(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年1月5日(05.01.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/276129 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 27/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/025047

(22) 国際出願日： 2021年7月1日(01.07.2021)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(71) 出願人: 株式会社日立ハイテク (**HITACHI HIGH-TECH CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1056409 東京都港区虎ノ門一丁目１７番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: グェンファム ハイ フィ (**NGUYENPHAM Hai Huy**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目６番６号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 柳川 善光 (**YANAGAWA Yoshimitsu**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目６番６号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 赤堀 玲奈 (**AKAHORI Rena**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目６番６号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP).

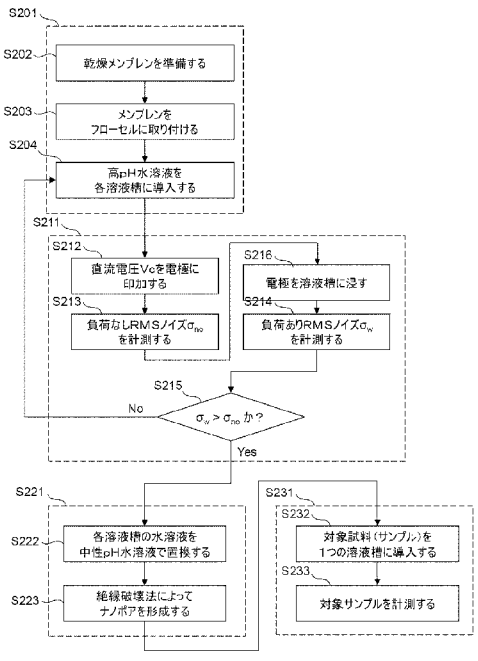
(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (**HIRAKI & ASSOCIATES**); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目５－１ 愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,

(54) **Title:** NANOPORE FORMATION METHOD

(54) 発明の名称： ナノポア形成方法

[図4]



S202 Prepare dried membrane
S203 Attach membrane to flow cell
S204 Introduce high-pH aqueous solution into each solution vessel
S212 Apply direct-current voltage Vc to electrode
S213 Measure RMS noise σno without load
S214 Measure RMS noise σw with load
S215 σw > σno ?
S216 Immerse electrode in solution vessel
S222 Replace aqueous solution in each solution vessel by aqueous solution having neutral pH value
S223 Form nanopores by breakdown method
S232 Introduce target sample (sample) into one solution vessel
S233 Measure target sample

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to form nanopores each having a proper size with high yield. For achieving the purpose, the present disclosure proposes a nanopore formation method for forming nanopores in a membrane, the method comprising: introducing an aqueous solution having a first pH value into a first solution vessel and a second solution vessel which are insulated from each by a membrane; securing the hydrophilicity of the surface of the membrane; replacing the aqueous solution having the first pH value in the first solution vessel and the second solution vessel by an

WO 2023/276129 A1

［続葉有］

EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

aqueous solution having a second pH value that is lower than the first pH value after the hydrophilicity of the surface of the membrane is secured; and immersing an electrode in each of the first solution vessel and the second solution vessel in which the aqueous solution having the second pH value is contained to cause breakdown, thereby forming nanopores in the membrane (see Fig. 4).

(57) 要約:歩留まりが高く、適切なサイズのナノポアを形成する。このため、本開示は、メンブレンにナノポアを形成するナノポア形成方法であって、メンブレンによって絶縁した第１溶液槽と第２溶液槽に第１ｐＨの水溶液を導入することと、前記メンブレンの表面の親水性を確保することと、メンブレンの表面の親水性が確保された後、第１溶液槽および第２溶液槽の第１ｐＨの水溶液を、第１ｐＨよりも低い第２ｐＨの水溶液で置換することと、第２ｐＨの水溶液を収容する第１溶液槽および第２溶液槽のそれぞれに電極を浸し、絶縁破壊を発生させて前記メンブレンにナノポアを形成することと、を含む、ナノポア形成方法について提案する（図４参照）。

明　細　書

発明の名称 ： ナノポア形成方法

技術分野

[0001] 本開示は、メンブレンにナノポアを形成するナノポア形成技術に関するものである。

背景技術

[0002] ナノポアセンサは、例えば、分子、粒子、ＤＮＡ、タンパク質などの解析する生体試料分析装置として開発されている。ナノポアセンサでは、生体試料（サンプル）のサイズよりも大きいか同等の大きさの細孔、例えば径が１ｎｍ～１００ｎｍの孔が、薄膜（メンブレン）上に形成され、水溶液がメンブレンによって絶縁される第１溶液槽および第２溶液槽に導入される。生体試料（サンプル）は、第１溶液槽あるいは第２溶液槽の１つの溶液槽に導入される。各溶液槽に浸入する電極間には電圧が印加され、電極間を流れるイオン電流が測定される。生体試料の物体特性および構造特性は、生体試料が細孔を通過する際に流れる封鎖イオン電流を測定することによって検知することができる。

[0003] ナノポアセンサには２種類あり、１つは生体膜（生体メンブレン）に基づくもので、もう１つは固体膜（固体メンブレン）に基づくものである。生体メンブレンを用いるナノポアセンサでは、孔（ポア）は、脂質二重膜（lipid bilayer membrane）上にナノメートルサイズの細孔を有する浮遊タンパク質によって形成される。一方、固体ナノポアでは、膜（メンブレン）は窒化シリコン（ＳｉＮ）などの高力学的強度材料製であり、ナノメートルサイズの細孔は、当該メンブレンへの電子線照射、化学エッチング技術、またはメンブレンに電圧を印加してポアを形成する絶縁破壊技術（dielectric breakdown technique）によって製造される。絶縁破壊技術では、外部電源等によってメンブレンに電位差を生じさせることでストレスを印加し，絶縁破壊によりナノポアを形成する。この絶縁破壊技術には、対象試料（ターゲットサンプ

ル）を計測する直前にナノポアをメンブレン上に形成することができるため、廉価なナノポア製造コスト、ユーザーフレンドリー、オンサイト加工（ユーザの使用場所での加工）、新鮮なナノポアを形成可能などの利点がある。

[0004] 例えば、特許文献１あるいは非特許文献１は、中性ｐＨ水溶液（ｐＨ７－７．５）を用いて、ＳｉＮ膜上にナノポアを形成することについて開示する。しかし、乾燥メンブレンの表面が疎水性となるため、導入された水溶液が乾燥メンブレンの表面に接触しないことがあり，ナノポア形成の歩留まりが悪化する恐れがある。固体膜が周囲環境で疎水性になる理由は、表面が酸化したり、または／かつ、不要な有機物質が表面に付着するためと考えられる。そのため、研究室では、通常、使用する前にメンブレンを親水化する処理が必要となる。通常、研究室では、ピラニア処理またはプラズマ処理によって親水性処理を行っている。しかし、ナノポアセンサを製品化する場合、エンドユーザにこれらの危険な処理を行わせることは現実的ではなく、他の代替技術が必要となる。

[0005] 例えば、特許文献２は、水の量、温度、および塩分濃度などの特定条件において水溶液中でメンブレンを保管する方法を導入することを開示する。また、特許文献３は、親水性表面と可溶性物質を含む保護層とを付着させることにより、メンブレンを保管する方法を導入することを開示する。さらに、特許文献４は、ＥＷＯＤ（Electorowetting On Dielectric）法を導入し、高電圧を印加することで疎水性および親水性特性を制御することにより水溶液の液滴をメンブレンの位置に移動させることを開示するが、この方法でもメンブレン表面のプラズマ処理が必要となる。また、特許文献５は、パルスレーザに基づくナノポア製造方法を導入し、試料（サンプル）測定前にピラニア処理を実施して親水性を実現することを開示する。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：ＷＯ２０１５／０９７７６５号

特許文献2：ＷＯ２０１９／００８７３６号

特許文献3：特開２０１９－７４４９５号公報

特許文献4：ＷＯ２０２０／２１７３３０号

特許文献5：ＷＯ２０２０／１９４３０３号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Harold Kwok, Kyle Briggs, and Vicent Tabard-Cossa, “Nanopore fabrication by controlled dielectric breakdown”, PLos ONE 9 (3), e92880 (2014), DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092880

非特許文献2：Itaru Yanagi, Rena Akahori, and Ken-ichi Takeda, “Stable fabrication of a large nanopore by controlled dielectric breakdown in a high-pH solution for the detection of various-sized molecules”, Scientific Reports 9, 13143 (2019), DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-019-49622-y

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、特許文献１および非特許文献１では、ピラニア処理やプラズマ処理を伴わずに中性ｐＨ水溶液を用いて絶縁破壊を行っているものの、乾燥メンブレン表面が疎水性特性を有するため、ナノポア形成の歩留まりは低い。また、ユーザの使用場所（オンサイト）でピラニア処理やプラズマ処理を操作しなければならないとすると、ユーザに加工の負担を掛けたり、安全上の好ましくないという課題があり、現実的ではない。また、特許文献２および３による代替保存技術を用いたとしても、保存プロセス自体がユーザに負担を生じさせる可能性がある。

[0009] 一方、アルカリ水溶液または高ｐＨ水溶液は、低表面張力特性を有しており、メンブレン位置に入り込んでメンブレン表面に付着した不要物質を洗い流すことができる。非特許文献２では、このような高ｐＨ水溶液を利用して、約２０ｎｍのメンブレン上にナノポアを形成している。しかし、高ｐＨ水溶液の利用は、化学エッチングプロセスのため、形成されるナノポアのサイズが制御不能であり、メンブレンの劣化を引き起こす可能性がある。サブナ

ノメートルのオーダにおいてナノポアサイズを精密に制御することは、ＤＮＡシーケンシングなどの実用的な生体分析を実行する上では重要であると考えられる。

本開示は、このような状況に鑑み、歩留まりが高く、適切なサイズのナノポアの形成技術を提案する。

問題を解決するための手段

[0010] 上記課題を解決するために、本開示は、メンブレンにナノポアを形成するナノポア形成方法であって、前記メンブレンによって絶縁した第１溶液槽と第２溶液槽に第１ｐＨの水溶液を導入することと、前記メンブレンの表面の親水性を確保することと、前記メンブレンの表面の親水性が確保された後、前記第１溶液槽および前記第２溶液槽の前記第１ｐＨの水溶液を、前記第１ｐＨよりも低い第２ｐＨの水溶液で置換することと、前記第２ｐＨの水溶液を収容する前記第１溶液槽および前記第２溶液槽のそれぞれに電極を浸し、絶縁破壊を発生させて前記メンブレンにナノポアを形成することを含む、ナノポア形成方法について提案する。

