

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6228613号  
(P6228613)

(45) 発行日 平成29年11月8日(2017.11.8)

(24) 登録日 平成29年10月20日(2017.10.20)

(51) Int.Cl.			F I		
<b>GO 1 N</b>	<b>27/00</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	27/00	Z
<b>HO 1 L</b>	<b>21/3063</b>	<b>(2006.01)</b>	HO 1 L	21/306	L
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 M	1/00	A
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/68	Z

請求項の数 19 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2015-554346 (P2015-554346)	(73) 特許権者	000005108
(86) (22) 出願日	平成25年12月25日 (2013.12.25)		株式会社日立製作所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/084551		東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
(87) 国際公開番号	W02015/097765	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成27年7月2日 (2015.7.2)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成28年5月31日 (2016.5.31)	(74) 代理人	100105463
			弁理士 関谷 三男
		(74) 代理人	100102576
			弁理士 渡辺 敏章
		(72) 発明者	柳 至
			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
		(72) 発明者	赤堀 玲奈
			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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノポア形成方法、ナノポア形成装置及びセット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

膜に対しナノメートルサイズの貫通孔であるナノポアを形成する方法であって、  
電解液中に設けられた前記膜を挟んで設置された第1の電極と第2の電極の間に第1の電圧を印加する第1の工程と、

前記第1の電圧を印加後、前記第1の電極と前記第2の電極の間に前記第1の電圧よりも小さい第2の電圧を印加し、前記第2の電圧を印加することにより前記第1の電極と前記第2の電極の間に流れる電流値( $I_{tot}$ 、以下同様である。)を測定する第2の工程と、

前記電流値があらかじめ設定した閾値と一致もしくは超えた時点でナノポアが形成されたと判断する第3の工程と、を含み、

前記第3の工程において、前記電流値( $I_{tot}$ )が前記閾値よりも小さい場合に、前記第1及び第2の工程を繰り返すことを特徴とするナノポア形成方法。

【請求項 2】

前記第2の電圧は、前記膜を通過して流れる電流値( $I_{PF} = I_{tot} - I_{NP}$ 、 $I_{NP}$ はナノポアを通過するイオン電流、以下同様である。)が実質的に0となるような電圧であることを特徴とする請求項1に記載のナノポア形成方法。

【請求項 3】

前記第1の電圧は、前記膜に印加される電界が0.4V/nm以上1.0V/nm以下となるような電圧であり、前記第2の電圧は、10mV以上であり前記膜に印加される電界が0.3V/nm以下となるような電圧であることを特徴とする請求項1に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 4】

前記第 2 の電圧は、前記膜を通過して流れる電流値 ( $I_{PF}$ ) が前記閾値の 1/5 以下となる電圧であることを特徴とする請求項 1 に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 5】

前記第 2 の電圧は、前記膜を通過して流れる電流値 ( $I_{PF}$ ) が前記閾値の 1/10 以下となる電圧であることを特徴とする請求項 1 に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 6】

前記第 2 の電圧は、複数の値を取ることを特徴とする請求項 2 に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 7】

前記第 3 の工程において、前記電流値が前記閾値を超えた場合に、前記第 1 の電極と前記第 2 の電極の間に、第 3 の電圧を印加する第 4 の工程と、

前記第 3 の電圧を印加後、前記第 2 の電圧を印加し、前記第 2 の電圧を印加することにより前記第 1 の電極と前記第 2 の電極の間に流れる電流値を測定する第 5 の工程と、

前記第 5 の工程で測定された電流値が、ナノポア径と電流値との関係のデータに照らし合わせて所望のナノポア径に該当する電流値であるかどうかを判断する第 6 の工程と、を含み、

前記第 4 の工程における前記第 3 の電圧は、前記第 1 の電圧よりも小さい値の電圧か、または、前記第 1 の電圧が最後に印加された時の印加時間幅よりも短い印加時間幅である、前記第 1 の電圧と同じ大きさの値の電圧であって、

前記第 6 の工程において、前記電流値が所望のナノポア径に該当する電流値よりも小さい場合に、前記第 4 及び第 5 の工程を繰り返すことを特徴とする請求項 1 に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 8】

前記第 1 及び第 2 の工程を繰り返す場合に、前記第 1 の電圧の印加時間は、 $n$  回目より  $n + 1$  回目の方が長いことを特徴とする請求項 1 に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 9】

前記第 4 及び第 5 の工程を繰り返す場合に、前記第 3 の電圧の印加時間は、 $m$  回目より  $m + 1$  回目の方が長いことを特徴とする請求項 7 に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 10】

前記第 1 の電圧の印加後前記第 2 の電圧を印加する前に、前記第 1 の電圧と逆向きの電圧を印加する工程を有することを特徴とする請求項 1 に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 11】

前記第 3 の電圧の印加後前記第 2 の電圧を印加する前に、前記第 3 の電圧と逆向きの電圧を印加する工程を有することを特徴とする請求項 7 に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 12】

前記第 1 及び第 2 の工程を繰り返す場合に、前記第 1 の電圧の大きさは、 $n$  回目より  $n + 1$  回目の方が大きいことを特徴とする請求項 1 に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 13】

前記第 4 及び第 5 の工程を繰り返す場合に、前記第 3 の電圧の大きさは、 $m$  回目より  $m + 1$  回目の方が大きいことを特徴とする請求項 7 に記載のナノポア形成方法。

## 【請求項 14】

膜をチャンバに設置する機構と、

前記膜が設置されたチャンバに電解液を導入する溶液導入口と、

前記膜を挟んで設けられる第 1 の電極及び第 2 の電極と、

前記第 1 の電極及び第 2 の電極との間に電圧を印加する電源と、

前記電圧を制御する制御回路と、

前記電圧を印加することにより得られる電流値 ( $I_{tot}$ ) を測定する測定部と、

前記膜に電圧を印加することにより形成されるナノメータサイズの貫通孔であるナノポアの大きさと、 $I_{PF} \ll I_{NP}$  となる低い電圧  $V_b$  を印加して測定した電流値 ( $I_{tot}$ ) との関係

10

20

30

40

50

前記膜の材料と膜厚に応じて記憶した記憶部と、を備えることを特徴とするナノポア形成装置。

【請求項 15】

前記制御回路は、前記第1の電極と前記第2の電極の間に第1の電圧を印加後、前記第1の電極と前記第2の電極の間に前記膜を通過して流れる電流値( $I_{PF}$ )が実質的に0となるような電圧を印加して、前記第1の電極と前記第2の電極の間に流れる電流値( $I_{tot}$ )を前記測定部により測定する第1のシーケンスを行い、前記電流値( $I_{tot}$ )があらかじめ設定した閾値を超えるか否かを判断して、前記電流値( $I_{tot}$ )が前記閾値以下の場合に、前記第1のシーケンスを繰り返す制御を行うことを特徴とする請求項14に記載のナノポア形成装置。

10

【請求項 16】

前記電流値が前記閾値を超えた場合に、前記第1の電極と前記第2の電極の間に、第3の電圧を印加後、前記第1の電極と前記第2の電極の間に前記膜を通過して流れる電流値( $I_{PF}$ )が実質的に0となるような電圧を印加して、前記第1の電極と前記第2の電極の間に流れる電流値( $I_{tot}$ )を前記測定部により測定する第2のシーケンスを行い、

前記第3の電圧は、前記第1の電圧よりも小さい値の電圧か、または、前記第1の電圧が最後に印加された時の印加時間幅よりも短い印加時間幅である、前記第1の電圧と同じ大きさの値の電圧であって、

測定される前記電流値( $I_{tot}$ )が前記記憶部に記憶された所望のナノポア径に該当する電流値以下の場合に、前記第2のシーケンスを繰り返す制御を行うことを特徴とする請求項15に記載のナノポア形成装置。

20

【請求項 17】

前記所望のナノポア径のナノポアが形成された後、前記電解液中に導入される核酸試料を前記第1の電極と前記第2の電極に電圧を印加することにより前記ナノポアに導入し、前記測定部により前記核酸試料の前記ナノポアを通過することによる前記電流値( $I_{PF}$ )を測定することを特徴とする請求項16に記載のナノポア形成装置。

【請求項 18】

設置される膜は前記電解液に接触する部分が絶縁体により複数部分に分けられており、前記第2の電極は、絶縁体により分けられた前記複数部分のそれぞれに対して設けられ、前記制御回路は、各々の部分を個別に制御することを特徴とする請求項14に記載のナノポア形成装置。

30

【請求項 19】

電解液中で、膜の一面ともう一面の間に電位差が生じるように電圧を印加することにより前記膜を貫通するようにナノメートルサイズの貫通孔(ナノポア)を形成するための前記膜と、前記膜に前記電圧の印加により形成されるナノポアの大きさと、 $I_{PF} \ll I_{NP}$ となる低い電圧 $V_b$ を印加して測定した電流値( $I_{tot}$ )との関係を前記膜の材料と膜厚に応じて記憶した記憶媒体とのセット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、半導体を用いたセンサに関する技術である。

40

【背景技術】

【0002】

次々世代DNAシーケンサを実現するアプローチとして、ナノポアを用いた技術が研究されている。すなわち、薄膜メンブレンにDNAと同程度の大きさの孔(ナノポア)を設け、薄膜メンブレンの上下チャンバは水溶液で満たし、両チャンバに水溶液に接触するよう電極を設け、チャンバの片側には測定対象となるDNAを入れて、両チャンバに設けた電極間に電位差を持たせてDNAを電気泳動させてナノポアに通過させた際に、両電極間に流れるイオン電流の時間変化を計測することで、DNAの構造的な特徴や塩基配列を決定しようとするものである。また上記は、DNAに限らず多様な生体分子の構造的な特徴取得に有用で

