(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
2013 年 2 月 14 日(14.02.2013)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2013/021815 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 27/00 (2006.01) *G01N 27/447* (2006.01)
G01N 27/28 (2006.01) *G01N 33/483* (2006.01)
G01N 27/416 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/068765

(22) 国際出願日: 2012 年 7 月 25 日(25.07.2012)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2011-173567 2011 年 8 月 9 日(09.08.2011) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立ハイテクノロジーズ (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目２４番１４号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大浦 剛 (OHURA Takeshi) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛８８２番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕２丁目５番１号 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

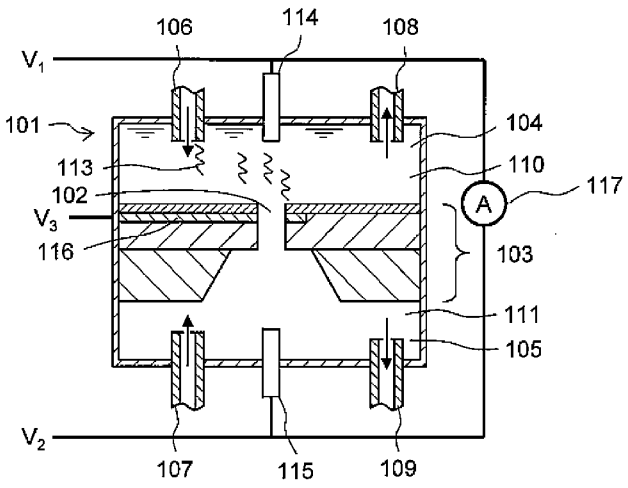
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

WO 2013/021815 A1

(54) **Title**: NANOPORE-BASED ANALYSIS DEVICE

(54) 発明の名称 : ナノポア式分析装置

図 1



(57) **Abstract**: The present invention provides a nanopore-based biopolymer analysis device capable of, in a measurement method using a nanopore, improving passing-through frequency at which a low concentration sample passes through the nanopore and improving the throughput, and also provides a biopolymer analysis method using the nanopore-based biopolymer analysis device. The present invention relates in particular to the nanopore-based biopolymer analysis device characterized by having a chamber portion including: a chamber having a sample introduction section and a sample outflow section separated by a substrate; a first electrode provided in the sample introduction section and a second electrode provided in the sample outflow section; a thin film formed on the substrate; a nanopore provided in the thin film formed on the substrate and communicatively connecting the sample introduction section and the sample outflow section; a third electrode disposed near the nanopore of the substrate; and a voltage applying means for the electrodes. In the nanopore-based biopolymer analysis device, the voltage applying means includes a means for applying voltages between the first and third electrodes, between the first and second electrodes, and between the third and second electrodes, respectively. The present invention also relates to the biopolymer analysis method using the nanopore-based biopolymer analysis device.

(57) 要約:

[続葉有]

本発明は、ナノポアを用いた計測方法において、低濃度の試料に関してナノポアを通過する通過頻度を向上させ、スループットを改善させることが可能なナノポア式生体高分子分析装置及びそれを用いた生体高分子分析方法を提供する。本発明は、特に、ナノポア式生体高分子分析装置であって、基板で隔てられた試料導入区画と試料流出区画とを有するチャンバと、前記試料導入区画に設けられた第１の電極及び前記試料流出区画に設けられた第２の電極と、前記基板に形成されている薄膜と、前記基板の薄膜に設けられた、前記試料導入区画と前記試料流出区画とを連通するナノポアと、前記基板の前記ナノポアの近傍に配置された第３の電極と、電極に対する電圧印加手段と、を備えたチャンバ部を有し、前記電圧印加手段が、第１の電極と第３の電極の間、第１の電極と第２の電極の間、及び第３の電極と第２の電極の間にそれぞれ電圧を印加する手段を含むことを特徴とする、ナノポア式生体高分子分析装置、及びそれを用いた生体高分子の分析方法に関する。

明　細　書

発明の名称 ： ナノポア式分析装置

技術分野

[0001] 本発明は、ＤＮＡ、タンパク質などの生体高分子をナノメートルサイズの細孔（本願では、ナノポアと称する）を通過させて分析する装置に関する。本発明は特に、生体高分子のナノポアの通過頻度を向上させることができるナノポア式分析装置に関する。

背景技術

[0002] ナノポアと呼ばれる、ナノメートルサイズの細孔を用いて、ＤＮＡや蛋白質などの高分子ポリマーを分析する方法の開発が進められている。ナノポアを開けることは、技術的に難しかったが、初めに、バイオ分野において、脂質２重膜にイオンチャネルを導入することで実現された（非特許文献１）。また、ナノポアを使った測定方法も、生体のイオンチャネル計測に用いられるパッチクランプ法に準じた方法が開発された。次に、半導体プロセスを利用してナノポアを開けることが試みられ、イオンビームによる方法（非特許文献２）や電子線による方法（非特許文献３）が開発されてきた。

[0003] ナノポアが作成できるにつれ、ナノポアを使ったＤＮＡや蛋白質などの高分子を分析する方法が開発された。ナノポア式の分析で必要な主要技術は、以下の２つである。

[0004] １．検出技術：高分子がナノポアを通る際の物理的変化を検出

２．移動制御技術：高分子を移動させ、ナノポアを通す

上記検出技術には、封鎖電流方式、トンネル電流方式、キャパシタンス方式が知られている。封鎖電流方式とは、高分子がナノポアの開口部を部分的に封鎖することによる影響を検出する方式である（非特許文献４）。具体的な構造としては、ナノポアを有する膜によって空間を２つに分離し、それぞれの空間にイオンを含む液体を充填し、且つ、電極を配置する。電極に一定の電圧を印加すると、イオンがナノポアを通って移動し、電流が流れる（イ

オン通過電流）。帯電した高分子が存在する場合、その高分子も電位差により、片側へ引き寄せられ、ナノポアを通る。その際、ナノポアの開口部が部分的に封鎖されるので、イオンが流れ難くなりイオン通過電流の大きさが低下する。封鎖電流方式は、この電流値低下を検出することにより、高分子の存在や成分を分析する方法である。イオンの流れにくさは、開口面積に加え、高分子の荷電状態やナノポア壁面との相互作用からの影響を受ける。

[0005] 一方、トンネル電流方式とは、高分子がナノポアを通過する際、ナノポア近辺に設けられたトンネル電流用電極と高分子とのわずかな隙間にトンネル電流が流れ、それを検出することで、高分子の存在や成分を分析する方法である（非特許文献５、非特許文献６）。

[0006] キャパシタンス方式とは、高分子がナノポアを通過する際、ナノポアが部分的に封鎖されるため、ナノポアを有する膜のキャパシタが変化し、それを検出することで、高分子の存在や成分を分析する方法である（非特許文献７）。

[0007] また上記移動制御技術には、電位差移動方式、酵素移動方式、力学的移動方式がある。電位差移動方式とは、上記、封鎖電流方式で出てきたように、ナノポアを有する膜によって分離された２つの空間に電極を配置し、電極に電圧を印加することで、帯電した高分子を電場の勾配にしたがって移動させる方法であり、利点として、単純な構造で実現可能である、高分子に余分な付加がかからないなどが挙げられる。

[0008] 酵素移動方式とは、ナノポア近辺に酵素を配置し、高分子と酵素の反応を利用して高分子を移動させる方法である。例えば、高分子が１本鎖ＤＮＡの場合、ＤＮＡポリメラーゼをナノポア近辺に配置し、２本鎖合成反応を起こさせることで、一塩基ずつＤＮＡを動かす方法がある。この方法では、ＤＮＡがＤＮＡポリメラーゼ近辺に位置する必要があるので、電位差移動方式を併用し、ＤＮＡをナノポア近辺に集めることが、高効率化の点から望ましい。

[0009] 力学的移動方式とは、高分子をビーズに固定し、ビーズを光ピンセットで

移動させることで、高分子の移動を実現する方式である。この方法では、高分子のビーズがついていない端部を、ナノポアに入れる必要があり、その際に、電位差移動方式が採用される。

[0010] 従って、電位差移動方式は、試料をナノポア開口部まで運ぶ駆動力として、どの方法とも併用される。

[0011] 試料は、次の3つの移動状態を経て、ナノポア開口部まで運ばれ、ナノポアを通過する。第1は試料拡散による移動、第2は電気泳動による移動、第3は試料が長鎖状の場合にその先端がナノポア開口部に到着する確率、である（非特許文献８）。第2と第3において、電位差の影響が大きく関与する。

[0012] 従来のナノポア式の分析では、試料が低濃度の場合、試料がナノポアの開口部へ到達する頻度が低下するため、ナノポアを通過する頻度が小さくなり、計測のスループットが低下するという問題がある。

先行技術文献

非特許文献

[0013] 非特許文献1：Kasianowicz J.J.; Brandin E.; Branton D.; Deamer D.W.：Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996, 93, 13770-13773

非特許文献2：Li J.; D.Stein; C.McMullan; D.Branton; M.J.Aziz; J.A. Golovchenko J. A.: 2001, Nature, 412, 166

非特許文献3：Storm A.J.; J.H.Chen; X.S.Ling; H.Zandbergen; C.Dekker 2003, Nat. Mater. 2, 537540

非特許文献4：D.Fologea; M.Gershow; B.Ledden; D.S.McNabb; J.A.Golovchenko;J.Li; Nano Lett 2005, 5, 10, 1905

非特許文献5：M.Zwolak; M.D.Ventra; Nano Lett 2005, 5, 3, 421

非特許文献6：M.Taniguchi; M.Tsutsui; K.Yokota; T.Kawai: Appl Phys Lett 95, 123701(2009)

非特許文献7：G.Sigalov; J.Comer; G.Timp; A.Aksimentiev: Nano Lett 2008, 8, 1, 56

非特許文献8：M.Wanunu; W.Morrison; Y.Rabin; A.Y.Grosberg; A.Meller :

Nat. Nano. 5, 160, 2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は、ナノポアを用いた計測方法において、低濃度の試料に関してナノポアを通過する通過頻度を向上させ、スループットを改善させることが可能なナノポア式生体高分子分析装置及びそれを用いた生体高分子分析方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、ナノポア近傍に配置した電極に電圧を印加することにより、試料を導入する側のナノポア開口部近傍の電位差を拡大し、試料中の生体高分子をナノポア開口部に収集しナノポアを効率良く通過させることに成功し、本発明を完成するに至った。

[0016] すなわち、本発明は以下を包含する。

[0017] [１] ナノポア式生体高分子分析装置であって、

基板で隔てられた試料導入区画と試料流出区画とを有するチャンバと、

前記試料導入区画に設けられた第１の電極及び前記試料流出区画に設けられた第２の電極と、

前記基板に形成されている薄膜と、

前記基板の薄膜に設けられた、前記試料導入区画と前記試料流出区画とを連通するナノポアと、

前記基板の前記ナノポアの近傍に配置された第３の電極と、

電圧印加手段と、

を備えたチャンバ部を有し、

前記電圧印加手段が、第１の電極と第３の電極の間、第１の電極と第２の電極の間、及び第３の電極と第２の電極の間に電圧を印加する手段を含むことを特徴とする、ナノポア式生体高分子分析装置。

