

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6953431号
(P6953431)

(45) 発行日 令和3年10月27日 (2021. 10. 27)

(24) 登録日 令和3年10月1日 (2021. 10. 1)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 B 5/157 (2006. 01)

A 6 1 B 5/157

A 6 1 B 5/1477 (2006. 01)

A 6 1 B 5/1477

A 6 1 B 5/1486 (2006. 01)

A 6 1 B 5/1486

G O 1 N 27/327 (2006. 01)

G O 1 N 27/327 3 5 3 D

G O 1 N 27/416 (2006. 01)

G O 1 N 27/416 3 3 8

請求項の数 14 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2018-555939 (P2018-555939)
 (86) (22) 出願日 平成29年4月26日 (2017. 4. 26)
 (65) 公表番号 特表2019-516452 (P2019-516452A)
 (43) 公表日 令和1年6月20日 (2019. 6. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/059909
 (87) 国際公開番号 W02017/186783
 (87) 国際公開日 平成29年11月2日 (2017. 11. 2)
 審査請求日 令和2年4月8日 (2020. 4. 8)
 (31) 優先権主張番号 1607265. 4
 (32) 優先日 平成28年4月26日 (2016. 4. 26)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 1703300. 2
 (32) 優先日 平成29年3月1日 (2017. 3. 1)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

(73) 特許権者 514007092
 ザ ユニバーシティ オブ パース
 イギリス B A 2 7 A Y パース アン
 ド ノース イースト サマセット パー
 ス クラバートン ダウン
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹
 (74) 代理人 100120112
 弁理士 中西 基晴
 (74) 代理人 100137039
 弁理士 田上 靖子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 物質の非侵襲性モニタリング用多重経皮抽出および検出装置ならびに使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者における 1 つまたは複数の物質を非侵襲性モニタリングするための、多重化された経皮的抽出および検出装置であって、個別にアドレス指定可能なセンサ画素のアレイを備え、各センサ画素は、

(a) 電界移動によっておよび / または電気浸透によって間質液から 1 つまたは複数の物質を経皮的に抽出するために、前記被験者の皮膚に電流を印加する一組の電極を備える基板と、

(b) 前記センサ画素に関連付けられた貯蔵部であって、前記センサ画素から経皮的に抽出された前記物質を受容するゲルを収容する貯蔵部と、

(c) 前記センサ画素に関連付けられた前記貯蔵部内に存在する、 1 つまたは複数の経皮的に抽出された前記物質の濃度を電気化学的に検出するための一組の検出電極と、を備え、

前記センサ画素のアレイは、前記センサ画素の少なくとも 1 つが前記被験者の皮膚上の優先的経路を介して 1 つまたは複数の前記物質を抽出することが可能であるように構成され、前記装置は、 1 つまたは複数のセンサ画素で測定された優先的経路を介して取得された経皮的に抽出された物質の試料を、他のセンサ画素で測定された他の経路を介して抽出されたものと区別することができる、多重化された経皮的抽出および検出装置。

【請求項 2】

被験者における 1 つまたは複数の物質を非侵襲性モニタリングするための、多重化され

た経皮的抽出および検出システムであって、

(i) 請求項 1 に記載される、個別にアドレス指定可能なセンサ画素のアレイを備える装置と、

(i i) 1 つまたは複数のセンサ画素で測定された優先的経路を介して経皮的に抽出された物質の試料が、前記被験者における 1 つまたは複数の前記物質の濃度を評価するのに使用されるように、前記優先的経路を介して前記装置によって取得された前記経皮的に抽出された物質の試料を、他のセンサ画素で測定された他の経路を介して抽出された試料と識別することができるデータ処理システムと、
を備える、多重化された経皮的抽出および検出システム。

【請求項 3】

被験者における 1 つまたは複数の物質を非侵襲性モニタリングするための方法であって、前記方法は、個別にアドレス指定可能なセンサ画素のアレイを備える、多重化された経皮的抽出および検出装置を使用し、各センサ画素は、

(a) 電界移動によっておよび / または電気浸透によって間質液から 1 つまたは複数の物質を経皮的に抽出するために、前記被験者の皮膚に電流を印加する一組の抽出電極を備える基板と、

(b) 前記センサ画素に関連付けられた貯蔵部であって、前記センサ画素から経皮的に抽出された前記物質を受容するゲルを収容する貯蔵部と、

(c) 前記センサ画素に関連付けられた前記貯蔵部内に存在する、1 つまたは複数の経皮的に抽出された前記物質の濃度を電気化学的に検出するための一組の検出電極であって、前記センサ画素のアレイは、前記センサ画素の少なくとも 1 つが前記被験者の皮膚上の優先的経路を介して 1 つまたは複数の前記物質を抽出することが可能であるように構成され、前記装置は、1 つまたは複数のセンサ画素で測定された優先的経路を介して取得された経皮的に抽出された物質の試料を、他のセンサ画素で測定された他の経路を介して抽出されたものと区別することができる、一組の検出電極と、

(d) 1 つまたは複数のセンサ画素で測定された優先的経路を介して経皮的に抽出された物質の試料が、前記被験者における 1 つまたは複数の前記物質の濃度を評価するのに使用されるように、前記優先的経路を介して取得された前記経皮的に抽出された物質の試料を、他のセンサ画素で測定された他の経路を介して抽出された試料と識別することができるデータ処理システムと、を備え、

前記方法は、

(i) 前記センサ画素のアレイを前記被験者の前記皮膚に接触させるステップと、

(i i) 前記アレイ内の前記センサ画素において、前記抽出電極を使用して、前記被験者の前記皮膚に電流を印加し、電界移動によっておよび / または電気浸透によって前記間質液から 1 つまたは複数の物質を経皮的に抽出するステップと、

(i i i) 液体試料を前記アレイ内の前記センサ画素の前記ゲル貯蔵部内に吸収させるステップと、

(i v) 前記ゲル貯蔵部内に吸収された前記 1 つまたは複数の物質を電気化学的に検出するステップと、

(v) 個々の前記ゲル貯蔵部内に存在する前記 1 つまたは複数の物質の濃度を分析し、どのセンサ画素が、前記被験者の前記皮膚内の優先的経路を介して前記 1 つまたは複数の物質の試料を抽出したかを判定するステップと、

(v i) 優先的経路を介して抽出された前記試料からの物質濃度を使用して、前記被験者の体内の前記 1 つまたは複数の物質の濃度を決定するステップと、を含む、方法。

【請求項 4】

前記経皮的に抽出された物質が、グルコースを含む、
請求項 1 に記載の装置。

【請求項 5】

前記基板が、可撓性且つ透明であり、

10

20

30

40

50

前記基板が、ポリエチレンテレフタレート（PET）から形成される、
請求項 1 または 4 に記載の装置。

【請求項 6】

（a）前記一組の抽出電極が、銀電極および銀 / 塩化銀電極を含み、または、
（b）前記一組の検出電極が、グラフェン電極を含み、または、
（c）前記一組の検出電極が、塩化銀電極およびグラフェン電極、ならびに白金電極、
を含み、前記グラフェン電極が、電気化学的信号を増大させることができる触媒の粒子を
含む、
請求項 1、4、5 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 7】

（i）前記グラフェン電極が、制御された蒸着（CVD）グラフェンおよびグラフェン
- ナノフレークインクからなること、および、
（ii）前記グラフェン検出電極ならびに他の電極および / または外部回路への電氣的
な相互接続部を提供するために基板上に、グラフェンがパターニングまたは印刷されるこ
と、
の少なくとも一方を特徴とする、
請求項 6 に記載の装置。

【請求項 8】

（i）前記センサ画素のアレイが、少なくとも 16 のセンサ画素を備えること、および
、
（ii）前記センサ画素のアレイが、少なくとも 25 のセンサ画素を備えること、およ
び、
（iii）前記センサ画素のアレイが、10 ~ 100 のセンサ画素を備えること、およ
び、
（vi）前記センサ画素のアレイが、16 または 64 のセンサ画素を備えること、
の少なくとも 1 つを特徴とする、
請求項 1、4 から 7 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 9】

前記センサ画素が、 $3.0\text{ mm}^2 \sim 10.0\text{ mm}^2$ の面積を有する、
請求項 1、4 から 8 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 10】

センサ画素内の前記ゲルの量が $0.2 \sim 2\text{ }\mu\text{L}$ であり、
センサ画素内の前記ゲルが $0.05\text{ mm} \sim 0.2\text{ mm}$ の厚さを有する、
請求項 1、4 から 9 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 11】

前記ゲルが、前記検出電極によって検出するための過酸化水素を生成するために前記試
料内のグルコースと反応するためのグルコースオキシダーゼを収容する、
請求項 1、4 から 10 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 12】

前記ゲルが、前記検出電極によって検出するための過酸化水素を生成するために前記試
料内のグルコースと反応するためのグルコースオキシダーゼを収容し、
白金ナノ粒子が、前記過酸化水素からの信号を増幅するために前記グラフェン電極上で
固定化される、
請求項 6 に記載の装置。

【請求項 13】

前記ゲルが、アガロースなどのヒドロゲルである、
請求項 1、4 から 12 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 14】

前記ゲルの貯蔵部が、各センサ画素アレイ内の前記ゲルのための機械的支持を提供する
ために、エラストマによって収容される、

10

20

30

40

50

請求項 1、4 から 13 のいずれか一項に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グルコースなどの物質の非侵襲性モニタリング用多重経皮抽出および検出装置およびシステム、ならびに被験者における物質モニタリング用にこれらの装置を使用する方法に関する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0002】

Glucose Watch Biographer (登録商標) が依然として、米国食品医薬品局 (FDA) によって糖尿病の被験者への利用が認可されている唯一の非侵襲性のグルコースモニタリング装置である。その技術は、イオン浸透法 (すなわち、皮膚表面上に配置された 2 つの電極を横断する直流の小電流の印加) を用いて、内部にグルコースが血液中のそれと本質的に同一の濃度で存在するごく少量の間質液の電気浸透性抽出を誘起する (米国特許第 5279543 号、第 5362307 号、第 5730714 号、第 5911223 号、第 6542765 号、第 6714815 号、第 7693573 号、および第 7555337 号を参照のこと)。数マイクロリットル程度のこの少量の液体は、水性の受容ゲル内に収集され、内部で希釈され (Leboulanger ら、Reverse iontophoresis for non-invasive transdermal monitoring、Physiological Measurement、25(3): R35 ページ、2004、および Tierney ら、Electroanalysis of Glucose in Transcutaneously Extracted Samples、Electroanalysis、12(9): 666-671、2000)、グルコースが次に、グルコースオキシダーゼ媒介反応によって電気化学的に検出される。抽出が実行される面積は、約 3 cm^2 であり、収集ゲル内で測定されるグルコースのレベルは、マイクロモル濃度オーダーである (米国特許出願公開第 2002/019604 号)。結果的に、Glucose Watch は、特に糖尿病の被験者が低血糖性であるとき、その検出限界の非常に近くで動作する (Accuracy of the Glucose Watch G2 Biographer and the Continuous Glucose Monitoring System During Hypoglycemia: Experience of the Diabetes Research in Children Network、Diabetes Care、27(3): 722-726、2004)。さらに、希釈の因子は被験者間で、さらに単一個体上の異なる皮膚位置内でさえも、変化するので、従来の「指穿刺」測定によるサンプリング周期毎の前に装置を較正することは、必須であった。このこと、および他の理由により、Glucose Watch は、商業的に成功せず、もはや利用できない。これらの欠点のいくつかを回避する効果的な非侵襲性グルコースモニタリング装置の提供は、それゆえ当技術分野で依然として未解決の問題である。

【課題を解決するための手段】

【0003】

広くは、本発明は、逆イオン浸透法によるグルコースなどの物質の経皮的抽出および検出のための、被験者におけるそれらのレベルの非侵襲性モニタリングを可能にする、装置、システム、ならびに方法に関する。本発明の装置、システム、および方法は、被験者におけるそれらのレベルの半継続的または継続的モニタリングを可能とすることが好ましい。本発明の装置、システム、および方法は、優先的経路による物質の経皮的抽出を通して動作し、通常、皮膚の毛穴、毛嚢、および汗腺などの皮膚付属器を通して動作する。本発明は、物質のモニタリングする経皮的抽出および検出用の従来技術の方法と、センサ画素の多重アレイによって優先的経路を個別に利用しサンプリングできる点で異なり、各センサ画素は、物質 (たとえば、グルコース) の抽出および検出の 2 つの役割を実行する。こ

10

20

30

40

50

のことは、異なる抽出メカニズムで複数の皮膚構造にわたり経皮的に抽出された物質試料が結合するという避けられない結果を有する、比較的大きな皮膚面積を使用する従来技術のサンプリング方法に匹敵する。アレイ内の単一のセンサ画素を用いて単一の優先的経路を応答させる本発明の能力は、適切な経皮的モニタリングを、通常、指穿刺（または同等の方法の）較正の必要なしに、臨床的に実行可能にするという利点を有する。本発明は、これらの目的を、1つまたは複数のセンサ画素が優先的経路により抽出された分析物をサンプリングできる寸法のセンサ画素のアレイを用いて設計された、小型化イオン浸透サンプリング装置を使用して、達成する。