50

ある。

【0003】

ナノポアデバイスの製造は、機械的強度が高いこと等から、半導体基板、半導体材料および半導体プロセスを用いる方法が注目を集めている。例えば薄膜メンブレンはシリコン窒化膜(SiN膜)を用いて形成でき、ナノポアの形成にはTEM (transmission electron microscope) 装置をもちいて、電子ビームの照射面積をメンブレン上に小さく絞り、エネルギー、電流をコントロールすることで、10 nm以下のポアを形成することが出来る。(非特許文献1)

TEM装置での加工では、装置内に搬入できるサンプルの大きさに限りがあり、また複数箇所に同時にビームを絞ることも通常困難である。そのため、例えば8インチウエハ上の全てのチップを同時に一括加工することは出来ず、1チップずつ切り出しての処理となる。1チップごと装置に入れて、真空引きや装置の安定待ちなど長時間経過後にナノポア加工をする故、デバイス形成のスループットが低下する。さらに、電子線照射中のドリフトはほぼ不可避であり、数nmのばらつきができてしまう。また、10 nm以下のナノポアの形成は、通常の半導体リソグラフィ技術をもちいたパターンニングでは困難である。

【0004】

非特許文献2にて、ナノポアの形成方法が公開された。彼らは、穴の空いていない10 nm厚みのSiN膜を挟んで上下に塩化カリウム水溶液(KCl水溶液)を満たし、上下のチャンバのKCl水溶液中に電極を浸し、両電極間に高電圧を印加し続ける。そして、あるカットオフ電流値を設定しておき、そのカットオフ電流値を上回ったところで高電圧印加をストップする。非特許文献2の中のFigure 2のfに示されるとおり、5Vを電極間に印加し続け、400 sから500sの間で電極間電流がカットオフ電流値に到達し、そこで高電圧印加をストップすることで、5 nm程度のナノポアを形成している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】 Jacob K Rosenstein, et al., Nature Methods, Vol.9, No.5, 487-492 (2012) Vol.6, No.4, 779-782

【非特許文献2】 Kwok, H.; Briggs, K.; and Tabard-Cossa, V.; " Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown "

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

非特許文献2の方法をもちいて我々がナノポア形成の実験・検討をした結果、明らかになった課題を以下に詳しく説明する。

【0007】

イオン水溶液中のSiNメンブレンの上下間に高電圧を印加すると、例えばSiNメンブレンの上側に正の電圧、下側に負の電圧を加えたとき、SiNメンブレンの上側(表面側)には正イオン、下側(裏面側)には負のイオンが蓄積する。電圧が高い場合、イオンの持っている電荷は、SiN膜中をトンネル効果により通過して流れる電流ならびにSiN膜中の欠陥準位を介してSiN膜中を伝導する電流(これら膜を通過して流れる電流は、トンネル電流ならびにプルフレンケル電流といい、本明細書ではそれら膜を通過する電流(後に述べるナノポアを通過する電流 $I_{NP}$ 以外)を総じて $I_{PF}$ と称する)としてSiN膜中を伝導することが分かった。SiN膜中を電荷が伝導し続けると、その電荷がSiN膜中の結合を破壊していき、どんどん欠陥準位は増えていく。それに伴い、膜を通過するリーク電流 $I_{PF}$ も増加する。そして高電圧印加を続けていると、SiN膜中の最も欠陥密度が多い場所がやがて貫通しナノポアとなり、ナノポアを通過するイオン電流( $I_{NP}$ )が流れる。

【0008】

すなわち電極間電流( $I_{tot.}$ )は、

$$I_{tot.} = I_{NP} + I_{PF}$$

と記述でき、ナノポアが開口するまでは $I_{PF}$ のみ流れ、ナノポアが開口した後は $I_{NP} + I_{PF}$ の電流が流れる。水溶液のイオン濃度、イオン移動度、メンブレンの膜厚、メンブレンの材質をあらかじめ把握しておけば、電流量 $I_{NP}$ から、開口したナノポアの大きさ(ナノポア径)を算出することは可能である。つまり、高電圧を印加し続け、所望の穴径に相当する $I_{NP}$ が流れたところで高電圧印加をストップすることで、所望の穴径のナノポアを形成することが出来る。

#### 【0009】

しかしながら高電圧印加中の $I_{PF}$ は、メンブレン膜厚が同じでも、膜の欠陥準位の数や密度が作成された各メンブレン毎に違うため、さまざまな値をとることが我々の実験から分かった。また、高電圧を印加している最中にも、膜の欠陥の増加などにより、 $I_{PF}$ は時間と共に変化し、その様子もメンブレン毎に様々であった。そしてこれらは、非特許文献2に記載されている結果(たとえば非特許文献2のFigure.2のfや、FigureS3など)でも、そうである。ある穴径のポアを作る場合、 $I_{NP}$ の値が所望の穴径に相当する電流になったところで高電圧印加をストップする必要がある。しかしながら実際にメンブレン上下の電極間で測定できるのは $I_{tot.} = I_{NP} + I_{PF}$ であり、高電圧印加をストップするためのしきい値電流値(カットオフ電流値)は、計測上、 $I_{tot.}$ の値で設定しないとしない。先に述べたとおりメンブレン膜厚が同じでも、 $I_{PF}$ が各メンブレン毎、時間毎に変化するため、あるメンブレン膜厚に対して一律のカットオフ電流値を設けて穴形成を行っても、出来上がる穴の大きさ(穴の径)は、ばらばらとなってしまうことが分かった。

#### 【0010】

そうならないようにするためには、 $I_{PF}$ の変化に応じてカットオフ電流値を各メンブレン毎、時間毎に逐次変化させなければならない。これには各メンブレン毎に時間と共に変化するかットオフ電流値を逐次記憶し更新するユニットが必要で、信号処理量や信号処理する回路面積が増大する。この問題は特にナノポアセンサを集積・並列化してDNA測定を行う装置やシステムを構築しようとした場合、並列するナノポアセンサの数だけナノポアが必要であり、その各々のナノポア形成に対して時間と共に変化するかットオフ電流値を逐次記憶し更新するユニットが必要になるため、信号処理量や回路面積の増大はより深刻な問題となる。そのため装置の小型化並びに低コスト化に障壁が存在する。

#### 【0011】

またもうひとつの課題として、DNAシーケンスのためには、シングルストランドDNA(ssDNA)直径に近いナノポアを形成する必要があり、サブ1 nmから2 nm程度の穴径の穴を精度よく作る必要がある。そして並列化したナノポアセンサの場合、穴の直径はオングストロームオーダーでそのバラつきを制御する必要がある。穴径のばらつきが大きいと、各センサごとのDNA測定時の検出電流値がばらつくため、各センサごとに特化した信号処理が必要になり負荷が増える。また並列化したナノポアセンサから得られたDNA計測信号をマージしてデータを解析する場合、各センサごとの検出電流値がばらついていると、解析結果の精度を落とす要因となる。

#### 【0012】

非特許文献2に開示されているデータ(Figure.2のf)を見ると、高電圧(5V)を印加してから、nanopore creationと書いてある時間までで、50 nA程度電流値が変化している。今、DNA計測に適している1.4 nmのナノポアを、10 nm厚のSiNメンブレン(非特許文献2で用いているメンブレンの膜厚)に形成しようとした場合、1.4 nm相当の $I_{NP}$ は電極間の電圧5 Vの時に約10 nAとなる。つまり、所望の穴径に相当する $I_{NP}$ よりも、電圧印加中に変化する電流値の揺らぎの方が大きいことになる。ナノポアの形成過程では、電圧印加にともない径1 nm以下の非常に小さなナノポアが生成し、それが徐々に大きくなっていく場合もあり、そのようなゆっくりとしたナノポア形成過程を電流値 $I_{tot.}$ で観測していても、 $I_{NP}$ が徐々に増えているのか $I_{PF}$ が増えているのか見分けつきにくくなっていく。つまり、 $I_{PF}$ の時間的な揺らぎが所望の $I_{NP}$ と同程度かそれより大きいと、 $I_{NP}$ が徐々に増えているのか $I_{PF}$ が増えているのか区別が困難となっていく。これでは、特に3 nm以下の小さいナノポアを、精度よく穴径を制御して形成することが出来ない。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0013】

上記課題を解決するために、本発明の膜に穴を形成する方法は、電解液中に設けられた膜を挟んで設置された第1の電極と第2の電極の間に第1の電圧を印加する第1の工程と、第1の電圧を印加後、第1の電極と第2の電極の間に第1の電圧よりも小さい第2の電圧を印加し、第2の電圧を印加することにより第1の電極と第2の電極の間に流れる電流値を測定する第2の工程と、電流値があらかじめ設定した閾値と一致もしくは超えるか否かを判断する第3の工程と、第3の工程において、電流値が閾値よりも小さい場合に、第1及び第2の工程を繰り返す。また、第2の電圧は、膜を通過して流れる電流値( $I_{PF}$ )が実質的に0となるような電圧である。

10

## 【0014】

さらに、本発明の一態様として、第3の工程において電流値が第1の閾値を超えた場合に、第1の電極と第2の電極の間に、第3の電圧を印加する第4の工程と、第3の電圧を印加後、第2の電圧を印加し、第2の電圧を印加することにより第1の電極と第2の電極の間に流れる電流値を測定する第5の工程と、第5の工程で測定された電流値が、穴径と電流値との関係のデータに照らし合わせて所望の穴径に該当する電流値であるかどうかを判断する第6の工程と、第3の電圧は、第1の電圧よりも小さい値の電圧か、または、第1の電圧が最後に印加された時の印加時間幅よりも短い印加時間幅である、第1の電圧と同じ大きさの値の電圧であって、第6の工程において、電流値が所望の穴径に該当する電流値よりも小さい場合に、第4及び第5の工程を繰り返すことにより、穴を形成する方法

20

## 【0015】

また、本発明の一態様として測定装置を開示する。測定装置は、膜をチャンバに設置する機構と、膜が設置されたチャンバに電解液を導入する溶液導入口と、膜を挟んで設けられる第1の電極及び第2の電極と、第1の電極及び第2の電極との間に電圧を印加する電源と、電圧を制御する制御回路と、電圧を印加することにより得られる電流値を測定する測定部と、膜に電圧を印加することにより形成される穴の大きさと電流値との関係を膜の材料と膜厚に応じて記憶した記憶部とを備える。そこで電流値は、膜を通過して流れる電流値が実質的に0となるような電圧で測定された電流値であることを特徴とする。