[0018] [２] 前記基板が、前記ナノポアに面して配置された計測用電極をさらに備

える、［１］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0019] ［３］前記ナノポアが、最小直径部で直径1～100nmを有する、［１］又は［２］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0020] ［４］前記電圧印加手段が、第３の電極と第２の電極の間の電位差を可逆的に切替可能に構成されていることを特徴とする、［１］～［３］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0021] ［５］少なくとも一組の前記計測用電極が、前記ナノポアを挟んで互いに対向して配置されている、［２］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0022] ［６］前記ナノポアを挟んで第３の電極に対向して配置された前記計測用電極を備える、［２］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0023] ［７］少なくとも一組の前記計測用電極が、前記ナノポアの軸方向に沿って並列に配置されている、［２］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0024] ［８］第３の電極と前記計測用電極とが前記ナノポアの軸方向に沿って並列に配置され、前記計測用電極は第３の電極よりも前記試料流出区画側の位置に設けられている、［２］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0025] ［９］第３の電極が、前記試料導入区画側のナノポア開口部の近傍に配置されている、［１］～［８］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0026] ［１０］前記計測用電極が、ナノポア開口部の近傍又は薄膜内部に配置されている、［２］～［５］及び［７］～［９］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0027] ［１１］第３の電極が、ナノポア開口部を除く薄膜全面を覆っている、［１］～［１０］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0028] ［１２］第３の電極が、ナノポア開口部の周囲に配置されているか、又はナノポアを挟んで対向する位置に配置されている、［１］～［１０］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0029] ［１３］第３の電極が、多重に及び／又は多層に配置された２つ以上の電極を含む、［１］～［１２］のいずれか１項に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[0030] ［１４］前記チャンバ部を複数備える、［１］～［１３］のナノポア式生体高分子分析装置。

[0031] ［１５］［１］～［１４］のナノポア式生体高分子分析装置の前記試料導入区画に、生体高分子を含む試料溶液を導入し、前記第３の電極と第１の電極の間に電圧を印加することにより帯電した生体高分子を収集し、ナノポアを通過させて、ナノポアを通過中の生体高分子を計測することを含むことを特徴とする、生体高分子の分析方法。

[0032] ［１６］前記第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも高く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも低くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加することにより、負に帯電した生体高分子を収集することを特徴とする、［１５］の分析方法。

[0033] ［１７］前記第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも高く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも高くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加し、その後第３の電極の電位が第２の電極の電位よりも低くなるように電圧を変更することにより、負に帯電した生体高分子を収集し、ナノポア通過を促進する、［１５］の分析方法。

[0034] ［１８］前記第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも低く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも高くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加することにより、正に帯電した生体高分子を収集することを特徴とする、［１５］の分析方法。

[0035] ［１９］前記第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも低く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも低くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加し、その後第３の電極の電位が第２の電極の電位よりも高くなるように電圧を変更することにより、正に帯電した生体高分子を収集し、ナノポア通過を促進する、［１５］の分析方法。

[0036] ［２０］前記生体高分子が、核酸、ペプチド核酸、タンパク質、ポリペプチド及び糖鎖からなる群より選択される、［１５］～［１９］の分析方法。

[0037] 本明細書は本願の優先権主張の基礎となる日本国特許出願2011-173567号の

開示を包含する。

発明の効果

[0038] 本発明によれば、生体高分子がナノポアを通過する頻度を増加させ、ナノポア式計測法におけるスループットを改善することができる。

図面の簡単な説明

[0039] [図1]試料をナノポア開口部に収集するための第３の電極を配置したナノポア基板を備えたナノポア式分析装置の分析用チャンバ部の模式図である。

[図2]第３の電極を有しないナノポア式分析装置の分析用チャンバ部の比較図である。

[図3-1]ナノポア近傍に電極を配置したナノポア基板の模式図である。

[図3-2]全面に電極を配置したナノポア基板の模式図である。

[図3-3]ナノポア周囲に電極を配置したナノポア基板の模式図である。

[図3-4]ナノポア周囲に全面に電極を配置したナノポア基板の模式図である。

[図3-5]ナノポア周囲にナノポア端部から後退させて電極を配置したナノポア基板の模式図である。

[図3-6]ナノポア端部から後退させた部分を除くナノポア周囲の全面に電極を配置したナノポア基板の模式図である。

[図3-7]ナノポア周囲にナノポア端部から後退させて多重に電極を配置したナノポア基板の模式図である。

[図3-8]ナノポア周囲にナノポア端部から後退させて多重且つ多層に電極を配置したナノポア基板の模式図である。

[図4]基板にナノポアを挟んで対向して配置したトンネル電流計測用電極と、試料収集用電極を有するナノポア基板を備えた分析用チャンバ部の模式図である。

[図5]ナノポアを挟んで対向して配置したトンネル電流計測用電極が試料収集用電極を兼用しているナノポア基板を備えた分析用チャンバ部の模式図である。

[図6]ナノポア軸方向に沿って並列に配置したトンネル電流計測用電極と試料

収集用電極を有するナノポア基板を備えた分析用チャンバ部の模式図である。

[図7]ナノポア軸方向に沿って並列に配置したトンネル電流計測用電極の１つが試料収集用電極を兼用しているナノポア基板を備えた分析用チャンバ部の模式図である。

[図8]ナノポア軸方向に沿って並列に配置したキャパシタンス計測用電極と試料収集用電極を有するナノポア基板を備えた分析用チャンバ部の模式図である。

[図9]ナノポア軸方向に沿って並列に配置したキャパシタンス計測用電極が試料収集用電極を兼用しているナノポア基板を備えた分析用チャンバ部の模式図である。

[図10]試料容器からの流路を示したナノポア式分析装置の分析用チャンバ部の模式図である。

[図11-1]バイオロジカルナノポアの近傍に試料収集用電極を有するナノポア基板を備えた分析用チャンバ部の模式図である。

[図11-2]バイオロジカルナノポアを直接的に固体膜（薄膜）の穴に配置し、且つナノポアの近傍に試料収集用電極を有するナノポア基板を備えた分析用チャンバ部の模式図である。

[図12]試料収集用電極を有するナノポアが複数個配置された分析用チャンバ部の模式図である。

発明を実施するための形態

[0040] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0041] 本発明は、ナノポア近傍に配置した電極に電圧を印加し、ナノポア付近における電位差を増大させることにより、生体高分子をナノポア付近に収集し、高頻度で生体高分子をナノポア通過させることを特徴とするナノポア式生体高分子分析装置、及びそれを用いた生体高分子分析方法に関する。

[0042] 本発明に係るナノポア式生体高分子分析装置は、チャンバ部とその内部に配置されている基板とを有する。基板は、ベース（基材）と、基材に面して

形成された薄膜と、薄膜に設けられた、試料導入区画と試料流出区画とを連通するナノポアと、ナノポアの近傍に配置された試料収集用電極（本願明細書では、第３の電極とも称する）等を有し、チャンバの試料導入区画と試料流出区画の間に配置される。基板は、試料収集用電極（第３の電極）に面して配置された絶縁層を有してもよい。基板は、固体基板であることが好ましい。

[0043] 本発明において、基板は、電極を除き、電気的絶縁体の材料、例えば無機材料及び有機材料（高分子材料を含む）から形成することができる。基板を構成する電気的絶縁体材料の例としては、シリコン（ケイ素）、ケイ素化合物、ガラス、石英、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリスチレン、ポリプロピレン等が挙げられる。ケイ素化合物としては、窒化ケイ素、酸化ケイ素、炭化ケイ素等、酸窒化ケイ素が挙げられる。特に基板の支持部を構成するベース（基材）は、これらの任意の材料から作製することができるが、例えばケイ素又はケイ素化合物であってよい。

[0044] 基板のサイズ及び厚さは、ナノポアを設けることができるものであれば特に限定されるものではない。基板は、当技術分野で公知の方法により作製することができ、あるいは市販品として入手することも可能である。例えば、基板は、フォトリソグラフィ又は電子線リソグラフィ、及びエッチング、レーザーアブレーション、射出成形、鋳造、分子線エピタキシー、化学蒸着（CVD）、電子線若しくは収束イオンビームなどの技術を用いて作製することができる。基板は、表面への他の分子の吸着を避けるために、コーティングされていてもよい。

[0045] 基板の厚みは好ましくは100μm～1000μmである。基板は、少なくとも1つのナノポアを有する。ナノポアは、具体的には薄膜に設けられるが、場合により、ベース（基材）、電極、及び絶縁体に同時に設けてもよい。本発明において「ナノポア」及び「ポア」とは、ナノメートル（nm）サイズ（すなわち、1nm以上、１μm未満の直径）の孔であり、基板を貫通して試料導入区画と

試料流出区画とを連通する孔である。

[0046] 基板は、ナノポアを設けるための薄膜を有することが好ましい。すなわち、ナノサイズの孔を形成するのに適した材料及び厚さの薄膜を基板上に形成することによって、ナノポアを簡便かつ効率的に基板に設けることができる。ナノポア形成の面から、薄膜の材料は、例えば酸化ケイ素（SiO_2）、窒化ケイ素（SiN）、酸窒化ケイ素（SiON）、金属酸化物、金属ケイ酸塩などが好ましい。また薄膜（及び場合によっては基板全体）は、実質的に透明であってもよい。ここで「実質的に透明」とは、外部光をおよそ50％以上、好ましくは80％以上透過できることを意味する。また薄膜は、単層であっても複層であってもよい。薄膜の厚みは、1nm～200nm、好ましくは1nm～50nm、より好ましくは1nm～20nmである。薄膜は、当技術分野で公知の技術により、例えば減圧化学気相成長（LPCVD）により、基板上に形成することができる。

[0047] 薄膜上には、絶縁層を設けることも好ましい。絶縁層の厚みは好ましくは5nm～50nmである。絶縁層には任意の絶縁体材料を使用できるが、例えばケイ素又はケイ素化合物（窒化ケイ素、酸化ケイ素など）を使用することが好ましい。

[0048] 本発明においてナノポア又はポアの「開口部」とは、ナノポア又はポアが試料溶液と接する部分のナノポア又はポアの開口円を指す。生体高分子の分析の際には、試料溶液中の生体高分子やイオンなどは一方の開口部からナノポアに進入し、同じ又は反対側の開口部からナノポア外に出る。

[0049] ナノポアのサイズは、分析対象の生体高分子の種類によって適切なサイズを選択することができる。ナノポアは、均一な直径を有していてもよいが、部位により異なる直径を有してもよい。ナノポアは、1μm以上の直径を有するポアと連結していてもよい。基板の薄膜に設けるナノポアは、最小直径部、すなわち当該ナノポアの有する最も小さい直径が、直径100nm以下、例えば1nm～100nm、好ましくは1nm～50nm、例えば1nm～10nmであり、具体的には1nm以上5nm以下、3nm以上5nm以下などであることが好ましい。ナノポアのこのような直径100nm以下、好ましくは10nm以下、例えば1nm～100nm又は1nm～5nmの