【0004】

本発明の装置、システム、および方法は、グルコースの非侵襲性モニタリングに特に有用であるが、本発明は診断マーカ、薬剤、乱用物質、および毒素などの他の経皮的抽出可能物質（分析物）の検出にも利用され得る。経皮的に抽出可能な分析物の具体的な例は、グルコースと、グルタチオン、活性酸素種および活性窒素種、またはペルオキシナイトライトなどの酸化ストレスのマーカと、 Na^+ および K^+ などの金属イオンと、小児科の患者における尿素またはイオヘキソールなどの腎疾患のマーカと、皮膚の障壁機能および皮膚の水和に密接に関与するいわゆる「自然保湿因子」（NMF）の構成物質を含む皮膚の健康状態のマーカと、リチウム、フルオロウラシルおよびメトトレキサートなどの化学療法的な作用物質、喘息治療用のテオフィリン、アミトリプチリンHClなどの抗鬱剤の継続的モニタリング用などの治療薬剤を含む薬剤と、インシュリン、プロスタグランジン、またはステロイドなどのホルモンと、乳酸塩、アルコール、スクロース、ガラクトース、尿酸、アルファアミラーゼ、コリンおよびL-リジン、アセチルコリン、ピロカルピン（たとえば、嚢胞性線維症の診断）などの他の分析物とを、含む。物質の好ましいリストは、グルコース、リチウム、乳酸塩、アンモニウム、尿素、尿酸、カリウム、エタノール、バルプロエート、グルタチオン、フェニルアラニン、アミノ酸、皮膚の自然保湿因子（NMF）の構成物質、イオヘキソール、抗鬱および抗がん剤に代表される多様な化合物の治療的モニタリング、プロスタグランジン、ステロイド、および当業者には明白である他の薬剤類および薬剤を含む。本発明の非侵襲性サンプリング技術を用いてモニタリングされ得る物質の広範なリストは、参照によりその全体が明確に組み込まれる、特に表4を参照されたい、米国特許第5,279,543号で提供されている。

【0005】

ある特定の用途では、本発明の装置、システム、および方法は、たとえば紫外線（UV）および汚染などの環境ストレスから発生する高損傷性の活性酸素種および活性窒素種の非侵襲性モニタリングおよび間接的検出などの、酸化ストレスのマーカをモニタリングするために使用され得る。グルタチオンまたはペルオキシナイトライトの安定化された誘導体などの分子が、抽出され電気化学的に検出され得る。グルタチオンは、生理学的疾患に、還元された形態のGSHおよび酸化された形態のGS SGの、2つの形態で存在する。活性酸素種が、細胞を損傷することになり得るほどの濃度で生成されるとき、GSHは、GS SGに酸化される。組織内のGSH/GS SGの比は、それゆえ酸化ストレスと高い相関をもつ。ペルオキシナイトライトが、超酸化物の一酸化窒素との反応によって生体内で生成され、酸化ストレス中に細胞損傷に寄与する。非侵襲的にこれらの分子を検出しモニタリングする能力は、酸化および/またはニトロソ化のストレスの検出において、またそれに対する保護策の開発において主要な改善となり得る。

【0006】

したがって、第1の態様では、本発明は、被験者における1つまたは複数の物質を非侵襲性モニタリングするための、多重化された経皮的抽出および検出装置を提供し、装置は、センサ画素のアレイを備え、各センサ画素は、

（a）電界移動によっておよび/または電気浸透によって間質液から1つまたは複数の物質を経皮的に抽出するために、被験者の皮膚に電流を印加する一組の電極を備える基板と、

（b）センサ画素から経皮的に抽出された物質を受容するゲル量を収容する、センサ画

10

20

30

40

50

素に関連付けられた貯蔵部と、

(c) センサ画素に関連付けられた貯蔵部内に存在する、1つまたは複数の経皮的に抽出された物質の濃度を電気化学的に検出するための一組の検出電極と、を備え、

センサ画素のアレイは、センサ画素の少なくとも1つが被験者の皮膚上の優先的経路を介して1つまたは複数の物質を抽出することが可能であるように構成される。

【0007】

さらなる態様では、本発明は、被験者における1つまたは複数の物質を非侵襲性モニタリングするための、本発明の多重化された経皮的抽出および検出装置の使用法を提供する。

【0008】

さらなる態様では、本発明は、被験者における1つまたは複数の物質を非侵襲性モニタリングするための、多重化された経皮的抽出および検出システムを提供し、システムは、

(i) センサ画素のアレイを備える装置であって、各センサ画素が、

(a) 電界移動によっておよび/または電気浸透によって間質液から1つまたは複数の物質を経皮的に抽出するために、被験者の皮膚に電流を印加する一組の電極を備える基板と、

(b) センサ画素から経皮的に抽出された物質を受容するゲル量を収容する、センサ画素に関連付けられた貯蔵部と、

(c) センサ画素に関連付けられた貯蔵部内に存在する、1つまたは複数の経皮的に抽出された物質の濃度を電気化学的に検出するための一組の検出電極と、を備え、

センサ画素のアレイは、センサ画素の少なくとも1つが被験者の皮膚上の優先的経路を介して1つまたは複数の物質を抽出することが可能であるように構成される、センサ画素のアレイを備える装置と、

(ii) データ取得、制御、および処理システムであって、

(a) アレイの個々の画素のそれぞれへのアクセスを制御する取得および制御システムであって、抽出/検出が個々の画素それぞれについて機能する、収集および制御システムと、

(b) 優先的経路を介して経皮的に抽出された物質の試料が、被験者における1つまたは複数の物質の濃度を評価するのに使用されるように、優先的経路を介して装置によって取得された経皮的に抽出された物質の試料を、他の経路を介して抽出された試料と識別することができるデータ処理システムと、を備える、データ取得、制御、および処理システムと、を備える。

【0009】

さらなる態様では、本発明は、被験者における1つまたは複数の物質を非侵襲性モニタリングするための方法を提供し、方法は、多重化された経皮的抽出および検出システムを使用し、多重化された経皮的抽出および検出システムは、

(i) センサ画素のアレイの形態の装置であって、各センサ画素が、

(a) 電界移動によっておよび/または電気浸透によって間質液から1つまたは複数の物質を経皮的に抽出するために、被験者の皮膚に電流を印加する一組の電極を備える基板と、

(b) センサ画素から経皮的に抽出された物質を受容するゲル量を収容する、センサ画素に関連付けられた貯蔵部と、

(c) センサ画素に関連付けられた貯蔵部内に存在する、1つまたは複数の経皮的に抽出された物質の濃度を電気化学的に検出するための一組の検出電極と、を備え、

センサ画素のアレイは、センサ画素の少なくとも1つが被験者の皮膚上の優先的経路を介して1つまたは複数の物質を抽出することが可能であるように構成される、センサ画素のアレイの形態の装置と、

(ii) アレイ装置の各々の画素内での抽出/検出を制御することができ、優先的経路を介して経皮的に抽出された物質の試料が、被験者における1つまたは複数の物質の濃度を評価するのに使用されるように、優先的経路を介して取得された経皮的に抽出された物

10

20

30

40

50

質の試料を、他の経路を介して抽出された試料と識別することができる、データ取得 / 処理システムと、備え、

方法は、

(i) センサ画素のアレイを被験者の皮膚に接触させるステップと、

(i i) アレイ内のセンサ画素において、抽出電極を使用して、被験者の皮膚に電流を印加し、電界移動によっておよび / または電気浸透によって間質液から 1 つまたは複数の物質を経皮的に抽出するステップと、

(i i i) 液体試料をアレイ内のセンサ画素のゲル貯蔵部内に吸収させるステップと、

(i v) ゲル貯蔵部内に吸収された 1 つまたは複数の物質を電気化学的に検出するステップと、

(v) 個々のゲル貯蔵部内に存在する 1 つまたは複数の物質の濃度を分析し、どのセンサ画素が、被験者の皮膚内の優先的経路を介して試料を抽出したかを判定するステップと、

(v i) 優先的経路を介して抽出された試料からの物質濃度を使用して、被験者の体内の 1 つまたは複数の物質の濃度を決定するステップと、を含む。

【 0 0 1 0 】

本発明の全ての態様および実施形態において、モニタリングし得る好ましい物質は、グルコースであり、特に非侵襲性の、好ましくは、糖尿病管理における半継続的または継続的なグルコースモニタリングである。

【 0 0 1 1 】

各センサ画素の抽出および検出電極は、可撓性で、任意選択的に透明な基板上に配置されることが、好ましい。可撓性基板は、ポリエチレンテレフタレート (P E T) などの重合体から形成され得ることが、好都合である。ある好ましい実施形態では、一組の抽出電極は、たとえば A g および A g C l 電極対などの、2 つの電極を備える。通常、一組の検出電極は、たとえば一組の A g C l およびグラフェン電極、ならびに任意選択的に P t 電極などの、2 つまたは 3 つの電極を備える。電極材料としてグラフェンを使用することは、制御された蒸着で作られ、標準的な光学的リソグラフィを使用して、または直接陰影マスキングによって、プラズマエッチングなどの技術により、好適なサイズ (たとえば約 $2 \times 2 \text{ mm}^2$) のセンサ画素に容易にパターン形成できる利点を有する。別法として、グラフェンベースのナノフレークのインクが、印刷技術を用いて印刷され得る。有利なことに、グラフェンは、センサ画素への電氣的な相互配線を形成するためにも使用することができる。全ての実施形態で、白金ナノ粒子 (P t N P) は、グラフェン上に固定され、あるいは、印刷されたグラフェン内に組み込まれており、一組の検出電極の一部を形成し、分析物 (たとえば、グルコース) を検出するための背景雑音に対する測定電流レベルを増幅することができる触媒効果を発生させ、電気化学的反応を実行するのに必要な過電位を減少させる。白金ナノ粒子は、電気化学的堆積などの技術によって、センサ画素上に固定、またはスパッタリングによって形成され得る。これらの白金ナノ粒子は、たとえば、抽出された試料およびグルコースオキシダーゼ内のグルコースの酵素反応から生成される過酸化水素からの信号を増幅するために、グラフェン電極上に固定される。

【 0 0 1 2 】

そのような方法を用いることで、物質抽出および電気化学的検出の両方を行う数組の電極は次に、センサ画素が個別にアドレス指定可能であることを意味する方法で、各センサ画素に提供され、その結果、装置は、1 つまたは複数のセンサ画素で測定された優先的経路を介して取得された経皮的に抽出された物質の試料を、他のセンサ画素で測定された他の経路を介して抽出されたものと区別することが可能になる。

【 0 0 1 3 】

抽出および検出電極を支持する基板に加えて、装置は、一般にポリジメチルシロキサン (P D M S) などのエラストマから形成される可撓性膜の形態である、パターン化された支持膜を備え得る。装置内で、支持膜は、基板の上に配置される。好都合には、支持膜は、センサ画素のパターンと一致するように形成された孔パターンを有し、孔パターンを充

10

20

30

40

50

填するゲル貯蔵部のアレイのための解像度および機械的支持を提供する。このゲル貯蔵部を含む膜は、デバイスとユーザの皮膚との間の界面を提供する。ゲル貯蔵部は、膜の孔を充填し、その結果、ゲル貯蔵部は基板と接触する。最適な機能には、ゲルも、膜の外面と同一平面であり、その結果、抽出電極によって抽出される１つまたは複数の物質を受容するために皮膚と接触するようにできることが好ましい。支持エラストマ膜の厚さは、 0.5 mm 未満であることが好ましく、 0.4 mm 未満であればさらに好ましく、 0.3 mm 未満であればさらに好ましく、 0.2 mm 未満であればさらに好ましく、 0.1 mm 台にあれば最も好ましい。センサ画素を形成するゲルの好ましい厚さの範囲は、 $0.05\text{ mm} \sim 0.2\text{ mm}$ である。好ましい実施形態では、収容されたヒドロゲルを有するエラストマ膜は、この時センサ画素のアレイの上に配置され、その結果、ゲル画素は、センサ画素に位置が合う。一例として、センサ画素中のゲルの体積は、通常約 $30\text{ }\mu\text{L}$ 未満であり、 $20\text{ }\mu\text{L}$ 未満であればさらに好ましく、 $10\text{ }\mu\text{L}$ 未満であればなおさらに好ましい。ある好ましい構成では、センサ画素中のゲルの体積は、通常 $0.1\text{ }\mu\text{L} \sim 30\text{ }\mu\text{L}$ であり、 $0.1\text{ }\mu\text{L} \sim 10\text{ }\mu\text{L}$ であればさらに好ましく、 $0.2\text{ }\mu\text{L} \sim 2\text{ }\mu\text{L}$ であればなおさらに好ましい。好都合には、ゲルは、アガロースなどのヒドロゲルである。

【0014】

ある好ましい配置では、貯蔵部は、装置を用いて抽出される物質を検出するための酵素含有ゲルを備える。グルコースの検出には、酵素グルコースオキシダーゼが、ヒドロゲル貯蔵部内に閉じ込められ、試料中のグルコースと反応し、検出電極による検出用の過酸化水素を生成することによって、センサ画素にグルコースへの応答の特異性を付与する。このようにして、センサは、イオン浸透的に抽出される液体内に存在し得る干渉種に対して反応しないことになる。通常、酵素は、液化状態の間にヒドロゲルと混合される。支持膜が製造されるとき、酵素および液化ヒドロゲルは、マイクロディスペンサを用いて支持膜の孔のそれぞれに注入され（順次、または単一ステップで、２つの混合物を用いて、酵素およびヒドロゲルの両方の温度特性に応じて）、凝固されてもよい。ヒドロゲルは、通常、初期体積の約 $2/3$ に体積が設定されることに対応する、半固体状態に設定されてもよい。ヒドロゲルのこの状態は、ゲルを通過するグルコースの拡散と、電気化学的検出中の効果的な電子伝達との両方を支援する。ある実施形態では、支持膜およびゲル貯蔵部は、電極基板と結合する交換可能な部品であるように設計され、それにより電極が再利用されることを可能にする。