## 【0016】

上記の測定装置の制御回路の態様として、第1の電極と第2の電極の間に第1の電圧を印加後、第1の電極と第2の電極の間に膜を通過して流れる電流値が実質的に0となるような電圧を印加して、第1の電極と第2の電極の間に流れる電流値を測定部により測定する第1のシーケンスを行い、電流値があらかじめ設定した閾値を超えるか否かを判断して、電流値が閾値以下の場合に、第1のシーケンスを繰り返す制御を行う。

30

## 【0017】

また、電流値が閾値を超えた場合には、第1の電極と第2の電極の間に、第3の電圧を印加後、第1の電極と第2の電極の間に膜を通過して流れる電流値が実質的に0となるような電圧を印加して、第1の電極と第2の電極の間に流れる電流値を測定部により測定する第2のシーケンスを行い、第3の電圧は、第1の電圧よりも小さい値の電圧か、または、第1の電圧が最後に印加された時の印加時間幅よりも短い印加時間幅である、第1の電圧と同じ大きさの値の電圧であって、測定される電流値が記憶部に記憶された所望の穴径に該当する電流値以下の場合に、第2のシーケンスを繰り返す制御を行う。

40

## 【0018】

さらに、測定装置の一態様として、所望の穴径の穴が膜に形成された後、電解液中に導入される核酸試料を第1の電極と第2の電極に電圧を印加することにより穴に導入し、測定部により核酸試料の穴を通過することによる電流値を測定する。

## 【0019】

また、別の態様として、本発明はチップセットを開示する。電圧を印加することにより穴を形成するための膜と、膜に電圧を印加することにより形成される穴の大きさと電流値

50

との関係を膜の材料と膜厚に応じて記憶した記憶媒体とを有する。そこで、電流値は、膜を通過して流れる電流値 ( $I_{PF}$ ) が実質的に 0 となるような電圧で測定された電流値である。

【発明の効果】

【0020】

本願において開示される発明の複数の実施例のうち、代表的なものによって得られる効果を簡単に説明すれば以下のとおりである。すなわち、従来より簡便で、低コストかつ高精度に、メンブレンにナノポアを形成できる。

【0021】

上記した以外の、課題、構成及び効果は、以下の実施の形態の説明により明らかにされる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本発明の効果を示す実験結果である。

【図2】本発明の効果を示す実験結果である。

【図3】本発明の実施例を説明するフロー図である。

【図4】本発明の実施例を説明するチャート図である。

【図5】本発明の実施例を説明するフロー図である。

【図6】本発明の実施例を説明するチャート図である。

【図7】本発明の実施例を説明するフロー図である。

【図8】本発明の実施例を説明するチャート図である。

【図9】本発明の実施例を説明するフロー図である。

【図10】本発明の実施例を説明するチャート図である。

【図11】本発明の実施の形態を示す図である。

【図12】本発明の実施の形態を示す図である。

【図13】本発明の実施の形態を示す図である。

【図14】本発明の実施の形態を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本実施の形態を説明するための全図において同一機能を有するものは同一の符号を付すようにし、その繰り返しの説明は可能な限り省略するようにしている。以下、本発明の実施の形態を図面に基づいて詳細に説明する。実施例に記載するデバイス構造および材料は、本発明の思想を具現化するための一例であり、材料および寸法などを厳密に特定するものではない。

【実施例1】

【0024】

はじめに、ナノポア形成装置ならびにDNA等の生体試料の計測のシステムの例を図11に示す。100はメンブレンであり、例えばSiN膜である。101は例えばSi基板、メンブレン周辺膜102は例えばSiO<sub>2</sub>（シリコン酸化膜）またはSiNまたはSiO<sub>2</sub>とSiNの積層膜である。103は上部電極、104は下部電極であり、材料は例えばAg/AgClである。105ならびに106は水溶液ならびに測定対象物（例えばDNA）を注入および排出するための注入口ならびに排出口である。107はナノポア形成シーケンスを行うための制御回路部である。108ならびに109は、水溶液ならびに測定対象物が満たされているチャンバである。110は制御回路部を支持する基板である。111は、電源ならびに測定結果の検出、また測定開始の入力などトータルシステムの制御や補助を行うユニットである。117は、膜の設置する機構の一例として、チャンバ中の溶液が外に漏れ出さないようにするための、チャンバとチップ間に挟まれるo-リングである。制御回路部107は、これより実施例で示すナノポア形成のシーケンスを司るほか、DNA計測中の信号をPCに転送するなどの役割を果たす。また制御回路部107は、検出された電流を増幅するアンプや、ADCを備えていることが好ましい。もちろん、アンプは制御回路部107に有り、ADCは制御回路部107外（例えば111部）にあるという配置な

10

20

30

40

50

ど、バリエーションは様々であり、測定環境に適した系を構築することが重要である。

【0025】

以下の実施例に示す方法をもちいることで、先に説明した課題を解決することができる。メンブレン100を挟み上下に電解液（水溶液）が隔離されており、メンブレンの上側チャンバ108と下側チャンバ109にそれぞれ電極を水溶液に浸るように設ける。そしてその電極間に高い電圧（Va）印加後に低い電圧（Vb）（ $I_{PF} \ll I_{NP}$ となる電圧、つまり $I_{PF}$ が $I_{NP}$ よりも十分に小さく、ほぼ0となる電圧）で電極間電流 $I_{tot}$ を測定するというシーケンスを繰り返し、 $I_{tot}$ がある一定のカットオフ電流値1（例えば10 pA、直径1 nm以下のナノポア通過電流）を超えたら、シーケンスをストップする。カットオフ電流値1は、最低限必要な穴径に応じた電流値等で決めればよい。次に、それまで加えていた電圧（Va）よりも低い電圧（Vc）（ただし（Vb）よりも高い電圧）を印加した後に電圧（Vb）で $I_{tot}$ を計測するというシーケンスを繰り返し、設定した所望の穴径に相当するカットオフ電流値2に $I_{tot}$ が到達したら、シーケンスをストップする。

10

【0026】

本方式によれば、 $I_{tot}$ を計測する際に $I_{PF} = 0$ となる低電圧で計測するため、ナノポアが開口するまでは $I_{tot} = 0$ 、そして非常に小さなナノポアが開口した時点で $I_{tot} = I_{NP}$ となる。よって課題の原因であった、メンブレン毎、時間毎に変化する $I_{PF}$ の成分をほぼ0に出来、無視できるため、カットオフ電流値を一律に設定しても、同じ膜厚のメンブレンに対して同じ大きさの穴を形成できる。また、本方式によれば、高電圧印加をストップするためのカットオフ電流値をメンブレン毎、時間毎に逐次記憶し更新するユニットが必要なく、一律に決定することができる。そのため、信号処理量の低減ならびに、信号処理に必要な回路の面積を低減することができ、装置の小型化、低コスト化が図れる。特にナノポアセンサを集積・並列化してDNA測定を行う装置やシステムを構築しようとした場合、並列するナノポアセンサの数だけナノポアが必要であるが、カットオフ電流値を各メンブレン全て一律に設定できるため、各々のナノポア形成に対して時間と共に変化するカットオフ電流値を逐次記憶し更新するユニットが必要でなくなり、大幅な装置の低コスト化、小型化が可能となる。

20

【0027】

低い電圧（Vb）で $I_{tot} = 0$ 、そして $I_{tot} = I_{NP}$ と出来るのは、下記に示す我々の実験ならびに検討結果に基づく。

30

【0028】

すなわち我々は、水溶液中においてメンブレンを通過するリーク電流を実験をまじえ詳細解析をし、以下のことが明らかになった。 $I_{PF}$ は水溶液中において、メンブレン膜の欠陥準位をホッピングして伝導するプールフレネル電流と、メンブレン膜をトンネルして伝導するトンネル電流が混ざり合っていることが分かった。そして大事なものは、 $I_{PF}$ は、印加電圧の増加に対してオーミックに電流が増えるのではなく、印加電圧の増加に対し指数関数的に電流増加することが実験の結果分かった。従って、メンブレンにナノポアが形成される程度の高い電圧（Va）印加時には $I_{PF}$ は非常に大きい、0Vに近い低い電圧（Vb）では、 $I_{PF}$ は非常に小さくなるのが我々の検討から明らかになった。一方で、 $I_{NP}$ は印加電圧の増加に伴いオーミックに増加した。よって0Vに近い低い電圧（Vb）では、 $I_{PF} \ll I_{NP}$ となる状況が設定でき、そのときに電極間を流れる電流値は、ほぼナノポアを流れる電流値と等しいという状況を作ること成功した。よって、 $I_{NP}$ の電流値が、高電圧印加中に時間と共に増大したりして揺らぐ $I_{PF}$ の電流値に埋もれることなく、非常に小さいナノポア形成時の検出が可能となった。

40

【0029】

実際の実験結果を図1に示す。図の横軸は電圧（Va）もしくは、電圧（Va）よりも低い電圧（Vc）の印加積算時間であり、縦軸は、低い電圧（Vb）（ $I_{PF} \ll I_{NP}$ となる電圧）で計測した電極間の電流量 $I_{tot}$ である。もちいたメンブレンはSiNメンブレンであり、厚みは10 nmである。SiNメンブレンの上下両側に1MのKCl水溶液を満たし、上下両チャンバに電極103,104を浸している。電流量 $I_{tot}$ は、この両電極間の電流である。ここで用いた

50

電圧 (Va) は7V, 電圧 (Vb) は0.1 V, 電圧 (Vc) は3.5 Vである。電極間に電圧 (Va) 印加後に電圧 (Vb) で電極間電流  $I_{tot}$  を測定するというシーケンスを繰り返し、 $I_{tot}$  がある一定のカットオフ電流値1 (10 pA, 直径1 nm以下のナノポア通過電流に相当) を超えたら、シーケンスをストップした。