部分に、計測用電極を配置するなどして、検出部とすることが好ましい。

[0050] ssDNA（1本鎖DNA）の直径は約1.5nmであり、ssDNAを分析するためのナノポア直径の適切な範囲は1.5nm～10nm程度、好ましくは1.5nm～2.5nm程度である。dsDNA（2本鎖DNA）の直径は約2.6nmであり、dsDNAを分析するためのナノポア直径の適切な範囲は3nm～10nm程度、好ましくは3nm～5nm程度である。他の生体高分子、例えばタンパク質、ポリペプチド、糖鎖などを分析対象とする場合も同様に、生体高分子の外径寸法に応じたナノポア直径を選択することができる。

[0051] ナノポアの深さ（長さ）は、基板又は基板の薄膜の厚さを調整することにより調整することができる。ナノポアの深さは、分析対象の生体高分子を構成するモノマー単位とすることが好ましい。例えば生体高分子として核酸を選択する場合には、ナノポアの深さは、塩基3個以上の大きさ、例えば約1nm以上とすることが好ましい。ナノポアの形状（断面形状）は、基本的には円形又は略円形であるが、楕円形や多角形とすることも可能である。

[0052] ナノポアは、基板に少なくとも1つ設けることができ、複数のナノポアを設ける場合に、規則的に配列してもよい。ナノポアは、当技術分野で公知の方法により、例えば透過型電子顕微鏡（TEM）の電子ビームを照射することにより、ナノリソグラフィー技術又はイオンビームリソグラフィ技術などを使用することにより形成することができる。

[0053] 電極（第１～第３の電極及び計測用電極など）は、金属、例えば白金、パラジウム、ロジウム、ルテニウムなどの白金族、金、銀、銅、アルミニウム、ニッケルなど；グラファイト、例えばグラフェン（単層又は複層のいずれでもよい）、タングステン、タンタルなどから作製することができる。電極は任意の形状であってよいが、平面状とすることで加工が容易になる。

[0054] チャンバ部は、試料導入区画及び試料流出区画、基板、電圧印加手段、並びにナノポアを通過する生体高分子を計測するための計測用電極等を有する。好適な例では、チャンバ部は、試料導入区画及び試料流出区画、試料導入区画に設けた第１の電極、試料流出区画に設けた第２の電極、第３の電極を

有する基板、第１、第２及び第３の電極に対する電圧印加手段、並びにナノポアを通過する生体高分子を計測するための計測用電極等を有する。試料導入区画に設けた第１の電極、試料流出区画に設けた第２の電極の間には、電流計が配置されていてもよい。第１の電極と第２の電極の間の電流は、試料のナノポア通過速度を決定する点で適宜定めればよく、例えば、試料を含まないイオン液体を用いた場合、DNAであれば100mV～300mV程度が好ましいが、これに限定されない。

[0055] 本発明では、ナノポアを通過する生体高分子を計測するために、封鎖電流方式、トンネル電流方式、キャパシタンス方式等を利用することができるが、これらに限定されない。計測用電極は、これらの各計測法に適したものを適した配置で使用する。計測用電極は、１つであってもよいが、１組以上であることが好ましい。計測用電極を１つのみ使用する場合、限定するものではないが、例えば、第３の電極との組み合わせで計測を行うことが好ましい。この場合第３の電極は、試料収集用電極としてだけでなく、計測用電極としても機能する。一組以上の計測用電極は、組毎に、ナノポアを挟んで対向して配置してもよいし、ナノポアの軸方向に沿って並列に配置してもよい。並列に配置する場合、計測用電極の間には絶縁層を配置してもよい。計測用電極は、ナノポア開口部の近傍又は薄膜内部に配置されていることが好ましい。計測用電極は、第３の電極との組み合わせで計測用に使用しない場合には、第３の電極よりも前記試料流出区画側の位置に設けられることがさらに好ましい。

[0056] 第３の電極は、基板のナノポアの近傍に配置される。本発明において第３の電極が「ナノポアの近傍に配置される」とは、第３の電極の少なくとも一部が、ナノポアに面しているか、又はナノポアの端部からわずかに後退した位置（例えば、ナノポアの中心軸から鉛直方向に100nmまでの位置）に配置されることを意味する。本発明において「ナノポアに面している」とは、ナノポアの軸方向の壁面に第３の電極の少なくとも一部が接していることを意味する。第３の電極は、ナノポア開口部を除く薄膜全面を覆っていてもよいし

、ナノポア開口部の周囲に配置されていてもよい。本発明において第３の電極が「ナノポアの周囲に配置されている」とは、第３の電極がナノポアの近傍において、ナノポアを完全に囲むように、又はほぼ囲むように（好ましくは、円周の７０％以上、より好ましくは８０％以上、例えば８５％以上）、配置されていることを意味する。あるいは第３の電極は、ナノポアを挟んで対向する位置に配置された電極であってもよい。その場合の第３の電極は、ナノポアの軸方向に直交するように配置されていることが好ましい。第３の電極は、多重に配置された電極であってもよい。この文脈で「多重」とは、ナノポアを中心に、電極が平面図で同心円状又は略同心円状に配置されることを意味する。第３の電極は、多層に配置された電極であってもよい。この文脈で「多層」とは、電極が、ナノポアの軸方向に沿って層状に配置されることを意味する。多層に配置された電極については、各層の電極と電極の間に絶縁層が挟まれていることが好ましい。なお本発明では、第１及び第２の電極が存在しないか、又は第１及び第２の電極を生体高分子の収集に利用しないか、他の電極がさらに存在する場合でも、基板のナノポアの近傍に配置される電極を「第３の電極」と呼ぶことができる。

[0057] 第３の電極は、場合により、他の電極、例えばチャンバの外側（一例としては、試料導入区画に連結した流入路又はその流入路に接続された試料容器）に設けられた電極との間で電圧を印加され、その結果、試料をナノポア近傍に集めることができるように構成されていてもよい。

[0058] 本発明に係るナノポア式生体高分子分析装置は、限定するものではないが、上記チャンバ部に加えて、典型的には例えば、試料導入区画及び試料流出区画に接続された流出入路（流路）、ナノポアを通過する生体高分子を計測する計測部等を有する。計測部は、電極間の電気信号を増幅するアンプ（増幅器）、アンプのアナログ出力をデジタル出力に変換するアナログデジタル変換器、及び計測データを記録するための記録装置等を有していてもよい。計測部は、計測手段と計測データ記録手段の両方を備えたデータロガーであってもよい。例えば、ナノポアに進入した生体高分子に外部光（励起光）を

照射することにより生体高分子を励起させてラマン散乱光を発生させ、そのラマン散乱光のスペクトルに基づいて生体高分子の特性を分析する計測を行う場合には、当該計測部は外部光を照射するための光源と、ラマン散乱光を検出する検出器（分光検出器など）を有していてもよい。光源は、例えば、限定されるものではないが、クリプトン（Kr）イオンレーザ、ネオジム（Nd）レーザ、アルゴン（Ar）イオンレーザ、YAGレーザ、窒素レーザ、サファイアレーザ等であってよく、波長約400～800nm、好ましくは500～600nmの外部光を照射するものであることが好ましい。また計測部は、光源と組み合わせて、共焦点レンズ及び対物レンズ、フィルター、ハーフミラー、共焦点ピンポール等を有していてもよい。

[0059] また、本発明に係るナノポア式生体高分子分析装置は、前記計測部で取得した計測値を分析するための外部装置（例えばコンピュータ）と接続してもよい。

[0060] 第１、第２及び第３の電極に対する電圧印加手段は、それらの電極間へ電圧を印加する電源部であってよい。電源部は、印加電圧を制御したり切り替えたりする制御部を有していてもよい。電圧印加手段は、複数の電源を含んでもよいし、単独の電源を有していてもよい。

[0061] 第３の電極に対する電圧印加手段は、多重に配置された複数の電極の間に電圧を印加する手段であってもよい。

[0062] 本発明のナノポア式生体高分子分析装置は、より一般的には、

基板で隔てられた試料導入区画と試料流出区画とを有するチャンバと、

前記基板に形成されている薄膜と、

前記基板の薄膜に設けられた、前記試料導入区画と前記試料流出区画とを連通するナノポアと、

前記基板の前記ナノポアの近傍に配置された電極と、

前記電極に対する電圧印加手段と、

を備え、

前記電圧印加手段により、ナノポアの近傍に電位差を生じさせることによ

り、ナノポアの近傍に試料、好ましくは生体高分子（特に、荷電した生体高分子）を収集することを特徴とする。

[0063] 本発明のナノポア式生体高分子分析装置は、典型的には、

基板で隔てられた試料導入区画と試料流出区画とを有するチャンバと、

前記試料導入区画に設けられた第１の電極及び前記試料流出区画に設けられた第２の電極と、

前記基板に形成されている薄膜と、

前記基板の薄膜に設けられた、前記試料導入区画と前記試料流出区画とを連通するナノポアと、

前記基板の前記ナノポアの近傍に配置された第３の電極と、

電圧印加手段と、

を備えたチャンバ部を有し、

前記電圧印加手段が、第１の電極と第３の電極の間、第１の電極と第２の電極の間、及び第３の電極と第２の電極の間にそれぞれ電圧を印加する手段を含むことを特徴とする。

[0064] 図１に、試料をナノポア開口部に収集するための第３の電極を配置したナノポア基板を備えた、本発明に係るナノポア式生体高分子分析装置の１つの実施形態を模式的に示す。

[0065] 図１中にはナノポア基板、及びナノポア基板を配置したチャンバ部の構成が示されている。図１に図示するように、チャンバ１０１は、ナノポア１０２を有する基板１０３（ナノポア基板）を隔てて２つの閉じられた空間、すなわち試料導入区画１０４と試料流出区画１０５で構成されている。但し、試料導入区画１０４と試料流出区画１０５はナノポア１０２で連通している。試料導入区画１０４及び試料流出区画１０５は、両区画にそれぞれ連結された流入路１０６、１０７を介して導入される液体１１０、１１１で満たされる。液体１１０、１１１は、試料導入区画１０４及び試料流出区画１０５に連結された流出路１０８、１０９から流出する。流入路１０６と１０７は基板を挟んで対向する位置に設けられてもよいが、これに限定されない。流

出路１０８と１０９は基板を挟んで対向する位置に設けられてもよいが、これに限定されない。

[0066] 液体１１０は分析対象となる試料１１３を含む、試料溶液であることが好ましい。液体１１０は、電荷の担い手となるイオンを好ましくは大量に含む（以下、イオン液体１１２）。液体１１０は、試料以外には、イオン液体１１２のみを含むことが好ましい。イオン液体１１２としては、電離度の高い電解質を溶解した水溶液が好ましく、塩類溶液、例えば塩化カリウム水溶液などを好適に使用できる。

[0067] 試料１１３は、イオン液体１１２中で電荷を有するものであることが好ましい。試料１１３は、典型的には生体高分子である。

[0068] 試料導入区画１０４と試料流出区画１０５には、ナノポア１０２を挟んで対向するように配置された電極１１４、１１５（それぞれ、第１の電極、及び第２の電極）が設けられる。さらに、ナノポア１０２の開口部の、液体１１０に接する側の近傍に、ナノポア１０２を囲むように電極１１６（第３の電極）が配置される。

