され、導電性ワイヤに取り付けられる。第 5 のステップ 1 1 3 3 では、個々の断片は、絶縁材料でコーティングされる。第 6 のステップ 1 1 3 5 では、G F フィラメントを含む微小電極の活動部位は、露出される 1 1 3 5。

#### 【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、G F 繊維は、結合剤材料を含まない。いくつかの実施形態では、G F コアは、約 1 0 μ m ~ 約 2 0 0 μ m の範囲の直径を有し得る。G F 繊維が結合剤を含まない実施形態は、従来の結合剤が構造を機械的に支持する処理を助けるので、構造の電子的および電気化学的性質に有害である場合があるため、より低コストで製造され、より良い性能を提供し得る。

#### 【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、絶縁コーティングは、パリレン - C などのポリマーベースのコーティングであり得る。絶縁コーティングは、約 2 μ m の厚さを有し得る。

#### 【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、金属層は、グラフェン繊維コアの表面上にスパッタリングされ得る。そのような実施形態では、金属層は、グラフェン繊維コアのすべてまたは一部を覆い得る。いくつかの実施形態では、金属層は、グラフェン繊維コアの表面積の半分を覆い得る。金属層は、白金、イリジウム、酸化イリジウム、白金イリジウム、および窒化チタンのうちの 1 つ以上を含み得る。いくつかの実施形態では、金属層は、約 1 0 n m ~ 約 5 0 0 n m の範囲の厚さを有する。いくつかの実施形態では、金属層は、グラフェン繊維コアの表面積の約 5 0 % ~ 7 5 % を覆い得る。金属層で覆われる表面積のパーセンテージは、製造プロセスのために調整され得る。

#### 【 0 0 2 4 】

さらに、図 1 B に示されるように、多層グラフェン繊維コアは、液晶中の高度に秩序化された酸化グラフェンシートのその場還元を実行することによって形成され得る。任意選択で、これは、酸を含有する凝固浴を使用して酸化グラフェンの液晶分散液を湿式紡糸するステップを含み得る。いくつかの実施形態では、酸は、次亜リン酸および/または塩化カルシウムであり得る。

#### 【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、グラフェン繊維は、優秀な柔軟性を有する 2 マイクロメートルを含む酸化グラフェンの単一シートを生産することによって生成され得る。次いで、白金などの導電性の低い金属を使用して、グラフェン繊維を金属化し得る。しかしながら、金属層は、電荷を収集することによって全体的な導電性を改善するために使用され得る。

#### 【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムおよび方法に従って構築されたグラフェン繊維は、メッシュ構造、アレイ、糸、ヤーン、鋭利な針などを含むがこれらに限

10

20

30

40

50

定されない多数の形状を形成し得る。あるいは、グラフェン構造は、記録および/または刺激するための任意の好適な形状にバイオプリントされ得る。

【0027】

上記の開示に従って構築された金属化グラフェン繊維の製作、特性評価、および生体電子用途は、以下の実施例に提供される。

【実施例】

【0028】

実施例1：高性能グラフェン繊維ベースの神経記録微小電極

前述の実施例は、上記の開示に従って、神経刺激および記録用途のために、Ptでコーティングされたグラフェン繊維から作製された柔軟で自立型の微小電極の製作、特性評価、および急性の生体内性能を実証している。GOの高い機械的強度と高い曲げ柔軟性との独自の組み合わせを利用して、堅牢で柔軟な繊維および高導電性電極を製作した。得られたグラフェン繊維白金コーティング(GF-Pt)された微小電極は、優秀な電気化学的性質を有し、かつインピーダンスが著しく低くて、電荷蓄積容量が大きいことを特徴とする。電圧過渡分析は、これらの微小電極が、 $10\text{ mC/cm}^2$ 以上の高電荷注入容量を有することを裏付ける。生体内用途の場合、微小電極アレイで7.10 dBおよび単一微小電極で9.2 dBの高い信号対雑音比(SNR)を神経記録中に達成した。Ptコーティングされたグラフェン繊維は、次世代の神経刺激を開発し、かつ神経スケールサイズ、低インピーダンス、高電荷注入容量、および高柔軟性を備えた微小電極を記録するための有利な材料であるように思われる。

【0029】

電極の製作

上記の方法および技法に従って、酸化グラフェンシートの高い機械的強度および超柔軟性により、処理を助ける任意の結合剤を必要とせずに、3次元(3D)構造の直接処理が可能になった。還元グラフェンシートを備えた自己組織化、多層、結合剤フリー、整列した微小繊維を達成するために、次亜リン酸を含有する凝固浴を使用して、酸化グラフェンの液晶分散液(LCGO)の湿式紡糸を行った。この凝固浴は、柔軟性および機械的強度を損なうことなく、紡糸プロセス中のGOを還元した。微小繊維の柔軟性は、慣習的な金属電極と比較して、異物反応を最小限に抑え、かつより大きな近位ニューロンの生存率を最大化するため、埋め込み型微小電極を製作するための重要な特性である。

【0030】

より詳細には、GFは、自家製のLCGOから湿式紡糸プロセスを介して製作した。製作された湿式LCGO繊維は、次亜リン酸溶液(水中50%、Sigma-Aldrich)を用いて80で24時間還元した。乾燥した個々のGFフィラメント(直径40 $\mu\text{m}$ )を、スパッタコーターを使用してGF-Ptを作製することにより、200 nmのPt層で堆積させた。調製したGF-Ptを8~12 mmの断片に切断し、導電性銀塗料(SPI supplies、Z05002-AB)を使用して銀線に取り付けた。次いで、銀線とともにGF-Ptをパリレン蒸着システムコーター(Specialty Coating System、PDS 2010ラボコーター)を使用してパリレン-Cでコーティングした。組み立てたGF-Pt-PCを液体窒素に約10分間浸し、微小電極の活動部位を鋭利なはさみでその先端を切断することにより露出させた。銀線の尾部にあるパリレンCは、導電性にするために試験前に除去した。繊維の電気伝導率は、ガルバノスタット電流源(Princeton Applied Research 363)およびデジタルマルチメーター(Agilent 34401A)を使用して、240 $\mu\text{m}$ のプロブ間隔で自家製の4点プロブ導電率セットアップを使用して測定した。準備されたままの繊維および電極は、走査型電子顕微鏡(JEOL JSM-7500FA)およびビデオ顕微鏡(Leica M2056A)によって直接検査した。

【0031】

図2は、これらのグラフェン微小繊維の柔軟性を示している。図2のパネルAに示されるように、グラフェン微小繊維は、止め結び201を結び付けるのに十分な柔軟性がある

。図2のパネルBおよびCは、それぞれ19～23ゲージのノズルを使用することにより、直径 $20 \pm 3 \mu\text{m}$ ～ $40 \pm 5 \mu\text{m}$ のグラフェン微小繊維の走査型電子顕微鏡（SEM）画像を示している。これらの繊維の断面を比較すると、直径が大きいものは、乾燥後にシート間スペースでより不規則な形状を形成する傾向があることが示唆される（図2のパネルBの矢印で示される直径の大きい典型的な繊維のポイドによって示される）。これは、乾燥プロセス中の深刻な収縮を示している場合があり、それにより $40 \pm 5 \mu\text{m}$ の場合の $52 \pm 0.3 \text{ S/cm}$ と比較して、 $20 \pm 3 \mu\text{m}$ 繊維（ $205 \pm 16 \text{ S/cm}$ ）の導電率が高いことを説明できる。

#### 【0032】

図2のパネルDは、図2のパネルCからの拡大SEM断面を示しており、グラフェン微小繊維の整列した高度に組織化された特徴的な特徴を示している。何百もの個々のグラフェンシートを凝固浴中に一緒に崩壊し、グラフェン繊維アセンブリ中に多層コアを作成する。図2のパネルDに提示された典型的な繊維の断面の高倍率SEM画像は、グラフェンシート層の特に整列した特徴を示している。ここで、液晶状態の完全に秩序化された多層GOシートのその場還元は、緩和相を防ぐことによって形態のランダム化を抑制した。実際、固有のLC順序を維持し、GO微小繊維の高度に組織化されたアセンブリが可能になった。さらに、その場還元により、シートのあらゆる制御されていない再積み重ねが制限された。その結果、完全に秩序化された多孔質の構造を得た。そのような還元グラフェン繊維は、電解質へのアクセスおよび得られた電極へのイオン拡散を促進した最大約 $2.21 \times 10^2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ の極めて高い表面積を提供した。

#### 【0033】

図2のパネルEは、白金コーティングおよび長さの関数としてのグラフェン微小繊維の電気抵抗率を示している。示されるように、抵抗は、繊維の長さとともに増加する。さらに、GF-Pt電極は、GF電極よりも低い抵抗を示す。これらの微小繊維の電気抵抗は、長さが約0.5cmから5cmに増加するにつれて、約2から20kΩに増加するその長さの影響を受けた。抵抗率に対する繊維の長さの影響を最小限に抑え、かつ微細な神経の信号の記録を容易にするために、微小繊維の片側を最大約200nmの厚さのPt層（GF-Pt）でスパッタコーティングした。Ptコーティングにより、導電率が $205 \pm 16 \text{ S/cm}$ から $460 \pm 30.3 \text{ S/cm}$ に大幅に増加した。さらに、Ptが集電体として機能するため、微小繊維の長さによる抵抗率の増加は、それほど有害ではなくなった。抵抗率の最小化は、ノイズ低減、記録の安定性、および効果的な電気刺激を達成するために特に望ましい。

#### 【0034】

微小電極は、液体窒素浴で先端を鋭く切断する前に、個々の各白金化微小繊維を約 $2 \mu\text{m}$ の絶縁ポリマーコーティング（パリレン-C、GF-Pt-PC）で絶縁することによって製作し、電気化学的活動部位として露出した先端のみを残した。パリレン-Cは、その高い誘電性質、生体適合性、ピンホールフリーの均一なコーティング、および神経プロテゼのためのその一般的な使用のために選択した。比較のために、裸のグラフェン繊維（つまり、Ptコーティングなし）から作製された微小電極を製作した。さらに、ポリマーコーティングプロセスによりグラフェン微小繊維の堅牢性が増加したが、止め結びを結び付けることにより実証されるように柔軟性も改善した。

#### 【0035】

図2のパネルF、G、およびHは、各コーティングステップ後の典型的な微小繊維のSEM画像を示している。特に、パネルFは、GF電極の外面のSEM画像である。パネルGは、PtでコーティングされたGF電極の外面のSEM画像である。パネルHは、Ptでコーティングされ、かつパリレン-Cで絶縁されたGF電極の外面のSEM画像である。高解像度のSEM顕微鏡画像で証明されるように、Ptコーティングおよびパリレン-Cコーティングの両方が微小繊維の周りに薄層を形成し、多孔質構造および先端の高表面積を保持した（図2のパネルI、J、K、およびLを参照）。表面積が大きいいため、記録感度が高く、1Hz～10kHzで低インピーダンスの大きな電荷注入容量が得られる。

特に、パネルIおよびJは、GF-Pt電極の断面SEM画像を示し、パネルKおよびLは、最終的な微小電極の先端のSEM画像を示している。

#### 【0036】

##### 電気化学的特性評価

生体電気作用の刺激および記録中に、電極は、電解質中のイオン電流から測定システム中の電流への変換の機能を実施する。電極と生体組織との間のインターフェースの高い電気インピーダンスは、信号対雑音比に悪影響を及ぼし、信号の歪みを増加させる可能性がある。これは、寸法が縮小されるため、微小電極にとって特に非常に重要になる。図3は、電気化学的インピーダンス分光法(EIS)、サイクリックボルタンメトリー(CV)、ならびに電荷蓄積容量および電荷注入限界の計算によって評価されたグラフェン微小電極の電気化学的性能を示している。

10

#### 【0037】

電気化学インピーダンス分光法(EIS)およびサイクリックボルタンメトリー(CV)は、室温でCHI 660E電気化学ワークステーション(CH Instrument s)を用いて、リン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH7.4、Sigma-Aldrich)中で実行した。作用電極として試験サンプル、対電極として白金シート、および参照電極としてAg|AgClによる3電極セルシステムを用いた。CVは、10~50000mV/sのスキャン速度で-0.2~0.8Vの電圧で記録した。各サンプルを3~5サイクルで試験し、陰極電荷蓄積容量を100mV/sのスキャン速度で最後のサイクルで記録された経時的な電流の積分から計算した。-1.6~1.6Vの掃引を実行して、GF-Pt-PC電極の水ウィンドウ(例えば、電気分解のしきい値)を決定し、鋭い電流ピークが検出されたときに水の酸化および還元電位を決定した。EISは、1-10<sup>4</sup>Hzの周波数の間で実行し、比インピーダンスを10<sup>3</sup>Hzで計算した。