【0015】

本発明の装置はまた、画定されたセンサ画素のアレイ、およびそれらと外界とを相互接続する手段とを生成するために、スクリーン印刷技術を用いて製作され得る。これらの実施形態では、数組の電極およびその相互配線は、たとえばグラフェンフレークベースのインク、 Ag ベースのインク、および Ag/AgCl ベースのインクをそれぞれ用いて、可撓性の基板上に印刷される。

【0016】

全ての方法において、小型化により、溶液中でのオーミック電圧降下を最小化するために、作用電極および対電極を基準電極およびイオン浸透電極に十分近接させるように、センサ画素内の電極間の間隔が選択されることが可能になり、同様に、抽出された物質（たとえば、グルコース）が、検出電極に迅速かつ効率的に到達することが可能になる。

【0017】

通常、本発明の装置は、少なくとも１つの物質の試料が、優先的経路を介して抽出されることを保証するのに十分な画素を有するセンサ画素のアレイを含み、複数の試料が、そのように抽出されることが、より好ましい。このことは、少なくとも１６センサ画素を備えるセンサ画素のアレイを用いることで達成され得、少なくとも６４センサ画素を備えるセンサ画素のアレイであることが、より好ましい。いくつかの場合では、センサ画素のアレイは、 $10 \sim 100$ のセンサ画素、たとえば１６または６４センサ画素を備えるセンサ画素のアレイを備えることが、有利である。センサ画素は、 $1.0\text{ mm}^2 \sim 100.0\text{ mm}^2$ の面積、たとえば $2.0\text{ mm}^2 \sim 50.0\text{ mm}^2$ の面積、または $3.0\text{ mm}^2 \sim 10$

10

20

30

40

50

、 0 mm^2 の面積を有することが、好ましい。

【0018】

装置のアレイのデータの取得、制御、および処理は、システムオンチップ（SOC）を使用して専用のソフトウェアによって実行され得る。本発明の装置、システム、および方法は、個人の「スマート」デバイス（たとえば、スマートフォン、リストバンド、またはスマートウォッチ）、タブレット、または他のコンピュータなどの、当技術分野で知られている任意の便利な出力装置に無線で、1つまたは複数の物質のモニタリング結果を出力し得る。このことで、当該結果の表示をもたらすことになる、または低血糖の警告アラームの設定などのより洗練された筋書を可能にすることになる。

【0019】

以下、本発明の実施形態について、一例として限定することなく、添付図を参照して説明する。しかしながら、当業者には、本発明の多様なさらなる態様および実施形態が、本開示を考慮して明らかになるであろう。

【0020】

本明細書で用いられる用語「および/または」は、順序の有無に関わらず、2つの指定された特徴または構成要素のそれぞれの具体的な開示としてとらえられるべきである。たとえば、「Aおよび/またはB」は、本明細書で各々が個別に提示されたかのように、(i) A、(ii) B、ならびに(iii) AおよびB、のそれぞれの具体的な開示としてとらえられるべきである。

【0021】

文脈がそうでないことを示さない限り、上で提示された特徴の説明および定義は、本発明の任意の具体的な態様または実施形態に限定されず、説明される全ての態様および実施形態に適用される。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】「Glucose Pathfinder」の原理を示す図である。優先グルコース経路（毛嚢）が、個々の小型画素検出器によって標的にされている。十分な密度の画素アレイを用いて、いくつかのそのような経路が画素化されたセンサによって無作為にサンプリングされることになる。毛嚢を介して抽出されたグルコースの濃度は、間質液内のそれと一定の関係にある。

【図2】変化する毛の密度（左側が低密度、右側が高密度）の皮膚を介したグルコースサンプリングに対応する「Glucose Watch」と「Glucose Pathfinder」との比較写真である。(a)「Glucose Watch」の大面积サンプリングが、不定の希釈係数につながる。(b)「Pathfinder」のアレイ内の単一の画素装置は、十分に小面積であり、1つだけの毛嚢の経路のサンプリングを可能にし、このことが、毛の密度に関係なく抽出されたグルコースの一定の希釈係数を保証する。

【図3】個々の抽出および検出小型画素の図である。電極1（Ag）および2（Ag/AgCl）はグルコース抽出を実行する。電極2（Ag/AgCl、基準電極）、3（Ptナノ粒子で装飾されたグラフェン、グラフェン/Pt NP、作用電極）、および4（Pt、対電極）は、グルコースを電気化学的に検出する。グラフェン上の触媒のPtナノ粒子は、検出信号を増幅する。電極2、3、および4は、その内部へグルコースが抽出される、小型の酵素を収容するゲル貯蔵部の下に、適切に合致する大きさに作られる。ゲル貯蔵部は、支持エラストマ膜の孔の内側に形成される。好ましい大きさを以下に示す。

【図4】(a)画素半径の関数として、アレイ内の多様な数の画素に対する、装置が画素毎に1つの経路を有する少なくとも1つの作用画素を含む確率Pを示すグラフである。(b)アレイ内の画素数の関数として、多様な画素半径に対する、装置が画素毎に1つの経路を有する少なくとも1つの作用画素を含む確率Pを示すグラフである。

【図4-1】完全に集積化されたプレーナ型（基板上の）電極を有する、典型的なサイズを示した、実装された 2×2 画素アレイの多様な配置図である。示された電極の形状は、好ましいが、たとえば長方形または円などの他の形状もまた好適であり得る。この例では

10

20

30

40

50

、全ての電極（但し相互接続路は除外する）を含む画素セルの作用面積は、 $3 \times 3 \text{ mm}^2$ である。（a）構成1：グルコース検出用に、グラフェン/Pt NP電極（黒）が作用電極であり、一方小さなAg/AgCl電極（黄）は、対電極および基準電極の両方としてはたらく。グルコース抽出用に使用される回路は、検出用に使用される回路から完全に切り離され、最大のAg/AgCl電極（黄）とAg（緑）電極との間に形成される。

【図4-2】（b）構成2：グラフェン/Pt NP電極（黒）は、ここでは作用電極および対電極の両方として使用され（Pt電極の代わりに）、一方、Ag/AgCl電極（黄）は、2つの機能を有し、グルコース検出中は基準電極としてはたらく、Ag電極（緑）と組み合わせてグルコース抽出回路を形成する抽出電極のうちの1つでもある。それぞれの電極内部のAgおよびAgCl成分のリサイクルは、各抽出の後の「回復」期間中に抽出電流の極性を反転させることによって獲得される。

10

【図5】（c）構成3：各画素は、グラフェン/Pt NP作用電極、ならびにそれぞれ基準電極および対電極の役割を果たし、一方で抽出されたグルコースを検知する、小さいものと大きいものの2つのAg/AgCl電極とを含む。さらに、逆イオン浸透法では、2つの隣接する画素装置上に配置されたAg/AgCl電極のうち最大のものを、抽出回路を形成する陽極および陰極として利用する。この場合、動作サイクルのある半サイクル中に、グルコースが画素のうちの1つで抽出され、一方、動作サイクルの第2の半サイクルで、抽出電流の極性が反転され、グルコースは、他の画素内に抽出される。このようにして、抽出および抽出電極のそれぞれのAgCl成分の回復は、上述の構成1および2のように1つの画素だけでなく、連続して2つの隣接する画素に関係する。

20

【図5-1】（a）外部電極としてAg/AgClおよびPtワイヤを用いて取得した典型的なグラフェンベースの電気化学的グルコースセンサの全体の応答曲線である。選択された図形の個々のゲル画素内での低血糖および高血糖の限度が示されており、対象とするこの領域は、センサの動作する下限を良好に回避している。

【図6】（b）完全に集積化された基板上的電気化学電極を用いて取得した類似の応答曲線である。挿入図は、低血糖から高血糖の濃度限界を取り囲んだ、 $10 \sim 100$ マイクロモル濃度の範囲でのセンサの線形応答である。測定値は、Ag/AgCl小電極に対して 0.4 V で取得された。

【図7】（a）アスコルビン酸（紫色の矢印によって示されている）および（b）アセトアミノフェン（赤紫色の矢印によって示されている）の添加に際した、ゲル内に閉じ込められたグルコースに反応したクロノアンペロメトリーのグラフである。測定値は、Ag/AgCl小電極に対して 0.4 V で取得された。

30

【図8】クロノアンペロメトリーによる生体外RI抽出グルコースの検出のグラフである。（a）外部電極としてAg/AgClおよびPtワイヤを用いた試験である。同一の小型グラフェンセンサが、実質的に異なる毛の密度を有する皮膚試料を比較するために作用電極として使用された。クロノアンペロメトリーの電流基準線は、 $32 \text{ 毛}/\text{cm}^2$ を伴う皮膚試料を使用して（Hとしてラベル付けされている）、他には、無毛嚢の皮膚を通して（濃青色の曲線）、わずか $6 \text{ 毛}/\text{cm}^2$ を伴う皮膚試料を使用して（Lとしてラベル付けされている）、RI前（黒および水色の曲線）と、「単一の毛が標的にされた」抽出に関係するRI後（赤の曲線）とに記録された。（b）グルコース抽出が、PET基板上的の平面電極を使用して実演された。

40

【図9】クロノアンペロメトリーまたは量的NMR検出のいずれかによって取得された結果を組み合わせた、抽出されたグルコース濃度と、毛の密度比との間の関係を示すグラフである。各データポイントは、異なる抽出試験を表す。両方の技術からの結果が、同一の「グルコース濃度対毛の密度」曲線上にのっており、グルコースの電気化学的分析とNMR分析との間の一貫性が、後者が前者の確認を与えることで示されている。

【図10】クロノアンペロメトリーによる2つの隣接する装置画素AおよびBの間にクロストークがないことを示す図である。2つの画素は、近接したグラフェン薄膜上に構成されるが、個々のゲル貯蔵部を有する。画素Bは、 $10 \mu\text{M} \sim 1 \text{ mM}$ の範囲でグルコースが添加された。グルコースに曝されていない隣接する画素Aでの基準線応答は、画素Bに添

50

加されたグルコースの総量に対応するそのたった3%での増大しか見られない。

【図11】画素作用面積の関数である、アレイ内の多様な数の画素に対する、画素アレイが画素毎に唯1つの経路を有する少なくとも1つの作用画素(27毛包/cm²と計算される、すなわち人間の全身の典型的毛包密度の範囲の全体の中央値)を含む確率Pのグラフである。ここで、作用面積は、グルコース抽出が行われる画素装置面積として画定され、ゲル貯蔵部の占有面積と一致する。2~6mm²の画素作用面積が、任意に位置決めされた目標を定めない測定での、単一の毛包に当たる確率を最大化する。

【図12】n×n画素(ここで、n=1~4)を伴うアレイ装置が、皮膚に(a)18、(b)27毛包/cm²で適用されるとき、少なくとも1つの作用画素を有する、異なるサイズのアレイに対応する、画素作用面積の関数である確率Pのグラフである。作用画素は、唯1つの毛包の「ヒット」がある画素として画定される(すなわち、毛包「ヒット」が皆無または2つ以上である非作用画素の反対である)。

【図12-1】n×n画素(ここで、n=1~4)を伴うアレイ装置が、皮膚に(c)36毛包/cm²で適用されるとき、少なくとも1つの作用画素を有する、異なるサイズのアレイに対応する、画素作用面積の関数である確率Pのグラフである。作用画素は、唯1つの毛包の「ヒット」がある画素として画定される(すなわち、毛包「ヒット」が皆無または2つ以上である非作用画素の反対である)。(d)は、値が重なる範囲すなわち2~5mm²が、全ての通常の人間の腹側の前腕上の毛包の密度に存在することを示す、全部で3つの選択された毛包密度の4×4アレイの画素作用面積の関数としてのPのグラフである。このことは、次に、作用アレイの設計を特徴づける。

【図13】1cm²当たり18、27、および36毛包に対する画素作用面積の関数である確率の比 pF_1/pF_2 のグラフである。ここで、 pF_1 は、単一の毛包が作用面積aの画素によってヒットされる確率であり、 pF_2 は、2つの毛包が作用面積aの画素によってヒットされる確率である。画素面積aが、2~5mm²であるとき、単一の毛包をヒットする画素の確率 pF_1 が、全ての通常の人間の毛包の密度にわたり支配的であり、aの値が小さくなるほど、単一の毛包ヒットの確率がより大きくなる。

【図14】機能的で完全に集積化された、可撓性基板上のグラフェンベースの2×2画素アレイである。A：可撓性(PET)基板上のグラフェンベースの2×2画素アレイが実現されたものである。パネル1：アレイの全レイアウトである。プロトタイプは、抽出・検出用の電極と、検知領域(各2mm²のPtナノ粒子で装飾されたグラフェン)と、内部にグルコースが閉じ込められたヒドロゲルが配置され各約6mm²(破線の輪郭、パネル3)の抽出領域を形成する孔(パネル2)を有するエラストマ膜とを備える。電極1~3のみが、抽出・検出に関与し、一方、電極4は、この試験的構成では役割をもたない。C：パネル1および2は、10mMの皮下グルコースが、約0.5mA/cm²のRI電流下で、豚の皮膚を横断して生体外で5分間抽出された、各アレイ画素(6mm²の抽出面積、破線の輪郭)によって検査される毛包の数(この場合では約28毛包/cm²)と、抽出後に検出される電流との間の視覚的な関係の一例を示す。アレイ電極は、皮膚を通して視認可能である。