[0069] 本実施形態において、チャンバー部は、電極１１４、１１５、１１６に対する電圧印加手段をも備える。電圧印加手段は、電極１１４と１１６、電極１１４と１１５、電極１１５と１１６の間に電圧を印加する電化印加手段である。

[0070] 電極１１４、１１５、１１６に電圧を印加する場合に生じる各電極の電位をそれぞれＶ１、Ｖ２、Ｖ３とすると、試料が負の電荷を持つ場合、Ｖ１＜Ｖ３となるように電圧を印加することにより、試料１１３は、試料導入区画１０４側のナノポア１０２の開口部近傍に引き寄せられて集まる。このとき、同時に、Ｖ３＜Ｖ２となるように電圧を印加すると、試料１１３はナノポア１０２を通過し、試料流出区画１０５の電極１１５の近傍に引き寄せられる。この場合、電極１１４と１１５の間の電流を電流計１１７で計測すると、試料１１３がナノポア１０２内に存在しない場合は、イオンのみが流れる電流が計測されるが、試料１１３が存在する場合は、試料１１３の体積分だ

け、ナノポア１０２内を通過できるイオンが制限されるため、流れる電流はイオンのみの状態から減少する。この減少量を試料１１３による封鎖電流として計測し、試料の分析を行うことができる。すなわち本発明の電化印加手段は、各電極の電位がＶ１（第１の電極）＜Ｖ３（第３の電極）＜Ｖ２（第２の電極）となるように同時に電圧を印加可能になるように構成されていることが好ましい。

[0071] 本実施形態のチャンバ部を有するナノポア式生体高分子分析装置を生体高分子の分析に用いる場合、試料１１３をできる限り速くナノポア開口部へ到達させるため、Ｖ１とＶ３の電位差は大きくすることが好ましい。Ｖ３とＶ２の電位差は、試料がナノポアを通過して電気信号を出力する速度に影響するので、電流検出系のサンプリング速度に応じた適切な値とすることが好ましい。例えば、Ｖ３とＶ２の電位差を小さくして試料をゆっくりナノポアに通し、試料１１３が存在する状態を複数回計測することで、平均化や統計処理で、精度の高い出力を得ることもできる。

[0072] 試料１１３が正の電荷を持つ場合は、負の電界を持つ場合とは逆方向に電圧を印加する。例えば、Ｖ１＞Ｖ３＞Ｖ２とする。

[0073] 別の態様として、試料１１３をナノポア１０２近傍に集める段階と、試料１１３をナノポア１０２に通過させる段階を分離して行ってもよい。その場合、試料１１３が負の電荷を持つ場合、試料１１３をナノポア１０２近傍に集める段階では、Ｖ１＜Ｖ３となるように電圧を印加する。このときにＶ２はどのような電位でもよいが、Ｖ３≧Ｖ２としてもよい。次に、試料１１３をナノポア１０２に通過させる段階では、Ｖ１≦Ｖ３＜Ｖ２となるように電圧を印加するか、あるいはＶ１＜Ｖ２で電圧印加して、Ｖ３は開放とすればよい。このように一旦試料１１３をナノポア１０２開口部近傍に集め、その後に、試料１１３をナノポア１０２を通過させることで、多くの試料を短時間で通過させることができる。すなわち本発明の電圧印加手段は、各電極の電位がＶ１（第１の電極）＜Ｖ３（第３の電極）と同時にＶ３（第３の電位）≧Ｖ２（第２の電位）となるように電圧を印加可能であり、かつその後に

Ｖ１≦Ｖ３＜Ｖ２となるように電圧を印加するか、あるいはＶ１＜Ｖ２で電圧印加して、Ｖ３は開放とするように変更することができるよう、第３の電極と第２の電極の間の電圧を可逆的に切替可能に構成されていることが好ましい。ここで「可逆的に」とは、例えば、Ｖ３≧Ｖ２となる電圧印加状態と、Ｖ３＜Ｖ２となる電圧印加状態又はＶ３開放状態とを相互に容易に切り替えられることを意味する。

[0074] この手法では、封鎖電流の検出開始のタイミングを制御できるので、試料がナノポアを通過している時間のみを検出することができ、効率的なデータ収集が可能となる。試料がナノポアを通過していない状態は、ベースラインの状態をモニタリングする場合を除いて、試料を分析する上では無駄なデータとなる。短時間に膨大なデータが生じる本計測法ではこのような無駄なデータ収集を回避し効率的にデータ収集できるため、重要な技術であるといえる。

[0075] 上記は、試料が正の電荷を持つ場合も実施可能であり、その場合、各電極間に、試料が負の電荷を持つ場合とは逆向きの電位差が生じるようにする。

[0076] 本発明に係るナノポア式生体高分子分析装置のチャンバ部を、第３の電極を有しないチャンバ部と比較して説明する。図２にはナノポア基板をその内部に配置しているがその基板に第３の電極を有しないチャンバ部の構成を示している。チャンバ２０１は、ナノポア２０２を有するナノポア基板２０３を隔てて２つの閉じられた空間２０４と２０５で構成され、流入路２０６、２０７と、流出路２０８、２０９、を介して導入される液体２１０、２１１で満たされている。液体２１０と２１１は電荷の担い手となる多量のイオン（以下、イオン液体）を含み、さらに、液体２１０と２１１のどちらか一方は、分析対象となる少量の試料２１２を含み、ナノポアの両側に配置された電極２１３、２１４で電圧をかけると、イオンと電荷を持った試料はナノポアを通って移動する。イオン液体は本発明と同様であり、例えば塩化カリウム水溶液などを用いる。試料２１２がナノポア２０２を通過する際、試料２１２とナノポア２０２の物理的、電気的、化学的相互作用を検出することで

、試料２１２の成分を分析する。例えば、負の電荷を有するＤＮＡなどの試料２１２を空間２０４に導入し、電極２１３と電極２１４に、電極２１４が高電位となるよう電圧を印加すると、試料２１２がナノポア２０２が通る際、試料２１２がナノポア２０２内に存在しない時より、存在する時の方が、イオンがナノポアを通過する量が減少するため、電極２１３と２１４間における電流値が低下する現象を検出する（封鎖電流方式）ことにより、試料を分析する。

[0077] しかしこの装置を用いる場合、試料２１２が低濃度の場合、試料２１２がナノポア２０２の開口部へ到達する頻度が小さくなるので、試料２１２がナノポア２０２を通過して信号を検出する頻度も小さくなり、計測のスループットが低下することが課題となる。電位差移動方式では、電位差を大きくすることで、到達頻度を大きくすることができるが、試料２１２がナノポア２０２を通過する速度も増加するので、信号を正確に取得することが困難となる。例えば、試料がＤＮＡやＲＮＡの場合、０．３～０．７ｎｍで隣接する各塩基を識別する必要があり、一般的に、１ＭのＫＣｌ水溶液において、１ｎＭの塩基１０００個がつらなる２本鎖ＤＮＡを用い、１００ｍＶの印加電圧の下で、直径５～１０ｎｍ、長さ２０ｎｍのナノポアを通過させると、頻度は、０．５～１回/秒であり、通過速度は、１ｍｓｅｃ以下であるので、１μｓｅｃ以下の高速サンプリングで１００ｐＡ程度の１塩基分の信号を取得しなければならない。

[0078] ナノポア通過頻度を増加させる方法としては、ＫＣｌ水溶液の濃度をナノポア２０２の両側の液体２１０と２１１で変え、濃度勾配をつくり、ナノポア開口部近傍の電位差を大きくする方法があるが、ＫＣｌ水溶液の飽和濃度は、２０℃で３．４ｍｏｌ／Ｌであり、濃度勾配を大きくすることも限界がある（M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Y. Grosberg, A. Meller, 2009, Nat.Nano, 379）。

[0079] 試料がナノポアを通過する頻度は変えず、計測のスループットを向上させるには、ナノポアの数を増やし、並列化することでも対応できるが、複数個

のナノポアを均一なサイズで製造することは困難であり、製造上のばらつきが検出信号のばらつきとなる可能性もあり、高精度の検出が難しい。

[0080] 試料が低濃度のＤＮＡの場合、Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ法（ＰＣＲ法）などにより増幅する方法もあるが、増幅エラーが生じたり、増幅困難な部位が存在するなど、精度に関する問題点や、Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅなどの酵素を利用するのでコスト高となる問題点から、ＰＣＲ法を用いない方が望ましい。

[0081] これに対し、本発明に係るナノポア式生体高分子分析装置では、チャンバ部の基板に第３の電極を配置して電極１１４（第１の電極）及び電極１１５（第２の電極）と第３の電極との間に電圧を印加することにより、試料（荷電した生体高分子）をナノポア開口部の近傍に収集し、且つナノポア通過頻度を容易に向上させることができる。

[0082] 図３－１は、本発明で用いる基板の一実施形態を示している。

[0083] 図３－１（ａ）は、基板３０１の平面図を示す。図３－１（ｂ）は図３－１（ｃ）のＡ－Ａ線断面図を示す。図３－１（ｃ）は図３－１（ａ）のI－I線断面図である。

[0084] 図３－１に示すように、チャンバ内に配置される基板３０１は、ベース（基材）３０２、薄膜３０３、電極３０４、絶縁層３０５で構成される。

[0085] 基板の薄膜には、ナノメートルサイズの細孔であるナノポア３０６が設けられている。ナノポア３０６は、基板を貫通している。

[0086] ナノポア３０６のサイズは、1nm～100nmが望ましい。ナノポアの作製は、集束イオンビームを用いた方法、電子線を用いた方法などの公知の方法により実施することができる（例えば、J.Li, D.Stein et al., 2001, Nature, 412, 166、A.J.Storm et al., 2003, Nat. Mater. 2, 537540参照）。

[0087] 限定するものではないが、材質の好適例に関しては、ベース３０２としてはケイ素、薄膜３０３としては窒化ケイ素、酸化ケイ素、又は炭化ケイ素、電極３０４はとしては、金、白金、タングステン、又はタンタル、絶縁層３０５としては窒化ケイ素、酸化ケイ素等を有利に利用できる。

[0088] 基板３０１は、その厚みが100μm～1,000μmであることが好ましい。ベース３０２は厚み100μm～1000μm、電極３０４は厚み1nm～100nm、絶縁層は厚み5nm～50nmであることが好ましい。薄膜の厚みは、第３の電極（試料収集用電極）や計測用電極の配置及び数によっても変化するが、図３－１のような構成の場合、薄膜の厚みが1nm～10nm、好ましくは、1nm～5nmであることが好ましい。

[0089] 電極３０４は、基板のナノポア３０６の近傍に配置されている。電極３０４は、例えば図３－１に示すような、ナノポア３０６を囲む部分と、そこから基板の外側端部へ向かって伸びる電圧を印加するためのリード線として機能しうる部分とから構成されるものであってよい。その場合、ナノポア３０６を囲む部分及びリード線として機能しうる部分は、それぞれ、直径10nm～1,000nm、幅10nm～1,000nmの形状である。