20

#### 【0038】

図3のパネルAは、微小電極のインピーダンス係数を示している。微小繊維を備えた同様の直径のPtワイヤから作製された電極も製作し、対照として試験した。EIS分析は、グラフェン微小電極のインピーダンスが、試験された周波数範囲(1Hz~10kHz、パネルA)でPt電極よりも約2桁低いことを示した。特に、1kHzでのインピーダンスは、Pt電極の50分の1以下であった(約50k対約300k)。グラフェン微小電極のインピーダンスにおけるこの大幅な還元は、完全に秩序化されかつ分離されたグラフェンシートの利用可能な表面積の増加の結果であった。さらに、Pt修飾された微小電極(1kHz)のインピーダンスは、ニートグラフェンおよびPt微小電極よりもそれぞれ約5倍および約300倍低かった。グラフェン微小繊維上に(集電体として)Ptの薄層を追加すると、強力な相乗効果が得られ、インピーダンスの低い堅牢で優秀なハイブリッド微小電極につながる。

30

#### 【0039】

図3のパネルBは、微小電極のインピーダンスの位相角を示している。刺激中の理想的に分極可能な電極では、通過する電荷は、いかなるファラディック反応ではなく、静電容量に完全に起因する。図3のパネルBに示されるように、微小電極の位相遅れは、露出した先端での電気化学的相互作用が、微小電極先端の二重層の上の容量性充放電プロセス(吸着制御プロセス)によって制御されることを示している。

40

#### 【0040】

図3のパネルCは、PBS溶液中の10mV/sでの微小電極のCVを示している。CVは、電極-溶液の界面で静電容量およびファラデー成分を測定するためのシンプルで高速な技法である。図3のパネルCは、この実施例で準備された異なる電極のサイクリックボルタンメトリー(CV)を比較している。両方のグラフェンベースの微小電極は、長方形に近いCV曲線を示したが、Pt修飾された微小電極の電流は、他の電極よりも大幅に高かった。この改善は、電解質イオンの効果的な拡散を可能にするGO電極の高表面積と結合したPtコーティングの高導電率の統合とそれに続くPt層を介した容易な電子伝達によるものであった。さらに、CVから計算されたPt修飾されたGO微小電極の陰極電

50

荷蓄積容量は、 $946 \pm 140 \text{ mC} / \text{cm}^2$ であり、Pt電極よりも約3桁高く、未修飾のグラフェン微小繊維よりも約2倍高い値であった。

【0041】

図3のパネルDは、微小電極の水ウィンドウを示し、図3のパネルEは、微小電極の過渡電圧試験を示している。また、図3のパネルFは、文献に報告された神経インターフェース電極と比較して、本明細書に記載の方法に従って構築された微小電極の電荷注入容量、比インピーダンス、および幾何学的面積の比較を示している。

【0042】

特に、過渡電圧測定は、室温でPBS溶液(pH7.4、Sigma-Aldrich)にセットアップされた2つの電極で実行した。デジタル刺激装置DS800およびA365アイソレーターユニット(World Precision Instruments)によって、幅 $100 \mu\text{s}$ 、相間開回路電位 $20 \mu\text{s}$ 、および $250 \text{ Hz}$ での短絡 $2.78 \text{ ms}$ の対称電荷平衡型カソードファーストの二相電流パルスを生じた。印加された電流パルスに応答する活動微小電極の両端の電圧波形は、e-corderシステム(eDAQ)で記録した。最大負分極電位( $E_{mc}$ )は、総過渡電圧から初期アクセス電圧( $V_a$ )を差し引くことによって計算した。電荷注入容量は、 $E_{mc}$ が次の式から水還元限界に達したときに決定した：

【数1】

$$Q_{inj} = \frac{I_c \cdot t_c}{GSA}$$

式中、 $Q_{inj}$ は、電荷注入限界容量であり、 $I_c$ は、印加される電流パルスであり、 $t_c$ は、パルス幅であり、 $GSA$ は、幾何学的表面積である。

【0043】

電気刺激は、興奮性細胞の膜を脱分極させることによって機能的応答を開始し、これは、電極間のイオン電流の流れによって達成される。電圧過渡測定は、電極-電解質界面全体の最大の正および負の分極値を決定し、かつ水の電気分解限界を超えることなく刺激パルスに注入することができる最大電荷を推定するために行った。電位を広いウィンドウで掃引して、電極、電解質、および水が酸化も還元もされない電圧範囲を得る。刺激中の微小電極の安全な分極を確実にするために、微小電極のCVは、 $-1.6 \text{ V} \sim 1.6 \text{ V}$ の電圧限界の間の電位を掃引することによって記録した(対Ag/AgCl電極)。生物学的システムでは、この電位範囲は、主に水の酸化および還元によって決定する(水ウィンドウ)。水ウィンドウは、電流の急激な増加によって示される水の酸化および還元電圧によって制限した。この実施例では、GFベースの微小電極の水ウィンドウが $-1.0 \text{ V} \sim 0.9 \text{ V}$ に見られた(図3のパネルD)。図3のパネルEの上部は、典型的な入力二相電流パルス( $300 \mu\text{A}$ および $20 \mu\text{s}$ の遅延)を示している。電流パルスに対する電位エクスカッション応答(図3のパネルEの下部を参照)は、電解質のオーム抵抗による、アクセス電圧( $V_a = -1.35 \text{ V}$ )として知られる電位の初期の急速な変化を示し、その後、ゆっくりと上昇する分極電圧( $V_p = -0.90 \text{ V}$ )が続き、これは、電極/電解質界面の充電によるものである。 $V_p$ は、過渡状態( $V_t = -2.25 \text{ V}$ )の最大負電圧から $V_a$ を差し引くことによって計算した。

【0044】

二相パルスの位相の一方の分極電圧は、電荷注入限界を決定するために使用し、分極電圧が $1.0 \text{ V}$ に達するまで電流振幅を連続的に増加させることによって得た。電荷注入容量は、水の還元電位(図3のパネルE)の前の $V_p = 0.90 \text{ V}$ で計算し、GF-Pt電極で $10.34 \pm 1.5 \text{ mC} / \text{cm}^2$ であり、Ptよりも約3桁高い値であり、かつ未修飾のグラフェン微小繊維の約2倍の大きさである。

【0045】

GF-Pt微小電極の電荷注入容量は、最もよく報告されているすべての電極材料よりも大幅に高く、これには、図3のパネルFに提示するように、Pt、カーボンナノチュー

10

20

30

40

50

ブ繊維、導電性ポリマーコーティング、金属窒化物、および酸化物などが含まれるがこれらに限定されない。Pt層の電気抵抗率が低い秩序化されたグラフェンシートの相乗効果により、大幅に強化された電気化学的性能とともにこの顕著な電荷注入容量をもたらした。

【0046】

耐久性の特性評価

図4は、本明細書で説明する方法に従って構築された電極の耐久性を示している。経時的に、慢性的に埋め込まれた電極は、材料の劣化、およびデバイスの故障の原因となるパリレンなどの絶縁体コーティングの層間剥離によって悪影響を受ける。GF-Pt微小電極の寿命は、PBS溶液中でサイクリックボルタムメトリーを使用して試験した。図4のパネルAは、50 mV/sのスキャン速度での1000回の電気化学サイクル後の微小電極の代表的なSEM画像を示している。示されるように、電極先端は、いかなる顕著なグラフェン劣化またはパリレン層間剥離も示さなかった。パリレンコーティングは、Ptおよびシリコンなどの硬い下にある電極から剥がれることがよくある。しかしながら、ここでは、下にある繊維の柔軟性および柔らかさとともにパリレンとグラフェン微小繊維との間の強力な界面接着が、パリレンコーティングの顕著な安定性をもたらした。

10

【0047】

図4のパネルBにより、長期安定性試験にわたって電気化学的性能に目立った変化がなかったことを裏付ける。

【0048】

さらに、グラフェン微小繊維および微小電極の安定性を、繰り返し曲げて、PBS溶液に長期間浸漬することに対して評価した(図4のパネルC、D、E、およびFに示される)。特に、図4のパネルCは、ストレートGF-Pt繊維電極と曲げられたGF-Pt繊維電極との間(105.2 ± 2.7対104.4 ± 3.7 S/cm)、または200回曲げた後(105.2 ± 2.7対102.7 ± 2.5 S/cm)のコンダクタンスに明らかな違いがなかったため、グラフェン微小繊維が曲げサイクル試験で顕著な安定性を示すことを実証している。さらに、図4のパネルDは、PBSに2週間浸漬した後でも、約8%の導電率の低下しか観察されなかったことを示している。微小電極はまた、200回の360°折り畳み(図4のパネルE)および2週間のPBSへの浸漬(図4のパネルF)を伴う非常に厳しい耐久性および疲労試験の後、それぞれ77.6%および52.2%の電荷蓄積容量を維持できた。

20

30

【0049】

本開示の実施形態に従って構築された微小電極を含む、実施例1の神経インターフェース電極の電気化学的性能は、以下のように要約され得る：

【表1】

材料	幾何学的表面積 (μm <sup>2</sup> )	インピーダンス (1kHzでkΩ)	比インピーダンス (MΩ μm <sup>2</sup> )	電荷蓄積容量 (mC/cm <sup>2</sup> )	電荷注入容量 (mC/cm <sup>2</sup> )
グラフェン繊維 (GF)	169±25	50±7.5	19.5±2.9	798±110	8.7±1.3
Ptコーティングされた繊維 (GF-Pt)		10±1.3	11±1.5	946±140	10.5±1.5

40

【0050】

外科的(生体内)埋め込みおよび神経活動の記録

実施例1に関連して、本開示に従って構築された電極を、ラットに外科的に埋め込んだ。

【0051】

すべての手順は、2017年の1月6日にテキサス大学ダラス校で施設内動物管理使用委員会によって承認された動物使用プロトコル15-19に準じて実行した。ロングエバンズラットをこの研究のために選択し、標的は、左前足の制御に関連する領域の運動皮質内であった。動物は、酸素中に混合された2%のイソフルランを使用して麻酔し、続いて

50

、ケタミン (65 mg / kg)、キシラジン (13.33 mg / kg)、およびアセプロマジン (1.5 mg / kg) からなるコホートを腹腔内投与した。動物は、Kopf Model 900 小動物定位固定装置 (David Kopf Instruments, CA, United States) に固定した。デキサメタゾン (2 mg / kg) を肩越しに皮下投与して炎症反応を軽減し、続いて頭皮切開部位直下に 0.5% のリドカイン (0.16 cc) を皮下投与した。頭蓋骨を露出させた後、2.0 mm x 2.0 mm の開頭術を作成し、プレグマから 2.5 mm 吻側および 2.5 mm 外側の本発明者らの埋め込みの初期座標を中心とした。その領域中の硬膜は、硬膜ピックとそれに続くマイクロハサミを使用して反射し、皮質の表面が露出した。7.4 pH の滅菌生理的リン酸緩衝液を頻繁に適用して、領域全体を液体下に保った。

10

#### 【0052】

この概念実証研究では、5つのインプラントを選択した。第1のインプラントは、白金の薄層でコーティングされ、パリレン-C絶縁体 (GF-Pt-PC) でカプセル化されたグラファイト繊維で構成された直径 40 μm の微小電極4本の束からなつた。第2の微小電極は、パリレン-C絶縁体 (GF-PC) でカプセル化された直径 40 μm の単一のグラファイト繊維導体からなつた。第3の微小電極は、直径 40 μm の単一の GF-Pt-PC 微小電極であった。最後の2つの微小電極は、直径 20 μm の GF-PC および GF-Pt-PC からなつた。

#### 【0053】

4つの微小電極の束を、モデル 2650 油圧マイクロポジショナー (David Kopf Instruments, CA, United States) の微小電極ホルダーに装填した。微小繊維ワイヤ束の先端を、それらが埋め込み座標で皮質表面に接触するまで下げ、マイクロポジショナーの距離カウンターをリセットし、デバイスを 1000 μm / s の速度で運動皮質に下げた。ワイヤの座屈が始まった場合、埋め込みを直ちに停止し、速度を 100 μm / s に低下させた。対極として機能するように、滅菌ステンレス鋼皮下注射針をラットの尾部に挿入した。最適な埋め込み深さは、1500 μm であった。