【図14-1】B：10mMの皮下グルコースが、約0.5mA/cm²のRI電流下で、豚の皮膚を横断して生体外で5分間抽出された。パネル1：非常に類似した電流密度依存状態(わずかに線形を超えるべき乗則)を示す、4画素センサ装置の感度検量線である。標的にされる密度の動作範囲は、紫色で示されている。パネル3：同一の画素装置を用いた2つの連続する抽出後の検出電流対時間を示すグラフであり、皮下グルコース濃度は、それぞれ10および100mMである。抽出されたグルコースの濃度は、装置のそれぞれの検量線から決定され、毛包抽出の流動および検査される毛包の数に基づいた計算に一致する。

【図14-2】パネル2：パネル1で特徴づけられる4つの画素のそれぞれ内でグルコース抽出された後の検出電流対時間を示すグラフであり、画素のそれぞれによって標的にされる毛包の数が示されている。PBSを含む非グルコースの抽出が、負の制御(黒色の基準線)としてさらに示されている。

10

20

30

40

50

【図15】非常に近い一致性を示す2つのグラフェンベースのアレイから収集された感度検量線を示すグラフである。

【図16】グラフェンがAu膜と置き換えられたアレイの感度検量線を示すグラフである。アレイ設計の全ての他の態様は、変化無しのままとされた。全ての曲線は、わずかに線形を超える単一のべき乗則に一致され得る。

【発明を実施するための形態】

【0023】

非侵襲性物質 / 分析物モニタリング

以下の議論は、グルコースモニタリングの具体的な事例に焦点を当てるが、他の物質 / 分析物が、電界が皮膚を横断し印加されたとき成立される逆イオン浸透法の処理に伴う、電界移動および / または電気浸透により皮膚を通して非侵襲的に抽出され得ることは、当業者には明らかであろう。極性物質であり水溶性物質であるが、生理学的条件下で実効電荷を輸送しないグルコースの場合、イオン浸透抽出のそのメカニズムは、電気浸透によるだけである。このプロセスは、主に、皮膚孔、毛嚢、および汗腺などの皮膚付属器を伴う、低抵抗の優先的経路を通して発生する（たとえば、Weaverら、Advanced Drug Delivery Reviews、35:21-39、1999の図1を参照のこと）。これらの付属器は、細胞を浸し、グルコースなどの対象とする物質を含む間質液へと皮下に貫通している（図1）。この抽出原理は、従来の経皮的技術「Glucose Watch（登録商標）Biographer」で利用されてきた。その場合では、グルコースは、約 3.5 cm^2 の比較的大きな面積にわたって、サンプリングされたグルコースが次に測定される単一の大容量のグル貯蔵部内へと、無差別に抽出される。重要なこととして、この従来技術の方法は、単一経路サンプリングによってもたらされる利点を認識または利用せず、その代わりに、毛の密度が皮膚領域間で、およびユーザによって変化するとき、抽出の大面积によって、多様な希釈係数をもたらされた（図2a）。このことの1つの結果は、「指穿刺」血液サンプリングによるGlucose Watch（登録商標）Biographerの定期的な（かつ少なくとも1日毎の）較正が必要とされたことである。

【0024】

対照的に、本発明の装置、システム、および方法は、指穿刺較正の必要性を回避する単一経路サンプリングの技術概念を利用し、抽出された物質の希釈係数は、センサ画素（図2b）のアレイの小型化単一画素装置の幾何学的な特性によって固定されるので、その結果、物質が抽出される皮膚の毛嚢などの皮膚付属器の密度は、経皮的に抽出された液体内の物質濃度の決定に関して影響を及ぼさなくなる。グルコースモニタリングのための本発明のある好ましい実施態様では、装置サイズ / グルコース操作範囲、および感度 / 材料実装の具体的な技術的達成に基づく、この能力が、我々の技術の固有の態様である。経皮的なグルコースモニタリングは、したがって、真に非侵襲的で、重要な未だ対処されていない医療需要を満足するために有望になっている。

【0025】

さらに、本発明の装置、システム、および方法は、多重アレイ内の各センサ画素によって取得されたデータ分析を可能にし、優先のグルコース経路をサンプリングするセンサ画素を識別し、有用な信号を生成しないあるいは他の経路またはメカニズムにより抽出された試料に起因する信号を生成するアレイ内の他のセンサ画素は除外した、これらのセンサ画素から生成されるデータを保持および処理する、データ取得および処理システム（たとえば、システムオンチップ技術を使用して実装されたソフトウェア制御を通した）を使用し得る。このようにして、間質液中のグルコースレベルを反映しないデータは、棄却され得る。本発明上で使用される方法のさらなる利点は、それにより取得 / 読出しサイクルの初期段階で意味のあるデータを生成するセンサ画素の識別が可能になり、誰でも1つまたは複数の物質のレベルを決定する全体の処理時間を削減することが可能になる。

【0026】

アレイは、最適化された数（以下を参照のこと）の小型化グラフェンセンサ画素を含む

。各画素（図3）は、グルコース抽出および検出の重要な機能を実行し、（a）個々の酵素を保持する、その中にグルコースが経皮的に抽出されるゲル貯蔵部と、（b）グルコースがゲル貯蔵部内に抽出されることを可能にする抽出回路と、（c）白金ナノ粒子（NP）装飾されたグラフェン材料に基づく電気化学的な酵素ベースのグルコース検出器とを、備える。その最終的な形態では、アレイは、可撓性の小片内に集積され、使い捨ての構成要素（以下を参照のこと）を伴ってもよく、究極的には無線読出しを有してもよい。

【0027】

1. 形状の検討

アレイの機能を最適化するために、その画素数および形状寸法は、以下の基準に従って慎重に選択される必要がある。

【0028】

基準1：アレイ内の画素数および単位面積当たりの画素数は、選択された形状を使用して少なくとも1つの毛嚢が「ヒット」する確率Pによって、およびわずか1つの毛嚢が、個々の画素によってプローブされる確率Pによって規定される。そのような推定値のための入力パラメータとして、装置小片の全体面積は、 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ であり（実際的な理由のために）、人間の毛の分布は、 1 cm^2 当たり24毛包の最高値付近に中心をおかれた（これは人間の前腕上に 1 cm^2 当たり18～32の毛包をもつ平均的な毛の分布に含まれる）。図4-1（a）は、酵素含有ゲルの2～3 mm直径円筒の4×4画素アレイが、少なくとも1つの毛嚢の「ヒット」を保証することを示している。この最適な範囲の外で、（i）モニタの全体作用面積が低過ぎるときの小半径、および（ii）1画素が2つ以上の優先的経路にヒットし得るときの大半径に対して、Pは、1未満になる。図4-2（b）は、この単調でない振る舞いを、画素半径の関数としてさらに明確に示す。（a）および（b）の両方のグラフは、アレイ上の画素数を増加させることによって、アレイ当たり2つ以上の画素が優先的経路にヒットし、それゆえ、有用な冗長性を保証することを示している。

【0029】

原寸の実施態様では、8×8アレイは、優先通行権をもつグルコース経路をプローブするので、有用な冗長性を提供する。

したがって、本発明の多重化イオン浸透サンプリング装置は、4～100のセンサ画素を含む、約 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ にわたるアレイを備えることが好ましく、さらに好ましくは、10～80のセンサ画素を含む。いくつかの実施形態では、センサ画素のアレイは、たとえば2×2、3×3、4×4、5×5、6×6、7×7、または8×8のアレイのセンサ画素内に、4、9、16、25、36、49、または64のセンサ画素を含む。一方、いくつかの実施形態では、センサ画素は、正方形のアレイに配置され、センサ画素の他の配置も使用され得る。

【0030】

基準2：画素内に酵素を閉じ込めたゲルの半径/面積が上述のように見積もられる場合、その体積は、画素貯蔵部内に達成されるグルコース濃度範囲がセンサの全使用可能範囲内に良好におさまるという要件によって決定される。低血糖性および高血糖性血液濃度をそれぞれ3.5および12 mMとすると、11 μMおよび36 μMが、24 μlのゲル内でのそれらの希釈後に取得される。これらの値は、1時間の抽出期間にわたる0.2 mAの抽出電流で取得され、以下のセクション3（「原理証明」）で決定されるように、10 mMの皮下グルコース濃度で $3.5 \text{ nmol} \cdot \text{mA}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ の単一の毛嚢の経路を通るグルコース抽出流動の値と一致する。図6は、典型的な個々の画素センサが、（a）外部の（ワイヤタイプ）PtおよびAg/AgCl電極を用いた試験、および（b）オンチップに集積化された電極を用いた試験、で応答する、全体のグルコース濃度範囲上に（赤色で）記された、これらの選択された形状を用いて取得された希釈濃度範囲を示す。

【0031】

ゲル貯蔵部の体積および抽出条件は、間質液のグルコース濃度と、アレイの画素内で達成されるそれとの間の一定の変換効率の値を設定する。貯蔵部体積を減少させることによ

10

20

30

40

50

って、濃度は増加し、図6のそれに類似する作用濃度範囲をやはり取得するが、抽出時間およびイオン浸透電流が、減少させられるようになる。たとえば、約60倍でのゲル貯蔵部体積の減少は、ゲル貯蔵部内の10~40 μ Mのグルコース濃度上に記されることになる低血糖から高血糖血液グルコース濃度範囲が、それぞれ0.02mAおよび10分の抽出電流および期間を用いて達成されることを可能にする(10mMの皮下グルコース濃度で3.5nmol \cdot mA $^{-1}$ \cdot hr $^{-1}$ の毛嚢グルコース流動値が、この見積り用に使用された)。

【0032】

基準3:ゲルの寸法も、グルコース抽出/読出しサイクルの総持続時間に影響を及ぼす。ゲルの厚さは、抽出されたグルコースが、皮膚に面した側からグラフェンセンサに面した側へ、ゲルを横断して拡散するのに必要とされる時間を削減するために、最小化されなければならない。目標とされる厚さの範囲は、したがって、ゲル貯蔵部の最も好ましい厚さである、0.1mmのオーダーである(Tierneyら、Electroanalysis of Glucose in Transcutaneously Extracted Samples. Electroanalysis、12(9):666-671、2000)。

【0033】

まとめると、たとえば、直径2mmおよび厚さ0.1mmのゲル貯蔵部体積により、図6に赤色で記されているようにゲル貯蔵部内で同量のグルコース濃度範囲10~40 μ Mを達成する一方で、抽出電流および期間が、それぞれ、たとえば0.02mAおよび10分へと削減されることを可能にする。

【0034】

全ての設計において、アレイ内の所与の画素装置のために、抽出および検出電極の作用面積は、画素面積以内に適応する。画素面積以内の典型的寸法の一例は、図5で与えられ、アレイの単位セル(画素面積)は、4 \times 4mm²の面積を占有する電極の作用領域と、直径3mmの円形領域を占有し、内部でグルコースが抽出されるゲル貯蔵部の占有面積(図5で点線を用いて描いた)とを伴う、5 \times 5mm²へと選択された。より大きい数の画素を有するアレイでは、全ての電極の寸法および間隔は、より小さい単位セル内に適応するように適切に削減されることになり、直径2mm付近(図4からの単一の毛嚢の経路の「ヒット確率」の計算値に一致した)のゲル貯蔵部の直径のために最も低い値を維持する。最終的な形状では、相互配線およびシステムオンチップのための周辺面積を含めた、全体的に小片状のモニタは、用いられた小型化の程度により、たいがい3 \times 3~4 \times 4cm²の面積以内に適応する。

【0035】

2. 材料選択および装置実現方法

本実施形態でグルコースモニタを構成するために用いられる主要材料は、(i)検知材料を同時に形成する、白金ナノ粒子で装飾されたグラフェン薄膜、(ii)酵素である、グルコースとの電気化学的反応で、電気化学的グラフェンセンサによって検出される反応生成物である、過酸化水素を生成するグルコースオキシダーゼ、(iii)酵素を収容するために用いられるヒドロゲル(アガロース、キトサン、エチルセルロース、またはメチルセルロースなどの重合体に基づく)、(iv)機械的支持および各画素のゲル貯蔵部のための解像度を提供するために用いられる、穿孔膜を作成するための生体適合性エラストマ(たとえば、数100マイクロメートル範囲の厚さを生じさせる、ポリジメチルシロキサン(PDMS)などのシリコンゴムまたはPlatSil7315、あるいは100 μ m未満範囲の厚さが要求される設計用にはパリレン)である。グラフェンは、可撓性電子機器用に選択される材料である。ここで、その屈曲および撓みに対する機械的弾性、標準的な微細加工技術(画素化されたアレイを作成するために必要な特性)によるパターンニングおよびデバイス集積化へのその容易さ、グリーンエレクトロニクスとのその互換性、および中でも特に、貴金属電気化学的電極と比べて市販製品でのコストを削減するためのその可能性、により選択された。Ptナノ粒子(または他の触媒粒子)と組み合わせて、