[0090] 電極３０４及びナノポアを有する基板の作製手順としては、限定するものではないが例えば、ベース３０２の上に、薄膜３０３を蒸着し、電極３０４を、パターンを用いた選択的エッチング又はリフトオフプロセスで加工し、絶縁層３０５を蒸着した後、ナノポア３０６の加工を行う方法が挙げられる。複数個のナノポアを形成する場合は、各ナノポアを取り囲む電極毎に異なるリード線を作成し、異なる電圧を印加することが可能である。

[0091] また図３－２には、基板の別の実施形態３０７を示している。

[0092] 図３－２（ａ）は、基板３０７の平面図を示す。図３－２（ｂ）は図３－２（ｃ）のＢ－Ｂ線断面図を示す。図３－２（ｃ）は図３－２（ａ）のII－II線断面図である。

[0093] 図３－２に示す実施形態では、図３－１に示す基板の構造とは電極（第３の電極）の形状が異なっており、電極３０８は基板の薄膜全面（ナノポアを除き）を覆うように形成されている。電極３０８の作製は、典型的には、基板全面に電極部材を蒸着することによって簡易に行うことができる。また、ナノポアを薄膜上に複数個形成する場合でも、電極３０８により、全ナノポアに対して一度に同じ電圧を印加することが可能である。

[0094] 図３－３には、基板の別の実施形態３０９を示している。

[0095] 図３－３（ａ）は、基板３０９の平面図を示す。図３－３（ｂ）は図３－３（ｃ）のＣ－Ｃ線断面図を示す。図３－３（ｃ）は図３－３（ａ）のIII－III線断面図である。

[0096] 図３－３に示す実施形態では、図３－１に示す基板の構造とは、絶縁層の形状の点で異なっており、ナノポア近傍において、電極３１０が空間３１１に露出するように、絶縁層３１２が形成されている。この場合、電極３１０により試料を引き付けることができる空間（電場）が拡大することにより、広範囲に試料を集めやすくなる。基板の作製方法としては、絶縁層３１２を、パターンを用いた選択的エッチングあるいはリフトオフプロセスで加工する必要がある。

[0097] また図３－４には、基板の別の実施形態３１３を示している。

[0098] 図３－４（ａ）は、基板３１３の平面図を示す。図３－４（ｂ）は図３－４（ｃ）のＤ－Ｄ線断面図を示す。図３－４（ｃ）は図３－４（ａ）のIV－IV線断面図である。

[0099] 図３－４に示す実施形態は、図３－２の実施形態３０７と図３－３の実施形態３０９を組み合わせた形状であり、電極３１４が薄膜全面に形成され、且つ電極３１４が空間３１５に露出するように、絶縁層３１６が形成されている。この実施形態は、図３－２の実施形態３０７と図３－３の実施形態３０９の利点を併せ持つ。

[0100] また図３－５には、基板の別の実施形態３１７を示している。

[0101] 図３－５（ａ）は、基板３１７の平面図を示す。図３－５（ｂ）は図３－５（ｃ）のＥ－Ｅ線断面図を示す。図３－５（ｃ）は図３－５（ａ）のV－V線断面図である。

[0102] 図３－５に示す実施形態では、ナノポア３１８は薄膜３１９にのみ形成され、ナノポア３１８を囲んで（すなわち、ナノポアの周囲に）電極３２０が配置される。この基板の作製手順としては、ベース３２１の上に膜３１９を蒸着し、膜３１９の上に、パターンを用いた選択的エッチングやリフトオフ

プロセスなどにより、電極３２０と絶縁層３２２を予め形成し、その後、薄膜３１９の部分に、電子線やイオンビームによりナノポア３１８を加工する。ナノポアを加工するには、ナノポア加工の対象となる膜の厚みが薄い方が有利であり、また絶縁層を蒸着した薄膜にナノポア加工をするよりも薄膜だけの加工では材料が混じりにくいため、薄膜３１９のみにナノポアを設ける本実施形態では容易な且つ高品質な加工が実現できる。

[0103] また図３－６には、基板の別の実施形態３２３を示している。

[0104] 図３－６（ａ）は、基板３２３の平面図を示す。図３－６（ｂ）は図３－６（ｃ）のＦ－Ｆ線断面図を示す。図３－６（ｃ）は図３－６（ａ）のVI－VI線断面図である。

[0105] 図３－６に示す実施形態では、図３－５の実施形態３１７に示す基板の構造とは、電極の形状の点で異なり、電極３２４は、ナノポア端部から後退した部分を除き、薄膜全面に形成されている。

[0106] また図３－７には、基板の別の実施形態３２５を示している。

[0107] 図３－７（ａ）は、基板３２５の平面図を示す。図３－７（ｂ）は図３－７（ｃ）のＧ－Ｇ線断面図を示す。図３－７（ｃ）は図３－７（ａ）のVII－VII線断面図である。

[0108] 図３－７に示す実施形態では、ナノポア３２６の周囲に電極３２７と３２８を多重（２重）に配置することで、試料をより広範囲から集めることが可能である。例えば、試料が負に帯電している場合、内側の電極３２７に印加する電位Ｖ３２７と、外側の電極３２８に印加する電位Ｖ３２８を、Ｖ３２７＞Ｖ３２８となるようにすることで、試料をナノポア３２６近傍に集めることができる。試料が正に帯電している場合は、逆向きの電圧を印加すればよい。電極を、３重、４重とすると、より広範囲から試料をナノポア近傍に集めることが可能となる。さらに、Ｖ１＜Ｖ３２８≦Ｖ３２７＜Ｖ２となるように電圧を印加することにより、ナノポア近傍に収集した試料を高効率にナノポア通過させることができる。

[0109] また図３－８には、基板の別の実施形態３２９を示している。

[0110] 図３－８（ａ）は、基板３２９の平面図を示す。図３－８（ｂ）は図３－８（ｃ）のＨ－Ｈ線断面図を示す。図３－８（ｃ）は図３－８（ａ）のVIII－VIII線断面図である。

[0111] 図３－８に示す実施形態は、図３－７の実施形態と同様にナノポアの周囲に電極を多重に囲む方法であるが、この図に示すように、さらに電極を多層化することができる。電極３３０と３３１は各層において（ナノポア端部から後退させた部分を除き）全面に電極部材を蒸着させた構造である。試料をナノポア近傍に集めるには、例えば、試料が負に帯電している場合、電極３３０に印加する電位Ｖ３３０と、電極３３１に印加する電位Ｖ３３１を、Ｖ３３０＞Ｖ３３１となるように印加する。試料が正に帯電している場合は、逆向きの電圧を印加すればよい。これにより、さらに強力に試料をナノポア近傍に集めることが可能となる。また多層化することで、電極へのリード線の配置がより容易になる。

[0112] 図３－１～３－８に示す実施形態では、基板は上部が薄膜、下部がベースとして記載されているが、チャンバに配置されるときは、薄膜とベースの上下の関係は逆であっても構わない。但し、第３の電極は、試料導入区画側に形成されることが好ましい。

[0113] 図３の実施形態に対応するナノポア式生体高分子分析装置は、１個又は複数個のナノメートルサイズの細孔が開いている薄膜と上記薄膜を隔てて２区画に分離される、試料導入側の第１のチャンバ及び試料流出側の第２のチャンバと、上記チャンバの２区画にそれぞれ送液を行う流出入路と、上記基板を隔てて電圧を印加するために設けられた、第１のチャンバに配置される第１の電極と、第２のチャンバに配置される第２の電極と、ナノポア近傍に配置された第3の電極と、電極へ電圧を印加する電源と、電極間の電気信号を増幅するアンプと、アンプのアナログ出力をデジタル出力に変換して記録するアナログデジタル変換機とデータロガーと、を有し、第3の電極の配置が、ナノポアの両開口の内、第１のチャンバ側の近傍であることを特徴とするものであってよい。

[0114] 図４には、本発明の別の実施形態を示す。

[0115] 図４（ａ）は本発明のチャンバ部を記載したナノポア計測システム４０１を示す。図４（ｂ）は図４（ａ）に示す基板を電極４０９においてナノポア４０４の軸方向に鉛直に切断したＪ－Ｊ線断面図を示す。

[0116] チャンバやナノポア基板の配置、使用する液体などは、図１の実施形態１０１と同じであるが、試料４０２を計測する方法として、図３の封鎖電流とは異なり、トンネル電流を用いる。そのため、ナノポア基板４０３には、ナノポア４０４を挟んで対向するトンネル電流計測用の電極４０５、４０６を配置することが好ましい。電極４０５と電極４０６の間に電圧を印加すると、チャンバ内のその電極間の位置に試料４０２が存在する場合にトンネル電流が流れ、トンネル電流の大きさから試料の成分を分析することができる。電極４０７、４０８、４０９は、試料４０２をナノポア４０４に通過させるのに寄与し、特に、電極４０９は、図１の実施形態１０１の電極１１６と同様に、試料４０２をナノポア４０４の近傍に集める機能を果たす。試料４０２をナノポア４０４近傍に集めることで、試料４０２が高頻度にナノポア４０４を通過するようになり、計測のスループットを向上させることができる。

[0117] 図４の実施形態に対応するナノポア式生体高分子分析装置は、１個又は複数個のナノメートルサイズの細孔が開いている薄膜と上記薄膜を隔てて２区画に分離される、試料導入側の第１のチャンバ及び試料流出側の第２のチャンバと、上記チャンバの２区画にそれぞれ送液を行う流出入路と、上記基板を隔てて電圧を印加するために設けられた、第１のチャンバに配置される第１の電極と、第２のチャンバに配置される第２の電極と、ナノポア近傍に配置された第3の電極と、第3の電極の近傍にありナノポアの軸方向に直行し、それぞれ対向して配置される第4と第5の電極と、電極へ電圧を印加する電源と、電極間の電気信号を増幅するアンプと、アンプのアナログ出力をデジタル出力に変換して記録するアナログデジタル変換機とデータロガーと、を有し、第3の電極の配置が、ナノポア開口の第１のチャンバ側近傍にあり、第4

、第5の電極が第２のチャンバ側近傍あるいは、ナノポアが形成されている薄膜内部にあることを特徴とするものであってよい。

[0118] 図５に本発明の別の実施形態を示す。

[0119] 図５（ａ）は本発明のチャンバ部を記載したナノポア計測システム５０１を示す。図５（ｂ）は図５（ａ）に示す基板を電極５０２、５０３においてナノポアの軸方向に鉛直に切断したＫ－Ｋ線断面図を示す。

[0120] この実施形態では、図４の実施形態の電極４０９が果たしていた試料を集める機能もトンネル電流計測用の電極である電極５０２と５０３が代替する。試料５０４の成分分析も、電極５０２と電極５０３の電極間に生じるトンネル電流により行う。試料５０４の移動は、電極５０５と電極５０６の間の電位差を利用して誘導する。例えば、試料が負の電荷を持つ場合、電極５０５、５０６、５０２、５０３に印加する電位をそれぞれ、Ｖ５０５、Ｖ５０６、Ｖ５０２、Ｖ５０３とすると、Ｖ５０５＜Ｖ５０２＜Ｖ５０３＜Ｖ５０６とすることで、電極５０５と電極５０２の間、及び、電極５０５と電極５０３の間で、電位差に依存した力が試料５０４に働き、試料５０４をナノポア５０７近傍に集めることができる。集まった試料５０４は、電極５０６に引き寄せられて、ナノポア５０７を通過し、その際に、電極５０２と電極５０３の間を通過する。このため、電極５０２と電極５０３の間に生じるトンネル電流の変化を検出することにより試料の成分を計測することができる。