[0011] 本開示に関連する更なる特徴は、本明細書の記述、添付図面から明らかになるものである。また、本開示の態様は、要素及び多様な要素の組み合わせおよび以降の詳細な記述と添付される請求の範囲の様態により達成され実現される。

発明の効果

[0012] 本開示の技術によれば、歩留まりが高く、適切なサイズのナノポアを形成することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]メンブレンにナノポア形成する前のナノポアセンシングシステムの構成例を示す図である。

[図2]メンブレン表面の親水性確認からナノポア形成までの処理概要を説明するための図である。

[図3]ナノポアセンシングシステム１００における試料計測の処理概要を説明

するための図である。

[図4]本実施形態による、メンブレンに対するナノポア形成から試料計測までの処理の流れを説明するためのフローチャートである。

[図5]絶縁破壊技術を用いたナノポア形成処理の詳細内容（例）を示すフローチャートである（パルス電圧）。

[図6]絶縁破壊技術を用いたナノポア形成処理の詳細内容（例）を示すフローチャートである（定電圧）。

[図7]絶縁破壊技術を用いたナノポア形成処理の詳細内容（例）を示すフローチャートである（パルス電流）。

[図8]絶縁破壊技術を用いたナノポア形成処理の詳細内容（例）を示すフローチャートである（定電流）。

[図9A]絶縁破壊技術によってナノポアがメンブレン１０１に形成される前のＩＶ（電流‐電圧）特性を示す図である。

[図9B]パルス電圧を印加する形態（図５）に対応し、パルス電圧V_pを４Ｖから４．８Ｖまで段階的に増加させ、各電圧についてパルス期間（パルス電圧の印加期間）を２００ｍｓまで増加させた後に、特定の低電圧V_m（一例として０．４Ｖ）を印加して計測した電流I_m（イオン電流）の特性を示す図である。

[図10A]印加直流電圧V_cが０Ｖのときに計測される電流値（フローセルに電極１０４および１０９を挿入する前と後の電流値）を示す図である。

[図10B]負荷ありＲＭＳノイズが負荷なしＲＭＳノイズの数倍（図１０Ａでは５倍）大きくなった状態でメンブレン１０１に対してナノポア形成処理（Ｓ２２１）を実行したときの実験結果（電圧印加累積時間‐イオン電流特性）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 本実施形態では、メンブレンの材料、厚さ、サイズ、および数は制限されない。また、本実施形態では、高ｐＨ水溶液の水溶液の組成、ナノポア形成に用いる中性ｐＨ水溶液の水溶液の組成、および試料測定に用いる水溶液の

組成についても制限されない。ナノポア形成に用いられる絶縁破壊技術は、単なる一例に過ぎず、様々な形態の絶縁破壊技術を適用することができる。さらに、本実施形態では、ＲＭＳノイズを測定する際に静電容量ノイズ測定方法を用いているが、これに限定されるものでもない。

[0015] ＜概要＞

（ｉ）本実施形態では、ナノポアセンシングシステムにおいて、乾燥メンブレンが、ナノポアが形成される前、フローセル（ナノポアセンシングシステムの一部）に取り付けられ、フローセルの第１溶液槽と第２溶液槽とを絶縁する。各溶液槽には、高ｐＨ水溶液（第１ｐＨ水溶液）が導入（充填）される。電極が各溶液槽の溶液中に沈入され、電圧あるいは電流を供給することができる電気機器ユニットに接続される。ナノポア形成を行う前には、まず、無負荷状態と負荷状態における静電容量ノイズが計測（測定）される（静電容量ノイズ測定プロセス）。メンブレン表面が親水性になり、水溶液がメンブレン表面に接触しているか否か確認される。メンブレン表面の親水性が確認された場合、各溶液槽内の高ｐＨ水溶液はそれより低いｐＨの水溶液（第２ｐＨ水溶液：中性ｐＨ水溶液）によって迅速に置換される（水溶液置換プロセス）。これは、メンブレンが高ｐＨ水溶液による化学エッチングプロセスにより分解されやすいためである。続いて、電極が各溶液槽にそれぞれ浸され、電気機器ユニットによって電圧あるいは電流が供給される。これにより、絶縁破壊が起こり、ナノポアがメンブレン上に形成される。

[0016] （ｉｉ）上記静電容量ノイズ測定プロセスでは、２つの電極間に直流電圧が印加される。そして、二乗平均平方根（ＲＭＳ：Root Mean Square）ノイズまたは電気機器ユニットのノイズが、負荷のない状態（メンブレンによって絶縁された両溶液槽に各電極を差し込まない状態）と負荷がある状態（メンブレンによって絶縁された両溶液槽に各電極を差し込んだ状態）で監視される。ここで、直流電圧は、メンブレンの絶縁破壊惹起電圧未満にすることができる。例えば、５ｎｍ厚のメンブレンを用いる場合、５Ｖの絶縁破壊電圧を呈するため、静電容量ノイズをチェックする直流電圧は－２．５Ｖから２．

５Ｖまでである。このように、静電容量ノイズ測定プロセスで印加電圧を絶縁破壊惹起電圧未満とすることにより、当該プロセス中に不要な絶縁破壊の発生を防止することができる。

[0017] 本実施形態では、負荷あり静電容量ノイズ（負荷ありＲＭＳノイズ）が負荷なし静電容量ノイズ（負荷ありＲＭＳノイズ）よりも数倍（少なくとも２倍以上）高い場合、メンブレン表面は親水性になった、あるいは水溶液がメンブレン表面に接触している状態になったと判断される。一方、負荷ありＲＭＳノイズが負荷なしＲＭＳノイズと同等以下である場合、水溶液がメンブレン表面に接触しないことがある。このため、高ｐＨ水溶液（第１ｐＨ水溶液）が各溶液槽から取り出され、再び導入（充填）される。再導入する場合には、第１ｐＨ水溶液のｐＨをさらに高くしてもよい。また、第１ｐＨ水溶液をメンブレン表面上で前後に移動させる（例えば、ピペッティング処理）ことにより、第１ｐＨ水溶液とメンブレン表面との接触を確かなものにするようにしてもよい。

[0018] （iii）水溶液置換プロセスでは、各溶液槽から第１ｐＨ水溶液（高ｐＨ水溶液）を取り出し、第１ｐＨより低い第２ｐＨ水溶液（例えば、中性ｐＨ水溶液）を各溶液槽に導入する。このプロセスは、各溶液槽の水溶液が確実に中性となるように数回行うようにしてもよい。なお、当該水溶液置換プロセスを行った場合、例えば、各溶液槽内の水溶液のｐＨが中性であることを確認するようにしてもよい。

[0019] （iv）所望のサイズのナノポアは、絶縁破壊を起こさせることによってメンブレン上に形成することができる。試料（サンプル）は、２つのうち１つの溶液槽に導入することができる。各溶液槽の電極間に電圧が印加されると、あるいは当該電極間に電流が流されると、イオン電流が計測される。対象の分子または粒子（ターゲットの分子または粒子）は、対象の分子または粒子がナノポアを通過する際のイオン電流(封鎖電流)を測定することによって検出することができる。

[0020] （v）乾燥メンブレンの疎水性特性による固体ナノポアセンサの利用率の低さ

は、上述のように、高ｐＨ水溶液を導入することにより克服される。また、静電容量ノイズを測定することによってメンブレン表面に水溶液が接触することを確認した後は、絶縁破壊技術によるナノポア製造のための中性ｐＨ水溶液へ迅速に置換することによって、ナノポアのサイズは効果的に制御される。また、メンブレンの高度な保存処理を用いる負担も回避される。

[0021] ＜ナノポアセンシングシステムの構成例＞

図１は、メンブレンにナノポアを形成する前のナノポアセンシングシステムの構成例を示す図である。ナノポアセンシングシステム１００は、水溶液（例えば、１ＭＫＣｌ　ｐＨ１２．７）を収容する第１溶液槽１０３と、水溶液（例えば、１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ１２．７）を収容する第２溶液槽１１０と、液体密閉用ガスケット１０２および１１１と、水溶液に浸された電極（例えば、Ａｇ／ＡｇＣｌ電極）１０４および１０９と、電源や電流を供給するための電気機器ユニット１０７と、電極１０４と電気機器ユニット１０７とを接続する電気導線１０５と、電極１０９と電気機器ユニット１０７とを接続する電気導線１０８と、を備える。メンブレン１０１は、液体密閉用ガスケット１０２および１１１によって挟むことによりナノポアセンシングシステム１００に配置される。また、メンブレン１０１を配置した後に、水溶液１０６および１１２が第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０にそれぞれ注入される。なお、メンブレン１０１には、例えば、乾燥ＳｉＮ膜または多元膜を用いることができる。

[0022] ＜メンブレン表面の親水性確認およびナノポア形成：概要＞

図２は、メンブレン表面の親水性確認からナノポア形成までの処理概要を説明するための図である。

[0023] まず、図１に示されるように１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ１２．７水溶液１０６および１１２を第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０のそれぞれに収容した状態で静電容量ノイズ（ＲＭＳノイズ）を測定して当該水溶液１０６および１１２がメンブレン１０１の表面に接触しているか否か（メンブレン１０１の表面の親水性となったか否か）が確認される（詳細については後述）。そ

の後、１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ １２．７水溶液１０６および１１２を第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０から排出し、第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ７．５水溶液１３０および１３１が充填される。つまり、１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ １２．７水溶液１０６および１１２が１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ７．５水溶液１３０および１３１によって置換される。

[0024] 水溶液置換後、絶縁破壊技術に基づいて、電気機器ユニット１０７から電圧または電流を印加することにより、メンブレン１０１に所望のサイズのナノポア１１３を形成することができる（ポアサイズが制御可能）。

[0025] ＜試料（サンプル）測定＞

図３は、ナノポアセンシングシステム１００における試料計測の処理概要を説明するための図である。図３に示されるように、試料（サンプル）１２０は、第1溶液槽１０３あるいは第２溶液槽１１０の一方に導入される。そして、電気機器ユニット１０７により、２０Ｖ以下の低電圧（例えば、２Ｖ以下）を電極１０４および１０９間に印加することにより、試料１２０がナノポア１１３を通過する際のイオン電流(封鎖電流)を計測する。なお、試料（サンプル）測定時に第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に充填される水溶液１４０および１４１のそれぞれは、計測対象の試料（ターゲットサンプル）の種類に依存する。