10

20

30

40

50

グラフェン/Pt-NP電極のグルコースへの電気化学的応答は、多数の規模水準にわたり、その感度は、優れている（セクション3を参照のこと）。最後に、好適な実施形態では、グラフェンは、電気化学的画素センサの作用面積を提供するためだけでなく、これらの検知領域を外界とつなぐ電気的相互配線も提供するために用いられ得る（図5）。実現方法（以下を参照のこと）によっては、用いられることになるグラフェンのタイプは、CVDによって形成される原子的に薄い層、または印刷される領域を作成するのに用いられるグラフェンナノフレークインクのいずれかであり得る。

【0036】

画素アレイの実現は、上述した検知材料に制限されない。プルシアンブルー（または作用電位をさらに低減する役割を有する等価物）でさらに機能をもたされたグラフェン/Pt-NP（または他の触媒粒子）、炭素ベースの電極（カーボンナノチューブを含む）、単体のプルシアンブルー（または等価物）、電気化学で従来から使用されている金属電極、またはそれらを組み合わせたものなどの、他の検知材料も使用され得る。

【0037】

画素アレイを構築するために、いくつかの実現方法が用いられ得る。

方法1

1. 化学蒸着（CVD）によって形成された典型的には $1.6 \times 1.6 \text{ cm}^2$ の大面积グラフェンの小片が、ウェットまたはドライプロセスを用いて、可撓性（可能性として、透明でもある）基板上へと転写される。基板は、グラフェンに基づくものを含めて、種々の可撓性電子機器用途に選択される基板である、ポリエチレンテレフタレート（PET）であってもよい。可能性のある可撓性基板の他の例は、ポリエチレンナフタレート（PEN）、またはポリイミドの薄膜（カプトンなどの）である。

【0038】

2. 次にグラフェンが、標準的な光学的リソグラフィを用いたプラズマエッチングにより、または、直接、陰影マスクングにより、約 $2 \times 2 \text{ m}^2$ の画素へとパターンニングされ、このようにして不要なグラフェン領域は、エッチングで除去される。このことにより、図5にあるように、画素検知面積と、付加的に（不可欠でないが）、グラフェンに基づく外界との電気的相互配線との両方の画定が可能になる。

【0039】

3. Ptナノ粒子が次に、電気化学的堆積によって、グラフェン画素検知面積上へと固定化される（セクション4の「支持方法」を参照のこと）か、または別法として、スパッタリングによって形成され得る。それらの触媒効果は、グルコースを検出するための背景雑音に対する測定電流レベルを増幅し、反応を実行するのに必要な過電位を減少させる。

【0040】

4. グルコース抽出および電気化学的グルコース検出の両方のための電極が次に、各画素内に形成される。図3は、それぞれAgおよびAgClからなる電極1および2が抽出用に用いられ、一方、それぞれAgCl、グラフェン、およびPtからなる電極2、3、および4が検出用に用いられる、初期設計を示している。より最近の設計である図5では、Pt電極は、削除されている。

【0041】

これらの異なる材料（Ag、AgCl、Pt）の電極は、好都合には、特注のステンシルマスクによる熱的蒸着またはスパッタリングのいくつかの段階によって画定されるか、あるいは別法として、それらはまた、標準的なリソグラフィを用いて実現され得る。AgCl領域は、後に化学的にAgClへと変換される（たとえば、 FeCl_3 を用いた反応によって）基礎となるAg層から開始して、または予め堆積されたAg層の電気化学的陽極化によって、形成され得る（セクション4の「支持方法」を参照のこと）。

【0042】

5. パターンニングされた絶縁層（酸化物または絶縁性重合体）が、アレイ装置上に堆積される。このステップは、各画素の作用面積（グルコース抽出および検出が発生する）のみを露出させて残すことになり、他の全て、すなわちアレイ内の各画素装置の作用面積を

10

20

30

40

50

取得および制御のシステムオンチップのコネクタにつなぐ全ての電氣的相互配線、は被覆される。このようにして、相互配線は、動作中の湿度、液体、および汗から保護される。

【0043】

6. グラフェン画素アレイパターンに一致するパターンの孔を有する、エラストマ (P D M S、P l a t s i l、またはパリレンなどの) の薄い、可撓性の、自立する膜、あるいは類似材料 (図3の図解を参照のこと) が、別々に形成される。膜は、回転成形、重合体蒸着、または射出成形などの方法によって形成され得る。この膜は、次に膜内の孔が充填され、膜表面と同一面になる酵素含有ゲル貯蔵部に、画定および機械的支持を提供する。この膜の好ましい厚さは、0.1 mm のオーダーにあり、ゲル貯蔵部の好ましい厚さによって課せられる要件であり、そのような厚さは、たとえば、回転成形によって得られる。エラストマ-ゲル部は、デバイスと皮膚との間の界面を提供する。好ましい実施形態では、収容されたゲルを有するエラストマ膜は、この時グラフェン画素アレイの上に配置され、その結果、ゲル画素は、グラフェン検知画素に位置が合う。

10

【0044】

7. 酵素グルコースオキシダーゼは、センサの応答に特異性 (グルコースへの) を付与するためにヒドロゲル貯蔵部内に収容される (セクション4の「支持方法」を参照のこと)。このようにして、センサは、イオン浸透的に抽出物内に存在し得る干渉種に対して反応しないことになる。酵素は、液化状態の間にヒドロゲルと混合される。

【0045】

8. それらの温度特性により、酵素および液化ヒドロゲルは、マイクロディスペンサを使用して、支持膜の孔のそれぞれ内に、順次注入され (酵素の変性を回避するために)、または共に混合され、凝固する。全体サイズのアレイの場合、B i o d o t x y z または B i o j e t などの市販のマイクロディスペンサシステムが、使用され得る。このステップを実現する他の方法は、ある種のパターンニングまたは機械的転写を含み得る。

20

【0046】

ヒドロゲルは、その体積が初期値の約2/3になる点を示す半固体状態になり、ヒドロゲルの半固体性状は、ゲルを通過するグルコースの拡散と、電気化学的検知中の効果的な電子伝達との両方を支援する。収容されたゲルを有するエラストマ部は、装置の交換可能な部分であり得る。

【0047】

30

方法2

この方法は、アレイの画素およびそれらを外界とつなぐ相互配線を画定するためのスクリーン印刷技術の広範な使用方法を立案する。好ましい実現では (図5を参照のこと)、多様なアレイ領域が以下のように作成される。(i) 電氣的相互配線および作用電極が、グラフェンフレークベースのインクを印刷することによって画定される (アレイの初期設計は、A g ベースのインクに基づく相互配線を有する)。(ii) グルコース検出用、およびグルコース抽出中の逆イオン浸透法用の疑似基準電極として使用されることになる A g / A g C l 電極が、それぞれ A g および A g C l ベースのインクの連続する印刷段階によって、画定される。

【0048】

40

図5は、2×2アレイの多様な構成要素の相対位置を示し、溶液中でのオーミック電圧降下を最小化するために、作用電極および対電極を基準電極およびイオン浸透電極に十分近接させるように、画素内の電極間の間隔が選択され、同様に、抽出されたグルコースが、検出電極に迅速かつ効率的に到達することが可能になる。抽出および検出の両方のために (図5(b)のレイアウトで提案されるように)、単体の A g / A g C l 電極を使用することは、経時的にその性能に影響し得るので、検知および逆イオン浸透回路が完全に切り離された (すなわち、それらはいずれの電極も共有しない) 第2のレイアウトが設計された (図5(a))。2つの電極だけが電気化学的検出に使用される、図5(a)からの設計は、低電流電気化学的検出用に使われる一般的な方法である (N a t u r e 2016、529、509-514、A n a l . C h e m . 2015、87、394-398

50

)。

【0049】

方法1のステップ5と同様に、絶縁層が、適切なインクを用いて印刷され得る。いくつかのそのようなインクが、生体適合性の変形形態を含めて、存在する。印刷されたアレイは次に、上述したもの(方法1)と同じステップ6~8を用いて作成されたエラストマ-ヒドロゲル膜に結合される。

【0050】

アレイを製作するために用いられる方法に関係なく、図5(a)および5(b)で示されるレイアウトを使用するとき、アレイ内の全ての画素装置は、長期間の動作中にAgClおよびAgがそれらのそれぞれの電極内で欠乏することを回避するために、電極材料「回復」へとつながる逆イオン浸透抽出を実行することが期待される。全ての画素のために、このことは、各画素内に存在するAgおよびAgCl電極を使用する。対照的に、図5(c)のレイアウトは、連続的な抽出/回復段階で、2つの隣接する画素装置を使用し、その結果、常時アレイ画素の半数だけがグルコースを抽出し、一方、他の半数は、抽出の電気回路の完成に必要なAgCl電極を提供するだけである。次に、印加電流の極性を反転させることによって、グルコースは、アレイ画素の他の半数によって次の動作サイクルで抽出され、画素装置のそれぞれのペア間のAgおよびAgClの連続的なリサイクルが、それにより保証される。電極の極性の連続的な変更は、刺痛および紅はんに関連することが示唆されてきた皮膚の任意の分極をも制限し得る。

【0051】

3. 原理証明

経皮的なグルコースの非侵襲性モニタリングのための本発明の小型化された画素装置の例は、その検出範囲、検出限界、グルコースへの応答特異性、および単一の毛嚢経路を通して2つのグルコース抽出/検出を実行するその能力を、決定するために試験された。さらに、2つの隣接する画素装置間のクロストークが、さらに評価された。

【0052】

図6(a)は、方法1で実現されたような実施形態での画素装置の典型的な電気化学的電流対グルコース濃度の検量線を示す。画素装置は、直径約3mmで、8mg/mlのグルコースオキシダーゼを収容する24μlの、酵素が収容されたゲル貯蔵部と、ゲル貯蔵部と接触する外部(ワイヤ)Ag/AgClおよびPt電極とを備える。結果として得られた検量線は、マイクロモル濃度からミリモル濃度を超えるまでの濃度範囲にわたって単一で低い依存性を示し、4マイクロモル濃度の検出下限(LOD)を示す。貯蔵部ゲルの体積(24μl)内での希釈後の、糖尿病での低血糖~高血糖までの範囲(すなわち、血液内の、および間質液内の極めて類似した範囲である、3.5~12mM)が、完全にセンサ検量線上に記され、それゆえ、この例で使用される幾何学的寸法では、測定されるグルコース濃度範囲は、10~40マイクロモル濃度であり、センサのLODを既に優に超えている。これらの濃度は、1時間の抽出期間にわたり印加された0.2mAの抽出電流を用いて到達された。ゲル貯蔵部体積のさらなる削減は、センサの動作範囲をさらにより高い濃度およびより大きな感度へと変移させる。

【0053】

図6(b)は、完全なオンチップ画素装置の電気化学的電流対グルコース濃度の検量線を示し、ここで全ての電極は、平面でありPET基板と共に集積化されている。画素装置は、4×2mm²の面積と、16mg/mlのグルコースを収容する10μlのゲル貯蔵部と、それぞれ白金ナノ粒子で装飾されたグラフェンおよびAg/AgCl薄膜からなる2つの平面電気化学電極とを有した(セクション4の「支持方法」を参照のこと)。この実施形態のために、図6(a)に対応する本実施形態の事例より大きな電流が、グルコース濃度範囲の下端で取得され、このことが、酵素反応の初期速度を加速させ得る収容された酵素の、より大きい濃度と組み合わせられ使用される平面電極形状の大概の結果である。全濃度範囲にわたる単一で低い依存性が見られ、検出限界は、2マイクロモル濃度より下へ減少したことが見られた。

【0054】

さらに最近の試験では、ゲル貯蔵部の体積は、約 $1 \mu\text{l}$ へと削減され、ゲルを横断するグルコース拡散時間を大きく削減する最も好ましい値である、約 0.1 mm の厚さをもたらした。この改善により、これらの装置の操作パラメータを最も好ましい範囲にもって行き、誰でも抽出時間および抽出電流の両方を削減することができるようになる。

【0055】

グルコースに特化した応答を実証するために、画素検出器は、イオン浸透抽出物内にグルコースに加えて存在し得る潜在的な干渉種である、アスコルビン酸および尿酸、ならびにアセトアミノフェンに曝露された。図7は、測定電流の平坦域が、各グルコース添加後に上昇し、実行可能な干渉種のいずれかが添加されたとき減少することを示している。このことは、ゲル内に既に存在するグルコースの希釈と一貫性があり、センサが、不動化された酵素と特定の相互作用しない種には、本質的に反応を示さないことを示す。

【0056】

プラットフォームのグルコース抽出機能は、豚の皮膚を用いた単純拡散セルでの生体外逆イオン浸透法 (RI) を実行することによって示され (セクション4の「支持方法」を参照のこと)、それは人間の相対部のための優れたモデルである (Schmook, F. P., J. G. Meingassner, および A. Billlich, Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption, International Journal of Pharmaceutics, 2001, 215 (1-2): p. 51-56)。哺乳類の皮膚は、 $\text{pH} 7.4$ で正味の陰電荷を輸送するので、電気浸透性移送が、陽イオン移動の方向で発生する (Marro, D.ら, Contributions of electromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery, Pharm Res, 2001, 18 (12): p. 1701-8)。これらの試験では、 0.2 mA の電流が、1時間の抽出時間にわたって印加された。異なる濃度で皮下溶液に存在するとき、成功した逆イオン浸透 (RI) グルコースサンプリングは、ゲル内で測定されたクロノアンペロメトリーの電流によって実証され (図8)、次に、この電流を、図6で示したタイプの検量線を用いて、グルコース濃度に変換する。負の制御のRI試験は、皮下溶液内にグルコースが存在しないときに実行され、皮膚自体からの干渉寄与が明白でないことを確認した。そのうえ、画素装置内のグルコースの電気化学的検出は、以下で議論されるように、量的な ^1H 核磁気共鳴 ($^1\text{H} - \text{qNMR}$) によって立証された。「形状の検討」という名称のセクションで述べたように、 0.1 mm 厚のエラストマ膜および 2 mm 直径のその中に収納されたゲルを用いて、約60倍でのゲル体積減少により、抽出期間および印加されるRI電流は、それぞれ典型的には10~15分および 0.02 mA に削減され、一方、ゲル内のグルコース濃度は、検出範囲内に良好に維持される。