[0121] 試料５０４をナノポア近傍に集める段階と、試料５０４の成分を検出する段階を分離して行ってもよい。試料５０４を集める段階では、Ｖ５０５＜Ｖ５０２≦Ｖ５０３、Ｖ５０６＜Ｖ５０２≦Ｖ５０３とし、試料を検出する段階では、Ｖ５０５＜Ｖ５０２＜Ｖ５０３＜Ｖ５０６とするように、電圧を印加すればよい。

[0122] 図５の実施形態に対応するナノポア式生体高分子分析装置は、例えば、１個又は複数個のナノメートルサイズの細孔が開いている薄膜と上記薄膜を隔てて２区画に分離される、試料導入側の第１のチャンバ及び試料流出側の第２のチャンバと、上記チャンバの２区画にそれぞれ送液を行う流出入路と、

上記基板を隔てて電圧を印加するために設けられた、第１のチャンバに配置される第１の電極と、第２のチャンバに配置される第２の電極と、ナノポア近傍に配置され、ナノポアの軸方向に直行し、それぞれ対向して配置される第３と第４の電極と、電極へ電圧を印加する電源と、電極間の電気信号を増幅するアンプと、アンプのアナログ出力をデジタル出力に変換して記録するアナログデジタル変換機とデータロガーと、を有し、第３と第４の電極が、ナノポア開口の第１のチャンバ側近傍にあることを特徴とするものであってよい。

[0123] 図６に本発明の別の実施形態を示す。

[0124] 図６（ａ）は本発明のチャンバ部を記載したナノポア計測システム６０１を示す。図６（ｂ）は図６（ａ）に示す基板を電極６０５においてナノポア６０２の軸方向に鉛直に切断したＬ－Ｌ線断面図を示す。

[0125] この実施形態では、図４の実施形態においてナノポア４０４を挟んで対向する位置に配置したトンネル電流計測用の電極４０５、４０６に代えて、ナノポア６０２の軸方向に沿って並列に計測用の電極６０３、６０４が配置される。電極６０５は、図４の実施形態の電極４０９と同様に、ナノポア６０２近傍に試料６０６を集める役割を果たす。計測用の電極６０３と６０４は、互いに非常に近接して配置することが好ましい。例えば、電極６０３と６０４の間隔は、好ましくは0.3nm～20nmであり、より好ましくは5nm以下、さらに好ましくは2nm以下である。電極６０３と６０４の間を絶縁層が隔てていることも好ましい。また試料収集用電極である電極６０５と計測用の電極６０３との間隔は、電極６０３と６０４の間隔よりも大きいことが好ましい。電極６０５と計測用の電極６０３との間隔は、例えば10nm以上、より好ましくは20nm以上、さらに好ましくは30nm以上である。

[0126] 電極６０３と電極６０４の間に電圧を印加すると、試料６０６がナノポア６０２を通過する際に、試料の成分に応じたトンネル電流が流れる。試料の移動は、電極６０７、６０８、６０５の電位差を利用して誘導される。例えば、試料６０６が負に帯電している場合、各電極６０７、６０８、６０５に

印加される電位をＶ６０７、Ｖ６０８、Ｖ６０５とすると、Ｖ６０７＜Ｖ６０５＜Ｖ６０８となるように電圧を印加することで、試料６０６についてナノポア６０２を通過させることができる。Ｖ６０７とＶ６０５の電位差を大きくとることで、試料６０６がより多くナノポア６０２近傍に集まり、試料６０６がナノポア６０２を通過する頻度が増え、計測のスループットを向上させることができる。

[0127] 図６の実施形態に対応するナノポア式生体高分子分析装置は、例えば、１個又は複数個のナノメートルサイズの細孔が開いている薄膜と上記薄膜を隔てて２区画に分離される、試料導入側の第１のチャンバ及び試料流出側の第２のチャンバと、上記チャンバの２区画にそれぞれ送液を行う流出入路と、上記基板を隔てて電圧を印加するために設けられた、第１のチャンバに配置される第１の電極と、第２のチャンバに配置される第２の電極と、ナノポア近傍に配置された第3、第4、第5の電極と、電極へ電圧を印加する電源と、電極間の電気信号を増幅するアンプと、アンプのアナログ出力をデジタル出力に変換して記録するアナログデジタル変換機とデータロガーと、を有し、第3の電極の配置が、ナノポア開口の第１のチャンバ側近傍にあり、第4、第5の電極が第２のチャンバ側近傍あるいは、ナノポアが形成されている薄膜内部にあり、それぞれの電極は、ナノポア軸方向に垂直であり、且つ、電極同士がそれぞれ平行に配置されることを特徴とするものであってもよい。

[0128] 図７に本発明の別の実施形態を示す。

[0129] 図７（ａ）は本発明のチャンバ部を記載したナノポア計測システム７０１を示す。図７（ｂ）は図７（ａ）に示す基板を電極７０２においてナノポアの軸方向に鉛直に切断したＭ－Ｍ線断面図を示す。

[0130] この実施形態では、図６の実施形態の電極６０５が果たしていた試料を集める機能も、トンネル電流計測用の電極である電極７０２が代替する。試料７０３の成分分析も、電極７０２と電極７０４の電極間に生じるトンネル電流を利用して行う。例えば、試料７０３が負に帯電している場合、電極７０２、７０４、７０５、７０６に印加される電圧を、それぞれ、Ｖ７０２、Ｖ

７０４、Ｖ７０５、Ｖ７０６とすると、Ｖ７０５＜Ｖ７０２＜Ｖ７０４＜Ｖ７０６となるように電圧を印加することで、電極７０５と電極７０２の間で試料を集め、電極７０２と電極７０４の間に生じるトンネル電流により試料の成分を計測することができる。

[0131] 試料７０３を集める段階と、試料７０３を検出する段階を分離してもよい。試料７０３を集める段階では、Ｖ７０５＜Ｖ７０２、Ｖ７０６≦Ｖ７０４≦Ｖ７０２とし、試料を検出する段階では、Ｖ７０５＜Ｖ７０２＜Ｖ７０４＜Ｖ７０６とするように電圧を印加すればよい。

[0132] 図７の実施形態に対応するナノポア式生体高分子分析装置は、例えば、１個又は複数個のナノメートルサイズの細孔が開いている薄膜と上記薄膜を隔てて２区画に分離される、試料導入側の第１のチャンバ及び試料流出側の第２のチャンバと、上記チャンバの２区画にそれぞれ送液を行う流出入路と、上記基板を隔てて電圧を印加するために設けられた、第１のチャンバに配置される第１の電極と、第２のチャンバに配置される第２の電極と、ナノポア近傍に配置された第3、第4の電極と、電極へ電圧を印加する電源と、電極間の電気信号を増幅するアンプと、アンプのアナログ出力をデジタル出力に変換して記録するアナログデジタル変換機とデータロガーと、を有し、第3の電極の配置が、ナノポア開口の第１のチャンバ側近傍にあり、第4の電極が第２のチャンバ側近傍又はナノポアが形成されている薄膜内部に配置され、それぞれの電極は、ナノポア軸方向に垂直であり、且つ、電極同士がそれぞれ平行に配置され、第３の電極と第４の電極の間隔が5nm以下、例えば2nm以下であることを特徴とするものであってもよい。

[0133] 図４～７には、試料の成分をトンネル電流で検出する計測法を示したが、検出する方法は他の方法でもよい。

[0134] 図８には、キャパシタンス計測により試料の成分を分析する場合のチャンバ、ナノポア、電極の構成を示した、本発明の別の実施形態を示す。

[0135] 図８（ａ）は本発明のチャンバ部を記載したナノポア計測システム８０１を示す。図８（ｂ）は図８（ａ）に示す基板を電極８０２においてナノポア

の軸方向に鉛直に切断したＮ－Ｎ線断面図を示す。

[0136] この実施形態では、電極８０２、８０４及び８０５はナノポア８０３の軸方向に沿って並列に配置され、電極８０２はナノポア８０３に面してナノポアの近傍に配置されている。電極８０４と電極８０５は、薄膜内部の、電極８０２に近い方のナノポア８０３の開口部よりも内側に入った位置、すなわち電極８０２よりも前記試料流出区画側の位置に配置されている。

[0137] 計測用の電極８０４と電極８０５との間隔は、図６の実施形態と同様であり、互いに非常に近接して配置することが好ましい。例えば、電極８０４と８０５の間隔は、好ましくは0.3nm～20nmであり、より好ましくは5nm以下、さらに好ましくは2nm以下である。電極８０４と８０５の間を絶縁層が隔てていることも好ましい。また試料収集用電極である電極８０２と計測用の電極８０４との間隔は、図６の実施形態と同様であり、電極８０４と８０５の間隔よりも大きいことが好ましい。

[0138] 本実施形態では、試料８０６がナノポア８０３を通過する際の、電極８０４と電極８０５間の電圧を計測することで、キャパシタンスを計測し、試料の成分を分析することができる。電極８０２は、試料８０６をナノポア８０３近傍に集める機能を果たす。各電極８０２、８０７、８０８に印加される電位をＶ８０２、Ｖ８０７、Ｖ８０８とすると、試料が負に帯電している場合、Ｖ８０７＜Ｖ８０２＜Ｖ８０８となるように電圧を印加することで、試料８０６をナノポア８０３に効率よく通過させることができる。

[0139] 図９には、キャパシタンス計測を用いる本発明の別の実施形態を示す。

[0140] 図９（ａ）は本発明のチャンバ部を記載したナノポア計測システム９０１を示す。図９（ｂ）は図９（ａ）に示す基板を電極９０２においてナノポアの軸方向に鉛直に切断したＯ－Ｏ線断面図を示す。

[0141] この実施形態では、図８の実施形態の電極８０２が果たしていた試料を集める機能もキャパシタンス計測用の電極である電極９０２が代替する。試料９０３の成分分析も、電極９０２と電極９０４の電極間のキャパシタンスを計測することで行うことができる。例えば、試料９０３が負に帯電している

場合、電極９０２、９０４、９０５、９０６に印加される電圧を、それぞれ、Ｖ９０２、Ｖ９０５、Ｖ９０６とすると、Ｖ９０５＜Ｖ９０２＜Ｖ９０６となるように電圧を印加することで、電極９０５と電極９０２の間で試料を集めることができる。そして電極９０２と電極９０４の間のキャパシタンスを測定することで、試料９０３の成分を分析することができる。

[0142] 試料９０３を集める段階と、試料９０３を検出する段階を分離して行ってもよい。試料９０３を集める段階では、Ｖ９０５＜Ｖ９０２、Ｖ９０６≦Ｖ９０２とし、試料を検出する段階では、Ｖ９０５＜Ｖ９０２＜Ｖ９０６ととするように電圧を印加すればよい。