#### 【0030】

次に、それまで加えていた電圧 (Va) よりも低い電圧 (Vc) を印加した後に電圧 (Vb) で  $I_{tot}$  を計測するというシーケンスを繰り返し、設定した所望の穴径に相当するカットオフ電流値2として300 pA (穴径約1.4 nm相当) になったところでシーケンスを終了した。これら実験における電流値、電圧値、膜厚などはあくまで一例であり、これに限るものでないことはいうまでもない。また、例えば電圧 (Va) よりも低い電圧 (Vc)、又は、電圧 (Va) よりも小さい電圧 (Vc) といった場合に、電圧 (Va) の絶対値としての大きさよりも電圧 (Vc) の絶対値としての大きさが小さいことを意味する。その他、電圧 (Vb) 等も同じである。

10

#### 【0031】

実験結果より、ナノポア形成前の電極間電流  $I_{tot}$  はほぼ0であり、ナノポアが開口した時点では、約90 pAの電流値が流れている。ナノポア径にして1 nmより小さい穴が空いたところである。ナノポア開口直前まで  $I_{tot}$ 、 $I_{PF}$  がほぼ0であるため、ナノポア開口後の電流値は  $I_{tot}$ 、 $I_{NP}$  であることが明確に分かる。よって高電圧印加中に時間と共に増大したりして揺らぐ  $I_{PF}$  の電流値に埋もれることなく、非常に小さいナノポア形成時点で、ナノポア開口の検出が可能となる。また、カットオフ電流値1,2も、 $I_{PF}$  の揺らぎがほぼ0であるため、一律にカットオフ電流値を決定しても、同じ大きさの穴を形成できる。従来例に対して、カットオフ電流値を各メンブレン毎、時間毎に逐次記憶し更新するユニットが必要ないため、信号処理量の低減ならびに、信号処理に必要な回路の面積を低減することができ、装置の小型化、低コスト化が実現できる。

20

#### 【0032】

また電圧 (Va) の一回の印加時間の幅を細かくすればするほど、より小さいナノポア開口時の検出が可能となる。先にも述べたとおり、本方式ではナノポア開口直前まで  $I_{tot}$ 、 $I_{PF}$  がほぼ0であり、ナノポア開口後の電流値は  $I_{tot}$ 、 $I_{NP}$  となるため、非常に小さなナノポアが形成できた時点で検出が可能である。

#### 【0033】

そして、一旦小さなナノポアが開口した後、電圧 (Vc) を印加した後に電圧 (Vb) で  $I_{tot}$  を計測するというシーケンスを、設定した所望の穴径に相当するカットオフ電流値2になるまでくりかえすことで、所望の穴径のナノポアを形成できる。一旦空いた小さなナノポアが、電圧 (Vc) の印加により大きくなるメカニズムは、穴の空いていないメンブレンに穴が生成するメカニズムと違い、ナノポアの側壁の原子を、イオンの衝突や反応などによって削り取るようなメカニズムであることが我々の検討から分かった。したがって、電圧 (Va) のような高い電圧は必要なく、それよりも低い電圧 (Vc) で、ゆっくりと穴を広げていくことで、より高精度にナノポア径を制御できる。本実験結果は径1.4 nm相当の穴を作るために、径1.4 nm相当の電流値が確認されたところでシーケンスをストップしたが、このシーケンスを続ければ、それより大きな穴を形成することも、もちろん可能である。(図1には、本方式を用いて1.4 nm以上の穴を空けた例を示している。もちろんそこに示された以上の穴径のナノポアも作成可能である)

30

40

図1にも記載している穴径と電流値の対応関係は、本方式で空けた穴をTEM観察しておよその直径を測定し、電圧 (Vb) で測定した電極間を流れる電流  $I_{tot}$ 、 $I_{NP}$  と穴径の関係をプロットしたグラフ (図2) から算出している。直径は(a)は1.2nm、(b)は1.8nm、(c)は2.6nm、(d)は3.2nmである。グラフからも見て取れるように、ナノポア径の二乗と電流値の関係はきれいな線形となり、この結果から検出電流値  $I_{tot}$ 、 $I_{NP}$  の値を管理することで穴径制御ができることが分かる。

#### 【0034】

つまり、ある膜厚、ある材料で構成されたメンブレンにナノポアが空いたときの穴の大

50

きさと電流値（電圧（Vb）で測定したときの電流値）をあらかじめ調べておけば、その膜厚とその材料で構成されたメンブレンを有するチップと、そのメンブレンに穴が空いたときの穴の大きさと電流値の関係が記録された媒体をもっておくことで、上記の方法で所望の穴を形成することが出来る。電圧（Vb）で測定するときには、 $I_{PF}$ がほぼ0であり、 $I_{t_{ot}} = I_{NP}$ の電流値となるので、膜の欠陥準位の数や密度が違ってても、本発明の方法であれば、一律のカットオフ電流値で所望の穴径を管理できる。

#### 【0035】

いろいろな材料、膜厚で構成されたメンブレンと、そのメンブレンに構成される穴の大きさと電流値の関係が記録されたデータを有していることで、いろいろな材料、膜厚で構成されたメンブレンに所望の穴を形成することが出来る。ナノポアが空いたときの穴の大きさの定義だが、例えば、 $2 \times$ （上面から観察したときのナノポア部分の面積/円周率）<sup>(1/2)</sup>をナノポアの実効直径として、その大きさを管理するのはよい方法である。

10

#### 【0036】

本方式では、先にも述べたとおり、ナノポア開口直前まで $I_{t_{ot}}$ 、 $I_{PF}$ がほぼ0であり、ナノポア開口後の電流値は $I_{t_{ot}}$ 、 $I_{NP}$ となるため、非常に小さなナノポアが形成できた時点で検出が可能である。それゆえ、本実験結果に示されるように、1 nm以下の非常に小さいナノポアが形成でき、しかも0.1nmオーダーもしくはそれ以下の精度で、1 nm以下のナノポアから3 nm以上の大きなナノポアまで、所望の径のナノポアを作ることができる。これは、非特許文献2で開示されているナノポアの最小径よりも小さな孔径を制御して形成できており、これも本方式の優位な点である。

20

#### 【0037】

本実施例の穴あけ方法のシーケンスを図3に示す。また、より本実施例が理解できるように、パルスチャートの例を図4に示す。図中のしきい値電流Aに関しては、1 nm径以下の穴径を流れる電流値に相当する電流を設定しておくのが好ましい。

#### 【0038】

また、ナノポア形成までに掛かる電圧（Va）印加時間は、同じ電圧（Va）、同じメンブレン膜厚でも、メンブレン毎によって欠陥の数や密度が違うため、さまざまである。（実験では、7Vで0.1 sで開口するものから10秒程度掛かるものもあり、桁で変化する）なので、早い時間で開口するメンブレンに合わせて一定の電圧（Va）印加時間を設定すると、開口時間が遅い膜に穴を空けるには、非常に時間が掛かる。電圧（Va）印加時間の増大により時間が掛かるというよりは、電圧（Va）印加後に電圧（Vb）で電流測定するというシーケンスの繰り返し数が増えることで時間が掛かる。そこで電圧印加時間を  $T_{n+1} > T_n$  として、ナノポア開口までの時間を短縮するのが効果的である。例えば、電圧（Va）印加時間を  $T_1 = 10^{-2}$  sからスタートする場合、n回目(n>1)の電圧印加時間を  $T_{n+1} = 10^{-2+0.1n} - 10^{-2+0.1(n-1)}$ と設定する。すると、ナノポア開口に掛かる電圧（Va）印加積算時間が桁で変わっても、シーケンスの繰り返しを含めて開口するまでに必要とする時間はそれほど変わらない。

30

#### 【0039】

また電圧（Vb）は1つの決まった電圧でなく、 $I_{PF}$   $0 \ll I_{NP}$ の範囲となる電圧（例えば本実験においては、0.1V-0.4Vといった範囲）で複数点の電流を測定し、その電流電圧特性がほぼオーミックな結果となっていることを確認することで、より確かにナノポアの形成を確認できる。

40

#### 【0040】

また、ナノポアが開口するまでの間に電極間電流を観測する電圧（Vb）（ $I_{PF}$   $0 \ll I_{NP}$ となる電圧）と、ナノポアが開口した後、穴径を広げる過程において電極間電流を観測する電圧（Vb）（ $I_{PF}$   $0 \ll I_{NP}$ となる電圧）は必ずしも同じでなくてよく、 $I_{PF}$   $0 \ll I_{NP}$ となる関係が満たされている範囲の電圧であればよい。また電圧（Vb）は、電圧（Va）もしくは電圧（Vc）と同じ向きではなく、逆向きの電圧でもよい（ $I_{PF}$   $0 \ll I_{NP}$ となる関係が満たされていればよい）。また電圧（Va）および電圧（Vc）は矩形波ではなく、例えば正弦波のように立ち上がりに時間が掛かるような波形で印加してもよいことは、言うまでもな

50

い。

【0041】

電圧 (Va) は、メンブレンに印加される電界が0.4 V/nm以上が好ましい。それより小さい値であっても穴が形成されることはあるが、穴が開口するまでに非常に長い時間が掛かるため、よりスループットよく穴を形成するためには0.4 V/nm以上が望ましい。我々の検討によると、メンブレンに印加される電界が0.4 V/nm 以上となるように設定した場合、ほぼ1時間以内にナノポアをメンブレンに形成できることがわかった、またメンブレンに印加される電界が0.4 V/nm よりも小さくなるようにVaを設定した場合、メンブレンにナノポアが形成されるまでに1時間以上の長い時間がかかってしまうことがわかった。ナノポアをもちいたDNAシーケンスやその他生体分子の測定自体は、測定の種類にもよるが、早いもので1時間以内が想定される。そのため、メンブレンにナノポアを開口するのに1時間以上かかってしまうと、ナノポア形成から測定終了までの時間が、測定に掛かる時間の何倍にも膨れ上がることとなり、トータルのスループットを著しく低下させてしまう。よって、ナノポア形成から測定終了までのトータルのスループットを著しく低下させないためには、メンブレンにナノポアが形成されるまでに1時間以内が望ましく、そのためには、電圧 (Va) は、メンブレンに印加される電界が0.4 V/nm以上となるようにするのが好ましい。