[0026] ＜ナノポア形成から試料計測までの処理の詳細＞

図４は、本実施形態による、メンブレンに対するナノポア形成から試料計測までの処理の流れを説明するためのフローチャートである。本実施形態によるナノポア形成から試料計測までの処理は、親水性処理Ｓ２０１、親水性確認処理Ｓ２１１、ナノポア形成処理Ｓ２２１、および試料（サンプル）計測処理Ｓ２３１によって構成される。つまり、メンブレン１０１の表面の親水性を確保するためにｐＨが高い水溶液（第１ｐＨの水溶液）にメンブレン１０１を浸すこと（ステップ２０１）、メンブレン１０１の表面が実際に親水性となっているか確認すること（ステップ２１１）、ｐＨが低い水溶液（第１ｐＨよりも低い第２ｐＨの水溶液）で絶縁破壊法によりナノポアを形成

すること（ステップ２２１）、および試料計測すること（ステップ２３１）により、高歩留まり、およびサイズ制御可能なナノポアを用いて試料（サンプル）を測定することが可能となる。

[0027] （ｉ）ステップ２０１

(i-1)ステップ２０２

まず、オペレータは、乾燥メンブレン１０１を準備する。

[0028] (i-2)ステップ２０３

次に、オペレータは、乾燥メンブレン１０１をフローセルに取り付ける。ここで、フローセルは、ナノポアセンシングシステム１００（図１から３参照）における、第１溶液槽１０３と、第２溶液槽１１０と、液体密閉用ガスケット１０２および１１１と、を含む構成部分に対応する。

[0029] (i-3)ステップ２０４

オペレータは、高ｐＨ（ｐＨ８より高い）の水溶液（第１ｐＨの水溶液）、例えば、１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ１２．７の水溶液をフローセルの第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に導入（充填）する。

[0030] （ｉｉ）ステップ２１１

親水性確認処理（ステップ２１１）は、電極間に直流電圧Vcを印加し（ステップ212），フローセル（第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０）に電極を挿入せずにＲＭＳノイズを計測し，（負荷なしＲＭＳノイズ計測：ステップ２１３）、およびフローセルに電極を挿入し（ステップ216）、ＲＭＳノイズを計測する（負荷ありＲＭＳノイズ計測：ステップ２１４）各ステップから構成される。

[0031] (ｉｉ-1)ステップ２１２

オペレータは、電気機器ユニット１０７を介して、Ａｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９間にＤＣ電圧（Ｖｃ）を印加する。この段階では、Ａｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９は、第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０の水溶液のそれぞれには浸されていない状態である。ここで印加される電圧は、例えば、１０Ｖ以下の低電圧である。これは、ステップ２１４にお

いて、所望されない絶縁破壊の発生を防止するためである。

[0032] (ii-2)ステップ２１３

オペレータは、Ａｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９が水溶液（第１ｐＨの水溶液）に浸されていない状態で、電流のＲＭＳ（Root Mean Square）ノイズ（負荷なしＲＭＳノイズσ_{no}）を計測する。

[0033] (ii-３)ステップ２１６

オペレータは、Ａｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９を水溶液（第１ｐＨの水溶液）に浸す。

[0034] (ii-４)ステップ２１４

続いて、オペレータは、Ａｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９を水溶液（第１ｐＨの水溶液）に浸した状態（第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に電極１０４および１０９を挿入した状態）で、電流のＲＭＳ（Root Mean Square）ノイズ（負荷ありＲＭＳノイズσ_{w}）を計測する。

[0035] (ii-５)ステップ２１５

オペレータは、負荷なしＲＭＳノイズσ_{no}と負荷ありＲＭＳノイズσ_{w}を比較する。具体的には、ＲＭＳノイズσ_{w}が負荷なしＲＭＳノイズσ_{no}の数倍（例えば、２倍）大きいか判断される。負荷ありＲＭＳノイズσ_{w}が負荷なしのＲＭＳノイズσ_{no}よりも大きい場合（ステップ２１５でＹｅｓの場合）、メンブレン１０１の表面が親水性を有すること（親水性特性：メンブレン１０１の表面が完全に水溶液と接している状態）が確認され、親水性確認処理（ステップ２１１）は終了し、処理はナノポア形成処理Ｓ２２１に移行する。負荷ありＲＭＳノイズσ_{w}が負荷なしＲＭＳノイズσ_{no}以下である場合（ステップ２１５でＮｏの場合）、メンブレン１０１の表面の親水性は担保されず、処理はステップ２０４に戻る。この場合、ステップ２０４では、第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０内の水溶液（第１ｐＨの水溶液：例えば、１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ１２．７の水溶液）を排出し、新しい第１ｐＨの水溶液が第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に充填され、再度親水性確認処理（ステップ２１１）が実行される。なお、再度親水性確認処理を実行すると

き、親水性確認処理を複数回（例えば５回）実行してもメンブレン１０１の表面の親水性が確認できなかった場合には、水溶液のｐＨを上げる（ただし、ｐＨ１４より低く設定する）ようにしてもよい。

[0036] なお、上述では、オペレータが負荷なしＲＭＳノイズσ_{no}と負荷ありＲＭＳノイズσ_wを比較するが、ナノポアセンシングシステム１００にコンピュータ（図示せず）を接続し、コンピュータが当該比較処理を行ってもよい。このとき、コンピュータは、負荷ありＲＭＳノイズσ_wが負荷なしのＲＭＳノイズσ_{no}よりも大きい場合には、表示装置の画面（図示せず）上にステップ２２１に処理を移行させるように指示を表示し、オペレータに次のナノポア形成処理の実行を促すことができる。また、コンピュータは、負荷ありＲＭＳノイズσ_wが負荷なしのＲＭＳノイズσ_{no}以下の場合には、表示装置の画面（図示せず）上にステップ２０４に処理を移行させるように指示を表示し、オペレータに再度親水性確認処理の実行を促すことができる。また、負荷なしＲＭＳノイズσ_{no}を予め計測してメモリ（図示せず）に格納しておき、親水性確認処理を実行する際に当該メモリから負荷なしＲＭＳノイズσ_{no}を読み出し、負荷ありＲＭＳノイズσ_wと比較するようにしてもよい。

[0037] （iii）ステップ２２１

(iii-1)ステップ２２２

オペレータは、第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に充填されている第１ｐＨの水溶液を排出し、第１ｐＨよりも低い第２ｐＨの水溶液（例えば、中性の水溶液、さらに具体的には、１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ７．５の水溶液）を代わりに充填する（水溶液の置換）。

[0038] (iii-2)ステップ２２３

オペレータは、電気機器ユニット１０７で電極１０４および１０９間に電圧を印加あるいは電流を流すことにより絶縁破壊を起こさせ、図２に示すように、メンブレン１０１に所望サイズのナノポア１１３を形成する。

[0039] （iv）ステップ２３１

試料（サンプル）計測処理では、ナノポア形成処理（ステップ２２１）と

同様に、水溶液は、第２ｐＨの水溶液（例えば、中性の水溶液、さらに具体的には、１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ７．５の水溶液：ただし、ｐＨではなく水溶液の種類（ＫＣｌなど）は導入される計測対象の試料（サンプル）の種類によって変わる）が第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に充填される。

[0040] （iv-1）ステップ２３２

オペレータは、図３に示されるように、計測対象とすべき試料（ターゲットサンプル）１２０を第１溶液槽１０３あるいは第２溶液槽１１０のいずれかに導入する。

[0041] (iv-2)ステップ２３３

オペレータは、電気機器ユニット１０７で電極１０４および１０９間に低電圧（例えば、２０Ｖより低電圧、さらに具体的には２Ｖよりも低電圧とすることができる）を印加することにより、試料（サンプル）１２０がナノポアを通過する際のイオン電流(封鎖電流)を計測する。

[0042] ＜ナノポア形成処理のステップ２２３の詳細内容＞

図５から図８は、絶縁破壊技術を利用したナノポア形成処理の詳細内容（例）を示すフローチャートである。ここでは、４つの形態を挙げて説明する。

[0043] （i）パルス電圧印加の例：図５

オペレータは、電気機器ユニット１０７を用いて、第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に浸されたＡｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９間に、少なくとも一周期分の期間、パルス電圧V_{p1}を印加する（ステップ２４１）。パルス電圧V_{p1}の大きさはメンブレン１０１の厚さと材質によって変わるが、例えば、５ｎｍのＳｉＮメンブレンの場合、４Ｖから５Ｖのパルス電圧が印加される。パルス電圧V_{p1}は、メンブレン１０１にストレスを与えるための電圧である。

[0044] 続いて、オペレータは、電気機器ユニット１０７を操作して、印加電圧をパルス電圧V_{p1}から所定の低電圧V_{m1}に変更し、低電圧V_{m1}において流れる電流I_{m1}を計測する（ステップ２４２）。ここで、低電圧V_{m1}は、ステップ

２４２の処理中に絶縁破壊を起こさない程度に、あるいは既に形成されたナノポアが拡張しない程度に、パルス電圧V_{p1}の値よりも低く設定される。例えば、メンブレン１０１として厚さ５ｎｍのＳｉＮメンブレンを用いる場合には、１Ｖ未満に設定される。

[0045] オペレータは、計測電流I_{m1}と閾値電流I_{th1}を比較する（ステップ２５３）。計測電流I_{m1}が閾値電流I_{th1}よりも大きい場合（ステップ２４３でＹｅｓの場合）、所望のナノポア１１３（図２参照）が形成されたと判断され、処理はステップ２３１（試料計測処理）に移行する。一方、計測電流I_{m1}が閾値電流I_{th1}以下の場合（ステップ２４３でＮｏの場合）、処理はステップ２４１に戻り、再度パルス電圧V_{p1}によってメンブレン１０１にストレスが掛けられることになる。なお、ステップ２４１で再度パルス電圧V_{p1}を印加する場合、印加時間を長くしてもよいし、印加電圧の極性（正負）を反転させてもよい。また、ステップ２４３において用いられる閾値電流I_{th1}は、水溶液の導電率、メンブレン１０１の厚さ、および所望のナノポアのサイズから推定することができるし、また、実験およびＴＥＭ（Transmission Electron Microscopy）による観察に基づいて決定（推定）することもできる。

[0046] （ii）定電圧印加の例：図６

オペレータは、電気機器ユニット１０７を用いて、第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に浸されたＡｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９間に、定電圧V_{dc}を所定時間印加する（ステップ２５１）。定電圧V_{dc}の大きさはメンブレン１０１の厚さと材質によって変わるが、例えば、２０ｎｍのＳｉＮメンブレンの場合、１６Ｖから２０Ｖの定電圧とすることができる。また、定電圧の印加時間は、次のステップ２５２での印加時間を含め、例えば、１０分未満である。