[0143] 図１０には、本発明における、チャンバへ試料を導入する実施形態の一例を示す。具体的には本発明のチャンバ部、試料容器及び流路を記載したナノポア計測システム１００１を示す。

[0144] この実施形態では、試料容器１００２に試料１００３が存在し、その試料１００３を吸引してチャンバ１００４に送り込み、更に、ナノポア１００５の開口部の近傍へ集めることができる。試料容器１００２とチャンバ１００４を結ぶ流路１００６の試料容器側の、流路自体、又は流路の近傍に電極１００７を配置してもよい。この電極１００７とナノポア１００５の開口部に配置された電極１００８との間に電圧を印加し、電気泳動により、試料１００３を試料容器１００２からナノポア１００５の開口部まで移動させる。流路１００６は、試料１００３の電荷の状態に応じて、電気浸透流を防いだり、促進させたりするためのコーティングを施してもよい。

[0145] 試料１００３の検出部１００９は、電極１００８よりナノポア１００５開口部から離れた領域に配置される。検出方式としては、例えば、前出の、封鎖電流方式、トンネル電流方式、キャパシタンス方式、あるいは、ナノポアと試料のインタラクションにより生じる物理的、電気的、化学的変化を検出する方式が挙げられる。また、検出部１００９に電極を用いる場合、電極１００８が有する試料１００３を移動させる機能を、検出部１００９の電極で代替してもよい。その場合、検出部１００９は、ナノポア１００５の試料１

００３が導入される開口部付近に配置することができる。例えば、封鎖電流方式で検出する場合、電極１０１０と電極１０１１の間に電圧を印加し、試料１００３がナノポア１００５を通過する際の電流値の変化を計測する。電極１００７は、試料１００３を試料容器１００２からチャンバ１００４に移動させると共に、ナノポア１００５の近傍へ試料１００３を収集する機能をも果たす。

[0146] 図１１－１には、本発明の別の実施形態として、バイオロジカルナノポアの近傍に試料収集用電極を有するナノポア基板を備えた分析用チャンバ部を記載したナノポア計測システム１１０１を示す。

[0147] この実施形態では、αーヘモーリシン等からなるバイオロジカルナノポア１１０２が脂質２重膜１１０３に配置され、脂質２重膜１１０３は、樹脂製又はケイ素化合物等の材料から構成されうる固体膜１１０４にあけられた穴１１０５に配置することができる。固体膜１１０４の上に、穴１１０５を取り囲むように配置された電極１１０６に電圧を印加することで、試料１１０７がナノポア１１０２の開口部に集まることを促す。

[0148] 検出は例えば図１１－１のように封鎖電流方式を用いることができ、電極１１０８と電極１１０９に電圧を印加し、試料１１０７がバイオロジカルナノポア１１０２を通過する際の電極１１０８と電極１１０９の間を流れる電流値の変化を計測すればよい。各電極１１０６、１１０８、１１０９に印加される電圧をＶ１１０６、Ｖ１１０８、Ｖ１１０９とすると、試料１１０７が負に帯電している場合、Ｖ１１０８＜Ｖ１１０６＜Ｖ１１０９となるように電圧を印加することにより、電極１１０８と電極１１０６の間で試料を集めることができる。さらに電極１１０８と電極１１０９に生じる封鎖電流を測定して試料１１０７の成分を分析すればよい。

[0149] 試料１１０７を集める段階と、試料１１０７を検出する段階を分離して行ってもよい。試料１１０７を集める段階では、Ｖ１１０８＜Ｖ１１０６、Ｖ１１０９≦Ｖ１１０６とし、試料１１０７を検出する段階では、Ｖ１１０８＜Ｖ１１０６＜Ｖ１１０９とすることにより、効率的に試料をナノポア通過

させることができる。

[0150] 図１１－２には、本発明の別の実施形態として、バイオロジカルナノポアを直接的に固体膜（薄膜）の穴に配置し、且つナノポアの近傍に試料収集用電極を有するナノポア基板を備えた分析用チャンバ部を記載したナノポア計測システム１１０１´を示す。図１１－２に示すように、脂質２重膜を用いず、直接、バイオロジカルナノポア１１０２´を固体膜１１０４´上の穴１１０５´に配置したものを使用してもよい。バイオロジカルナノポアの製造は、例えば、A.R. Hall; A. Scott; D. Rotem; K.l Mehta; H. Bayley; C. Dekker: Nat. Nano. 5, 874 (2010)に記載されたようにして行うことができる。

[0151] 図１２には、試料収集用電極を有するナノポアが複数個配置された分析用チャンバ部を用いる本発明の別の実施形態１２０１を示す。配置された電極１２０４、１２０４´により、各ナノポア１２０２、１２０２´近傍へ試料１２０３、１２０３´を集めることができる。この場合、各電極１２０４、１２０４´に印加される電位を別々に変えることで、各ナノポア１２０２、１２０２´を試料１２０３、１２０３´が通過する頻度をそれぞれ変えることができる。

[0152] 試料１２０３、１２０３´に対する検出部１２０５、１２０５´は、試料１２０３、１２０３´が導入されるナノポア１２０２、１２０２´の開口部や、電極１２０４、１２０４´よりも離れた位置、すなわち電極１２０４、１２０４´よりも試料流出区画側に配置することが好ましい。

[0153] 使用する試料の検出方式としては、例えば、封鎖電流方式、トンネル電流方式、キャパシタンス方式であってもよいし、あるいはナノポアと試料のインタラクションにより生じる物理的、電気的、化学的変化を検出する方式にて、試料の成分を検出してもよい。試料１２０３、１２０３´をナノポア１２０２、１２０２´に通すには、電極１２０６、１２０６´、１２０７、１２０７´に電圧を印加することで行う。電極１２０４と１２０４´は同電位でもよく、また、一体化されていてもよい。その場合、各１２０２、１２０

２´の近傍へ、同じ程度に試料１２０３、１２０３´を集めることができる。

[0154] 図１２は検出部１２０５、１２０５´が封鎖電流方式の場合を示しているが、トンネル電流方式やキャパシタンス方式の場合、電極１２０６、１２０６´、１２０７、１２０７´は試料１２０３、１２０３´を移動させることのみに用いられ、検出には寄与しない。したがって、電極１２０６と電極１２０６´は同電位でもよく、また、一体化されていてもよく、同様に、電極１２０７と電極１２０７´は同電位でもよく、また、一体化されていてもよい。

[0155] 図１２に示すように、本発明のナノポア式生体高分子分析装置は、複数の上記チャンバ図を有するものであってよい。チャンバ部は、２個以上、例えば２～１０個であってよい。複数のチャンバ部は、場合によりチャンバ内部で連通するように接続されていてもよい。

[0156] 複数の電極・流路、複数のチャンバ部、複数のナノポア、複数の電極とは、各要素が１次元あるいは２次元的に複数配置された構造を示す。図示では、各要素が２個表示されているが、本実施例での各要素が２個に限定されるものではなく、ナノポア式生体高分子分析装置は個々の要素を３個、４個又はそれ以上含んでもよい。

[0157] 以下では、ナノポア式生体高分子分析装置を用いた生体高分子分析方法について記載する。上記のような本発明に係るナノポア式生体高分子分析装置を用いれば、試料溶液中の試料、特に生体高分子を、高効率にナノポア近傍に収集し、高頻度でナノポアを通過させることができる。この結果、生体高分子の分析効率を大幅に増加させることができ、分析に要する時間を短縮することができる。

[0158] 具体的には、まず、ナノポア式生体高分子分析装置の試料導入区画に、生体高分子を含む試料溶液を導入する。ここで生体高分子は、ポリマー性の任意の生体分子であってよい。生体高分子は、天然由来のものであってよいが、合成したものであってもよく、また天然には存在しない誘導体等であって

もよい。生体高分子は、具体的には例えば、核酸、例えば一本鎖DNA（ssDNA）及び二本鎖DNA（dsDNA）、一本鎖RNA（ssRNA）及び二本鎖RNA（dsRNA）、DNAとRNAとからなるハイブリッド核酸など；ペプチド核酸；タンパク質、ポリペプチド（１００マー以下などのペプチドも含む）、例えばD-又はL-アミノ酸からなるタンパク質やポリペプチド等；及び糖鎖、例えば多糖、糖タンパク質の糖鎖等でありうるが、これらに限定されない。

[0159] 生体高分子を含む試料溶液の濃度は、特に限定されないが、低濃度であっても良好な分析が可能である。例えば試料溶液の濃度は、0.1nM以上であればよく、0.001nm以上であればよく、0.01nM～1000nM、好ましくは0.01nM～1nMが好ましい。

[0160] 試料導入区画に生体高分子を含む試料溶液を収容し、電圧印加手段を用いてナノポアの開口部の近傍において電位差を生じさせることにより、帯電した生体高分子をナノポアの開口部の近傍に引き寄せ、収集することができる。続いて、試料導入区画と試料流出区画との間に電位差を生じさせることにより、ナノポア開口部付近に集まった生体高分子を、ナノポア内に誘導し、ナノポアを通過させ、試料流出区画へと引き寄せることができる。

[0161] 電圧印加手段を用いてナノポアの開口部の近傍において電位差を生じさせるには、上記の各実施形態で記載したようにして各電極間への電圧印加を行えばよい。

[0162] 例を挙げて説明すると、例えば図１の実施形態の場合には、試料導入区画に生体高分子を含む試料溶液を収容し、前記第３の電極と第１の電極の間に電圧を印加することにより帯電した生体高分子を収集し、ナノポアを通過させることができる。

[0163] この際、第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも高く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも低くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加することにより、負に帯電した生体高分子を収集してもよい。

[0164] あるいは、第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも高く、且つ第２

の電極の電位と同じか又はそれよりも高くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加し、その後第３の電極の電位が第２の電極の電位よりも低くなるように電圧を変更することにより、負に帯電した生体高分子を収集し、ナノポア通過を促進することができる。このとき、電圧の変更は、上述のとおり、可逆的な切替手段によって行うことが好ましい。可逆的な切替手段とは、例えば制御装置である。

[0165] また、第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも低く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも高くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加することにより、正に帯電した生体高分子を収集してもよい。

[0166] あるいは、第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも低く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも低くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加し、その後第３の電極の電位が第２の電極の電位よりも高くなるように電圧を変更することにより、正に帯電した生体高分子を収集し、ナノポア通過を促進することができる。

[0167] さらに、ナノポア通過中の生体高分子を、ナノポア式生体高分子分析装置の計測部により計測することができる。この計測には、従来公知のナノポア方式の計測方法を用いればよい。例えば、封鎖電流方式、トンネル電流方式、キャパシタンス方式等の検出法を用いることができる。あるいは、生体高分子に外部光を照射して発生させたラマン散乱光のスペクトルに基づく検出を行ってもよい。