【0057】

毛嚢を通したグルコースの優先的RI抽出は、図8(a)で示したように、第1に、小型のエラストマに支持されたゲル「画素」が単一の毛嚢上に直接配置された毛の「標的」を介した、第2に、変化する毛の密度の皮膚試料を横断する抽出の比較を通した、2つの試験で確立された。両方の試験で、RIは、異なる毛の密度を有する2つの皮膚試料上の同一条件において実行された。すなわち同一のゲル貯蔵部体積が用いられ、その内部でのグルコースの電気化学的検出は同一のグラフェンセンサを用いて実行された。 $34 \text{ 毛}/\text{cm}^2$ を有する皮膚試料上で実行された、単一毛包「毛の標的」優先抽出が、わずか $6 \text{ 毛}/\text{cm}^2$ を有する毛包を比較的有さない別の試料からの抽出と対比された (図8)。これらの測定からの結果により、毛嚢のおよび無毛嚢の経路を介したRI抽出流動の相対的規模が見積もられることが可能になった。皮下グルコース濃度が 10 ミリモル 濃度であったとき、優先的経路による流動は、 $3.5 \text{ nmol} \cdot \text{mA}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ であって、一方無毛嚢の皮膚を通るのは、 $0.4 \text{ nmol} \cdot \text{mA}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ であった。これらの値は、以

前報告された生体外で豚の皮膚を横断した全グルコース抽出流動 ($4.5 \text{ nmol} \cdot \text{mA}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) と一致する (Siegel, A., R. H. Guy, および M. B. Delgado-Charro, *Electroosmosis in Transdermal Iontophoresis: Implications for Noninvasive and Calibration-Free Glucose Monitoring*, *Biophysical Journal*, 2004, 87 (5): p. 3344 - 3350)。優先的経路の対比はまた、走査型電気化学的顕微鏡検査を用いた電気浸透の直接可視化および定量化により決定される毛嚢におけるヒドロキノンの増大されたイオン浸透流動に一致する (Bath, B., H. White, および E. Scott, *Visualization and Analysis of Electroosmotic Flow in Hairless Mouse Skin*, *Pharmaceutical Research*, 2000, 17 (4): p. 471 - 475)。図9は、グルコース抽出の効率が毛の密度と相関をなし、分析物が電気化学的にまたは ^1H -q NMR のいずれかによって検出された、いくつかの試験の結果を収集する。毛包が多いおよび毛包が少ない皮膚試料を通して抽出された濃度の比と、それぞれのその毛の密度比との間の明確な相関を示すデータは、小型「画素」内への RI によるグルコース抽出が、確かに好ましい毛嚢の経路を通して優先的に発生することを実証する。電流測定および NMR 分析技術間の優れた一致性は、画素装置の2つの抽出・検出機能における確信をさらにもたらす。

【0058】

図8(b)は、PET基板に完全に集積化された平面電極を使用した逆イオン浸透法を例示する。データの傾向は、図8(a)で説明したものに非常に類似している。

隣接した「画素」装置間の無視可能な干渉が、さらに例示された(図10)。酵素を収容する2つの「画素」貯蔵部が、エラストマ母体内に組み込まれ、約1.5 mmで分離されていた。「画素」は、単一の連続したグラフェンセンサ上に配置され、その面積は単一の「画素」の面積の2倍である。このことは、電気化学的反応で作用電極として振る舞うグラフェン薄膜を介して結合されるが、2つの個別のヒドロゲル貯蔵部内で発生する酵素反応に関しては結合されない、2つの装置を作成した。クロノアンペロメトリーは、第1に、その貯蔵部がグルコースを収容しない「画素」のうちの1つで実行され、制御の基準線応答が取得された。第2の「画素」でのクロノアンペロメトリー電流が次に、10マイクロモル濃度から1ミリモル濃度の多様な濃度でのグルコース添加の前後で測定された。最後に、第1の「画素」内のクロノアンペロメトリー応答が、2つの装置間の任意のクロストークを評価するために再決定された。第1の「画素」内の基準線応答は、第2の「画素」に添加されたグルコースの総量に対応するそのたった3%しか増大しなかった。言い換えると、両方の装置に共通のグラフェン電極を有しても、個々のヒドロゲル貯蔵部の使用は、個々の「画素」の応答を効果的に切り離す。完全な切り離しを達成することは、個々のグラフェン検出器が想定されるアレイの実際の実施形態で想定される。

【0059】

4. 支持方法

検出装置作製。材料処理。

グラフェンベースのセンサ作製

当初はCu箔上に合成された、化学的蒸着(CVD)によるグラフェンの 3×3 または $2 \times 2 \text{ mm}^2$ の正方形が、 SiO_2/Si (初期の試験で)または可撓性PET基板上に、標準的手順によって転写された(Bae, S.ら, *Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes*, *Nat Nano*, 2010, 5 (8): p. 574 - 578)。 SiO_2/Si 上のグラフェンへの電氣的相互接続が、TiおよびAu配線路(たとえば、それぞれ10/60 nm厚)の連続する成膜によって可能にされ、ここでTiは、Au薄膜の接着層としてはたらき、PET上のグラフェンの場合、電氣的な相互配線は、PETに直接接着するAgで形成された。これらの金属相互配線は、

後にグラフェン自体に置き換えられた。Ptナノ粒子は、次に、グラフェン正方形上に電気化学的に堆積され、電気化学的グルコース検出中に作用電極として用いられるハイブリッドのグラフェン/Ptナノ粒子の画素材料を作成した。画素装置内で、電気化学で使用するグラフェン面積は、次に、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を有する電気回路の残部またはヒドロゲル貯蔵部がグラフェンの上面に投入される中央の円筒状孔を有するシリコンゴムフレームから絶縁される。電気化学回路は、(i)初期の試験では、外部のAg、Ag/AgCl、およびPtワイヤを伴い、(ii)その後の実施形態では、チップ集積化されたAg/AgCl(および、いくつかの変形形態ではPt)電極を伴い完了された。

【0060】

外部基準微小電極。Ag/AgCl微小電極は、基準および対電極としてPtを用いて、1時間1Vで、3.5MのKCl溶液でのクロノアンペロメトリー法によるAgClで純度99.95%の銀ワイヤを被覆することによって作製された。ワイヤは、次に、0.1MのKClを含む1%w/vアガロースゲル内に収容された。電極は、グルコースオキシダーゼ抑制剤の存在する量を制限するために低濃度(0.1M)KClのみ保持した。電極は、使用されないとき、4°Cで0.1MのKCl内に格納され、その性能および経時的安定性が、サイクリックボルタンメトリーを用いて定期的に確認された。

【0061】

チップ集積化された電気化学電極。完全集積化されたセンサを作製するために、電気化学に關与する全ての電極は、基板上に直接画定された。図5で示したように、このことは、Ag/AgCl電極の生成を必要とした。

【0062】

加熱/電子線蒸着：第1に、850nm厚のAgがパターニングされる領域が、ステンシルマスクを用いてPET上に直接堆積された。なお、原理証明の検討に用いられたSiO₂などの他の基板には、Tiの5~10nmの層が、Ag層の密着を保証するためにまず堆積されたことに留意されたい。次に、厚さ300nmの追加のAgCl層が、安定したAgCl/Ag基準電極を作成するためにAg領域上に堆積された。AgおよびAgClのそのように厚い層は、基準電極の長い有効期間を保証するために必要である(B. J. Polkら、Sensors and Actuators B114(2006)239-247)。

【0063】

化学的および電気化学的方法：(i)化学的に、50mMのFeCl₃が、20秒間、室温でAg表面に適用され、続いて脱イオン水でリンスされる。(ii)電気化学的に、作用電極としてオンチップAg電極を、ならびに参照および対電極としてPtワイヤを用いて、1MのKCl用溶液内で、クロノアンペロメトリーによってAgClが生成され、続いて脱イオン水でリンスされた。

【0064】

ネルンスト応答が、AgCl/Ag電極の準備手段に依存せずに、多様な塩化物イオン濃度の溶液内で取得された。

印刷技術：Ag/AgCl電極は、AgおよびAgClベースのインクの積層された層の直接印刷を用いてさらに作成され得る。

【0065】

ゲル注入および酵素収容。グルコースオキシダーゼの8mg/mL溶液の12μLが、PDMSまたはシリコンゴムフレームによって画定されるように、直径2または3mmのグラフェンセンサ領域上に直接堆積された。pH7.4の0.1Mのリン酸塩バッファ内の低温ゲル化アガロースの透明な1%のw/v溶液が、混合液を80°Cを超えて加熱し、その後、28°Cまで、すなわちゲル化温度の約36°Cより低く、冷却することによって調製された。次に、ゲル(まだ28°Cにある)の12μLが、酵素溶液に添加され、その結果、酵素の触媒の特性および構造的特性は、維持され、(Zoldak、G.ら、Irreversible Thermal Denaturation of G

10

20

30

40

50

lucose Oxidase from *Aspergillus niger* Is the Transition to the Denatured State with Residual Structure. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(46): p. 47601-47609)、その効率的なゲル内への収容が可能になった。

【0066】

抽出の電流および時間周期を削減するために、ゲルの体積は、減少させられる必要がある(「形状の検討」という名称のセクションを参照のこと)。したがって、2 μ lの酵素含有ゲルが、0.1 mm厚のPDMS膜の孔(直径1.5 ~ 2 mm)へ注入された。一般に、酵素含有ゲルの体積は、支持するエラストマ膜の厚さおよび貯蔵部孔内部の寸法によって画定された体積を削減することで縮小する。

10

【0067】

酵素の変性点を下回るゲル化温度を有する他のタイプのヒドロゲルの使用により、酵素のヒドロゲルとの直接混合、および次のエラストマ膜の孔への混合物の直接注入が可能になり得る。

【0068】

白金ナノ粒子の堆積。電気化学的方法: スキャン速度20 mV/秒で、0.1 MのH₂SO₄の10 μ L、1.7 mMのヘキサクロロ白金酸水和物で取得されるサイクリックボルタンモグラムは、微小Ag/AgCl基準電極に対して約-0.35 Vの典型的な塩化物還元ピークを示す。

20

【0069】

スパッタリング: アルゴン下でのDCスパッタリングが、 9×10^{-7} mbarより良好なベース圧力で実行された。Ptの10 nmの公称厚さが堆積され、直径3 ~ 5 nmの粒子サイズの結果をもたらした。この方法は、大規模生産に適し得る。

【0070】

逆イオン浸透法(RI)、生体外(豚の皮膚での)。出力データ。

材料準備。腹部の豚の皮膚が地元の畜殺場から取得され、公称厚さ750 μ mへと採皮され、屠殺の24時間以内に冷凍され、使用前に解凍された。その毛嚢の密度は、光学顕微鏡下での検査によって決定された。10および100 mMのD-グルコース溶液(脱イオンの、MilliQ水)が完全強度のPBS内で調製され、RI用皮下溶液としての使用のために夜通し変旋光するために放置された。電気化学的反応の要求を満足するために必要な塩化物量は、グルコース溶液として使用されるPBSによって供給される十分範囲にある、0.9 mMと見積もられた。

30

【0071】

経皮的なRIグルコース抽出。1片の皮膚が、上部区画に面した上皮側面で、垂直フロンツ拡散セルの2つの半身に分離された。下部の、細胞の皮下空間は、10または100 mMのグルコース溶液のいずれか7.5 mLで充填され、1時間磁気で攪拌された。RI抽出は、(i)第1に、外部ワイヤ抽出電極を伴い、次に、(ii)チップ集積化された抽出電極を伴い、2つの試験構成で実行された。

【0072】

40

外部電極: 酵素含有ゲル貯蔵部は、「画素」に接触するAg/AgCl多孔質陰極と共に皮膚表面上に配置された。銀陽極が、皮下区画内に挿入された。2つの電極は、それゆえ皮膚の両側に配置されていたので、イオン浸透回路の電気抵抗は、生体内で期待されるその約半分であり、ここで両方の電極は、皮膚表面上に配置され得、イオン浸透電流は、結果的に、皮膚を2回横断しなければならない。しかしながら、RI抽出は、一定電流で実行されるので、試験管内と生体内とでの状況間の唯一の差は、後者の事例で用いられる電流を駆動するために必要なほぼ2倍だけ高い電圧である(Potts, R.O., Mechanisms of Transdermal Drug Delivery, 1997: Taylor & Francis)。RIは、電源から陽極および陰極間に1時間、0.2 mAの一定電流が通過することによって実行され、皮膚を横切る電位は、電流通

50

過中定期的にモニタリングされた。利用された R I 電流の適用時間により、抽出されたグルコースをゲル貯蔵部の厚み全体を横切って本質的に均一に分散させることが可能になった。