[0047] 続いて、オペレータは、定電圧V_{dc}を印加しながら、そのときに流れる電流I_{m2}を計測する（ステップ２５２）。

[0048] そして、オペレータは、計測電流I_{m2}と閾値電流I_{th2}を比較し、所望のナノポア１１３がメンブレン１０１に形成されたか確認する（ステップ２５３

）。計測電流I_{m2}が閾値電流I_{th2}よりも大きい場合（ステップ２５３でＹｅｓの場合）、所望のナノポア１１３（図２参照）が形成されたと判断され、処理はステップ２３１（試料計測処理）に移行する。一方、計測電流I_{m2}が閾値電流I_{th2}以下の場合（ステップ２５３でＮｏの場合）、処理はステップ２５１に戻り、定電圧V_{dc}が再度印加される。なお、ステップ２５１で再度定電圧V_{dc}を印加する場合、印加電圧値を大きくしてもよいし、印加電圧の極性（正負）を反転させてもよい。また、ステップ２５３において用いられる閾値電流I_{th2}は、水溶液の導電率、メンブレン１０１の厚さ、および所望のナノポアのサイズから推定することができるし、また、実験およびＴＥＭ（Transmission Electron Microscopy）による観察に基づいて決定（推定）することもできる。

[0049] （iii）パルス電流を流す例：図７

オペレータは、電気機器ユニット１０７を用いて、第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に浸されたＡｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９間に、少なくとも一周期分の期間、パルス電流I_{p1}を流す（ステップ２６１）。パルス電流I_{p1}の大きさはメンブレン１０１の厚さと材質によって変わる。

[0050] 続いて、オペレータは、電気機器ユニット１０７を操作して、第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に浸されたＡｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９間に所定の低電圧V_{m2}を印加し、低電圧V_{m2}において流れる電流I_{m3}を計測する（ステップ２６２）。ここで、低電圧V_{m2}は、ステップ２６２の処理中に絶縁破壊を起こさない程度に、あるいは既に形成されたナノポアが拡張しない程度に、低く設定される。例えば、メンブレン１０１として厚さ５ｎｍのＳｉＮメンブレンを用いる場合には、１Ｖ未満に設定される。

[0051] オペレータは、計測電流I_{m3}と閾値電流I_{th3}を比較する（ステップ２６３）。計測電流I_{m3}が閾値電流I_{th3}よりも大きい場合（ステップ２６３でＹｅｓの場合）、所望のナノポア１１３（図２参照）が形成されたと判断され、処理はステップ２３１（試料計測処理）に移行する。一方、計測電流I_{m3}が閾値電流I_{th3}以下の場合（ステップ２６３でＮｏの場合）、処理はステップ

２６１に戻り、再度パルス電流I_{p1}がＡｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９間に流されることになる。なお、ステップ２６１で再度パルス電流I_{p1}を流す場合、電流値を大きくしてもよいし、流す電流の極性（正負）を反転させてもよい。また、ステップ２６３において用いられる閾値電流I_{th3}は、水溶液の導電率、メンブレン１０１の厚さ、および所望のナノポアのサイズから推定することができるし、また、実験およびＴＥＭ（Transmission Electron Microscopy）による観察に基づいて決定（推定）することもできる。

[0052] （iv）定電流を流す例：図８

オペレータは、電気機器ユニット１０７を用いて、第１溶液槽１０３および第２溶液槽１１０に浸されたＡｇ／ＡｇＣｌ電極１０４および１０９間に、定電流V_{dc}を所定時間流す（ステップ２７１）。定電流I_{dc}の大きさはメンブレン１０１の厚さと材質によって変わる。

オペレータは、定電流I_{dc}を流しながら、そのときの電圧V_{m3}を計測する（ステップ２７２）。

[0053] そして、オペレータは、計測電圧V_{m3}と閾値電圧V_{th}を比較し、所望のナノポア１１３がメンブレン１０１に形成されたか確認する（ステップ２７３）。計測電圧V_{m3}が閾値電圧V_{th}よりも大きい場合（ステップ２７３でＹｅｓの場合）、所望のナノポア１１３（図２参照）が形成されたと判断され、処理はステップ２３１（試料計測処理）に移行する。一方、計測電圧V_{m3}が閾値電圧V_{th}以下の場合（ステップ２７３でＮｏの場合）、処理はステップ２７１に戻り、定電流I_{dc}が電極１０４および１０９間に再度流される。なお、ステップ２７１で再度定電流I_{dc}を流す場合、電流値を大きくしてもよいし、流す電流の極性（正負）を反転させてもよい。また、ステップ２７３において用いられる閾値電圧V_{th}は、水溶液の導電率、メンブレン１０１の厚さ、および所望のナノポアのサイズから推定することができるし、また、実験およびＴＥＭ（Transmission Electron Microscopy）による観察に基づいて決定（推定）することもできる。

[0054] ＜実験結果＞

図９Ａおよび図９Ｂは共に、本開示の技術を用いた実験の結果を示す図である。当該実験結果は、（ｉ）２つのメンブレンについて、親水性処理（Ｓ２０１）および絶縁破壊技術によるナノポア形成処理（Ｓ２２１）で同じ高ｐＨ水溶液（第１ｐＨの水溶液：例えば、１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ１２．７）を用いて行う場合（点線）と、（ｉｉ）他の２つのメンブレンについて、親水性処理（Ｓ２０１）で高ｐＨ水溶液（第１ｐＨの水溶液：例えば１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ１２．７）を用い、絶縁破壊技術によるナノポア形成処理（Ｓ２２１）で中性ｐＨ水溶液（第２ｐＨの水溶液：例えば１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ７．５）を用いて行う場合（実線）を含んでいる。

[0055] 図９Ａは、絶縁破壊技術によってナノポアがメンブレン１０１に形成される前のＩＶ（電流‐電圧）特性を示す図である。図９Ａに示されるように、6×10^{-11}Ａ未満の漏れ電流が全てのメンブレンについて観測されている。このため、全てのメンブレンは、ナノポア形成処理前には同一条件下にあり、破損していないことが分かる。

[0056] 図９Ｂは、上述のパルス電圧を印加する形態（図５）に対応し、パルス電圧$Ｖ_{p}$を４Ｖから４．８Ｖまで段階的に増加させ、各電圧についてパルス期間（パルス電圧の印加期間）を２００ｍｓまで増加させた後に、特定の低電圧$Ｖ_{m}$（一例として０．４Ｖ）を印加して計測した電流$Ｉ_{m}$（イオン電流）の特性（）を示す図である。図９Ｂにおいて、点線のグラフ（□プロットと△プロット）は、第１ｐＨの水溶液（例えば、１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ１２．７）中で絶縁破壊を発生させた場合の２つのメンブレンのナノポア形成結果を示している。一方、実線のグラフ（○プロットと×プロット）は、第２ｐＨの水溶液（例えば、１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ７．５）中で絶縁破壊を発生させた場合の２つのメンブレンのナノポア形成結果を示している。図９Ｂからは、第１ｐＨ水溶液（１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ１２．７）中でナノポアが形成されときに計測される電流$Ｉ_{m}$は、大幅に閾値電流$Ｉ_{th}$を超える一方、第２ｐＨ水溶液（１Ｍ ＫＣｌ ｐＨ７．５）中でナノポアが形成されときに計測される電流$Ｉ_{m}$は、閾値電流$Ｉ_{th}$を少し上回わった値に止まっていることが分かる。つまり、前

者の場合（親水性処理およびナノポア形成処理を共に第１ｐＨ水溶液中で行う場合）によれば、ナノポアを形成することはできたが、そのサイズは所望のサイズよりも大きくなっている。一方、後者（本実施形態：親水性処理は第１ｐＨ水溶液中で行うが、ナノポア形成処理は第２ｐＨ水溶液（第２ｐＨ＜第１ｐＨ）中で行う場合）によれば、所望のナノポアサイズが正確に制御できている。

[0057] ＜親水性確認処理におけるＲＭＳノイズの計測定結果の例＞

図１０Ａおよび図１０Ｂは、親水性確認処理（Ｓ２１１）におけるＲＭＳノイズの計測定結果の例（実験結果）を示す図である。図１０Ａは、印加直流電圧$Ｖ_{c}$が０Ｖのときに計測される電流値（フローセルに電極１０４および１０９を挿入する前と後の電流値）を示す図である。つまり、図１０Ａには、図４のステップ２１２→ステップ２１３で計測される電流値がフローセルに電極１０４および１０９を挿入する前のＲＭＳノイズ（負荷なしＲＭＳノイズ）とステップ２１４で計測される電流値がフローセルに電極１０４および１０９を挿入した後のＲＭＳノイズ（負荷ありＲＭＳノイズ）が示されている。図１０Ａには、例えば、負荷なしＲＭＳノイズσ_{n_0}として１ｐＡが計測され、負荷ありＲＭＳノイズσ_{w}として５ｐＡが計測されたことが示されている。この場合、負荷ありＲＭＳノイズσ_{w}は、負荷なしＲＭＳノイズσ_{n_0}の５倍となっている。よって、メンブレン１０１の表面の親水性が確認されたと考えられ、後続のナノポア形成処理が実行される。

[0058] 図１０Ｂは、負荷ありＲＭＳノイズが負荷なしＲＭＳノイズの数倍（図１０Ａでは５倍）大きくなった状態でメンブレン１０１に対してナノポア形成処理（Ｓ２２１）を実行したときの実験結果（電圧印加累積時間‐イオン電流特性）を示す図である。図１０Ｂからは、電圧印加累積時間が所定期間（図１０Ｂでは、約１．４ｓ）を超えると、イオン電流値に大きな変化が見られるので、メンブレン１０１にナノポア１１３が形成されたことが分かる。メンブレン１０１にナノポア１１３が形成されたということは、メンブレン１０１の表面が成功裏に親水性となった、あるいは水溶液がメンブレン１０

１の表面に正常に接触するようになったと言える。つまり、ＲＭＳノイズの比較すること（図１０Ａ）は、メンブレン１０１の表面の親水性特性を確認することと同義であることが分かる。