20

#### 【0054】

各急性記録は、OmniPlex D ニューラルデータ取得システム (Plexon Inc., TX, United States) を使用して少なくとも 10 分間実行した。単一神経ユニットが取得されなかった場合、本発明者らは、埋め込みの深さを 200 μm 増やし、別の記録を実行した。本発明者らは、単一ユニットでの成功した記録を取得するまで、またはワイヤインプラントが最大深度 2000 μm に達するまで、埋め込みの深さを増やし続けた。記録後、微小繊維ワイヤ束を脳から完全に外植し、マイクロポジショナーをイソプロパノールで消毒し、別のワイヤをマイクロマニピュレーターに装填した。追加の各微小繊維微小電極を、別々の場所に埋め込み、第2の埋め込み位置は、初期の埋め込み場所から 200 μm 吻側に位置した。第3の微小電極を第2の場所から 200 μm 外側、次の微小電極を第3の場所から 200 μm 尾側、最後の微小電極を第3の場所から 100 μm に埋め込んだ。その後のすべての微小電極について、同一の記録手順に従った。調査後、呼吸停止が起こるまで適用された 5% のイソフルラン蒸気の過剰摂取を使用してラットを安楽死させた。

30

40

#### 【0055】

OmniPlex D から得た広帯域記録を、Plexon のオフラインソーターソフトウェアを使用してさらに処理した。広帯域信号を、カットオフが 550 Hz に位置する 4 次バターワースフィルターを使用してフィルター処理して、コモンモード参照を使用してノイズを排除した。単一ユニットを選択するためのしきい値は、1500 ps の波形持続時間でピーク高さから 3 に設定した。しきい値の交差からソートされた波形を、ソフトウェアに組み込まれているバレーシーキングアルゴリズムを使用してさらに評価した。ノイズエンベロープは、しきい値を元の信号の ±3 に設定し、かつしきい値を超えた 250 ミリ秒前および 750 ミリ秒後に波形セグメントを除去して得た。単一ユニット波形の平均振幅は、ゼロ交差からの最大の負のたわみによって決定した。報告された信号対雑

50

音 ( S N R ) 比を、次の式を使用してデシベルで計算した：

【数 2】

$$SNR = 10 \log_{10} \left( \frac{A_{\text{信号}}}{A_{\text{ノイズ}}} \right)^2.$$

【 0 0 5 6 】

概念実証の神経記録を生体内で実証するために、最初に単一微小電極を成体ラットの  
 脳皮質に埋め込んだ。完全に秩序化されたグラフェンシートを含有するセルラースケール  
 の微小電極 ( 2 0 μ m ~ 4 0 μ m ) は、合計 1 0 分間の神経信号を記録するために、挿入  
 され、かつ正確に位置付けられる十分な機械的堅牢性および鋭さを本発明者らに提供した  
 。図 5 のパネル A は、埋め込まれた微小電極の画像を示している。さらに、生体内試験は  
 、4 つの先端露出した微小電極のアレイを使用し、ワイヤの先端間を約 1 m m に整列させ  
 て、接着した ( 図 5 のパネル B に示される ) 。生体内試験の前に、個々の各微小電極の C  
 V を記録して ( 図 5 のパネル C に示されるように ) 、好適な電気化学的性能を裏付けた。  
 束ねられた微小電極を挿入している間、4 つの単一微小電極のうち 3 つのみが運動皮質に  
 浸透した。第 4 の微小電極は、座屈し、その後脳に入らなかったため、記録から排除した  
 。3 つの貫通微小電極のうち、2 つは、皮質の表面から測定した 1 5 0 0 μ m の束の深さ  
 で単一ユニットの活動を示した。図 5 のパネル D は、ブレグマから 2 . 5 m m 吻側および  
 2 . 5 m m 外側の場所でロングエバンスラットの運動皮質に 1 . 5 m m 挿入された G F -  
 P t - P C の束ねられた微小電極のうち 2 つから得られた 1 0 秒の 5 5 0 H x ハイパス  
 フィルター処理された電気信号を示している。図 5 のパネル E は、G F - P t - P C が埋  
 め込まれた微小電極のうち 1 つから 1 0 分間の記録時間にわたって得られた 1 5 4 3 個  
 の単一ユニット信号を示している。波形の中央にある暗い線は、振幅が - 7 0 . 2 μ V で  
 ピークツーピーク値が 1 3 0 . 5 μ V の平均的な単一ユニット信号を表している。第 2 の  
 活動電極 ( 図示せず ) のユニットは、同様の形状を有し、平均振幅がわずかに低い - 5 4  
 . 3 μ V であり、ピークツーピーク値は、8 9 . 7 μ V である。2 つの微小電極の S N R  
 は、7 . 1 0 d B および 4 . 4 3 d B である。

【 0 0 5 7 】

図 6 に示されるように、追加の単一 G F - P t 微小電極を、皮質表面から 1 5 0 0 μ m  
 の深さまで埋め込み、2 0 0 0 μ m の深さまで埋め込まれた G F のみの微小電極と比較し  
 た。単一微小電極から得られた信号を、図 5 に示す束ねられた微小電極と比較して、形状  
 および持続時間の両方で同様の単一ユニット波形を生産した。G F - P t 微小電極は、そ  
 れぞれ、- 7 5 . 2 μ V および - 6 9 . 3 μ V の振幅の 2 つの単一ユニット、1 8 3 . 4  
 μ V および 1 2 3 . 6 μ V のピークツーピーク電圧、ならびに 9 . 2 d B および 8 . 4 d  
 B の信号対雑音比 ( S N R ) を表示した。本発明者らの G F - P t 微小電極信号はすべて  
 、以前に報告されたものよりも大きい記録信号を実証している。一方、G F のみの微小電  
 極は、より弱い性能を示した。信号振幅は、- 9 3 . 9 μ V、ピークツーピーク電圧は、  
 1 4 6 . 4 μ V であったが、ノイズがかなり大きく、S N R が 3 . 0 d B 低下した。

【 0 0 5 8 】

したがって、極めて薄い白金コーティングを備えた堅牢で柔軟性のある自立型グラフェ  
 ン繊維ベースの微小電極アレイは、低インピーダンス、高表面積、および高電荷注入容量  
 を備えた高性能神経記録微小電極を実証している。生体内研究は、ラット脳皮質に埋め  
 込まれた微小電極が、著しく高い信号対雑音比 ( S N R ) で神経活動を検出できることを  
 示している。

【 0 0 5 9 】

カーボンナノチューブおよびグラフェンは、神経信号を効果的に捕捉するための、白金  
 、イリジウム、窒化チタン、および酸化イリジウムなどの神経インプラントデバイスとし  
 て使用される他の導電性材料の代替プラットフォームとして成功裏に実証されている。実  
 験例は、高い信号対雑音比を備えた単一ユニット記録能力のための白金修飾されたグラフ  
 ェン微小繊維の能力を実証した。さらに、これらの電極によって捕捉された記録されたコ

10

20

30

40

50

ニットは、他の小さな微小電極プラットフォームで報告されたものと異ならなかった。

【 0 0 6 0 】

図 7 は、様々な繊維の断面の SEM 画像を提供し、直径の大きい繊維は、より小さい繊維よりも収縮が大きいいため、試行中に大きなポイドを形成する傾向があることを示している。

【 0 0 6 1 】

図 8 は、Pt コーティングの厚さが異なる薄いグラフェン繊維の導電率を示す棒グラフを提供する。

【 0 0 6 2 】

図 9 は、Pt コーティングあり (GF - Pt - PC) および Pt コーティングなし (GF - PC) の微小電極を製作するためのプロセスを示している。図 9 に示されるように、任意選択で、グラフェン繊維 (GF) 901 を白金でコーティングして、このように Pt コーティング (GF - Pt) 909 を備えた微小電極を形成し得る。GF または GF - Pt は、それぞれ、ステップ 903 および 911 に示されるように、銀線に取り付けられ得る。さらに、パリレンコーティングは、それぞれステップ 905 および 913 で適用され得る。さらに、ステップ 907 および 915 に示されるように、各微小電極の先端を露出させ、銀線テール上のパリレン C を接続のために除去する。

【 0 0 6 3 】

図 10 は、GF - Pt の光学顕微鏡画像を提供する。図に示されるように、GF - Pt は、非常に柔軟性があり、簡単に結ぶ 1001 ことができ、かつ撚り合わす 1003 ことができる。

【 0 0 6 4 】

図 11 は、本明細書の開示に従って構築された電極の追加の電気化学的特性評価を提供する。特に、図 11 のパネル A は、GF - Pt - PC の CV 測定を提供して、グラフェンの二重層にわたる動的挙動を決定する。さらに、図 11 のパネル B は、ピーク電流が低スキャン速度でのスキャン速度に線形に依存し、線形回帰方程式が  $y = 3.2659 * 10^{-8} + 3.0127 * x$  ( $R^2 = 0.980$ ) であることを示しており、これは、GF - Pt - PC の表面吸着制御プロセスを示唆している。さらに、図 11 のパネル C は、ピーク電流が高スキャン速度でのスキャン速度の平方根に線形依存し、線形回帰式が  $y = -1.6698 * 10^{-8} + 5.4659 * x$  ( $R^2 = 0.999$ ) であることを示しており、これは、拡散制御プロセスを示唆している。

【 0 0 6 5 】

図 12 は、成体ラットの大脳皮質に単一ユニットを埋め込んだときの記録プロセスのスナップショットを提供する。示されるように、ユーザは、グラフィカルユーザインターフェース 1201 を使用して、特定の電極 1203 から記録を選択し得る。さらに、グラフィカルユーザインターフェース 1201 は、ユーザが、波形 1205、波形データのクラスター 1207、電極チャンネル情報 1209、タイムライン 1211、および波形 1213 を見ることが可能にし得る。

【 0 0 6 6 】

図 13 は、4 つのアレイ電極を使用した生体内皮質神経記録を示している。示されるように、電極は、脳の層 3 ~ 6 に挿入し得る。各電極に 1 つずつ、4 つの波形を記録し得る 1303、1305、1307、および 1309。複合波形 1301 を決定し得る。

【 0 0 6 7 】

図 14 は、血圧を下げる分子であるニトロプルシド (NPS) の投与によって誘発された脾臓神経からの内因性活動の記録を示している。示されるように、本明細書に記載の開示に従って作製されたグラフェン繊維電極は、脾臓神経の末端枝のうちの 1 つからの自発的な神経活動を記録することができる。パネル 1401 に示されるように、試験は、2 分間のベースライン活動の記録を伴う。その後、ニトロプルシド (NPS) の静脈内注射により、血圧を下げる血管拡張薬が投与される (緑色の矢印は、注入の時間を示す)。注入の約 1 分後、高振幅の神経活動をグラフェン電極から記録する (白い垂直トレース)。オ

10

20

30

40

50

フライン分析は、その誘発された活動における2つの特定の波形を示している。1つの波形は、NPSの後に367回出現し、1000秒前に発生率が高く、かつ周波数が比較的低い1403で示され、1409で示されているもう1つの波形は、より低い周波数で52回出現した。また、パワースペクトル信号14-7および1413、ならびに周波数1405および1411もそれぞれ示されている。図14は、この小さな(60~80マイクロメートル)サイズの神経に巻き付けられたグラフェン繊維電極を使用して、脾臓における生理学的に関連する神経信号を記録する能力を実証している。

【0068】

図15は、グラフェン繊維電極を使用して、電圧の増加でのフック電極で誘発された神経活動の記録を示している。特に、記録は、市販のフック電極(矢印)を使用して迷走神経に印加される電圧(1.2、1.4、1.6、1.8、および2V)1501の増加での電気刺激によって誘発される脾臓神経からの複合活動電位の記録である。グラフェン繊維電極を使用して、脾臓神経で2つの異なる波形を識別し、1つは、上部パネル1505に、もう1つは下部パネル1507に示されており、それは、より高い電圧の刺激にตอบสนองして増加する数で現れた1503。このデータは、本開示に従って構築されたグラフェン繊維電極が小神経における神経信号を記録する能力を裏付ける。

10

【0069】

図16は、グラフェン-Pt繊維電極を脾臓神経叢に結び付けて神経活動を記録または刺激することによる、グラフェン-Pt電極の脾臓神経の小さな末端枝への係合を示している。1601は、小さな末端枝を視覚化するためにわずかに持ち上げた1605ラットの脾臓の写真である(1603を挿入)。枝のより高い倍率が右1603に示されており、血管が見られ、下部にいくつかの脂肪細胞がある。神経のメッシュ(つまり、プレキシ)が血管に巻き付き、脾臓に神経制御をもたらすことが知られている。図16の写真は、神経活動を記録するために血管/プレキシに巻き付けられたグラフェン繊維電極1607(本明細書に記載の本開示に従って作製された)も示している。