【 0 0 7 3 】

チップ集積化された R I 電極：オンチップ A g および A g / A g C l 対の電極が、上述したオンチップ電気化学電極の作製のための方法と同一の方法により作成された。

装置の出力データ：クロノアンペロメトリーの電流（図 9）が、各測定で典型的には 700 秒毎に記録され、次に、全測定期間の最新の 600 秒にわたり（すなわち、平坦域領域に対応する）平均化し、対応するバックグラウンド値（すなわち、R I 前の）を減じた。

10

【 0 0 7 4 】

可撓性基板上の画素アレイ：特性および動作

1．原理証明

図 1 4 乃至 1 5 は、「詳細な議論 / 材料の選択および装置実現方法」のセクションで説明した方法 1 によって実現された、4 つの異なる 2×2 のグラフェンベースアレイを含む代表的な生体外（豚の皮膚）の抽出 - 検出試験を編集したものを含む。詳しく後述するように、データは、全ての期待される機能的側面を実証する。（i）標的にされる抽出（図 1 4 B および C）、（ii）各画素によってプローブされた毛嚢数との相関および比例関係（図 1 4 B および C）、（iii）単一の毛嚢を通して抽出されたグルコースを検出する能力（図 1 4 C）、（iv）皮下グルコースの濃度との比例関係（図 1 4 B、パネル 3）および（v）アレイ内（図 1 4 B、パネル 1）および異なるアレイ間（図 1 5）の画素のクローズ動作特性。

20

【 0 0 7 5 】

そのような 2×2 アレイの機能は、現実的な使用に適切なパラメータ（抽出の時間および電流、ならびに皮下グルコース濃度）を用いて例示されてきており、たとえば、抽出および検出時間に各々 5 分、10 mM の皮下グルコース濃度、 $0.5 \text{ mA} / \text{cm}^2$ の抽出電流密度、および $1 \sim 2 \mu\text{L}$ の画素デバイス内ゲル体積である。画素および多様な電極の寸法ならびに構成要素は、最終的な実施態様で必要とされるものに対応可能である（図 1 4 A）。

【 0 0 7 6 】

アレイ設計は、先行のセクションで説明した原理に従った（方法 1、下記の「材料の選択およびアレイの実現」をさらに参照のこと）。グルコース抽出のために、試験は、図 5（c）で示した（かつ「構成 3」と明示された）構成を使用し、ここで逆イオン浸透法は、抽出回路を形成する陽極および陰極としての 2 つの隣接した画素装置上に配置された A g / A g C l 電極の最大のもの（図 1 4 A 上に 1 で明示された）を利用する。この構成では、動作サイクルの半サイクル中に、グルコースが画素のうちの 1 つで抽出され、一方、第 2 の半サイクルで、抽出電流の極性が反転され、グルコースは、他の画素内に抽出される。このようにして、抽出および抽出電極のそれぞれの A g C l 成分の回復は、連続して 2 つの隣接する画素に関係する。それぞれの電極内部の A g および A g C l 成分のリサイクルは、各抽出の後の「回復」期間中に抽出電流の極性を反転させることによって獲得される。図 1 4 A 内に 4 で明示された電極は、この構成では役割を果たさない。A g / A g C l は、電気化学的ストレス後のその表面の化学的組成を回復する A g C l（イオン性固体）の能力により、抽出電極対用の材料として選択されており、したがって、電極極性を交番する必要がある抽出 / 回復の繰り返されるサイクル後のその安定性を保証する。対照的に、純粋な A g 電極の表面は、その化学的性質を変化させ得る反応（たとえば酸化）を受ける。アレイで実行される抽出 / 検出の 4 サイクル後に A g / A g C l 電極を横切る電位は、無視可能な程度で（わずかに約 30 mV で）変化し、その回復を確立することが分かった。

30

40

【 0 0 7 7 】

図 1 4 B のパネル 2 は、アレイの画素のそれぞれ（感度検量線が図 1 4 B のパネル 1 に

50

示された)を介した抽出後に取得された電流 - 時間の検出曲線を示し、抽出は、それぞれの画素装置によってプローブされるとき、毛嚢の多様な数を通して発生した。図14Bのパネル2の挿入図は、電流 - 時間の検出曲線毎に、曲線の平坦域に沿って平均され、感度の検量線上にプロットされた検出電流を示し、これにより、誰でも補間によって、画素のそれぞれのゲル内で抽出されたグルコース濃度を決定することが可能になる。分析を簡単にするために、挿入図内のグラフは、図14Bのパネル1で示される4つの電流 - 濃度の検量線の算術平均である。各事例では、このように決定されたグルコースの濃度は、それぞれの画素によって標的にされた毛包の数に比例し、事前に決定されたグルコース毛嚢の抽出流動に基づいた見積値と一致する。さらに、類似した条件で無毛嚢の皮膚を介した抽出は、画素ゲルの中の非常に低いグルコース含有量により、毛嚢の抽出の事例(図14Bのパネル2)におけるよりもはるかに速く減衰する検出電流をもたらす。要するに、これらの試験は、グルコース用の優先の経皮的な抽出経路として毛嚢を利用することによって、アレイが設計されたように動作することを明解に実証する。さらに、図14Bのパネル3は、同一の画素装置を通した抽出後の、検出電流の皮下グルコース濃度との比例関係を示す。図14Cは、抽出 - 検出がアレイで実際的に実行される方法の一例として、アレイのそれぞれの画素によって標的にされた毛嚢の画像と関連付けられた、検出電流対時間の曲線を示す。この場合、単一毛包を通した抽出後の検出がさらにプローブされ得る。

10

【0078】

グラフェン(アレイと使用されるように選択した材料である)に加えて、我々は、より従来の検知材料、この事例では金、を用いることによるアレイ設計の実行可能性を例示した(図16)。比較は、グラフェンおよび金の両方が、白金ナノ粒子に結合されて使用される場合、同一のアレイ設計で統合されるときに、非常に類似した感度の検量線を与えることを示した(図14Bのパネル1を図16と比較のこと)。

20

【0079】

2. 材料選択およびアレイ実現

平面のグラフェンベースのアレイ。手順のステップ:

グラフェンのPETシート上への湿式転写。銅基板上に成長された化学的蒸着(CVD)で合成されたグラフェンが、標準的湿式転写手順を用いて可撓性の事前に研磨されたPETシート上に転写された(Li, X., Zhu, Y., Cai, W., Borysik, M., Han, B., Chen, D., Piner, R.D., Colombo, L. および Ruoff, R.S., Transfer of Large-Area Graphene Films for High-Performance Transparent Conductive Electrodes. Nano Letters, 2009, 9(12): 4359 - 4363)。2x2のアレイのために、4つのそのようなグラフェン小片(最終的な所望のサイズより大きな)が、位置調整を案内するために、ステンシルマスク(後続の電極および配線路を画定するように設計された)を用いておおよその位置でPETシート上の所望の位置に配置された。グラフェン小片は、グルコースの電気化学的検出でのアレイ画素の各々用の作用電極を提供する。層の電氣的な断絶をもたらす、グラフェン層での潜在的な構造的断絶/分裂(CVD成長中または転写手順中の機械的ストレスによってもたらされる)を回避するために、第2のグラフェン層が、先に転写された小片のそれぞれの上に続けて転写される。

30

40

【0080】

物理的蒸着による電極および配線路の堆積(加熱蒸着)。画定された形状を有する薄膜電極を堆積するために、特注のまたは産業用のポリイミドテープ(カプトン(登録商標))とレーザ機械加工されたステンシルマスクのセットが、連続して配置され、PETで支持されたグラフェン小片の上で位置決めされた。ステンシルマスクセットは、アレイ配置に合わせて製作され、そのような配置の例は、図4-1、図4-2で与えられており、この特定の事例では、図4-1(a)からの設計が使用されている。500nmの銀の薄膜が、銀層の密着力を助長するために事前に堆積された30nmのパラジウム層の上に堆積された。500nm厚のAgCl層が、基準/対電極を完成させるために銀薄膜の上に続

50

いて堆積された。AgおよびAgClのそのように厚い層は、基準電極の長い有効期間を保証するために必要である(Polk, B. J., Stelzenmuller, A., Mijares, G., MacCrehan, W. および Gaitan, M., Ag/AgCl microelectrodes with improved stability for microfluidics. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 114(1): 239-247)。

【0081】

グラフェンパターニング。グラフェン小片は、次に、所定の形状にパターニングされた(たとえば、図5からの配置に従って)。低エネルギーではあるが、酸素プラズマが、プラスチック基板によって支持されたグラフェンをエッチングするために使用され得るが、現在の現実では、機械的切断(外科用メスを使用した)が、画素小片から過剰なグラフェンを除去するためにうまく利用された。

10

【0082】

酵素が収容されたゲルを支持するように設計されたエラストマ膜の実現および転写。硬化作用物質と混合されたPDMSが、PET支持シート上にスピンコートされ、硬化されて100 μ m厚の膜をもたらした。円形孔(直径1.5~3mmの)が、次に、貯蔵部ゲル用のソケットを作成するために掘削された。注意深い脱イオン水槽内での水面下の剥離の後、PDMS膜が、画定された電極および配線路を有するアレイ上に転写され、ソケットの各画素の電気化学的セル領域への位置合わせを保証した。組立体が、次に、空气中で乾燥させるために放置された。

20

【0083】

グラフェン画素電極上への白金ナノ粒子の堆積。白金ナノ粒子は、アルゴン下のDCスパッタリングによって、適切なステンシルマスクを通して画素のグラフェン領域上に形成され、堆積された。アルゴンガス圧力およびスパッタリング時間(典型的には20秒の)を調整することによって、直径3~5nmの粒子が達成された。

【0084】

ゲル注入および酵素収容。PBSのpH7.4のアガロースの透明な2%のw/v溶液1mLが、80 $^{\circ}$ Cを超えて加熱することによって形成された。これが、次に、スライドガラス上に(広がり平坦になることを可能にして)注入され、迅速なゲル化を達成するために換気フード内に15分間配置された。続いて、ゲルのブロック(約5 μ Lの体積を有する)が、所定の画素領域に対応する占有面積を用いて、切り取られた。次に、0.5~1 μ Lの酵素溶液(12mg/mL)が、ゲルブロックの電極側に配置され、吸収された。最後に、ゲルブロックは、PDMS膜のソケット内部の個々の画素の上に配置された。それらの最終的な形態では、ゲルブロックは、体積約1~2 μ Lへと収縮した。

30

【0085】

平面の金ベースのアレイ。

グラフェンベースのアレイに使用される全ての処理ステップは、グラフェン薄膜を含むものを除き、同一に留まる。グラフェンの代わりに、約200nm厚の金の画素領域が、適切なステンシルマスクを通して、所望の位置に加熱蒸着によって堆積された。

【0086】

本明細書で引用された、または本出願で提出された、全ての出版物、特許、および特許出願は、情報開示陳述書の一部として提出される引用を含めて、その全体が引用することにより本明細書に組み込まれる。

40

【 図 5 】

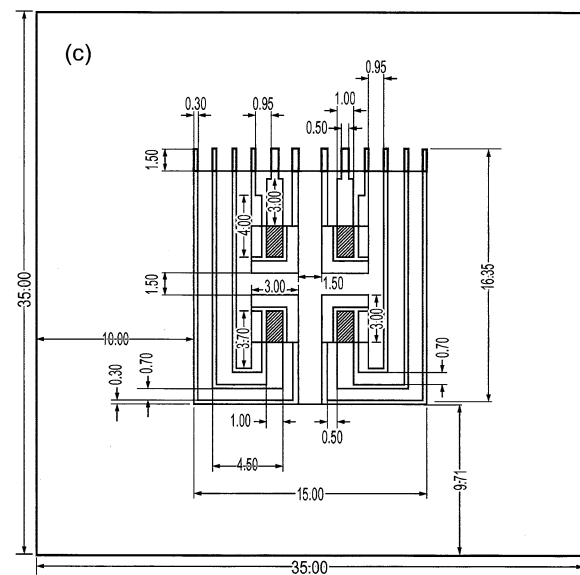


FIG. 5

【圖 7】

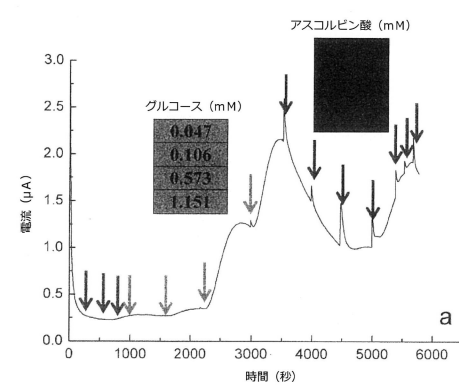


Figure 7

アセトアミノフェン (mM)