符号の説明

[0059] １０１　乾燥メンブレン（ＳｉＮ）

１０２、１１１　ガスケット

１０３　第１溶液槽

１０４　電極（Ａｇ／ＡｇＣｌ）

１０５　電気導線

１０６、１１２　高ｐＨ水溶液（第１ｐＨ水溶液）

１０７　電気機器ユニット

１０８　電気導線

１０９　電極（Ａｇ／ＡｇＣｌ）

１１０　第２溶液槽

１１３　ナノポア

１２０　試料（サンプル）

１３０、１３１　中性ｐＨ水溶液（第２ｐＨ水溶液）

１４０、１４１　水溶液

請求の範囲

[請求項1] メンブレンにナノポアを形成するナノポア形成方法であって、

前記メンブレンによって絶縁した第１溶液槽と第２溶液槽に第１ｐＨの水溶液を導入することと、

前記メンブレンの表面の親水性を確保することと、

前記メンブレンの表面の親水性が確保された後、前記第１溶液槽および前記第２溶液槽の前記第１ｐＨの水溶液を、前記第１ｐＨよりも低い第２ｐＨの水溶液で置換することと、

前記第２ｐＨの水溶液を収容する前記第１溶液槽および前記第２溶液槽のそれぞれに電極を浸し、絶縁破壊を発生させて前記メンブレンにナノポアを形成することと、

を含む、ナノポア形成方法。

[請求項2] 請求項１において、

前記メンブレンの表面の親水性を確保することは、

前記第１ｐＨの水溶液を収容する前記第１溶液槽および前記第２溶液槽に前記電極を浸さずに前記電極に電圧を印加し、第１静電容量ノイズを測定することと、

前記第１ｐＨの水溶液を収容する前記第１溶液槽および前記第２溶液槽に前記電極を浸した状態で前記電極に電圧を印加し、第２静電容量ノイズを測定することと、

前記第１静電容量ノイズと前記第２静電容量ノイズを比較することにより、前記メンブレンの表面の親水性を確認することと、

を含む、ナノポア形成方法。

[請求項3] 請求項２において、

前記第１静電容量ノイズを測定することでは、１０Ｖ未満の直流電圧での二乗平均平方根ノイズが測定される、ナノポア形成方法。

[請求項4] 請求項２において、

前記第２静電容量ノイズが前記第２静電容量ノイズよりも２倍以上

高い場合に前記メンブレンの表面の親水性が確保されたと判断する、ナノポア形成方法。

[請求項5] 請求項１において、

前記メンブレンは窒化シリコン層を含む、ナノポア形成方法。

[請求項6] 請求項５において、

前記窒化シリコン層の厚さは１００ｎｍ未満である、ナノポア形成方法。

[請求項7] 請求項１において、

前記第１ｐＨは８以上である、ナノポア形成方法。

[請求項8] 請求項１において、

前記第１ｐＨは１０以上である、ナノポア形成方法。

[請求項9] 請求項１において、

前記メンブレンにナノポアを形成することは、

前記電極にパルス電圧を印加することと、

前記パルス電圧よりも低い電圧を前記電極に印加したときに流れる電流を計測することと、

前記電流が閾値電流よりも大きいときに前記絶縁破壊が発生したと判断することと、

を含む、ナノポア形成方法。

[請求項10] 請求項１において、

前記メンブレンにナノポアを形成することは、

前記電極に定電圧を印加することと、

前記定電圧を印加した状態で流れる電流を計測することと、

前記電流が閾値電流よりも大きいときに前記絶縁破壊が発生したと判断することと、

を含む、ナノポア形成方法。

[請求項11] 請求項１において、

前記メンブレンにナノポアを形成することは、

前記電極にパルス電流を流すことと、

前記電極に所定の電圧を印加した状態で流れる電流を計測することと、

前記電流が閾値電流よりも大きいときに前記絶縁破壊が発生したと判断することと、

を含む、ナノポア形成方法。

[請求項12] 請求項１において、

前記メンブレンにナノポアを形成することは、

前記電極に定電流を流すことと、

前記定電流を流した状態で前記電極の電位を計測することと、

前記電位が閾値電位よりも小さいときに前記絶縁破壊が発生したと判断することと、

を含む、ナノポア形成方法。

[請求項13] メンブレンにナノポアを形成するナノポア形成方法であって、

前記メンブレンによって絶縁した第１溶液槽と第２溶液槽に第１ｐＨの水溶液を導入することと、

電極間に電圧を印加、あるいは電流を流す、電気機器を準備することと、

無負荷状態で前記電気機器により前記電極間に１０Ｖ未満の直流電圧を印加して第１二乗平方根ノイズを測定することと、

負荷状態で前記電気機器により前記電極間に前記１０Ｖ未満の直流電圧を印加して第２二乗平方根ノイズを計測することと、

前記メンブレンの表面の親水性が確保された後、前記第１溶液槽および前記第２溶液槽の前記第１ｐＨの水溶液を、前記第１ｐＨよりも低い第２ｐＨの水溶液で置換することと、

前記第２ｐＨの水溶液を収容する前記第１溶液槽および前記第２溶液槽のそれぞれに電極を浸し、絶縁破壊を発生させて前記メンブレンにナノポアを形成することと、

を含む、ナノポア形成方法。

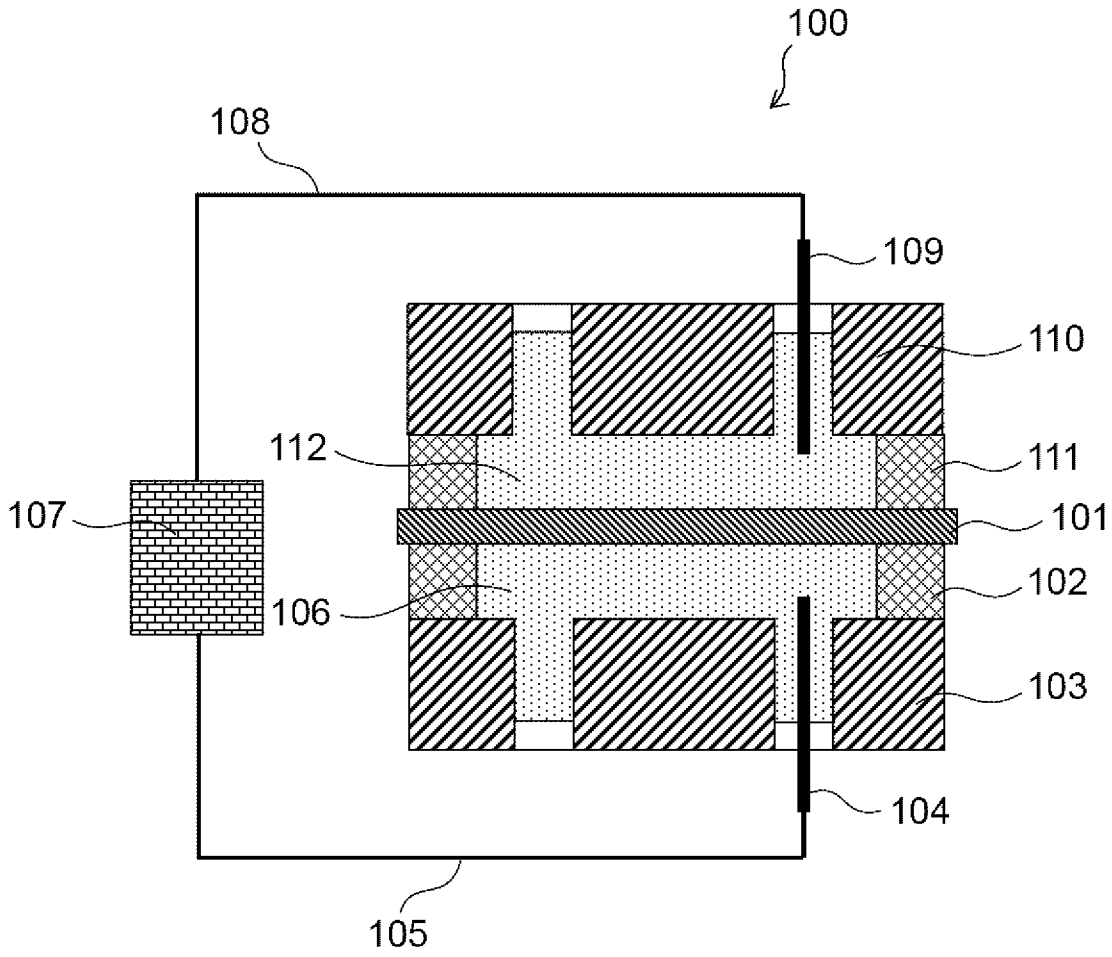
[請求項14] 請求項１３において、

前記無負荷状態は、前記第１ｐＨの水溶液を収容する前記第１溶液槽および前記第２溶液槽に前記電極を浸さない状態であり、

前記負荷状態は、前記第１ｐＨの水溶液を収容する前記第１溶液槽および前記第２溶液槽に前記電極を浸した状態である、ナノポア形成方法。

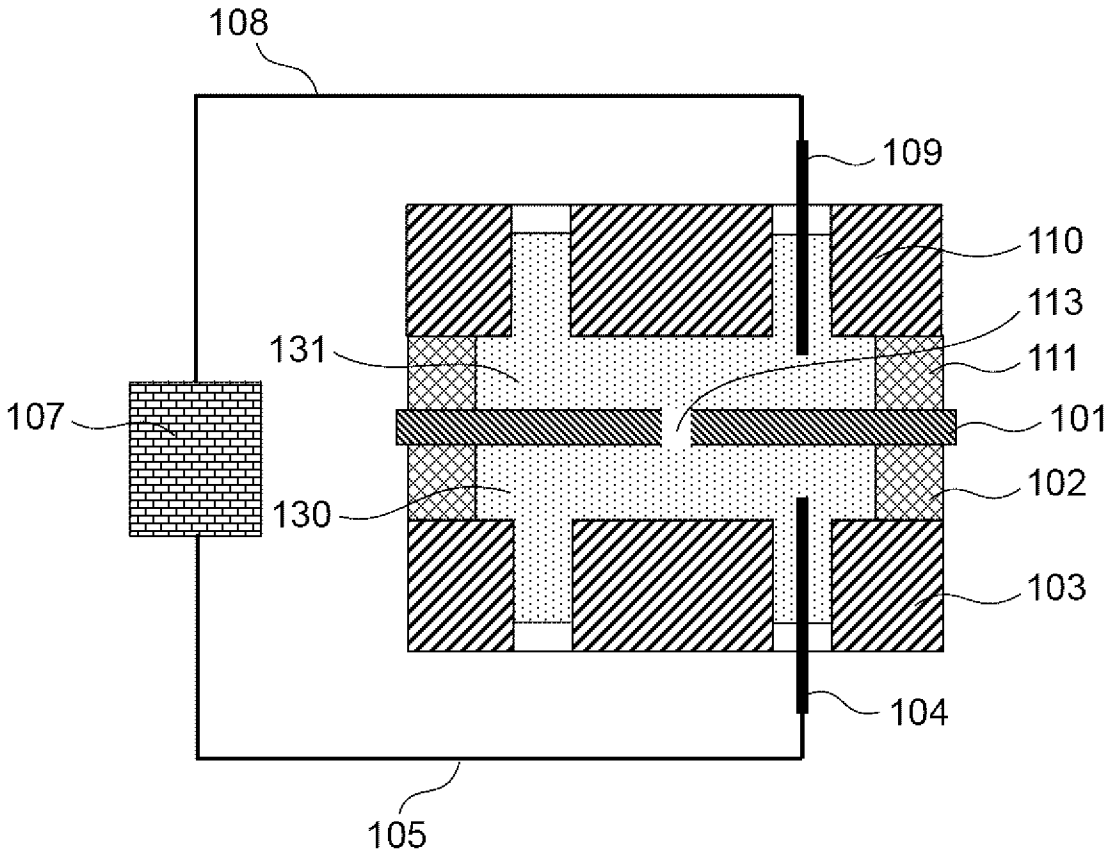
[図1]