20

【0070】

図17は、本開示によるグラフェン-Pt電極を使用して末端脾臓叢から記録された様々なタイプの神経活動を表す異なる波形を示している。グラフェン繊維電極で記録された9つの異なる波形を示している。

【0071】

図18は、本書の説明に従って作製されたグラフェン繊維電極の電気刺激能力を示している。2つのグラフェン繊維電極をラットの坐骨神経に挿入し、1つは、カソードとして機能し、もう1つは、アノードとして機能する。一連の電気パルスグラフェン繊維電極を通して適用し、誘発された活動をフック電極を使用してより近位のセグメントから記録した。この図は、電気パルス1801(黄色の矢印)を増やすと、本発明者らが、3つの異なるタイプの神経信号を動員できたことを示しており、それぞれが1803、1805に示される異なるニューロン集団からであり、3つの異なる波形1807に対応する。このデータは、本開示のグラフェン繊維電極が電気刺激を通して特定の神経活動を誘発することができることを裏付ける。

30

【0072】

実施例2

電極の製作

本明細書に記載の技術によれば、直径20マイクロメートルのグラフェン繊維電極、直径20マイクロメートルの白金でコーティングされたグラフェン繊維電極、直径40マイクロメートルのグラフェン繊維電極、および白金でコーティングされ、かつ40マイクロメートルの直径を有するグラフェン繊維電極を製作した。

【0073】

図19は、様々な繊維の長さでの4つのタイプのグラフェン繊維電極の抵抗を示している。示されるように、抵抗率は、繊維の長さの増加とともに増加する。

【0074】

40

50

### 電気化学的特性評価

図 20 は、Pt、グラフェン微小繊維、および Pt コーティングされたグラフェン微小繊維 ( $D = 20$  および  $40 \mu\text{m}$ ) から作製された様々な微小電極の電気化学的特性評価を提供する。図 20 のパネル A は、微小電極のモジュラスインピーダンスを提供する。図 20 のパネル B は、微小電極のインピーダンスの位相角を提供する。図 20 のパネル C は、PBS 溶液中の  $10 \text{ mV s}^{-1}$  の微小電極の CV を提供する。図 20 のパネル D は、微小電極の水ウィンドウを提供する。図 20 のパネル E は、微小電極の過渡電圧試験を提供する。図 20 のパネル F は、電荷注入容量、 $1 \text{ kHz}$  での比インピーダンス、および従来の神経インターフェース電極を用いた修飾された微小電極の幾何学的面積の比較を提供する。

10

【0075】

電気化学的特性評価を、実施例 1 に関連して上で論じた技術に従って実行した。

【0076】

### 耐久性の特性評価

図 21 は、修飾された微小電極 (GF - Pt - PC - 40) の電気化学的耐久性の特性評価を示している。特に、図 21 のパネル A および B は、 $50 \text{ mV s}^{-1}$  のスキャン速度で  $1000 \text{ CV}$  サイクルの前 (パネル A) および後 (パネル B) の典型的な修飾された微小電極の断面 SEM 画像を示し、これは、微小電極の高い安定性を示している。図 21 のパネル C は、 $50 \text{ mV s}^{-1}$  のスキャン速度で  $1000$  サイクルの修飾された微小電極の延長された CV を示している。図 21 のパネル D は、修飾微小電極の長期にわたるパルス安定性を示している。図 21 のパネル E は、連続した曲げサイクル後の修飾されたグラフェン微小繊維の電気伝導率を示しており、0 は、ストレート繊維を指し、1 は、 $360^\circ$  曲げられた繊維を指す。図 21 のパネル F は、PBS を長期間浸漬した後の修飾されたグラフェン微小繊維の電気伝導率を示している。図 21 のパネル G および H は、それぞれ連続曲げおよび長期間の PBS 浸漬後の修飾された微小電極の CV を示している。繰り返し回数は、4 つの独立した試験である。

20

【0077】

耐久性の特性評価を、実施例 1 に関連して上で論じた技術に従って実行した。

【0078】

実施例 3 : グラフェン電極を使用した中枢および末梢神経系ニューロンの単一ユニット記録

30

機能的活動を解読するため、またはこの機能を調節するために電氣的に刺激するために神経系をインターフェースすることは、多くの科学的小および医学的応用用途を有する。神経インターフェースの設計に使用される材料は、単一ユニットの活動の高感度な記録を可能にする高い信号対雑音比 (SNR) を備えた低インピーダンス、および効果的かつ安全な神経刺激のための高い電荷蓄積容量 (CSC) を有することが望ましい。微小電極は、通常、白金 (Pt)、Pt / イリジウム、および酸化イリジウム電極を備えたシリコンで製作する。しかしながら、軟神経組織に埋め込まれたシリコンシャフトの微動は、異物反応を悪化させ、これらのデバイスの最終的な故障の一因となる。カーボンナノチューブでコーティングされた微小電極の代替使用は、それらの生体適合性ならびに高 CSC (約  $372 \text{ mC / cm}^2$ ) および低インピーダンス (約  $20 \text{ M}$ ) のために有望であるが、金属シャフトの剛性およびカーボンナノチューブコーティングの層間剥離は、これらの電極の慢性的な使用を制限する。酸化グラフェンの液晶分散液 (LCGO) からのグラフェン繊維の生産は、優れた電気化学的および機械的特性を実証した。本開示に従って構築された電極を、脳および末梢神経の活動を記録するために使用する。成体ラット ( $n = 5$ ) の運動皮質および坐骨神経に単繊維および多電極アレイを埋め込んだ。電極は、優れた SNR で、単一ニューロンユニットを効果的に記録した。一緒に、データは、脳および末梢神経活動の神経インターフェースのための神経内電極としてのグラフェン繊維の使用を支援する。

40

【0079】

電極の製作

50

図 2 2 は、本開示に従って構築されたグラフェン電極を示している。パネル A および B は、酸性凝固浴で L C G O を押し出し、その後パリレン C でコーティングして得られた 2 0 ~ 4 0 マイクロメートルのグラフェン繊維を示している。パネル C および D は、グラフェン繊維の走査型電子顕微鏡画像を示している。

【 0 0 8 0 】

外科的（生体内）埋め込みおよび神経活動の記録

図 2 3 に示されるように、グラフェン電極を、成体雌ラット 2 3 0 0 の運動皮質または坐骨神経に埋め込んだ。特に、金属化グラフェン電極マルチアレイ 2 3 0 3 を運動皮質 2 3 0 1 に埋め込んだ。さらに、単一金属化グラフェン電極 2 3 0 7 を坐骨神経 2 3 0 9 に埋め込んだ。グラフェン電極からの信号を記録システム 2 3 0 5 に送信した。

10

【 0 0 8 1 】

図 2 4 に示されるように、単一ユニット記録 2 4 0 0 を運動皮質から記録した。多電極を運動皮質の異なる深さに埋め込み、そのように単一ユニット記録を異なる皮質層から得た。

【 0 0 8 2 】

図 2 5 に示されるように、運動皮質および坐骨神経からの記録を、ラスタプロット 2 5 0 1、2 5 0 3 を使用してプロットし、3つの独立した軸索の活動を示した（図 2 5 のパネル B の P C A プロットに示されている）。さらに、スパイク間隔 2 5 0 7 をプロットした。

【 0 0 8 3 】

20

図 2 2 ~ 2 5 は、グラフェン微小電極が中枢神経系および末梢神経系の高性能インターフェースとして使用され得ることを示している。さらに、グラフェン繊維上の金属コーティングの適用は、優れた電気化学的特性が材料に伝わる。さらに、グラフェン繊維の多電極アレイの設計は、複数の単一ニューロンユニットを高感度性能で記録するための代替手段を表している。

【 0 0 8 4 】

実施例 4：白金化グラフェン繊維電極によって記録された迷走神経における神経内および神経外活動

迷走神経（V N）とのインターフェースにより、研究者は、その活動を解読および調節することが可能になる。V N 刺激に基づく F D A 承認の臨床治療には、薬剤耐性でんかんおよびうつ病が含まれ、迷走神経は、現在、病的肥満、耳鳴り、および脳卒中について調査されている。V N は、不均一な解剖学的組成（約 8 0 % の求心性神経および約 2 0 % の遠心性線維）を有し、これは、異なる生理学的刺激に独自の方法で応答する複雑な機能的電気生理学をもたらす。V N とインターフェースする従来の電極を、白金または白金イリジウムで製作し、感度を制限し、電荷注入容量が低い（ $Q_{inj}$ 、約 0 . 0 5 ~ 0 . 2 6  $mC/cm^2$ ）のに対して、カーボンナノチューブで製作された神経内電極は、有望である（C S C、約 3 7 2  $mC/cm^2$ 、1 2 . 5  $k$ ）。

30

【 0 0 8 5 】

実施例 4 では、優れた電気化学的特性（C S C および  $Q_{inj}$  は、それぞれ、約 9 4 7 および約 4 6  $mC/cm^2$ ）を有する酸化グラフェンの液晶分散物から得られた高性能白金化グラフェン繊維を、V N に埋め込み、それらを使用して、i ) 酸素張力における全身的低下、i i ) 静脈内ニトロプルシド治療によって誘導された平均動脈圧の低下、ならびに i i i ) 白金フック電極を使用した近位 V N 刺激に応答した誘発された活動中に神経外および神経内構成の両方で誘発された電気生理学的活動を記録する。特定の活動波形および活動パターンは、高い信号対雑音比（S N R 約 4 . 3）のベースライン条件での治療と相関していた。データは、V N とインターフェースするための神経外および神経内電極としての白金化グラフェン繊維の使用を支援する。

40

【 0 0 8 6 】

電極の製作

図 2 6 のパネル A は、電極の製作ステップを示している。特に、L C G O 2 6 0 1 と

50

それに続く凝固浴 2603 での押し出しを使用して、グラフェン繊維 2605 を開発し、切断し 2607、金属（つまり、白金）2609 でコーティングし、絶縁材料（つまり、パリレン - C）でコーティングして、GF - Pt 微小電極 2611 を形成する。微小電極の SEM 画像を提供する 2613。

#### 【0087】

電気化学的特性評価

図 26 のパネル B、C、および D は、Pt - PC ワイヤ 2619 と比較した、外径 20 および 40  $\mu\text{m}$  の PC (GF - Pt - PC) でコーティングされたグラフェン繊維のインピーダンス分光法 2615、位相角 2617、およびサイクリックボルタンメトリーを示している。

10

#### 【0088】

外科的（生体内）埋め込みおよび神経活動の記録

図 27 は、本開示の実施形態に従って構築された電極の外科的埋め込みを示している。特に、示されるように、電極は、成体雌ラット 2701 に埋め込まれる。グラフェン電極は、頸部迷走神経（VN）2709 中の神経外 2703（図 27 のパネル B を参照）または神経内 2705（図 27 のパネル C を参照）のいずれかに埋め込んだ。ラット 2701 は、手術および神経刺激 / 神経記録手順中に酸素化した。神経活動を誘発するために、迷走神経刺激（VNS）、ニトロプルシドの適用、および酸素還元 of 3 つの技法を使用した。迷走神経 2709 からの電気的活動を記録し、研究者 2711 に提供した。ニトロプルシドは、ラット 2701 の大腿静脈を介して投与した 2713。酸素化測定および / または

20

#### 【0089】

図 28 は、図 27 で説明した生体内試験のセットアップの結果、より具体的には、全身性ニトロプルシドによる低血圧によって誘発される迷走神経活動の結果の要約を提供する。特に、パネル A は、大腿動脈からのベースライン血圧測定および迷走神経に埋め込まれたグラフェン電極からの神経活動の記録を示している。図 28 のパネル B は、誘導された低血圧によって誘発された迷走神経に埋め込まれたグラフェン電極からの血圧測定および神経活動の記録を示している。パネル C は、ニトロプルシドおよびリドカインの投与に対する神経活動の応答をラスタプロットで示している。パネル D に示されるように、2 つの別々の波形を識別した。

30

#### 【0090】

図 29 は、電気刺激による誘発された活動を示している。図 29 の上のプロットに示されるように、複合活動電位の周波数および振幅は、強度の関数として増加した。下のパネルに示されるように、1 つの波形およびそれに対応するラスタプロットを識別した。

#### 【0091】

図 30 は、本明細書における本開示に従って頸部 VN に埋め込まれた神経内グラフェン繊維によって検出された神経活動を示している。酸素制限は、神経電気活動の振幅を増加させた。選択した波形のラスタプロット（図 30 の右下のパネル）に対応する周波数の増加が見られ、これは、レートヒストグラム（図 30 の右上のパネル）に表されている。下のトレースは、2 ~ 0 L / 分への酸素還元の概略表示時間を提供する。