10

【0042】

また  $I_{PF} \ll I_{NP}$  となる電圧 (Vb) は、メンブレンに印加される電界が0.3 V/nm以下で、より低い電圧となるよう設定するのが好ましい。電圧 (Vb) 印加時にメンブレンに掛かる電界が0.3 V/nmより上でも、電圧 (Vb) が電圧 (Va) より低ければ本実施例の効果を多少得ることは出来るが、我々の検討結果では、 $I_{PF}$  をよりほぼ0に近づけ、精密な穴形成ならびに穴径の制御を行うには、メンブレンに印加される電界が0.3 V/nm以下の範囲で、より低い値に電圧 (Vb) を設定することが望ましい。

20

【0043】

我々の検討によると、メンブレンに印加される電界が0.3 V/nm以下になるような電圧 (Vb) で  $I_{PF}$  を測った場合、 $I_{PF} \ll (0.1 \text{ nm径に相当する穴を通過する電流})$  となる。本発明で対象としているナノポアの大きさは、主にDNAや生体分子が通過できる大きさであり、少なくとも0.1 nm以上の径のナノポアが対象である。よって、メンブレンに印加される電界が0.3 V/nm以下になるような電圧 (Vb) は、 $I_{PF} \ll I_{NP}$  となる電圧 (Vb) であるといえる。そのため、メンブレンに印加される電界が0.3 V/nm以下になるような電圧 (Vb) をもちいることで、0.1 nm以上のナノポアの形成を高精度に検出できる。また、 $I_{PF} \ll (0.1 \text{ nm径に相当する穴を通過する電流})$ 、 $I_{PF} \ll I_{NP}$  となるため、 $I_{Tot.} \approx I_{NP}$  の値から、形成された穴の大きさを、0.1 nmもしくはそれ以下のオーダーの精度で把握することが可能である。

30

【0044】

これを電圧関係で言い直すと、  
 電圧 (Va)  $0.4 \text{ V/nm} \times \text{メンブレンの膜厚 (nm)}$ 、  
 電圧 (Vb)  $0.3 \text{ V/nm} \times \text{メンブレンの膜厚 (nm)}$   
 となる関係の範囲内に設定するのが望ましい。

40

【0045】

また電圧 (Vb) は、好ましくは  $I_{PF} \approx 1/5 \times (\text{しきい値電流値A})$  となる範囲、より好ましくは  $I_{PF} \approx 1/10 \times (\text{しきい値電流値A})$  となるよう電圧 (Vb) を設定することで、より容易な信号検出が可能となる。つまり測定時における周辺の電磁波や振動などが原因となって引き起こされる  $I_{Tot.} \approx I_{PF}$  への電流ノイズよりも、しきい値電流値Aの値が高くないと、ナノポアが形成されていないにもかかわらず、ナノポアが形成されたと誤って見なされて、ナノポア形成のシーケンスがストップしてしまうことがある。測定時における周辺の電磁波や振動などが原因となって引き起こされる  $I_{Tot.} \approx I_{PF}$  への電流ノイズは、大体  $I_{Tot.} \approx I_{PF}$  の1/10から1/5程度である。よって、電圧 (Vb) は、好ましくは  $I_{PF} \approx 1/5 \times (\text{しきい値電流値A})$  となる範囲、より好ましくは  $I_{PF} \approx 1/10 \times (\text{しきい値電流値A})$  となるよう設定

50

することで、誤ることなくナノポア形成時の確かな検出が可能となる。

【0046】

また電圧 ( $V_a$ ) は、 $1.0 \text{ V/nm}$  電圧 ( $V_a$ ) の範囲とするのが望ましい。 $1.0 \text{ V/nm} < \text{電圧} (V_a)$  の範囲では、電圧 ( $V_a$ ) 印加時に膜に掛かるストレスが強いため、メンブレンに穴が形成された後に電圧  $V_b$  で測定したときの穴の大きさは、非常に大きくなってしまふ。詳しく説明すると、 $1.0 \text{ V/nm} < \text{電圧} (V_a)$  の場合、一回の電圧印加時間を非常に細かく設定しないかぎり、本発明の実験例のように、 $1 \text{ nm}$ 以下の穴径の穴が開口された時点で検出できない。しかし我々の検討では、現在の半導体ならびに回路技術の範囲で、可能な限り一回の電圧印加時間を短くしたとしても、 $1.0 \text{ V/nm} < \text{電圧} (V_a)$  の範囲では、 $1 \text{ nm}$ 以下の穴径の穴が開口された時点で検出することは、困難であった。そのため電圧 ( $V_a$ ) を、 $1.0 \text{ V/nm}$  電圧 ( $V_a$ ) の範囲とするのが望ましい。そうすることで、 $1 \text{ nm}$ 以下から、それ以上の穴径の穴までを精度良く、歩留まりよく形成することが出来る。

10

【0047】

また電圧 ( $V_b$ ) は、 $10 \text{ mV}$ 以上であることが望ましい。それ以下であると、 $I_{NP}$ の値も小さくなってしまい、小さな穴が形成された時点での検出が困難となってしまう。

【0048】

電圧  $V_a$  の印加時間幅の決定は、例えば、電圧  $V_a$  を印加してその後電圧  $V_b$  で電流値を計測するというシーケンスを、時間が1桁増える間に何回行うかという決め方で決定するのがよい方法である。先にも述べたとおり、ナノポア形成までに掛かる電圧 ( $V_a$ ) 印加時間は、同じ電圧 ( $V_a$ )、同じメンブレン膜厚でも、その時間は桁で変化するためである。(実験では、 $7\text{V}$ で $0.1 \text{ s}$ で開口するものから $10$ 秒程度掛かるものもある。)我々の検討からは、1桁の間に4回以上、電圧  $V_a$  を印加してその後電圧  $V_b$  で電流値を計測するというシーケンスを入れることで、 $1 \text{ nm}$ 以下のナノポアを形成できることがわかっており、この回数を多くすればするほど、より $1 \text{ nm}$ 以下のナノポアが形成できる確率が上がることがわかっている。特に1桁の間に24回以上、電圧  $V_a$  を印加してその後電圧  $V_b$  で電流値を計測するというシーケンスを入れることで、これまでの実験では $100\%$ の確率で $1 \text{ nm}$ 以下のナノポア形成が可能となることが分かっている。

20

【0049】

本方式によれば、例えば後の実施例に示すとおり、DNA測定直前にメンブレン基板をチャンバにセットして、水溶液を注入して上述の電圧印加方法により穴あけを行い、穴あけ後にはメンブレン基板をチャンバから取り外すことなくDNAを片側チャンバに注入して測定に移行できる。そのため、ナノポア形成後に大気中の汚染物質にナノポアが曝されることがなく、測定ノイズが少なくなる。またTEM装置をもちいたナノポア形成に比べ、製造コストは大幅に削減され、スループットは大幅に改善される。また形成されるナノポアの大きさの制御も、TEM装置をもちいたナノポア形成に比べ、大幅に向上する。また、ナノポアセンサを集積・並列化して測定したい場合、穴の空いていないメンブレンを集積・並列化しておき、各メンブレン部分へ電圧が印加できるよう各電極を配置しておけば、DNA測定前に穴あけを水溶液中で並列に行い、そのままDNA測定を並列に行うことができる。

30

【実施例2】

【0050】

実施例1のシーケンスによる穴の形成ならびに制御をより高精度に行うための実施例を示す。図5のシーケンスに示すように、電圧 ( $V_a$ ) 印加後、電圧 ( $V_b$ ) で  $I_{tot}$  を測定するまでの間に、電圧 ( $V_a$ ) と逆向きの電圧 ( $V_d$ ) をかけることで、電圧 ( $V_a$ ) 印加によって膜に充電された電荷を引き抜くことができる。これによって、電圧 ( $V_b$ ) にて電流計測時に、膜に充電された電流が放電されることによる電流成分を減らすことができ、 $I_{tot}$  中に含まれるノイズ電流を減らすことができる。それによってナノポア形成時により正確な  $I_{NP}$  を計測することができ、より高精度な穴の形成と大きさの管理が出来る。

40

【0051】

また図5に示すとおり、ナノポア形成後に穴を広げていくシーケンス (電圧 ( $V_c$ ) を印加し、電圧 ( $V_b$ ) にて電流値を測定するというシーケンス) において、電圧 ( $V_c$ ) を印加

50

後、電圧 (Vb) にて電流値を測定する間に、電圧 (Vc) と逆向きの電圧 (Ve) を印加することで、ナノポアに詰まることがある溶液中の狭雑物 (ゴミ) の引き抜きにも効果がある。つまり、狭雑物 (ゴミ) が電荷を持っていて、電圧 (Vc) 印加時に狭雑物 (ゴミ) がナノポアに引き寄せられてナノポアに詰まってしまった場合、逆向きの電圧をかけてあげれば、ナノポア外に出してあげることができ、詰まりが解消できる。