図 1



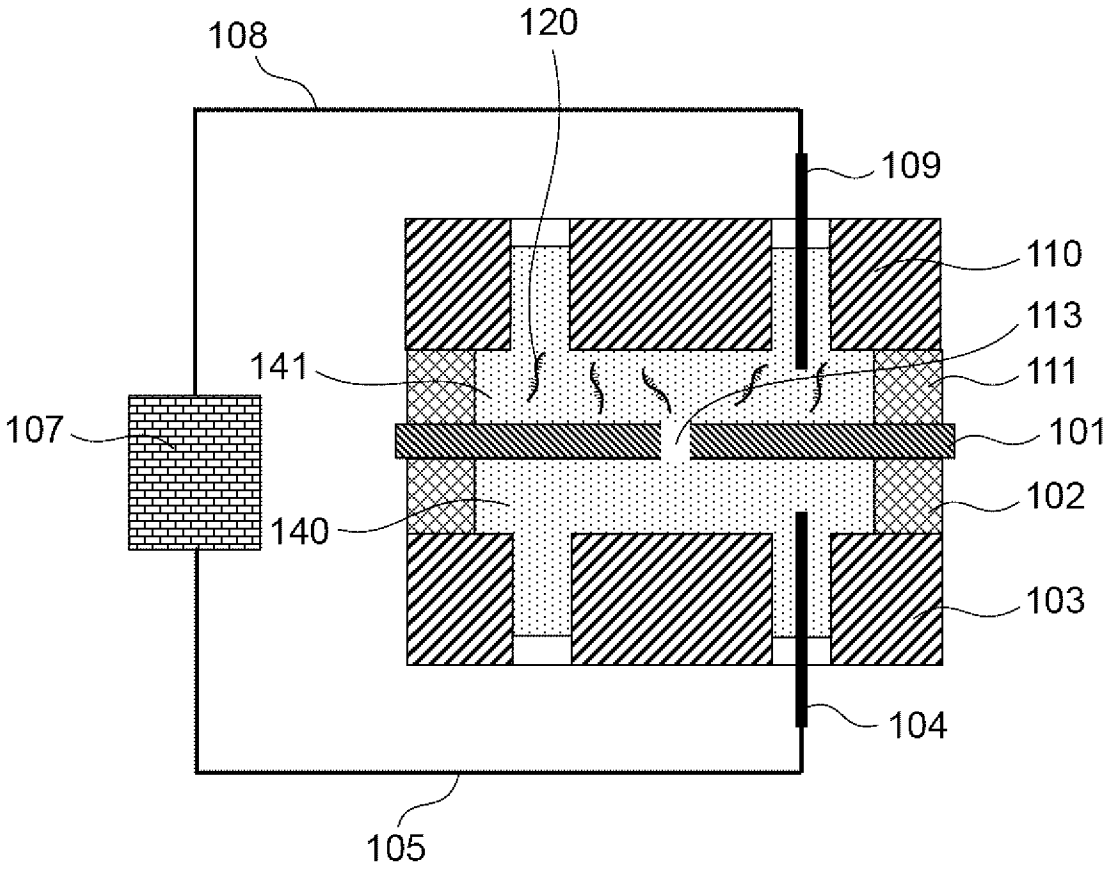
[図2]

図 2



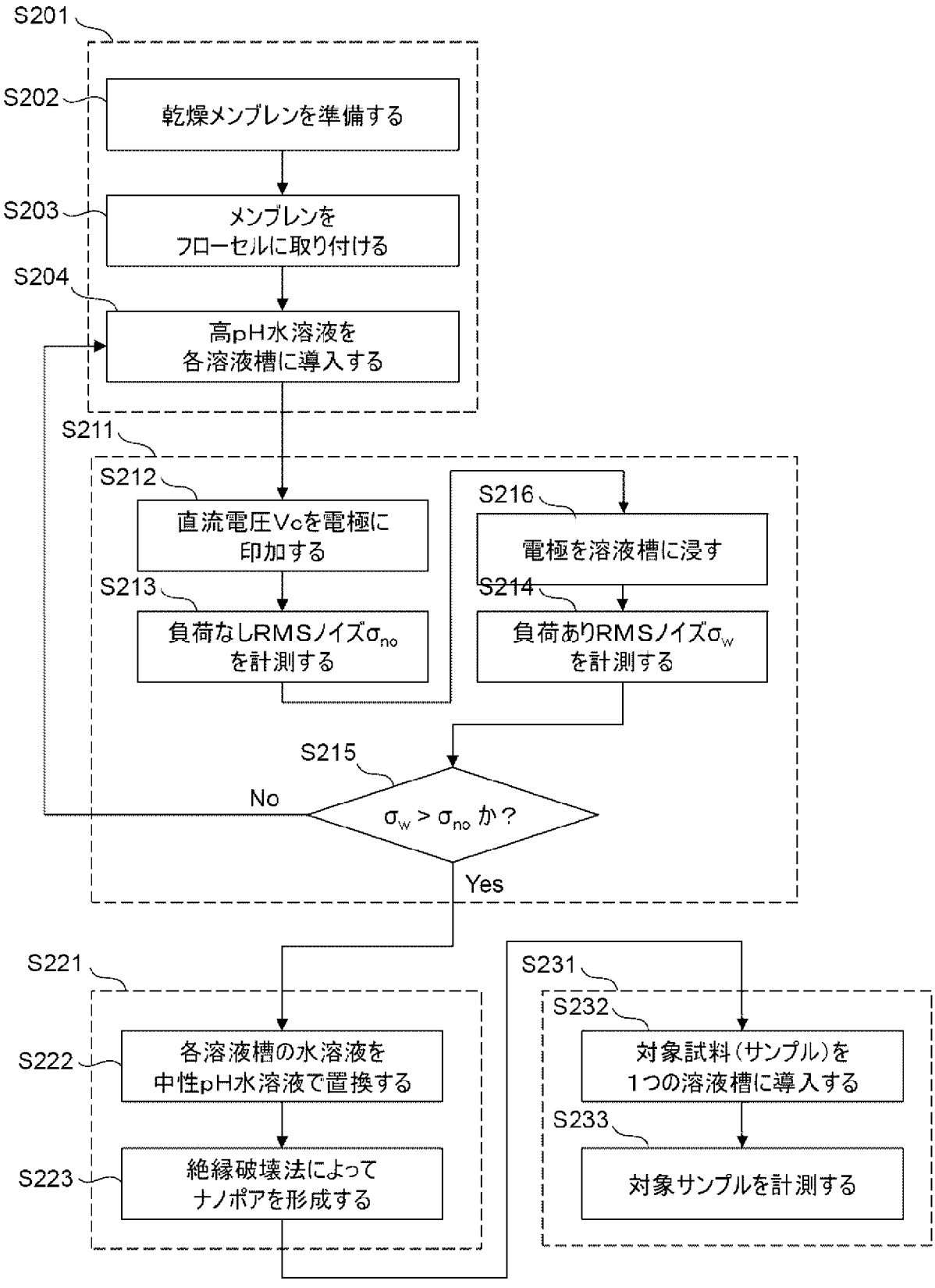
[図3]

図 3



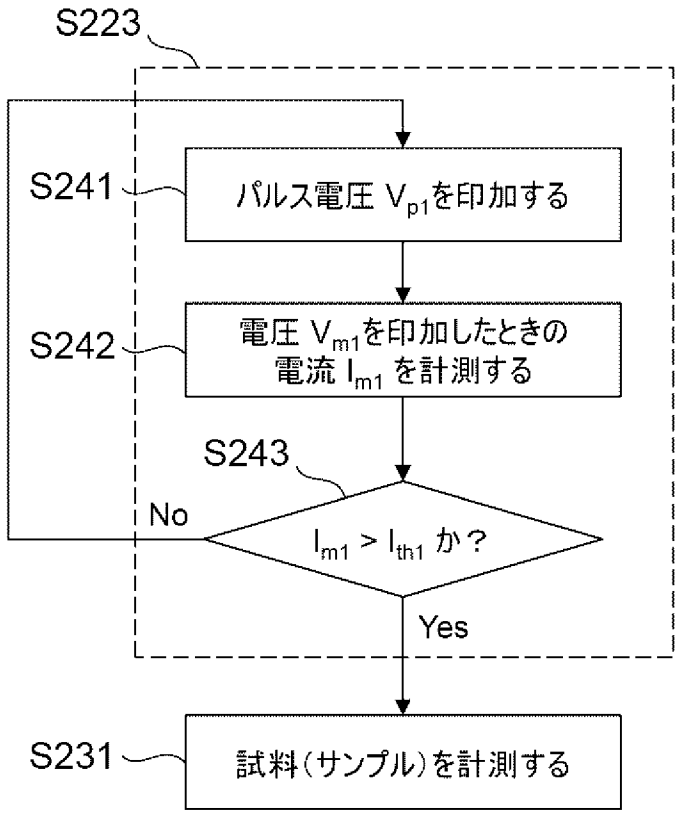
[図4]

図４


S201
S202
乾燥メンブレンを準備する
S203
メンブレンを
フローセルに取り付ける
S204
高pH水溶液を
各溶液槽に導入する
S211
S212
直流電圧Vcを電極に
印加する
S213
負荷なしRMSノイズσno
を計測する
S216
電極を溶液槽に浸す
S214
負荷ありRMSノイズσw
を計測する
S215
No
σw > σno か？
Yes
S221
S222
各溶液槽の水溶液を
中性pH水溶液で置換する
S223
絶縁破壊法によって
ナノポアを形成する
S231
S232
対象試料（サンプル）を
1つの溶液槽に導入する
S233
対象サンプルを計測する