40

#### 【0092】

図 26 ~ 30 に示される実施例 4 は、白金化グラフェン繊維電極を高性能神経インターフェースとして使用して、頸部 VN における神経活動を神経外または神経内の両方で記録し得ることを実証している。これらの電極の電気化学的性質（低抵抗および高導電率）により、SNR が約 4.3 の単一および複合神経ユニットを効果的に識別可能である。電気刺激、血圧の低下、および酸素還元中に誘発される電気的活動の効果的な検出は、生体電子医学に関連する神経電気的活動を解読するための自律神経インターフェースとしてのこれらの電極の使用を支援する。

#### 【0093】

実施例 5：末梢神経への白金化グラフェン繊維の方法および生体電子用途

50

## 電極の製作

図31のパネルAに示されるように、約200nmの層Ptでコーティングされ、かつ2μmのパリレン-C層(GF-Pt-PC)で絶縁されたグラフェン繊維微小電極を、本明細書で説明するシステムおよび方法に従って製作した。図31のパネルBおよび図31のパネルCに示されるように、グラフェン繊維微小電極を銀線に接続した。グラフェン繊維微小電極のSEM画像を図31のパネルDおよびEに提示し、これは、従来の微小電極よりも柔軟性が高いことを示している。本開示に従って構築された電極は、異なる繊維のアレイとして、ヤーンとして、またはストランド多電極アレイとして使用することができる。

【0094】

## 電気化学的特性評価

図32に示されるように、グラフェン微小繊維をPtの薄層でコーティングすると、強力な相乗効果が得られ、これは、元のGF微小繊維およびPt微小電極よりもインピーダンスがそれぞれ約1桁および約3桁低い堅牢で優秀なハイブリッド微小電極につながる。Ptコーティングは、40μmGF繊維の導電率を200~460S/cmに大幅に増加させる。さらに、CVから計算された微小電極の陰極電荷蓄積容量は、946mC/cm<sup>2</sup>であり、Pt電極よりも約3桁高く、元のGF微小繊維よりも約2倍高い値であった。

【0095】

## 外科的(生体内)埋め込みおよび神経活動の記録

従来の末梢神経インターフェース(PNI)は、その製作、感度、および侵襲性に基づいて分類され得る。カフ電極は、末梢神経に円周方向に埋め込まれたPNIであり、らせん状、渦巻形、分割円筒形、または折り畳み設計でそれらの円筒形に適合する柔軟な材料および金、白金、または白金/イリジウムなどの金属接点で作製される。シリコンで作られた従来のカフ電極は、その柔らかさ(つまり、MPa範囲のヤング率)および慢性的な安定性のために一般的に使用されるが、その製作は、主に成形およびラミネート技法に限定される。残念ながら、これらの従来のカフデバイスは、それらを閉じたままにするのに十分な曲げ力を生成するために必要な比較的厚い壁(例えば、280~600μm)を有し、これは重大な異物応答および上神経線維症を引き起こし、界面の感度に悪影響を与える。加えて、心臓、呼吸、消化、および尿の状態に関与する臓器生理学の調節のための新しい臨床応用は、より小さく、かつより少ない軸索(つまり、60~80μmのラット頸動脈洞神経で平均2.5μmの約600の軸索)で構成される自律神経末梢神経の神経調節に焦点を当てている。これらの状態の神経標的はまた、より薄い神経上膜を有し、ほとんど無髄の軸索で形成されており、したがって、神経インターフェースデバイスによる損傷を受けやすい可能性が高い。これらの標的の小さな神経サイズ、それらの壊れやすい性質、および埋め込みのための制限された領域は、効率的で安全な神経刺激のために小さく、柔軟性があり、かつ十分な電荷注入容量を備えた新しい埋め込み型電極の開発を推進している。

【0096】

図33のパネルAに示されるように、開示されたGP-Pt繊維は、それらが神経3305の周り3301に簡単に結び付けられ、任意のサイズの神経の記録および刺激の両方のための単極または多極電極として機能することができるため、「カフレス」PNIとして使用することができ、これは、結び目を結び付けるために繊維を使用することができ、したがって完全に閉じるためである。これにより、それを任意の神経、神経束、または神経叢および神経血管叢の上にとしっかりと設置することが可能である。電極の感度は、それを小さな神経の周りに巻き付けてそれらの活動を感知することを可能にするようなものである。

【0097】

あるいは、図33のパネルBに示されるように、先端が鋭利になっている場合は、それらは、個々に、またはアレイ3303として使用して、血管内を記録または刺激することができる。カフレス電極として使用する場合、神経の周りのセグメントは、それを神経の

10

20

30

40

50

周りに配置する前に絶縁解除される。

【0098】

図34は、迷走神経3403の周りの単極電極3401の設置を示し、560 $\mu$ Vのピークツーピークでの軽度の低酸素症によって誘発される神経活動の増加の高感度記録を示し(図34のパネルB)、すなわち、同じ神経中のカーボンナノチューブ繊維で報告された感度と比較して、感度が9~18倍増加している。

【0099】

他の構成では、Pt-Gph繊維を縫合糸用の使い捨て針に取り付けて、患者における組織部分を接合するために使用し得る。縫合糸は、伝統的に絹または合成材料から作製され、導電性ではない。

【0100】

図35に示されるように、別々の構成では、GF-Pt繊維を、脳または脊髄組織を記録または刺激するための皮質電極として使用することができる。GP-Pt繊維を、組織に挿入することができるか、または脊髄の場合は、感覚および運動のインターフェースのために背側もしくは腹側の根の周りに結び付けることができる。後根の刺激は、痛みを制御するために使用することができる。パネルAは、ラットの大脳皮質に挿入された電極の写真を示している。図35のパネルBは、GF-Pt電極によって記録された皮質ニューロンからの単一ユニット記録を示している。

【0101】

図36に示されるように、GF-Pt繊維を使用して、骨格筋、エ皮または筋肉内のいずれかを含む他の組織を記録および刺激することもできる。図36のパネルAは、ナイロン縫合糸3603がGF-Ptに結び付けられている針3601の使用を示している。図36のパネルBは、GP-Pt繊維が筋肉3605に打ち込まれる実施形態を示している。

【0102】

本明細書に記載の金属化グラフェン繊維は、使用して製造され得る。代替的、または追加的に、金属化グラフェン繊維はまた、3D印刷、押し出し、湿式紡糸などによって生産され得る。

【0103】

本明細書に記載の金属化グラフェン繊維は、任意の好適な筋肉に関連して使用され得る。例えば、ペースメーカーのように心臓に使用したり、または不整脈を記録したりすることができ、皮下刺激の経皮的に皮膚の上に使用することもできる。追加の用途には、眼瞼下垂または片頭痛の治療のための顔面筋が含まれる。この技術は、胃、肝臓、腎臓、および脾臓を含む他の臓器にも直接使用することができる。

【0104】

いくつかの構成では、本明細書に記載の金属化グラフェン繊維は、細胞培養記録、生化学的バイオセンシング、分子バイオセンシングなどに使用され得る。例えば、未修飾または機能化されたグラフェン繊維を使用して、多くの代謝および生化学的バイオマーカーの細胞外濃度を測定することができる。これらには、過酸化水素および酸素などの活性酸素種、ならびにセロトニン、ドーパミン、グルタメート、ガンマアミノ酪酸を含む多くの重要な神経伝達物質が含まれる。代謝バイオマーカーには、ブドウ糖、コーヒー酸、およびエストラジオールが含まれる。さらに、これらは、単一バイオセンサーまたは多機能センサーアレイとして、および血清、尿、汗、唾液などを含む幅広いサンプルに使用することができる。

【0105】

いくつかの構成では、繊維電極は、記録または刺激のためにバッテリーまたは無線システムに接続され得る。他の実施形態では、それは、電気的、熱的、または高周波エネルギー源に接続され得、ドーパミンのそれを含む電気化学的検出のために使用され得る。それらはまた、神経足場を所定の位置に保つ縫合糸も導電性であり、神経再生を刺激するための電気刺激を送達することができる神経足場の一部であることを含む、他のデバイスの構成要素として組み込むことができる。追加の用途は、鍼治療と同様の用途のためにこれら

10

20

30

40

50

の繊維を経皮的に設置することができ、これらの繊維は、一度配置され、必要に応じてアクセスすることができるという利点がある。これらのGP-Pt繊維は、鍼治療などによって対処される状態を治療するために使用することができる。

【0106】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の白金化グラフェン繊維を使用して、複数の組織および器官から記録し、刺激し得る。例えば、金属化グラフェン繊維は、脾臓、腎臓などのような他の器官上に設置され得る。いくつかの実施形態では、本開示に従って構築された電極は、バイオセンシングまたは神経調節のために血管または神経血管叢の周りに巻き付けることができる。さらに、電極は、心臓、肺、胃、肝臓、脾臓、膵臓、および他の骨盤器官を含むがこれらに限定されない内臓の内側、内臓を通して縫合して、または内臓の上に埋め込むことができる。

10

【0107】

例えば、いくつかの実施形態では、繊維の柔軟性および感度により、脾臓、腎臓、および他の胃ならびに骨盤の器官および神経節における小さな神経血管叢上にこれらのグラフェン繊維ベースの電極を同様に設置することが可能になり得る。特に、脾臓の末端神経血管枝では、グラフェン繊維は、複合活動電位の形態で異なるタイプの自発的および誘発された活動を検出することができる。これらの記録およびそれらの活動の誘発から、例えば、A-アルファ、A-ベータ、A-ガンマ、A-デルタ/B、およびC線維を含む複合活動電位への神経線維タイプの特定の群の寄与が推定され得る。さらに、脾臓神経の刺激を使用して、炎症性サイトカインの放出を含む脾臓の生理学的活動を神経調節し得、これは、関節リウマチおよびクローンなどを含む疾患に対する生体電子医学的アプローチとして有益であり得る。

20

【0108】

さらに、開示された実施形態は、例えば、結節性神経節、頸動脈神経節、ならびに腸間膜および脾臓神経節などを含む、体性および自律神経節の神経調節に使用され得る。開示された繊維は、それらの活動を直接神経調節するために、心臓または腸などの内因性ニューラルネットワークを有する神経性器官に直接挿入され得る。

【0109】

白金化グラフェン繊維は、慢性的な用途における神経および神経筋のインターフェースのための埋め込み型導電性縫合系として使用され得る。例えば、記載された白金化グラフェン繊維は、神経および神経筋接合部の電位を記録、刺激、および/または遮断するために使用され得、それにより、高い注入電荷容量、それらの血管-神経叢複合体、および高い電極感度を含む種々の筋肉および神経形状への適応性を備えた安全で長期のインターフェースを提供する。

30

【0110】

本開示に従って構築された実施形態は、麻痺患者の四肢の動きを回復するためのリハビリテーションにおいて、ならびに尿失禁の治療のための脛骨神経刺激および骨盤底、ならびに骨関節炎のための膝の筋肉の刺激などの断続的な電気刺激を必要とするそれらの治療において、加齢に伴う筋肉萎縮の予防のために神経および筋肉を含む身体の多くの組織を刺激するために使用され得る。さらに、本開示に従って構築された実施形態はまた、ロボット補綴装置、末梢神経調節、および生体電子医学的用途との双方向リンクとしても使用され得る。

40

【0111】

例えば、神経刺激および/または神経記録の方法は、本明細書の開示に従って構築された電極を、脳、心臓、脾臓、肝臓、腎臓などを含む内臓を制御する神経に生体内で埋め込むステップを含み得る。

【0112】

別の例では、神経刺激および/または神経記録の方法は、本明細書の開示に従って構築された電極を、脳、心筋を含む器官上へ表面的にまたは器官中への両方を直接生体内で埋め込むステップを含み得る。

50

## 【 0 1 1 3 】

さらに別の例では、埋め込み方法は、本明細書の開示に従って構築された電極を、組織の上、組織の内側、または組織を通して縫合して、もしくは組織の上に設置するステップを含み得る。

## 【 0 1 1 4 】

任意選択で、本明細書の開示に従って構築された電極を使用して、1つまたは複数の埋め込み型電極を通して電流を送ることによって、ニューロンおよび筋肉細胞を含む電気応答性細胞のセットを刺激し得る。さらに、本明細書の開示に従って構築された埋め込み型電極を介することによる、ニューロンおよび筋肉細胞を含む起電性細胞からの活動。

## 【 0 1 1 5 】

本明細書の説明および以下の特許請求の範囲全体で使用されるように、「a」、「an」、「およびthe」の意味は、文脈が明確に別段の指示をしない限り、複数形の参照を含む。数値に関連する「約」という用語は、値が5%上下に変動することを意味する。例えば、値が約100の場合、95~105（または95と105との間の任意の値）を意味する。