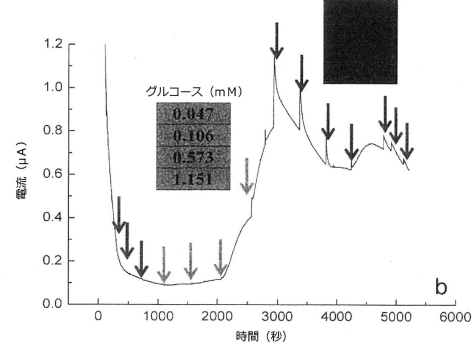


FIG. 6

【図 8】

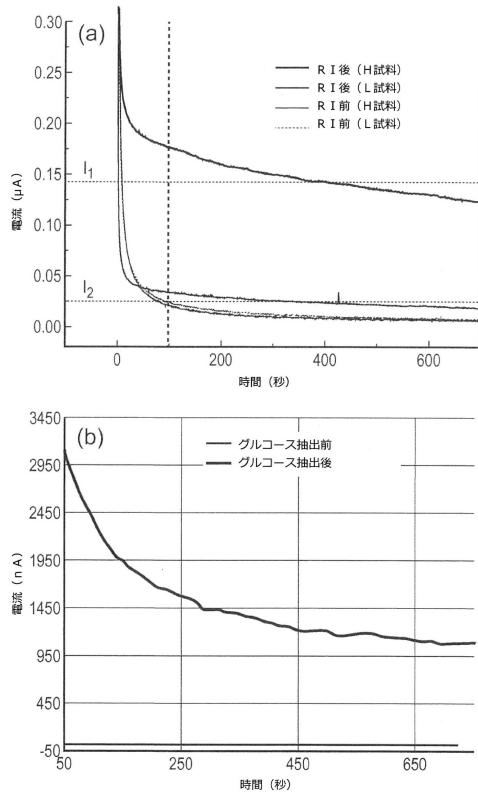


FIG. 8

【図 9】

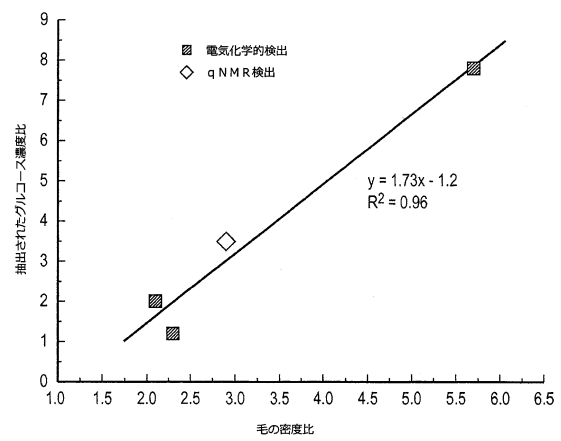


FIG. 9

【図 10】

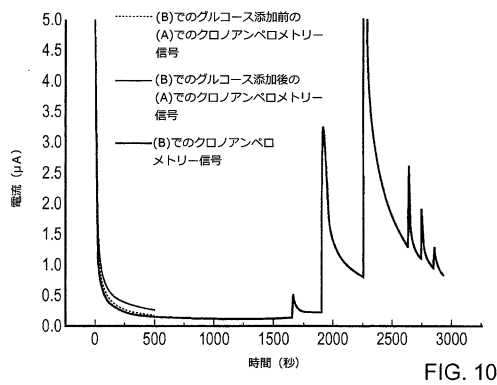


FIG. 10

【図 12】

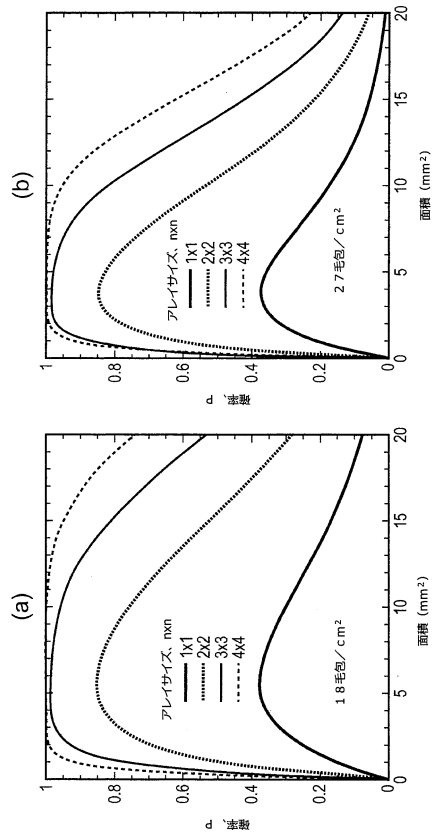


FIG. 12

【図 11】

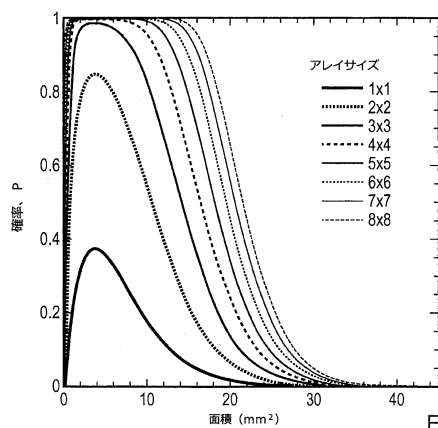


FIG. 11

【図 12 - 1】

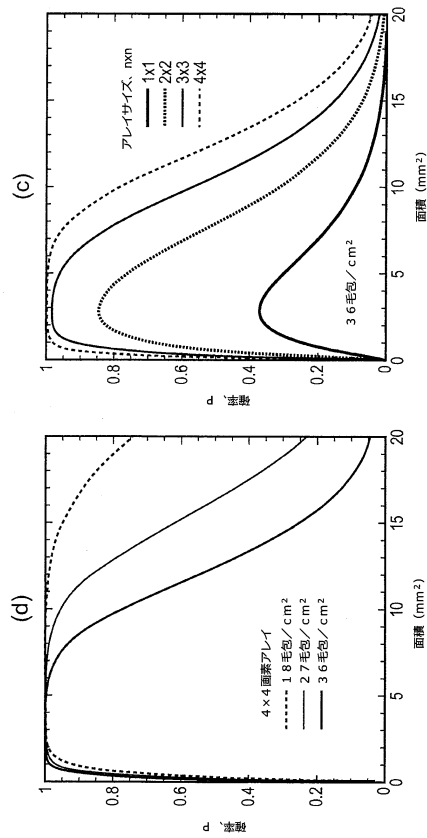


FIG. 12 (Continued)

【図 13】

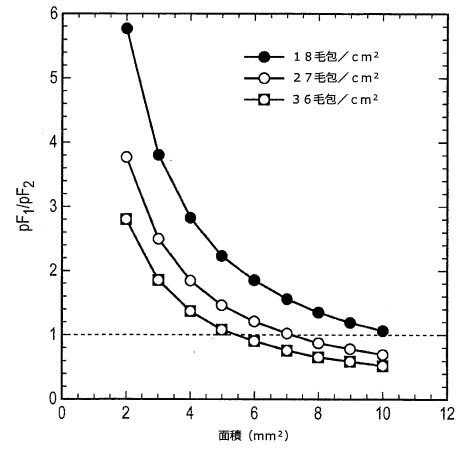


FIG. 13

【図 14】

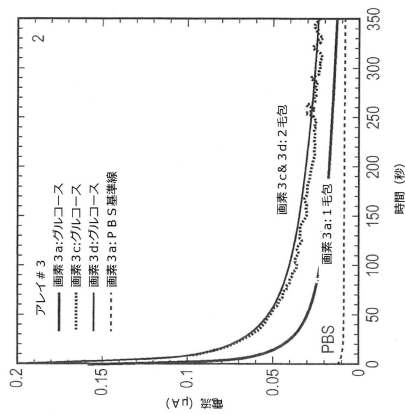
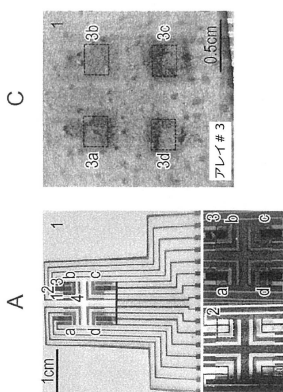


FIG. 14



【図 14 - 1】

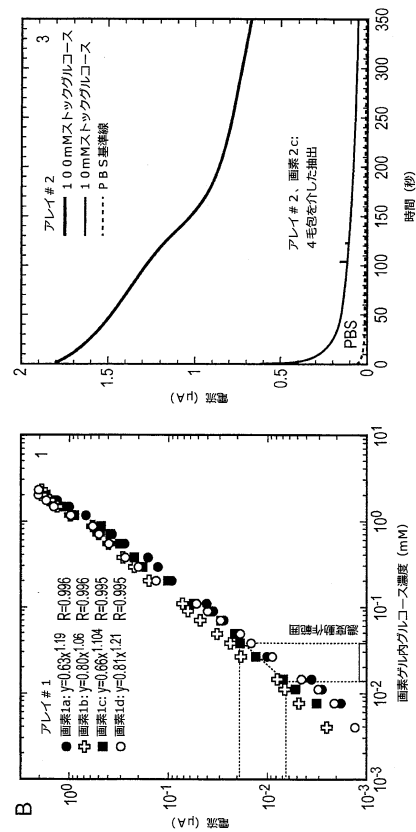


FIG. 14 (Continued)

【図 14 - 2】

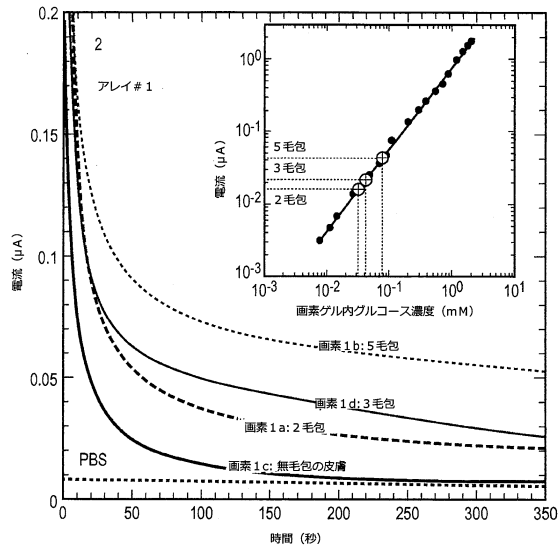


FIG. 14 (Continued)

【図 15】

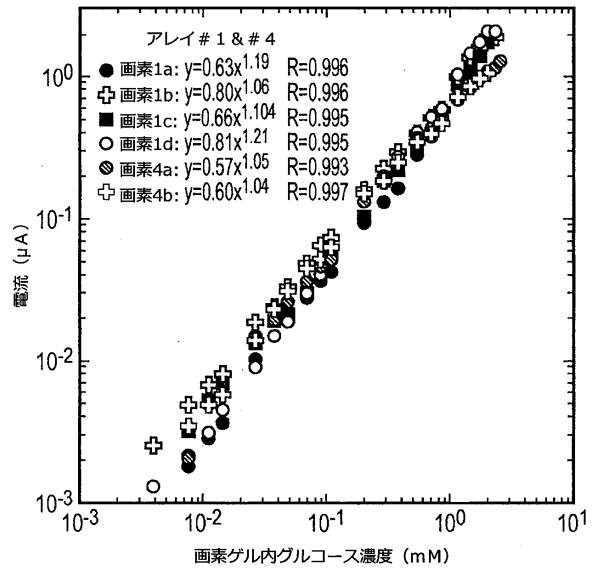


FIG. 15

【図 16】

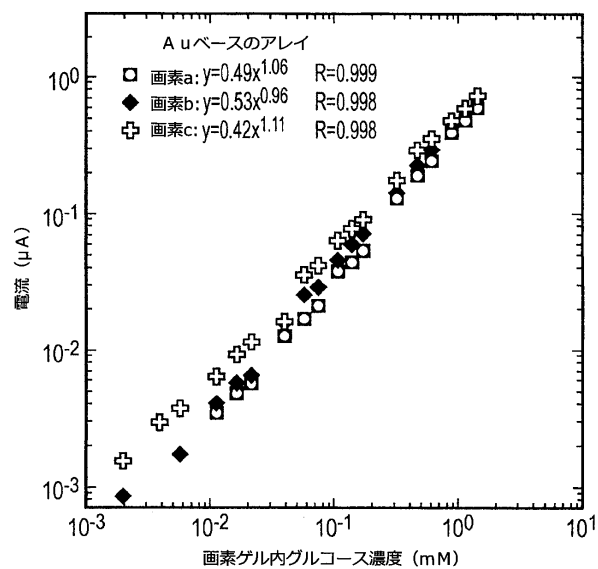


FIG. 16

フロントページの続き

- (72)発明者 ガイ, リチャード
イギリス国 BA2 7AY パース アンド ノース イースト サマセット パース クラバ
ートン ダウン, ウェセックス・ハウス, ザ ユニバーシティ オブ パース
- (72)発明者 イリエ, アデリーナ
イギリス国 BA2 7AY パース アンド ノース イースト サマセット パース クラバ
ートン ダウン, ウェセックス・ハウス, ザ ユニバーシティ オブ パース
- (72)発明者 リパーニ, ルカ
イギリス国 BA2 7AY パース アンド ノース イースト サマセット パース クラバ
ートン ダウン, ウェセックス・ハウス, ザ ユニバーシティ オブ パース
- (72)発明者 ドゥオンメネ, フロリアント
イギリス国 TW3 3DY ロンドン, ハウンズロー, エイヴオンウィック・ロード 22
- (72)発明者 デュボン, ベルトラン・ジルベール・ロジェ・ジャック
ポーランド国 62 020 スバジェンツ, クレンタ 3, ウ1

審査官 樋口 祐介

- (56)参考文献 特表2009-518113(JP, A)
特開2015-188475(JP, A)
特表平10-506293(JP, A)
特開2013-053925(JP, A)
特開2010-129385(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61B5/06-5/22
G01N27/26-27/404,
27/414-27/416,
27/42-27/49