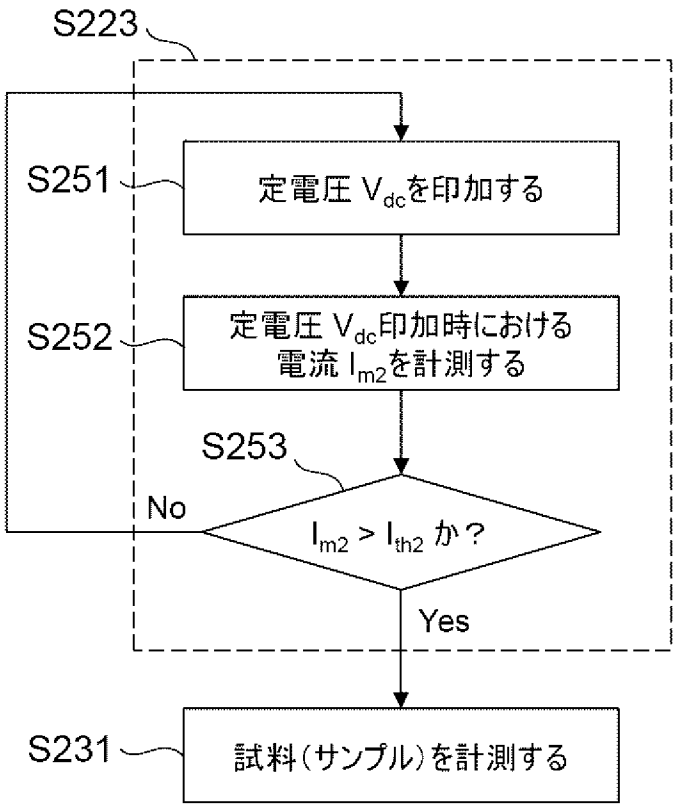
[図5]

図５


S223
S241
パルス電圧 V_{p1}を印加する
S242
電圧 V_{m1}を印加したときの
電流 I_{m1} を計測する
S243
No
$I_{m1} > I_{th1}$ か？
Yes
S231
試料（サンプル）を計測する

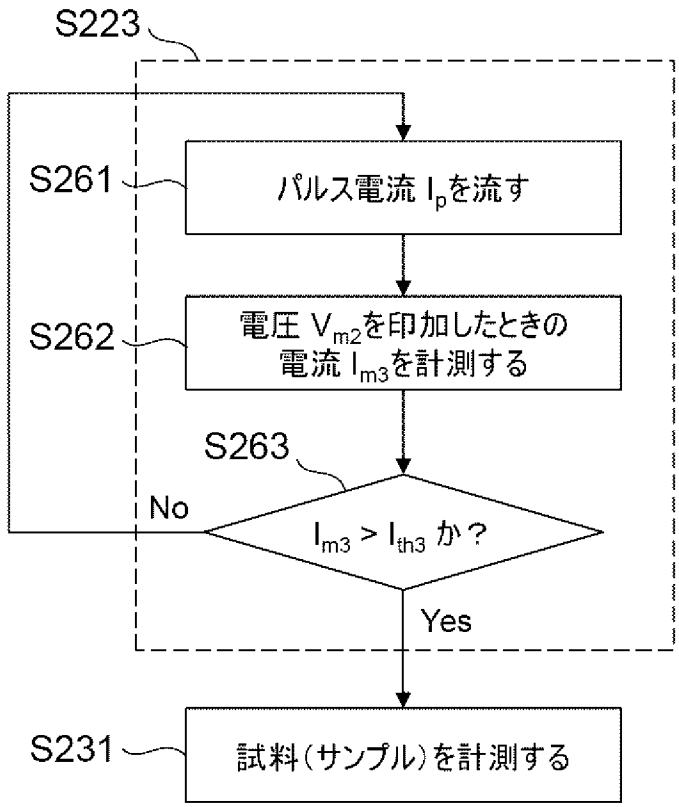
[図6]

図６


S223
S251
定電圧 V_{dc}を印加する
S252
定電圧 V_{dc}印加時における
電流 I_{m2}を計測する
S253
No
$I_{m2} > I_{th2}$ か？
Yes
S231
試料（サンプル）を計測する

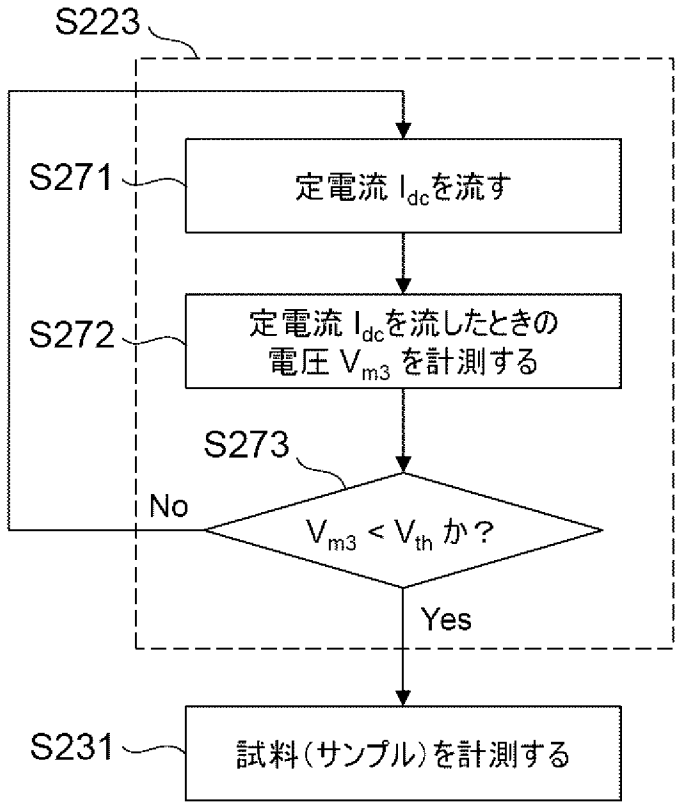
[図7]

図 7


S223
S261
パルス電流 I_pを流す
S262
電圧 V_{m2}を印加したときの
電流 I_{m3}を計測する
S263
No
$I_{m3} > I_{th3}$ か？
Yes
S231
試料（サンプル）を計測する

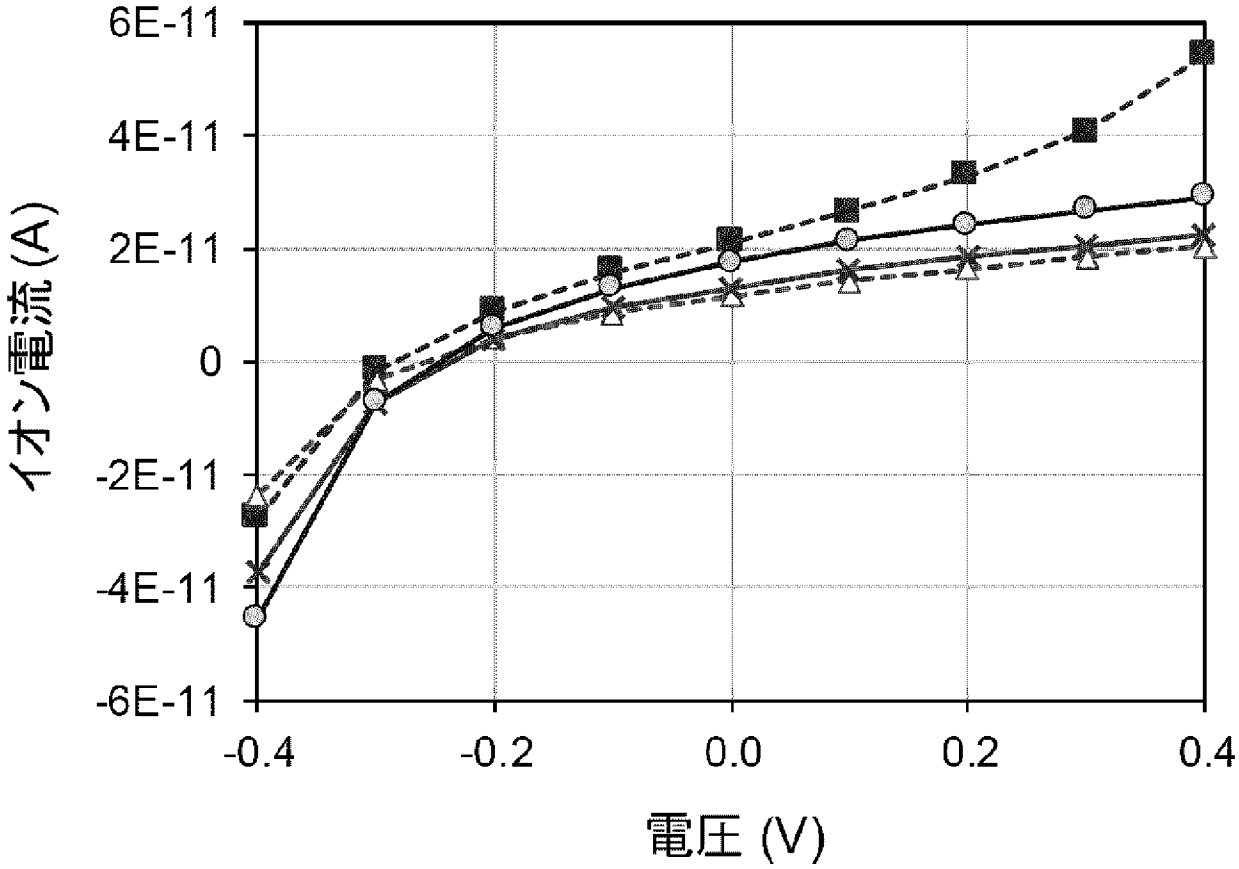
[図8]

図 8


S223
S271
定電流 I_{dc}を流す
S272
定電流 I_{dc}を流したときの
電圧 V_{m3} を計測する
S273
No
$V_{m3} < V_{th}$ か？
Yes
S231
試料（サンプル）を計測する