## 【 0 1 1 6 】

本明細書で使用される用語は、一般に、本明細書に記載の組成物および方法の文脈内で、ならびに各用語が使用される特定の文脈において、当技術分野でそれらの通常の意味を有する。いくつかの用語は、組成物および方法の説明に関して開業医に追加のガイダンスを提供するために、上記でより具体的に定義されている。

## 【 0 1 1 7 】

本明細書のどこかで言及されているすべての特許、特許出願、および他の科学的または技術的文書は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に例示的に記載されている実施形態は、本明細書に具体的に開示されていない任意の要素（複数可）、制限（複数可）がない状態で実施することができる。したがって、例えば、本明細書の各場合において、「含む」、「本質的になる」、および「からなる」のいずれかの用語は、それらの通常の意味を保持しながら、他の2つの用語のいずれかで置き換えてもよい。用いられた用語および表現は、説明の用語として使用され、限定ではなく、そのような用語および表現の使用において、示され、説明された特徴またはその一部のいかなる同等物も除外する意図はないが、特許請求された本発明の範囲内で様々な変更が可能であることが認識される。したがって、本発明は実施形態によって具体的に開示されているが、本明細書に開示される概念の任意選択の特徴、修正、および変形は、当業者が頼りにしてもよく、そのような修正および変形は、説明および添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内であると見なされることを理解されたい。

## 【 0 1 1 8 】

温度範囲、時間範囲、または組成もしくは濃度範囲などの範囲が本明細書に与えられている場合は常に、すべての中間範囲および部分範囲、ならびに所与の範囲に含まれるすべての個々の値は、本開示に含まれることを意図している。本明細書の説明に含まれる範囲または部分範囲内の任意の部分範囲または個々の値は、本明細書の態様から除外できることが理解されよう。本明細書の説明に含まれる任意の要素またはステップは、特許請求された組成物または方法から除外できることが理解されよう。

## 【 0 1 1 9 】

加えて、本発明の特徴または態様がマーカッシュグループまたは他の代替のグループ化に関して説明される場合、当業者は、本発明がそれによって、マーカッシュグループまたは他のグループの任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループについても説明されることを認識するであろう。

## 【 0 1 2 0 】

本開示は、その特定の実施形態に関連して説明されてきたが、他の多くの変形および修正ならびに他の使用が当業者に明らかになるであろう。したがって、本開示は、本明細書の特定の開示によってではなく、添付の特許請求の範囲によってのみ制限されることが好