【 0 0 5 2 】

電圧 (Vd) ならびに電圧 (Ve) は矩形波ではなく、例えば正弦波のように立ち上がり時間が掛かるような波形で印加してもよいことは、言うまでもない。

【 0 0 5 3 】

また本実施例をよりよく理解できるようにパルスチャートの一例を、図6に示す。

10

【実施例 3】

【 0 0 5 4 】

ナノポア開口後に、ナノポアを広げていく過程 (電圧 (Vc) を印加し、電圧 (Vb) にて電流値を測定するというシーケンス) において、電圧 (Vc) を高い電圧 (Va) と同じ電圧値にしてそのシーケンスを行ってもよい。ただしその場合は、一回の電圧 (Vc) 印加の時間幅 (図3から図7の  $T_m$ ) を、非常に短くして行う必要がある。特に、電圧 (Vc) を最初に印加するときの印加時間の幅は、電圧 (Va) を最後に印加したときの印加時間よりも短く設定する必要がある。一旦空いたナノポアを高い電圧 (Va) と同じ電圧で、一回の電圧印加時間幅も長いまま処理すると、穴の広がるスピードが早すぎて穴径の制御ができないためである。すなわち電圧 (Vc) は、穴径を制御するため、実施例 1 のように電圧 (Va) より小さい大きさであるか、電圧の大きさが同じであっても印加時間が電圧 (Va) を印加する時間より小さければよい。本方式によれば、電圧 (Va) と電圧 (Vc) を同じにすることができるため、穴あけシーケンスに必要な電圧の種類を1つ減らすことができ、制御回路の負担を減らすことができる。よって回路面積の低減とシステムコストの低減が実現できる。

20

【実施例 4】

【 0 0 5 5 】

実施例 1 とほぼ同等の効果を生む別の方法を本実施例に示す。図7に示すように、これまでの実施例 1-3 での電圧 (Va) に相当する電圧の大きさを可変にし、始めに低めの電圧  $V_1$  を時間  $T_1$  だけ印加した後、メンブレン上下の電極間電流を  $V_1$  よりも低い電圧 (Vb) ( $I_{PF}$   $0 << I_{NP}$  となる電圧) で測定し、ナノポアが開口しているか (電流値がしきい値電流 A を上回るか) を確認し、しきい値電流を上回っていない場合は、電圧  $V_1$  よりも高い電圧  $V_2$  を時間  $T_1$  だけ印加し、その後、メンブレン上下の電極間電流を  $V_1$  よりも低い電圧 (Vb) ( $I_{PF}$   $0 << I_{NP}$  となる電圧) で測定し、ナノポアが開口しているか (電流値がしきい値電流 A を上回るか)、というシーケンスを、電流値がしきい値電流 A を上回るまで繰り返すことによって、ナノポアを開口させる方法である。

30

【 0 0 5 6 】

本実施例をよりよく理解できるよう、パルスチャートの一例を図8に示す。つまり、n 目に印加する電圧  $V_n$  の印加時間は、n の回数に依存せず同じにして、電圧  $V_n$  を繰り返し回数と共に増加させていく方法である。  $V_{n+1} - V_n$  を小さくすればするほど、より小さなナノポアが開口した時点で、ナノポア形成を検出できる。本方式でもやはり、ナノポア開口直前まで  $I_{tot}$ 、  $I_{PF}$  がほぼ 0 であり、ナノポア開口後の電流値は  $I_{tot}$ 、  $I_{NP}$  であるため、実施例 1 と同等の効果が得られる。

40

【 0 0 5 7 】

本手法は図9に示すとおり、ナノポアが開口した後に穴を広げていくシーケンスにも適用可能である。より理解がすすむよう図10にはそのパルスチャートの一例を示している。すなわち、ナノポアを広げるために印加する m 回目の電圧  $V_m$  を、  $V_{m+1} > V_m$  となるようにし、その印加時間  $T_2$  は固定とする。  $V_{m+1} - V_m$  は小さければ小さいほど徐々に穴径を広げられるため、より高精度に穴径を制御できる。

【 0 0 5 8 】

50

また本実施例のシーケンス中に、実施例2に示した逆電圧を印加する手順を追加しても、やはり実施例2に示した効果と同様の効果が得られる。

【0059】

また電圧 $V_n$ ならびに電圧 $V_m$ は矩形波ではなく、例えば正弦波のように立ち上がり時間に時間がかかるような波形で印加してもよいことは、言うまでもない。

【0060】

本方法は、一定の時間内で穴が形成される電圧( $V_a$ )の値が、各メンブレンごとに大きくばらつく場合に有用である。

【実施例5】

【0061】

実施例1-5の手法をもちいたナノポア形成方法は、SiNメンブレンのほか、SiONメンブレン、 $SiO_2$ メンブレン、 $Al_2O_3$ メンブレン、 $HfO_2$ メンブレン、HfSiONメンブレン、 $TiO_2$ メンブレン、 $ZrSiO_4$ メンブレン、 $Y_2O_3$ メンブレンなどの無機材料メンブレン、グラフェン、その他ポリマ膜などに対しても有用である。

【実施例6】

【0062】

実際のDNA測定までの手順の例を図11を参照して以下に示す。まず始めに、チャンバにメンブレン100を有するチップ(ここでは例えばメンブレン100、Si基板101、メンブレン周辺膜102で構成される)をセットし、メンブレン上部と下部に例えばKCl水溶液を満たす。そしてメンブレン上部には電極103、下部には基板110で支持された電極104と制御回路部107を設置する。電極103と104のコントロールは、制御回路部107で出来るようになっている。チップを設置する機構として、チップとチャンバの間は、例えばo-リングなどで封止され、チャンバ内の溶液が外に漏れ出さないようになっている。

【0063】

上記セッティングの後、始めに、実施例1-4に示したシーケンスによるナノポア形成を行う。例えば、電極103の電圧は0Vに固定し、電極104の電圧がこれまでの実施例に示した電圧(電圧( $V_a$ ), 電圧( $V_b$ ), 電圧( $V_c$ ), 電圧( $V_d$ ), 電圧( $V_e$ ), 電圧 $V_n$ , 電圧 $V_m$ )を用いて、電圧印加と低電圧での電流計測を繰り返し、所望の径のナノポア形成を行うよう制御回路部107で制御する。

【0064】

ナノポアが形成された後に、注入口105ならびに排出口106を通じて、上側チャンバ108が測定対象物(DNA)を含有した水溶液で満たされるよう置換する。その後、制御回路部107を通じ電極103の電圧を0V、電極104の電圧をDNA測定に適した電圧(例えば0.5V)に設定すれば、上側チャンバの測定対象DNAがナノポアへ電気泳動で誘導され、そしてナノポアをDNAが通過したときの電極103と104の間のイオン電流変化が制御回路部で検出される。その信号は制御回路部107もしくはその外にあるアンプやADCを通じてPCへ転送され、PCでデータ解析することでDNAの構造的な特徴や塩基配列が決定できる。例えば、DNAを構成するATCGでそれぞれ穴を通過する際の電流値が異なるため、DNAの配列を電流値の変化により測定することができる。

【0065】

なお所望のナノポアが形成された時点で、チップをチャンバから取り出し保管しておいて(作り置きをしておいて)、後日測定を行ってもよい。また、時間短縮のために、ナノポア形成前の段階で始めから測定対象物のDNAを上側チャンバ108に入れておき、ナノポア形成シーケンスによりナノポアが形成したら、溶液置換することなくそのままDNA測定をスタートしてもよい。

【0066】

また図2のように、ある膜厚、ある材料で構成されたメンブレンにナノポアが空いたときの穴の大きさと電流値(電圧( $V_b$ )で測定したときの電流値)をあらかじめ調べておけば、その膜厚と材料で構成されたメンブレンを有するチップと、そのメンブレンに穴が空いたときの穴の大きさと電流値の関係が記録された媒体をセットとしておくことで

10

20

30

40

50

、これまでの実施例に示した手法により所望の穴を形成することが出来る。いろいろな材料、膜厚で構成されたメンブレンと、そのメンブレンに構成される穴の大きさと電流値の関係が記録されたデータシートを有している、もしくはそのデータが記録されている部分が装置の中に組み込まれていることで、いろいろな材料、膜厚で構成されたメンブレンに所望の穴を形成することが出来る。

【実施例7】

【0067】

並列化されたナノポアセンサにおけるDNA計測に対応した、ナノポア形成装置ならびにDNA計測のシステムの例を図12(A)に示す。図12(A)では、メンブレン下部の水溶液が満たされている部分が基板101を隔てて絶縁されている。基板101は絶縁性の材料もしくは、表面が絶縁性の材料で覆われている。図12(B)は、基板上に並列されて形成されたメンブレンの上面図である。

10

【0068】

個々のメンブレンに対するナノポア形成ならびにDNA計測のシーケンスは実施例6と同じである。メンブレン上部の電極は固定電圧であり、各々のメンブレンの下部電極の電圧をコントロールし、各々の下部電極の電流値を観測する。制御回路部107の内部構造は、例えば図13に示すとおり、各下部電極104に inputsする電圧や、104で検出された電流の測定を司るユニット114を各メンブレンごとに設ける。各々のユニット114は、実施例6で示したような制御機構（これまでの実施例に示した手法によるナノポア形成のシーケンスを司るほか、DNA計測中の信号をPCに転送するなどの役割を果たすこと。また電流を増幅するアンプや、ADCを備えているなど）を備えている。各々のユニット114と各々の下部電極104は、配線113によって接続されている。

20

【0069】

また図14に示すとおり、各々の下部電極104への電気的な接続可否がアレイで制御できるように、各下部電極104に選択トランジスタ（スイッチ）を設けてもよい。115は各行の選択トランジスタの電圧をコントロールできて、116は各下部電極104から流れる電流を検出できるほか、各下部電極にナノポア形成時およびDNA測定時に電圧印加できるようになっている。動作方法は、例えば、1行1列目のメンブレンに電圧（ $V_a$ ）を印加したい場合、上部電極を0Vとし、1行目の配線に選択トランジスタがONする電圧を加え、それ以外の行の配線には、選択トランジスタがOFFする電圧を加える。同時に1列目に電圧（ $V_a$ ）を印加し、それ以外の列には、上部電極と同電圧を印加する。こうして1行1列目の上部-下部電極間にのみ電圧（ $V_a$ ）が印加される。