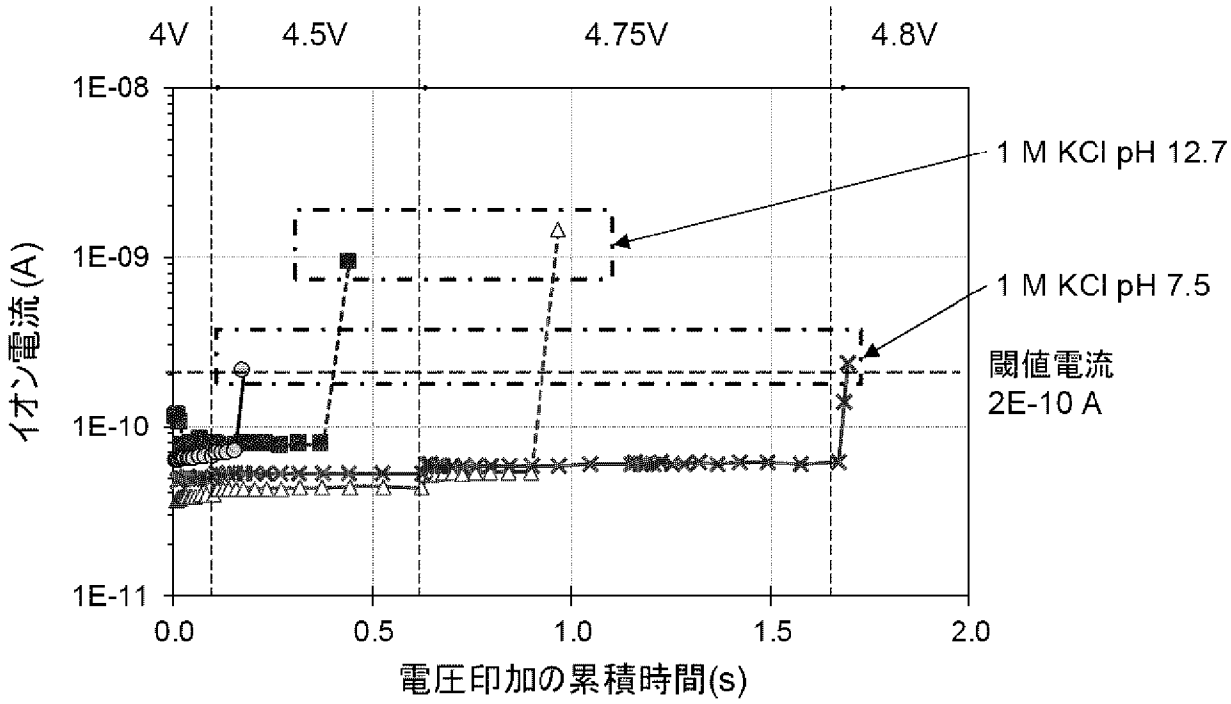
[図9A]

図９Ａ



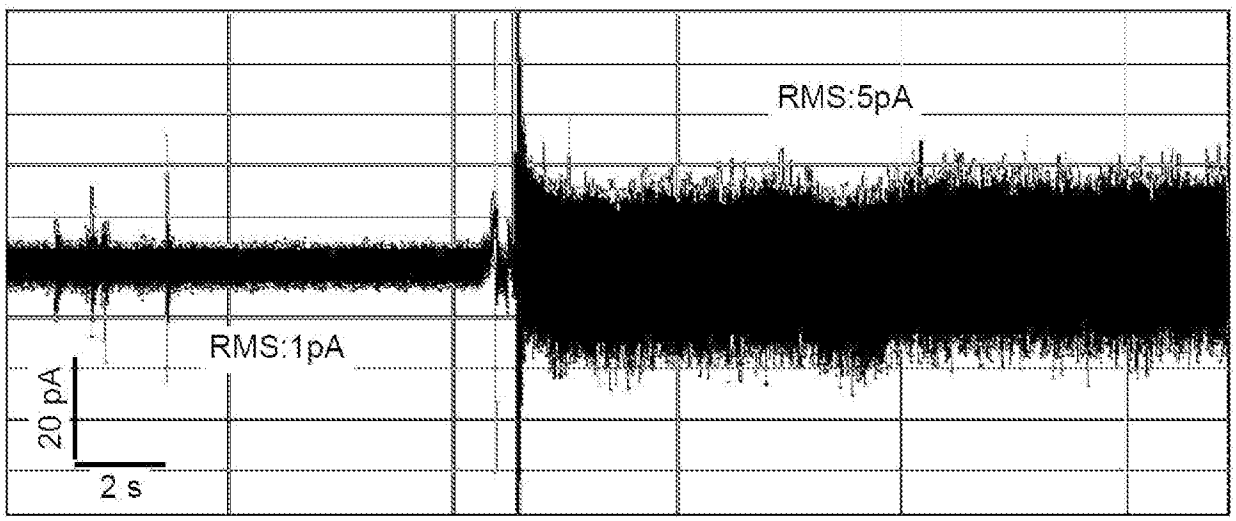
[図9B]

図９Ｂ



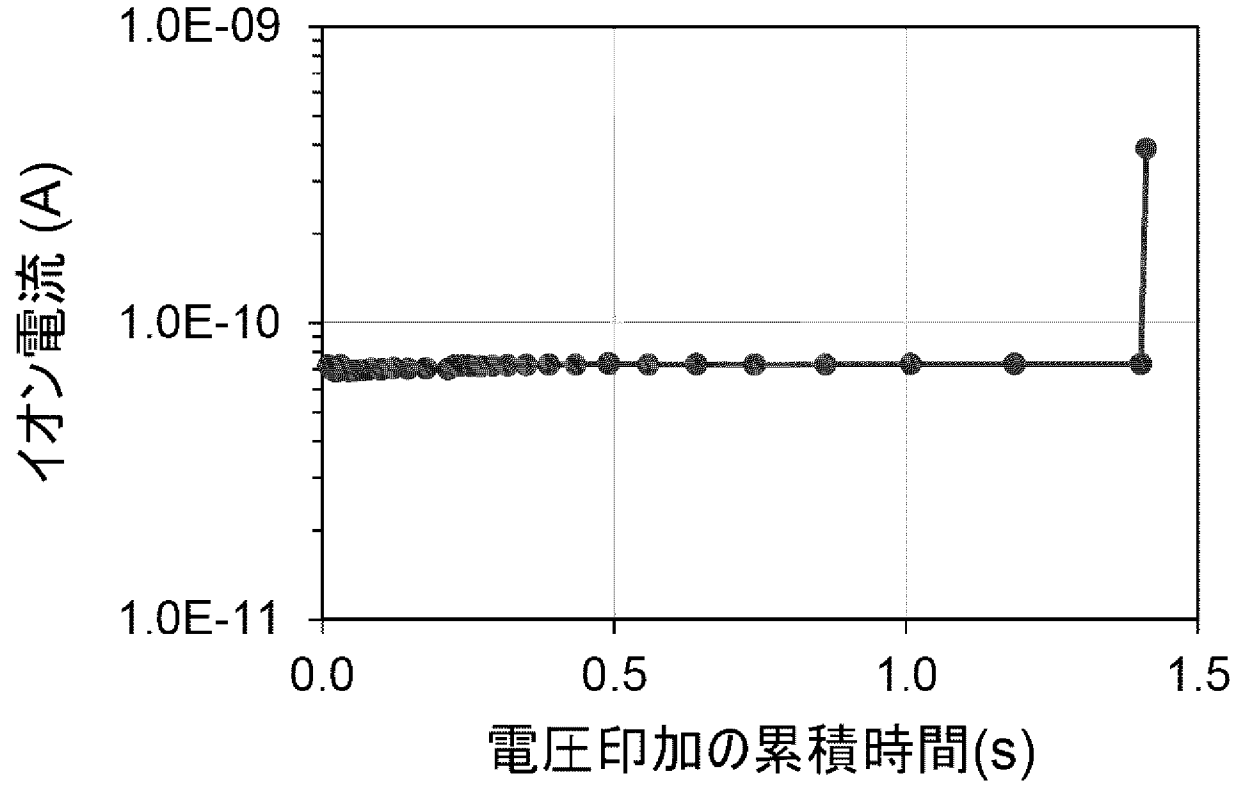
[図10A]

図１０Ａ



[図10B]

図１０Ｂ



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/025047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N 27/00(2006.01)i
FI: G01N27/00 Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N27/00-G01N27/49; C12M1/00-C12M1/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/008736 A1 (HITACHI HIGH TECH CORP) 10 January 2019 (2019-01-10) entire text, all drawings	1-14
A	WO 2020/121697 A1 (HITACHI LTD) 18 June 2020 (2020-06-18) entire text, all drawings	1-14
A	JP 2018-11532 A (HITACHI LTD) 25 January 2018 (2018-01-25) entire text, all drawings	1-14
A	WO 2018/131064 A1 (HITACHI HIGH TECH CORP) 19 July 2018 (2018-07-19) entire text, all drawings	1-14
A	US 2020/0054999 A1 (THE ROYAL INSTITUTION FOR THE ADVANCEMENT OF LEARNING / MCGILL UNIVERSITY) 20 February 2020 (2020-02-20) entire text, all drawings	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 06 September 2021 (06.09.2021)	Date of mailing of the international search report 21 September 2021 (21.09.2021)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/025047

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2019/008736 A1	10 Jan. 2019	US 2020/0116697 A1	
		CN 110709500 A	
WO 2020/121697 A1	18 Jun. 2020	JP 2020-94894 A	
JP 2018-11532 A	25 Jan. 2018	US 2019/0086362 A1	
		WO 2018/016117 A1	
WO 2018/131064 A1	19 Jul. 2018	US 2019/0353636 A1	
		CN 110121645 A	
US 2020/0054999 A1	20 Feb. 2020	WO 2018/209441 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/025047

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 27/00(2006.01)i
FI: G01N27/00 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N27/00-G01N27/49; C12M1/00-C12M1/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2019/008736 A1 (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 10.01.2019 (2019-01-10) 全文、全図	1-14
A	WO 2020/121697 A1 (株式会社日立製作所) 18.06.2020 (2020-06-18) 全文、全図	1-14
A	JP 2018-11532 A (株式会社日立製作所) 25.01.2018 (2018-01-25) 全文、全図	1-14
A	WO 2018/131064 A1 (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 19.07.2018 (2018-07-19) 全文、全図	1-14
A	US 2020/0054999 A1 (THE ROYAL INSTITUTION FOR THE ADVANCEMENT OF LEARNING / MCGILL UNIVERSITY) 20.02.2020 (2020-02-20) 全文、全図	1-14

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
06.09.2021	21.09.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
田中　洋介 2W 3009
電話番号 03-3581-1101 内線 3258

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/025047

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2019/008736 A1	10.01.2019	US 2020/0116697 A1	
		CN 110709500 A	
WO 2020/121697 A1	18.06.2020	JP 2020-94894 A	
JP 2018-11532 A	25.01.2018	US 2019/0086362 A1	
		WO 2018/016117 A1	
WO 2018/131064 A1	19.07.2018	US 2019/0353636 A1	
		CN 110121645 A	
US 2020/0054999 A1	20.02.2020	WO 2018/209441 A1	