10

20

30

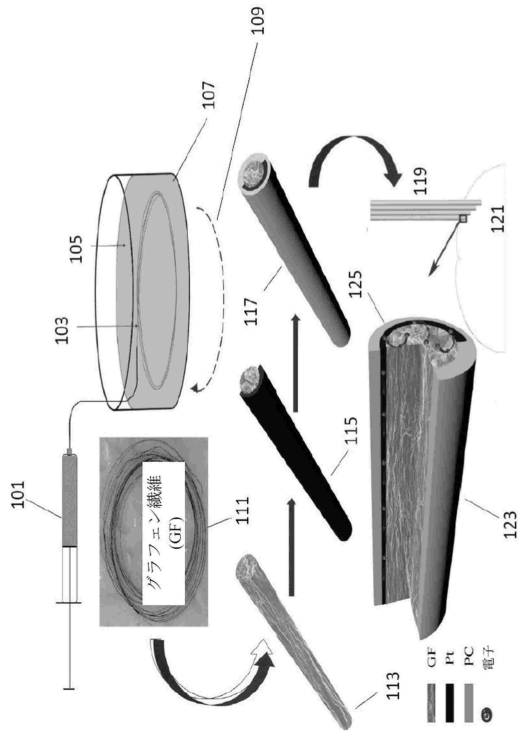
40

50

新しい。

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

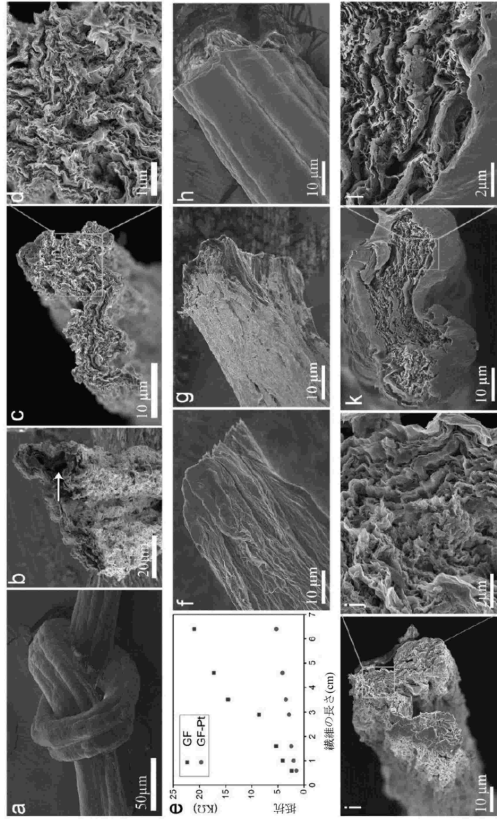
20

30

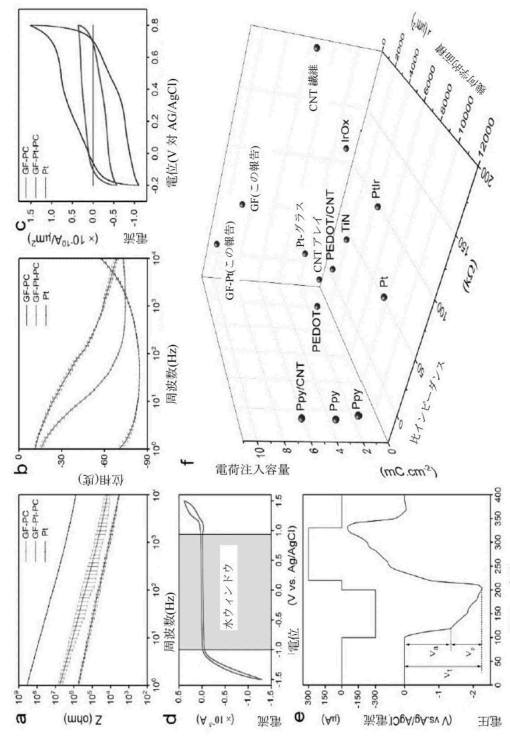
40

50

【図 2】



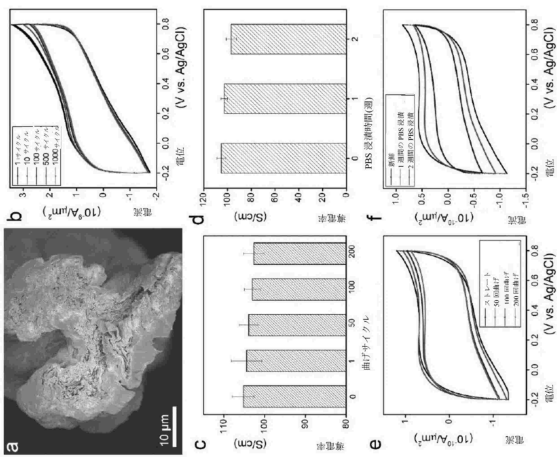
【図 3】



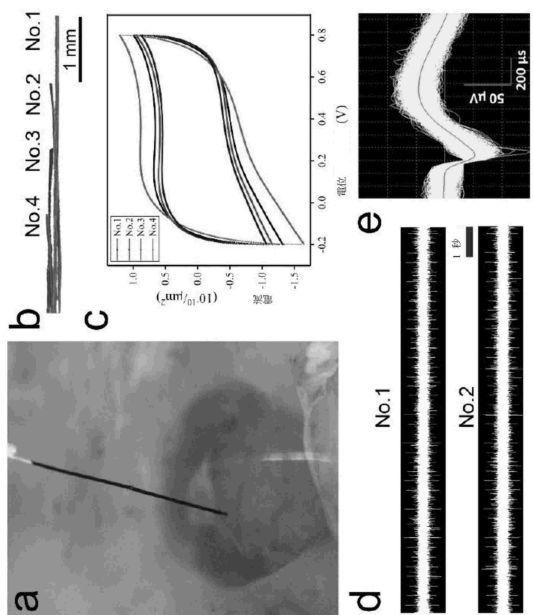
10

20

【図 4】



【図 5】

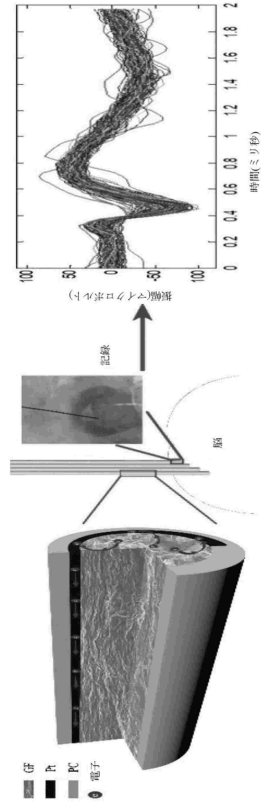


30

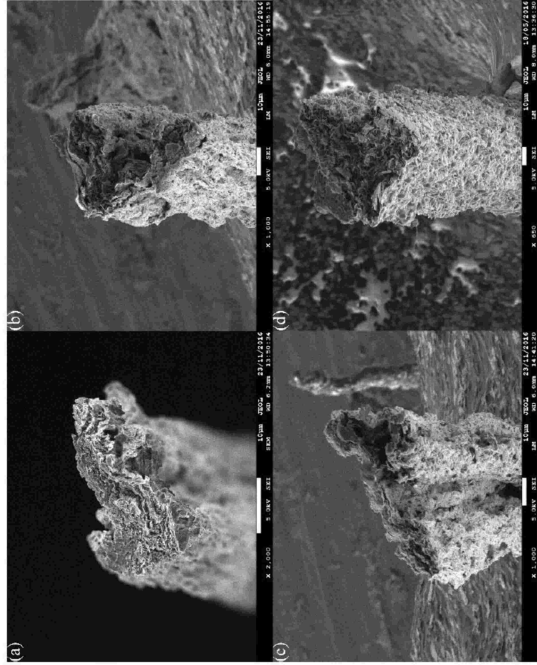
40

50

【図 6】



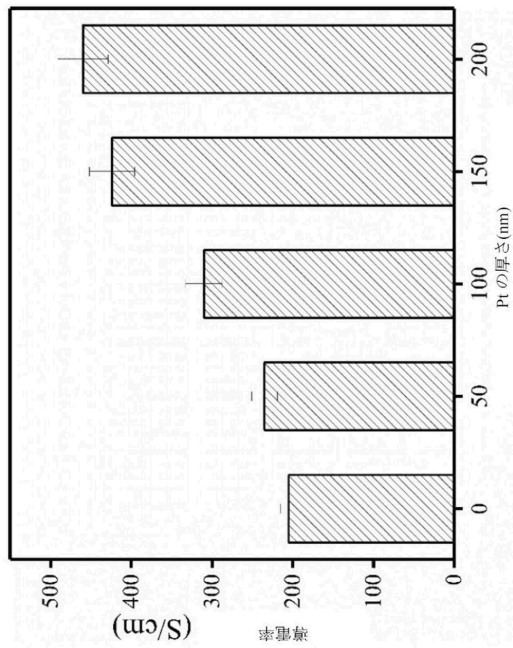
【図 7】



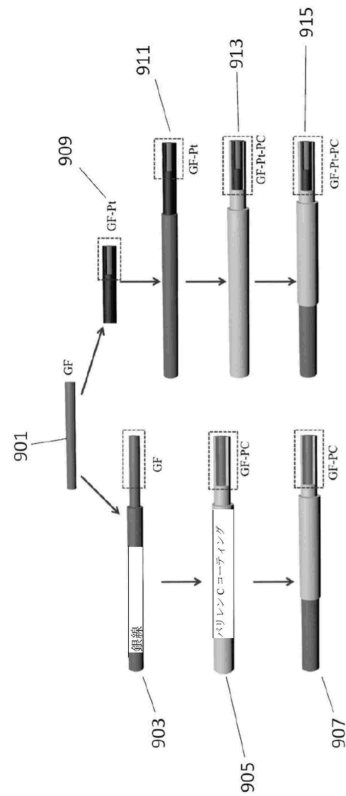
10

20

【図 8】



【図 9】

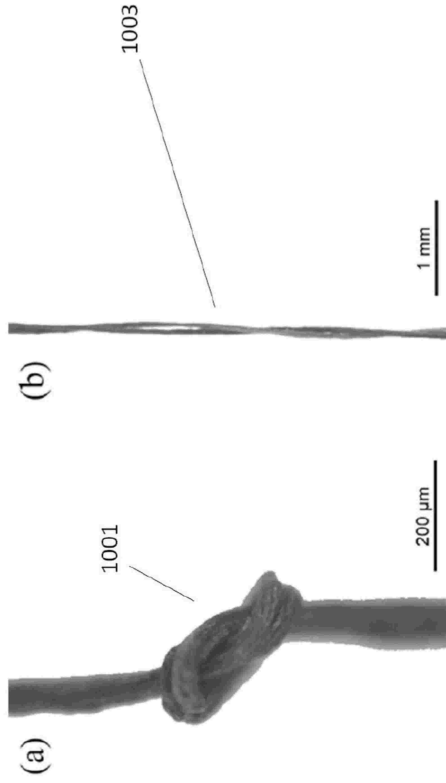


30

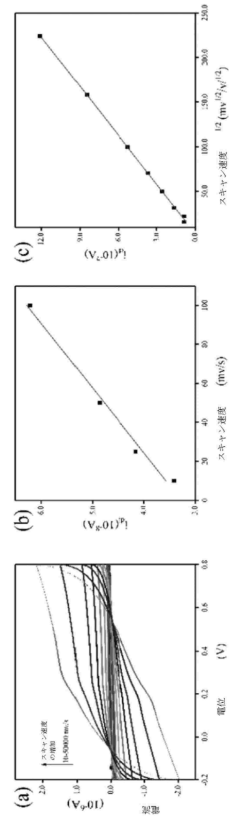
40

50

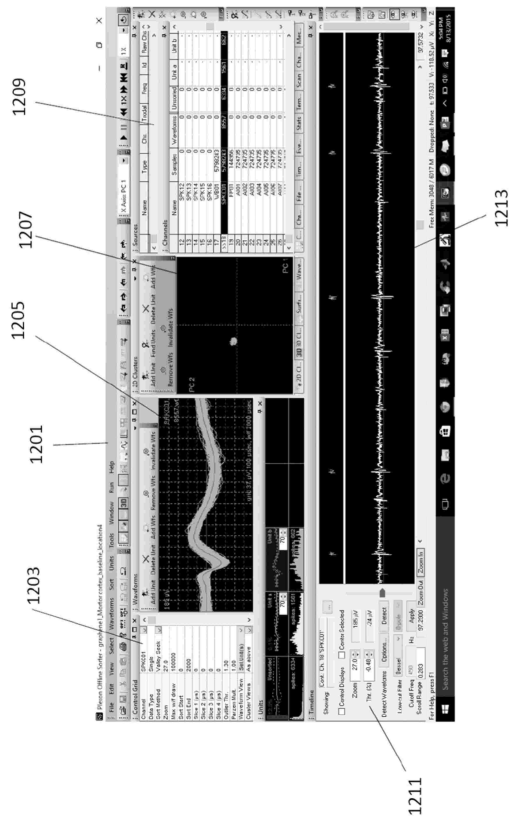
【 図 1 0 】



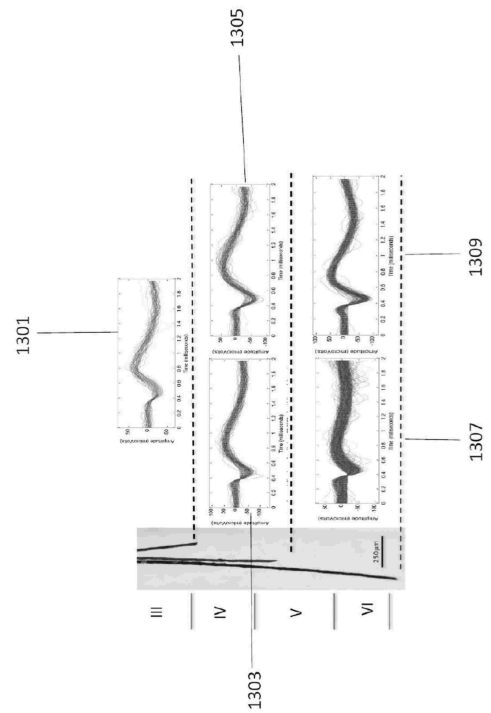
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