30

【0070】

また一行目すべてに電圧（ $V_a$ ）を印加したい場合は、上部電極を0Vとし、1行目の配線に選択トランジスタがONする電圧を加え、それ以外の行の配線には、選択トランジスタがOFFする電圧を加える。同時にすべての列に電圧（ $V_a$ ）を印加する。その後、例えば一行一列目にナノポアが形成されたら一列目への電圧（ $V_a$ ）印加をストップし、残りの列でナノポアが空いていない列への電圧（ $V_a$ ）の印加と低い電圧（ $V_b$ ）での電流読出しを繰り返す、このようなシーケンスで1行目のナノポア形成をおこなうことが出来る。1行目のすべてのナノポア形成が終了したら、2行目、3行目とすべて完了するまで繰り返すことで、すべてのメンブレンにナノポアが形成できる。

40

【0071】

またDNAなどの測定対象物の測定時も、このように各行のナノポア毎に逐次電流計測を高速で繰り返すことで、測定が可能となる。

【0072】

制御回路部107をこのように（図14のように）構成することで、個々のメンブレンごとに電圧印加・電流測定ユニット114を設けるよりも回路面積を縮小することが出来（なぜなら電圧印加・電流測定ユニットの一部を共通化できるため）、装置・システムの低コスト化が実現できる。

【0073】

50

また図2のように、ある膜厚、ある材料で構成されたメンブレンにナノポアが空いたときの穴の大きさと電流値（電圧（Vb）で測定したときの電流値）をあらかじめ調べておけば、その膜厚と材料で構成されたメンブレンを有するチップと、そのメンブレンに穴が空いたときの穴の大きさと電流値の関係が記録された媒体をもっておくことで、これまでの実施例に示した手法により所望の穴を形成することが出来る。いろいろな材料、膜厚で構成されたメンブレンと、そのメンブレンに構成される穴の大きさと電流値の関係が記録されたデータシートを有している、もしくはそのデータが記録されている部分が装置の中に組み込まれていることで、いろいろな材料、膜厚で構成されたメンブレンに所望の穴を形成することが出来る。

【符号の説明】

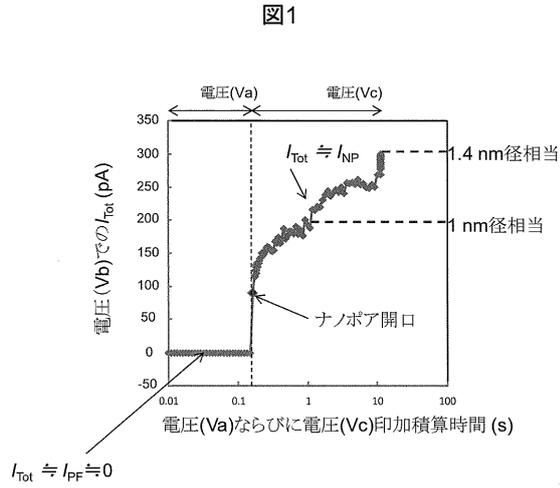
10

【0074】

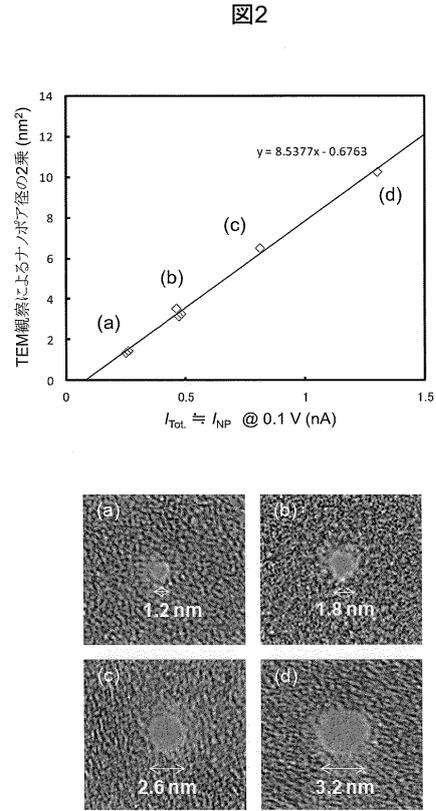
- 100      メンブレン
- 101      基板
- 102      メンブレン周辺膜
- 103      上部電極
- 104      下部電極
- 105      注入口もしくは排出口
- 106      注入口もしくは排出口
- 107      制御回路部
- 108      メンブレン上部チャンバ
- 109      メンブレン下部チャンバ
- 110      支持基板
- 111      電源ならびに制御・検出データ取得ユニット（PC）
- 113      配線
- 114      電圧印加，電流測定制御ユニット
- 115      選択トランジスタ制御ユニット
- 116      電圧印加，電流測定制御ユニット
- 117      膜設置機構

20

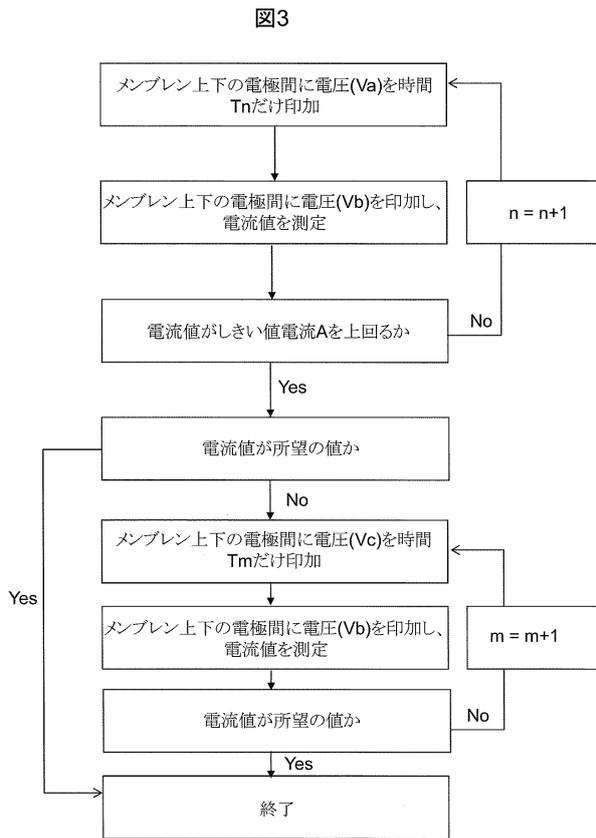
【 図 1 】



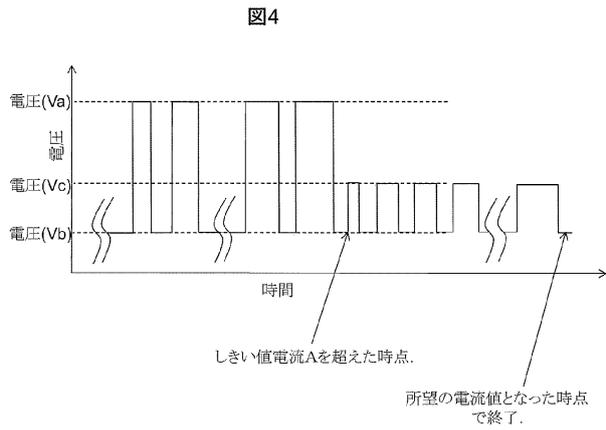
【 図 2 】



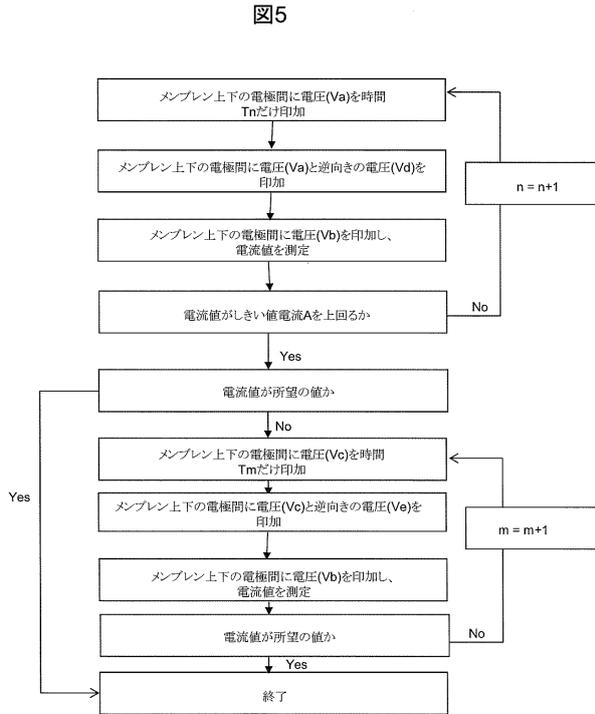
【 図 3 】



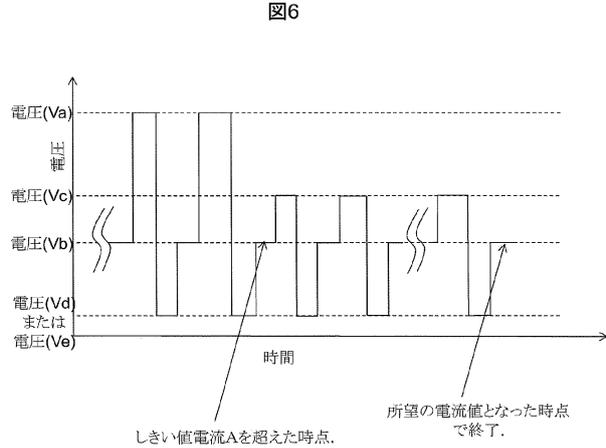
【 図 4 】



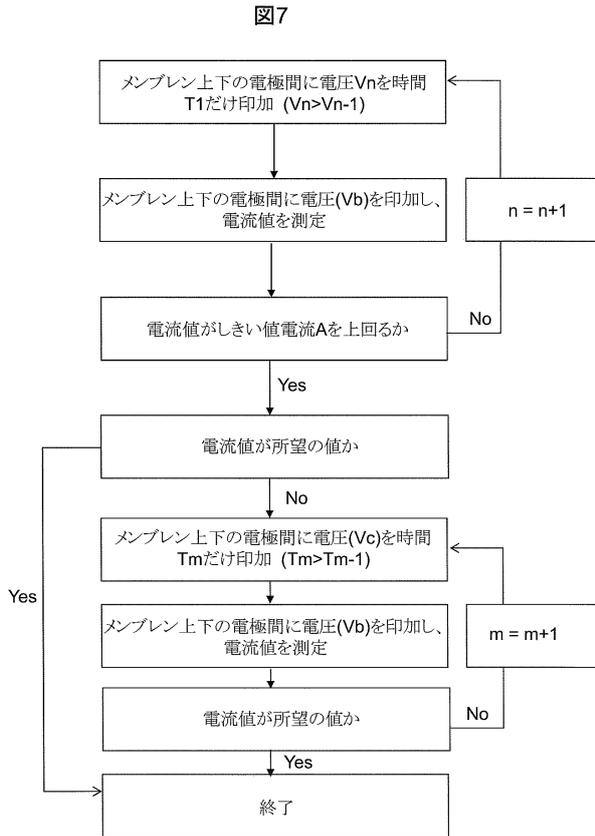
【 図 5 】



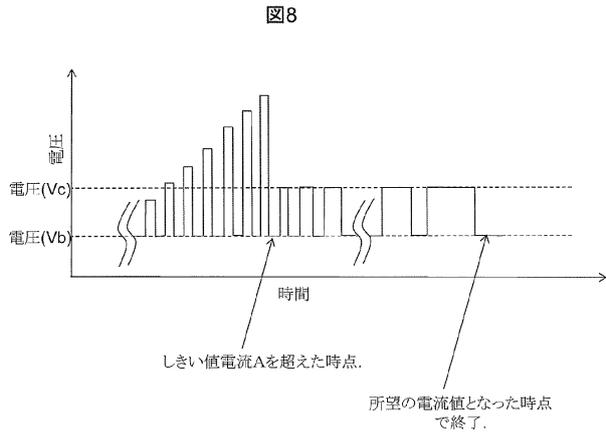
【 図 6 】



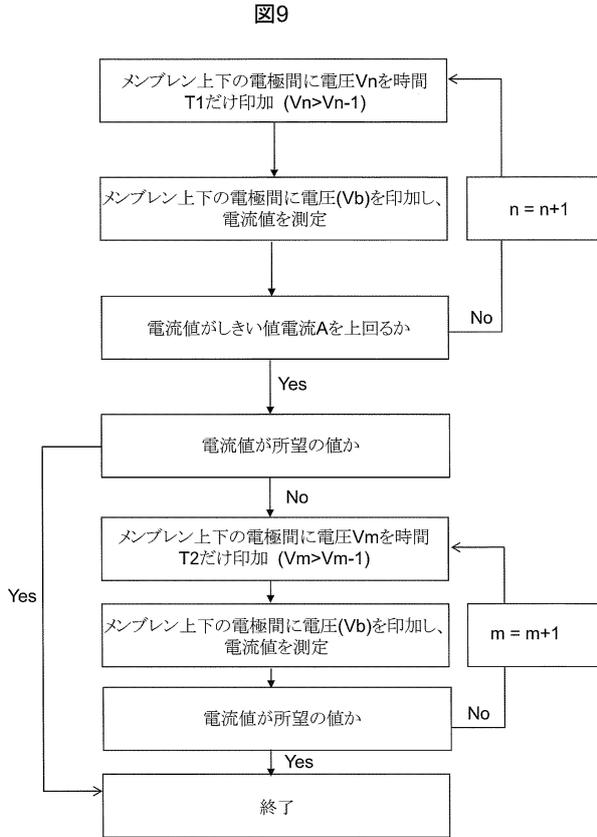
【 図 7 】



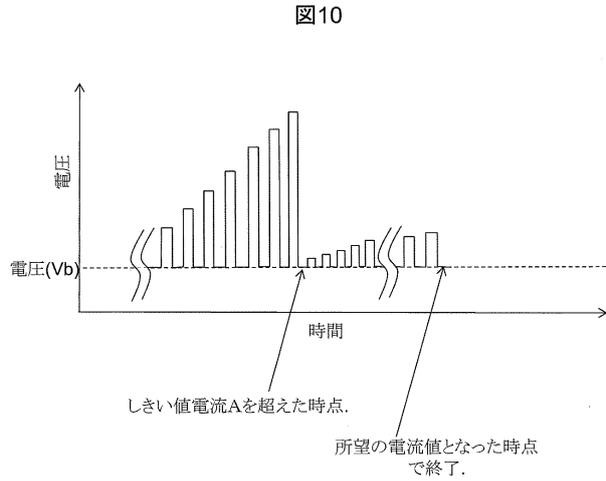
【 図 8 】



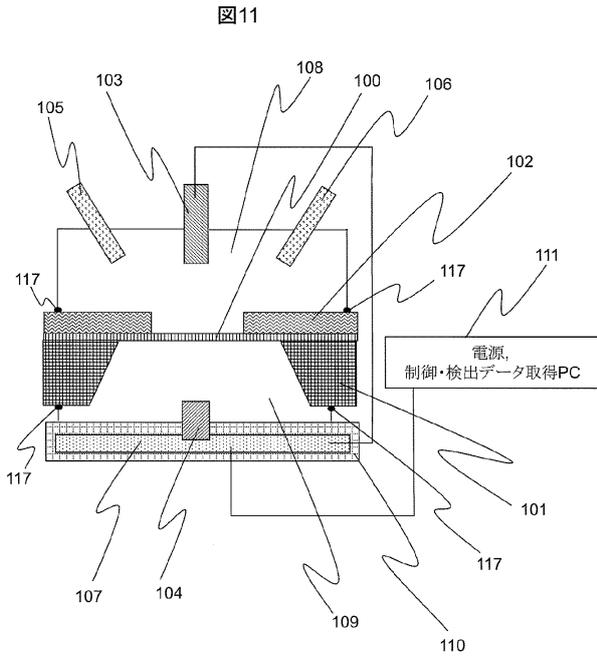
【 図 9 】



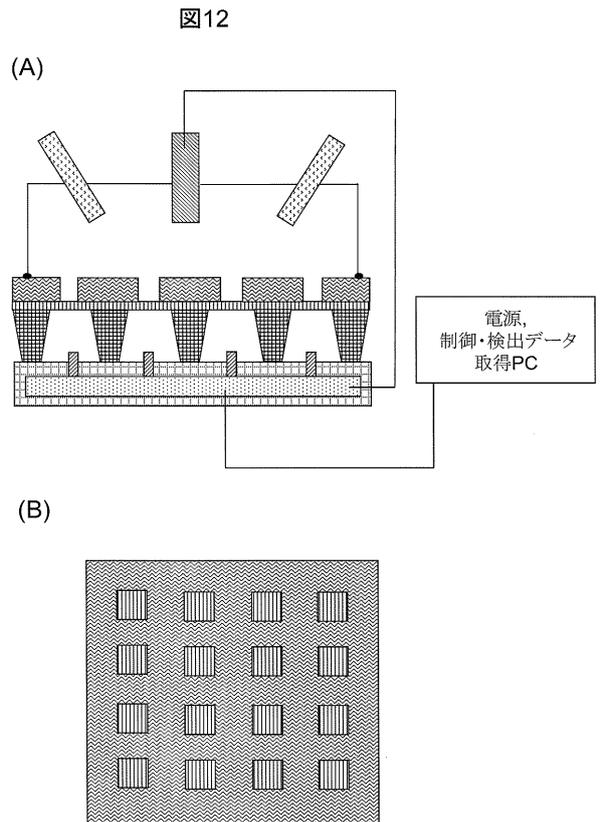
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】

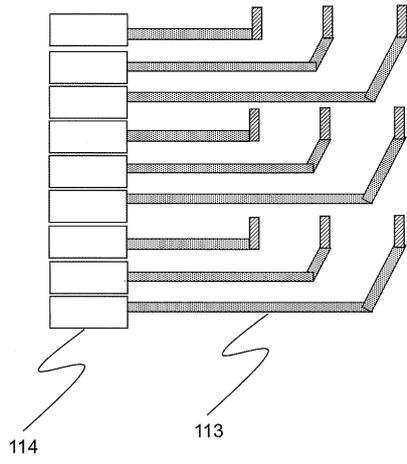


【 図 1 2 】



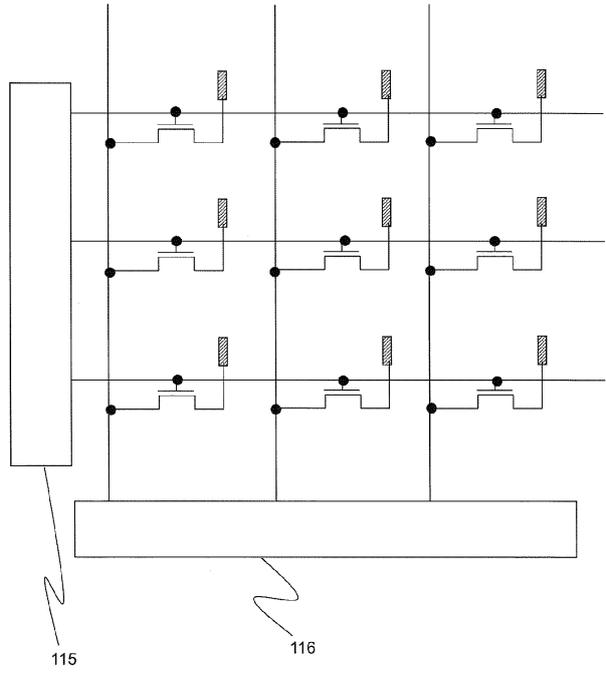
【 13 】

13



【 14 】

14



---

フロントページの続き

(72)発明者 武田 健一  
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

審査官 正山 旭

(56)参考文献 特開2013-036865(JP,A)  
特開2000-269180(JP,A)  
特開平11-168084(JP,A)  
特開平03-257827(JP,A)  
特開2011-243769(JP,A)  
特表2005-516383(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N	27/00
C12M	1/00
C12Q	1/68
H01L	21/3063