10

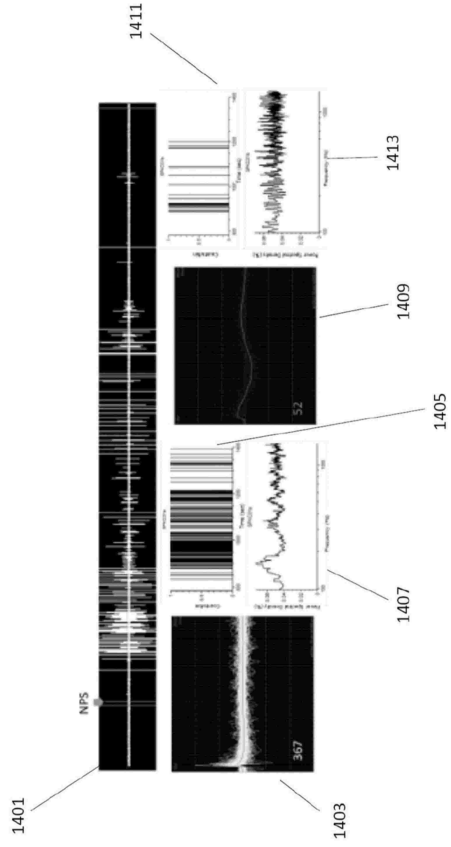
20

30

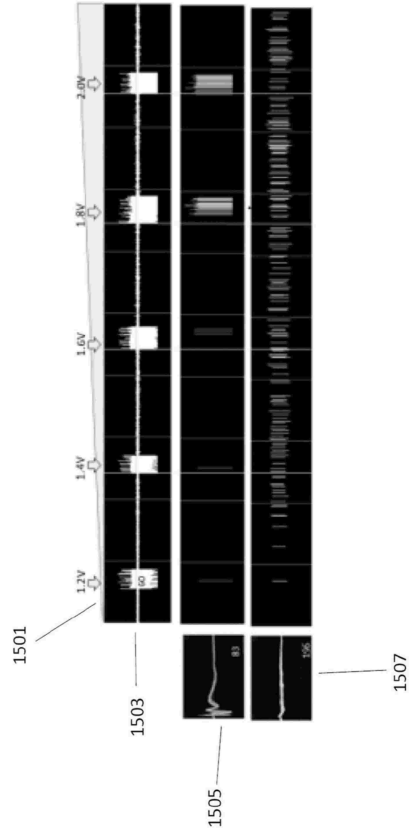
40

50

【図 14】



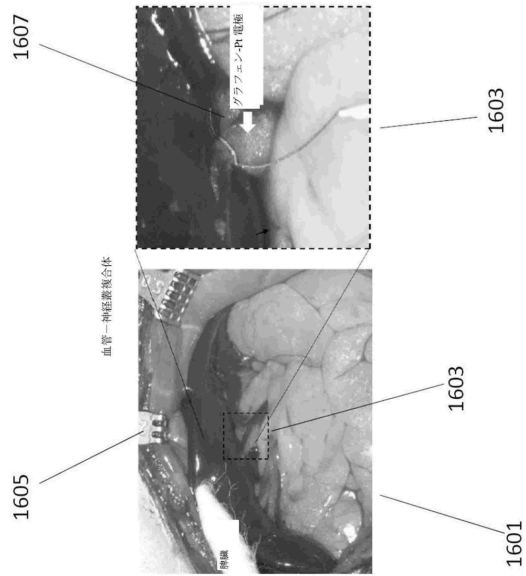
【図 15】



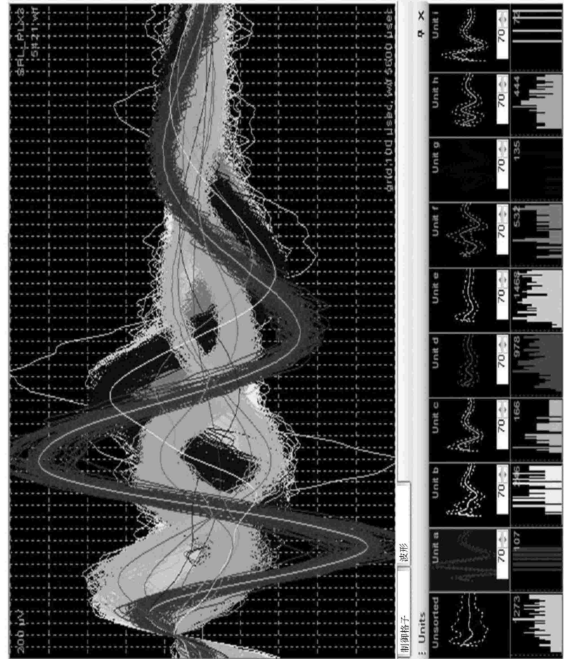
10

20

【図 16】



【図 17】



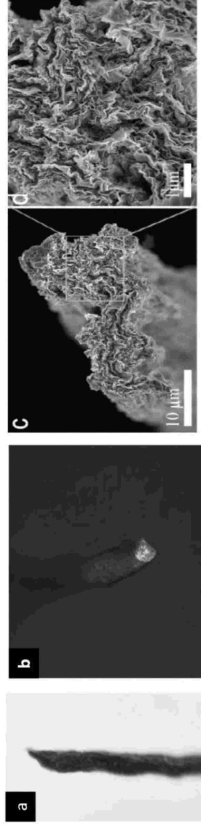
30

40

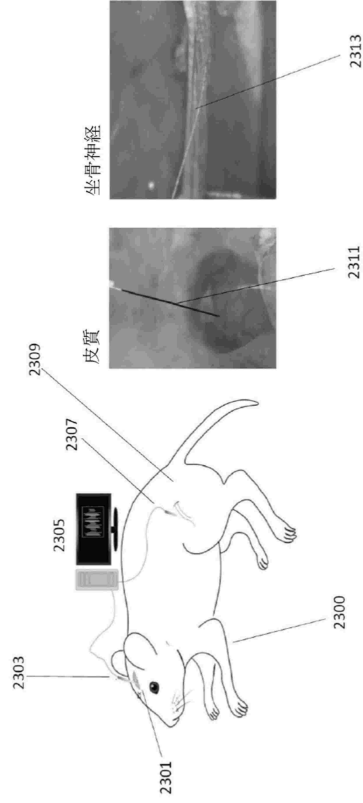
50



【図 2 2】



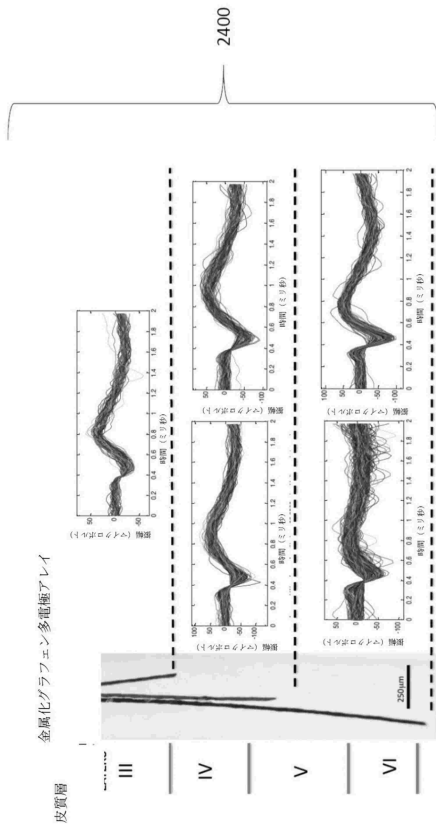
【図 2 3】



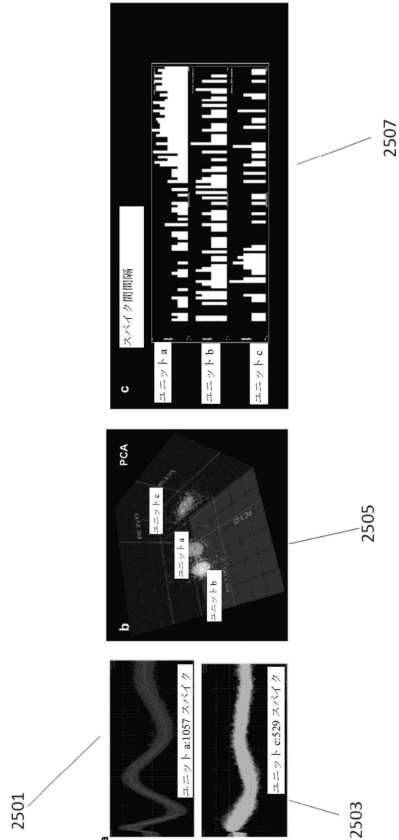
10

20

【図 2 4】



【図 2 5】

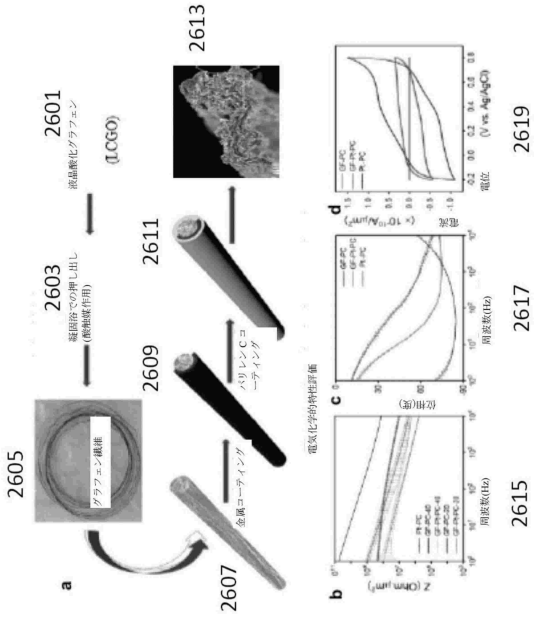


30

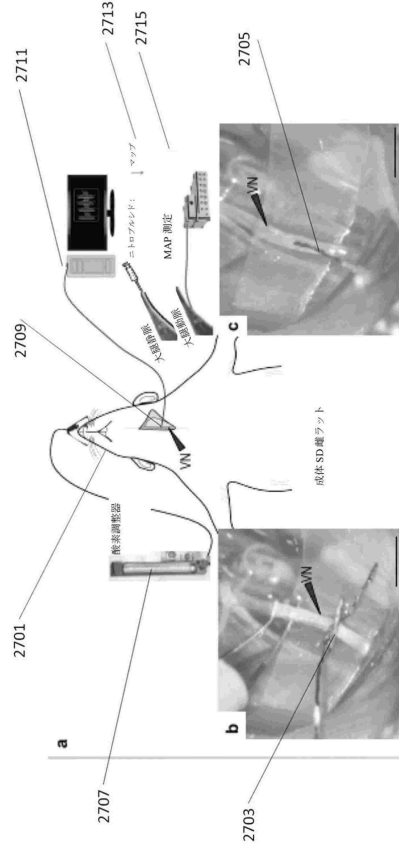
40

50

【図 26】



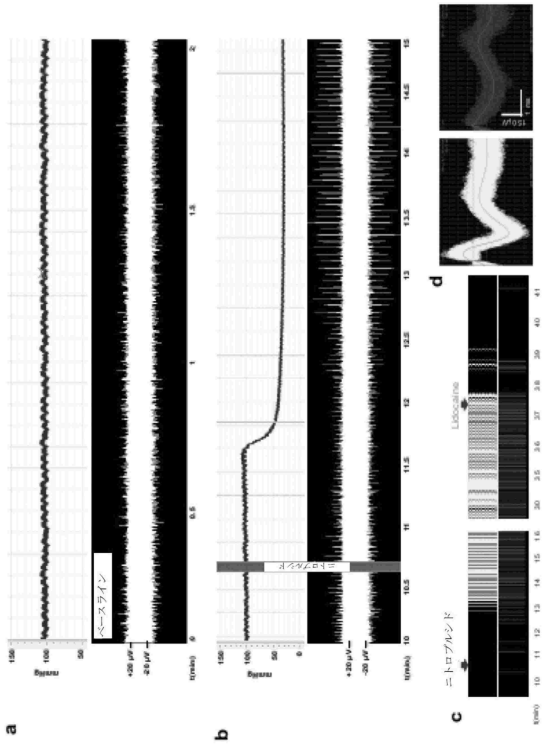
【図 27】



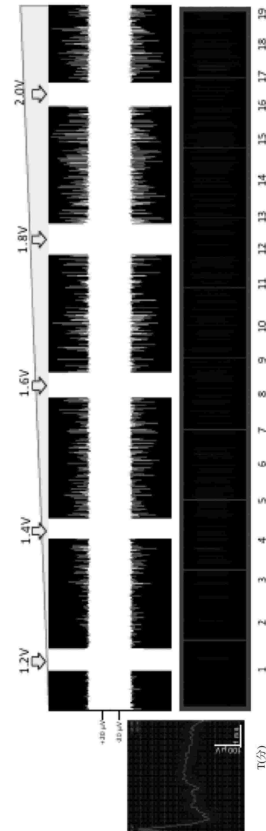
10

20

【図 28】



【図 29】

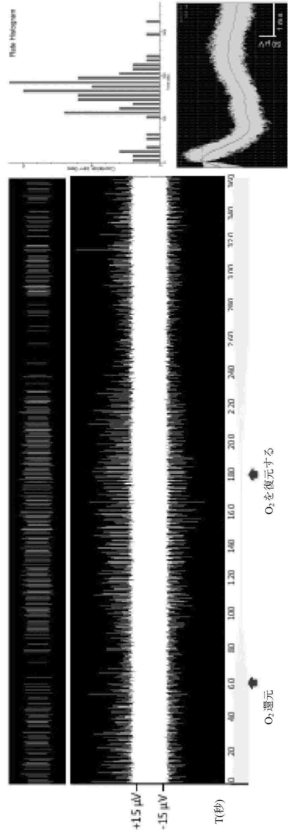


30

40

50

【図 3 0】



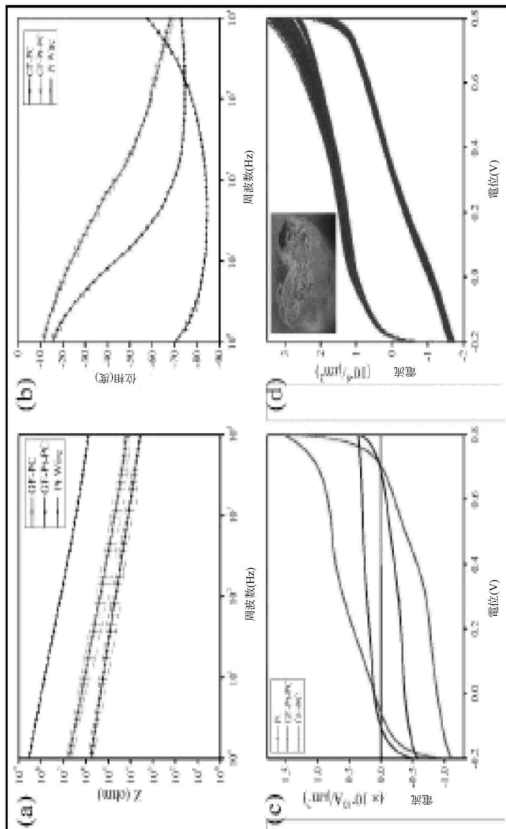
【図 3 1】



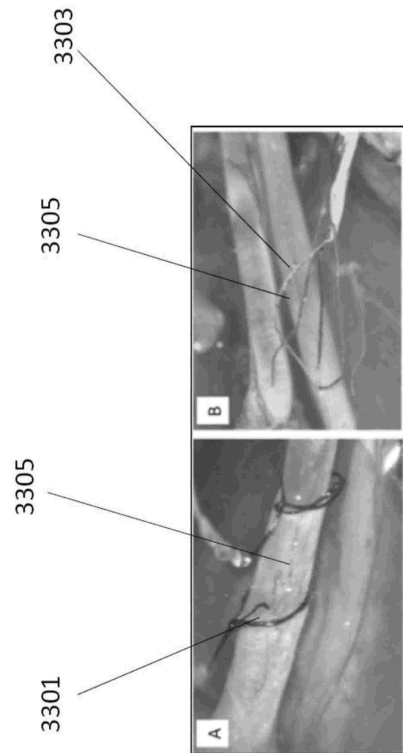
10

20

【図 3 2】



【図 3 3】

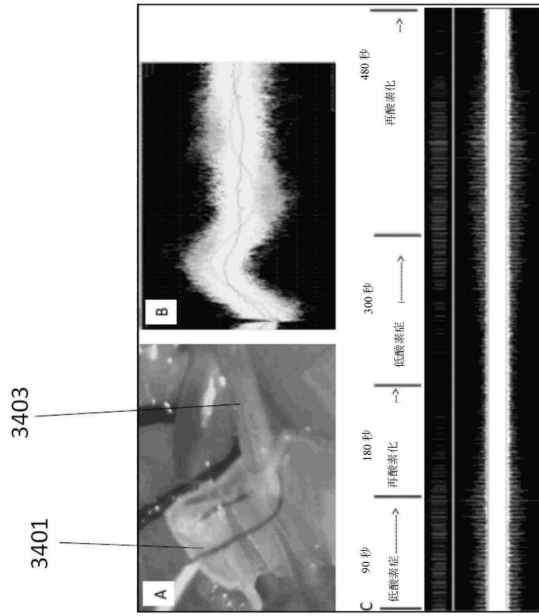


30

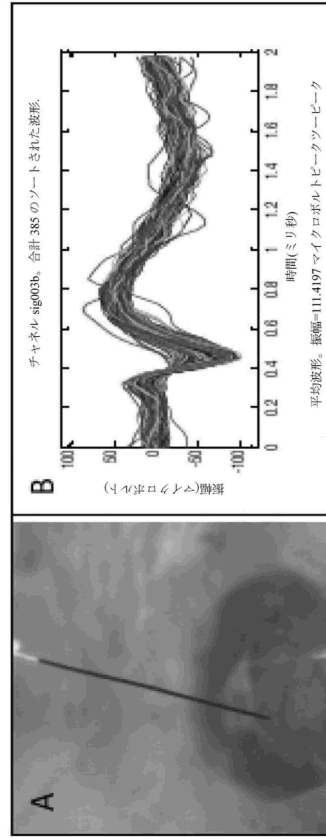
40

50

【 図 3 4 】



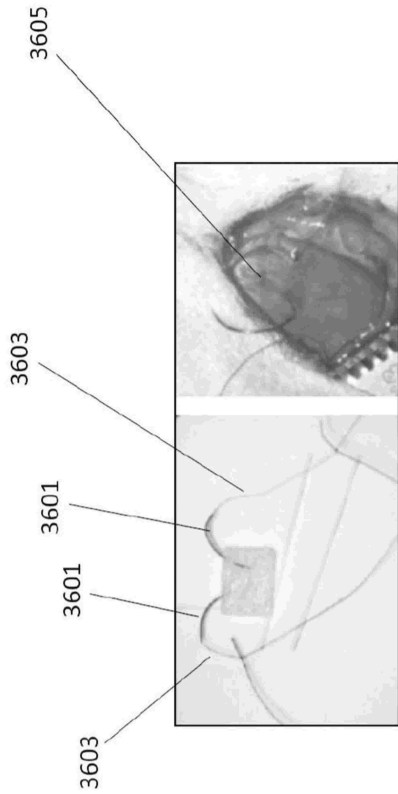
【 図 3 5 】



10

20

【 図 3 6 】



30

40

50

## フロントページの続き

NGONG

オーストラリア 2522 ニュー・サウス・ウェールズ州ウーロンゴン、ノースフィールズ・アベニュー

Northfields Avenue, Wollongong, NSW 2522, Australia

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(74)代理人 100098501

弁理士 森田 拓

(74)代理人 100116403

弁理士 前川 純一

(74)代理人 100134315

弁理士 永島 秀郎

(74)代理人 100135633

弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100162880

弁理士 上島 類

(72)発明者 マリオ ロメロ - オルテガ

アメリカ合衆国 テキサス コッペル グレイド ポイント ドライブ 1409

(72)発明者 ゴードン ウォレス

オーストラリア国 ビクトリア パスコー ベール サウス ロットエアー ストリート 3 / 38

(72)発明者 マリア ゴンザレス ゴンザレス

アメリカ合衆国 テキサス ダラス ウェスト セブンス ストリート 210

(72)発明者 ルーホッター アリ ジャリーリー

オーストラリア国 ビクトリア パスコー ベール サウス ロットエアー ストリート 3 / 38

審査官 槻木澤 昌司

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2009 / 0248113 (US, A1)

国際公開第 2013 / 073673 (WO, A1)

特開 2010 - 214107 (JP, A)

特表 2015 - 524883 (JP, A)

特開 2015 - 019806 (JP, A)

特開平 05 - 140332 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61N 1 / 00 - 1 / 44

A61B 18 / 14