[0168] 本発明の方法を用いれば、生体高分子を検出することができるだけでなく、定量することもでき、さらに生体高分子を構成する各モノマーの配列や組成を分析し、配列解析等を行うこともできる。本発明の方法及び分析装置は、これまで分析が困難であった比較的大きいサイズの生体高分子の分析に適している。本発明の方法及び分析装置は、例えばＤＮＡであれば、勿論lkb未満の短いものも良好に分析できるが、好ましくは1kb以上、さらに好ましくは3kb以上、特に好ましくは4kb以上、例えば1～5kbの長さのものを、ナノポアを通過させて分析するのに特に好適である。本発明の方法はまた、試料溶液

中の低濃度の生体高分子を分析するのに好適である。

[0169] 本発明は上述の実施形態に限定されるものではなく、特許請求の範囲に記載された発明の範囲にて様々な変更が可能であることは当業者に容易に理解されよう。

[0170] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

符号の説明

[0171] 101…チャンバ、102…ナノポア、103…ナノポア基板、104…空間（試料導入区画）、105…空間（試料流出区画）、106…流入路、107…流入路、108…流出路、109…流出路、110…液体、111…液体、112…イオン液体、113…試料、114…電極、115…電極、116…電極、117…電流計、201…チャンバ、202…ナノポア、203…ナノポア基板、204…空間（試料導入区画）、205…空間（試料流出区画）、206…流入路、207…流入路、208…流出路、209…流出路、210…液体、211…液体、212…試料、213…電極、214…電極、215…電流計、301…基板、302…ベース、303…膜、304…電極、305…絶縁層、306…ナノポア、307…基板、308…電極、309…基板、310…電極、311…空間、312…絶縁層、313…基板、314…電極、315…空間、316…絶縁層、317…基板、318…ナノポア、319…膜、320…電極、321…ベース、322…絶縁層、323…基板、324…電極、325…基板、326…ナノポア、327…電極、328…電極、329…基板、330…電極、331…電極、401…ナノポア計測システム、402…試料、403…ナノポア基板、404…ナノポア、405…トンネル電流計測用電極、406…トンネル電流計測用電極、407…電極、408…電極、409…電極、501…ナノポア計測システム、502…電極、503…電極、504…試料、505…電極、506…電極、507…ナノポア、601…ナノポア計測システム、602…ナノポア、603…トンネル電流計測用電極、604…トンネル電流計測用電極、605…電極、606…試料、607…電極、608…電極、701…ナノポア計測システム、702…電極、703…試料、704…電極、705…電極、801…ナノポア計測システム、802…電極、803…ナノポア、804…電極、805…電極、806…試料、807…電極、808…電極、901…ナノポア計測システ

ム、902…電極、903…試料、904…電極、905…電極、906…電極、1001…ナノポア計測システム、1002…試料容器、1003…試料、1004…チャンバ、1005…ナノポア、1006…流路、1007…電極、1008…電極、1009…検出部、1010…電極、1011…電極、1101…ナノポア計測システム、1102…バイオロジカルナノポア、1103…脂質２重膜、1104…固体膜、1105…穴、1106…電極、1107…試料、1108…電極、1109…電極、1201…ナノポア計測システム、1202…ナノポア、1202´…ナノポア、1203…試料、1203´…試料、1204…電極、1204´…電極、1205…検出部、1205´…検出部、1206…電極、1206´…電極、1207…電極、1207´…電極

請求の範囲

[請求項1] ナノポア式生体高分子分析装置であって、

基板で隔てられた試料導入区画と試料流出区画とを有するチャンバと、

前記試料導入区画に設けられた第１の電極及び前記試料流出区画に設けられた第２の電極と、

前記基板に形成されている薄膜と、

前記基板の薄膜に設けられた、前記試料導入区画と前記試料流出区画とを連通するナノポアと、

前記基板の前記ナノポアの近傍に配置された第３の電極と、

電圧印加手段と、

を備えたチャンバ部を有し、

前記電圧印加手段が、第１の電極と第３の電極の間、第１の電極と第２の電極の間、及び第３の電極と第２の電極の間に電圧を印加する手段を含むことを特徴とする、ナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項2] 前記基板が、前記ナノポアに面して配置された計測用電極をさらに備える、請求項１に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項3] 前記ナノポアが、最小直径部で直径1～100nmを有する、請求項１に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項4] 前記電圧印加手段が、第３の電極と第２の電極の間の電圧を可逆的に切替可能に構成されていることを特徴とする、請求項１に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項5] 少なくとも一組の前記計測用電極が、前記ナノポアを挟んで互いに対向して配置されている、請求項２に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項6] 前記ナノポアを挟んで第３の電極に対向して配置された前記計測用電極を備える、請求項２に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項7] 少なくとも一組の前記計測用電極が、前記ナノポアの軸方向に沿っ

て並列に配置され、且つ第３の電極よりも前記試料流出区画側の位置に設けられている、請求項２に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項8] 第３の電極と前記計測用電極とが前記ナノポアの軸方向に沿って並列に配置され、前記計測用電極は第３の電極よりも前記試料流出区画側の位置に設けられている、請求項２に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項9] 第３の電極が、前記試料導入区画側のナノポア開口部の近傍に配置されている、請求項１に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項10] 前記計測用電極が、ナノポア開口部の近傍又は薄膜内部に配置されている、請求項２に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項11] 第３の電極が、ナノポア開口部を除く薄膜全面を覆っている、請求項１に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項12] 第３の電極が、ナノポア開口部の周囲に配置されているか、又はナノポアを挟んで対向する位置に配置されている、請求項１に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項13] 第３の電極が、多重に及び／又は多層に配置された２つ以上の電極を含む、請求項１に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項14] 前記チャンバ部を複数備える、請求項１に記載のナノポア式生体高分子分析装置。

[請求項15] 請求項１に記載のナノポア式生体高分子分析装置の前記試料導入区画に、生体高分子を含む試料溶液を導入し、前記第３の電極と第１の電極の間に電圧を印加することにより帯電した生体高分子を収集し、ナノポアを通過させて、ナノポアを通過中の生体高分子を計測することを含むことを特徴とする、生体高分子の分析方法。

[請求項16] 前記第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも高く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも低くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加することにより、負に帯電した生体高分子を

収集することを特徴とする、請求項１５に記載の分析方法。

[請求項17] 前記第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも高く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも高くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加し、その後第３の電極の電位が第２の電極の電位よりも低くなるように電圧を変更することにより、負に帯電した生体高分子を収集し、ナノポア通過を促進する、請求項１５に記載の方法。

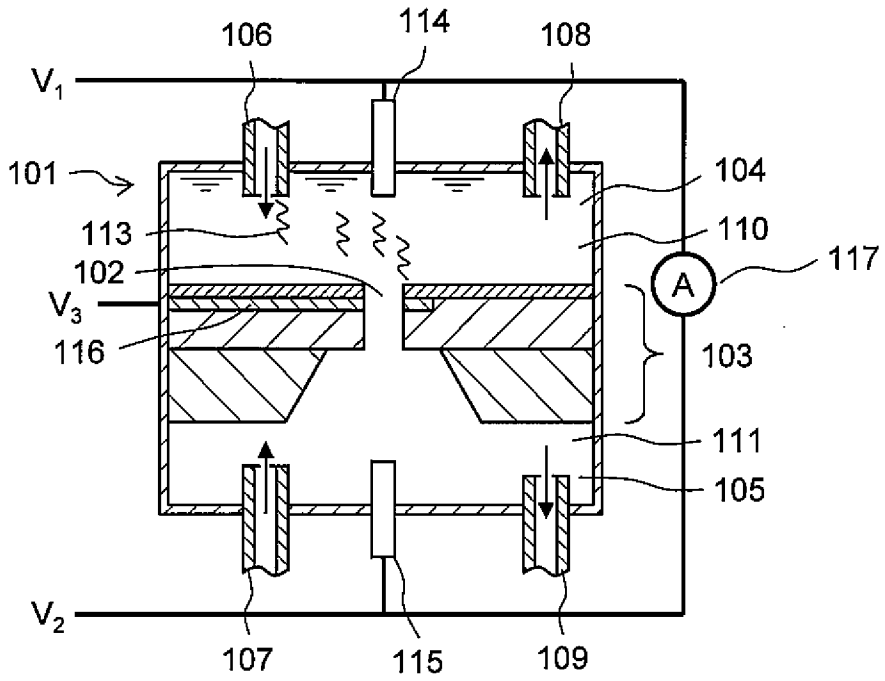
[請求項18] 前記第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも低く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも高くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加することにより、正に帯電した生体高分子を収集することを特徴とする、請求項１５に記載の分析方法。

[請求項19] 前記第３の電極の電位が、第１の電極の電位よりも低く、且つ第２の電極の電位と同じか又はそれよりも低くなるように第１、第２及び第３の電極に電圧を印加し、その後第３の電極の電位が第２の電極の電位よりも高くなるように電圧を変更することにより、正に帯電した生体高分子を収集し、ナノポア通過を促進する、請求項１５に記載の分析方法。

[請求項20] 前記生体高分子が、核酸、ペプチド核酸、タンパク質、ポリペプチド、及び糖鎖からなる群より選択される、請求項１５に記載の分析方法。

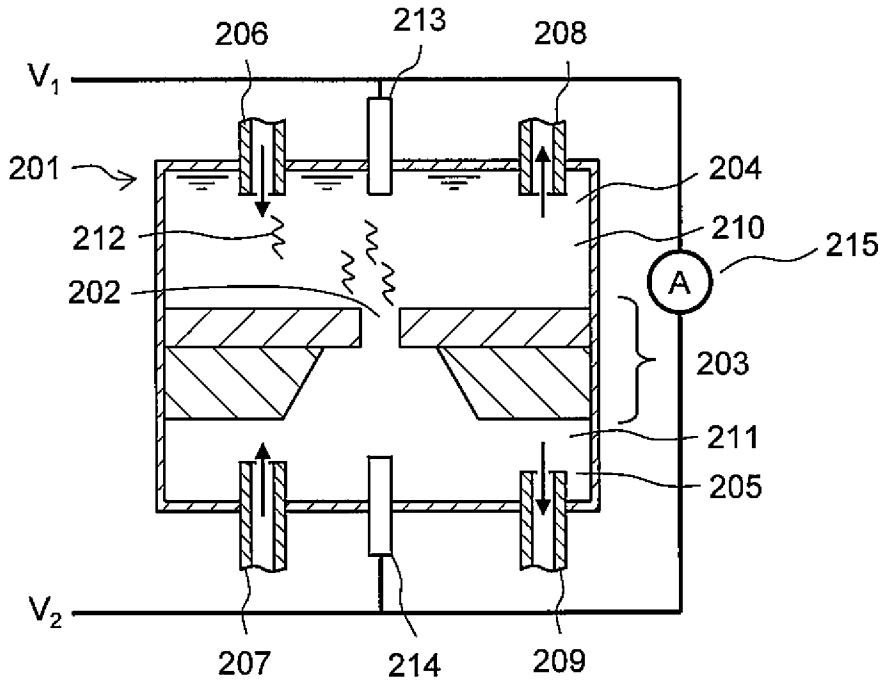
[図1]

図 1


106
114
108
V1
101
104
113
110
117
102
A
V3
116
103
111
105
V2
107
115
109

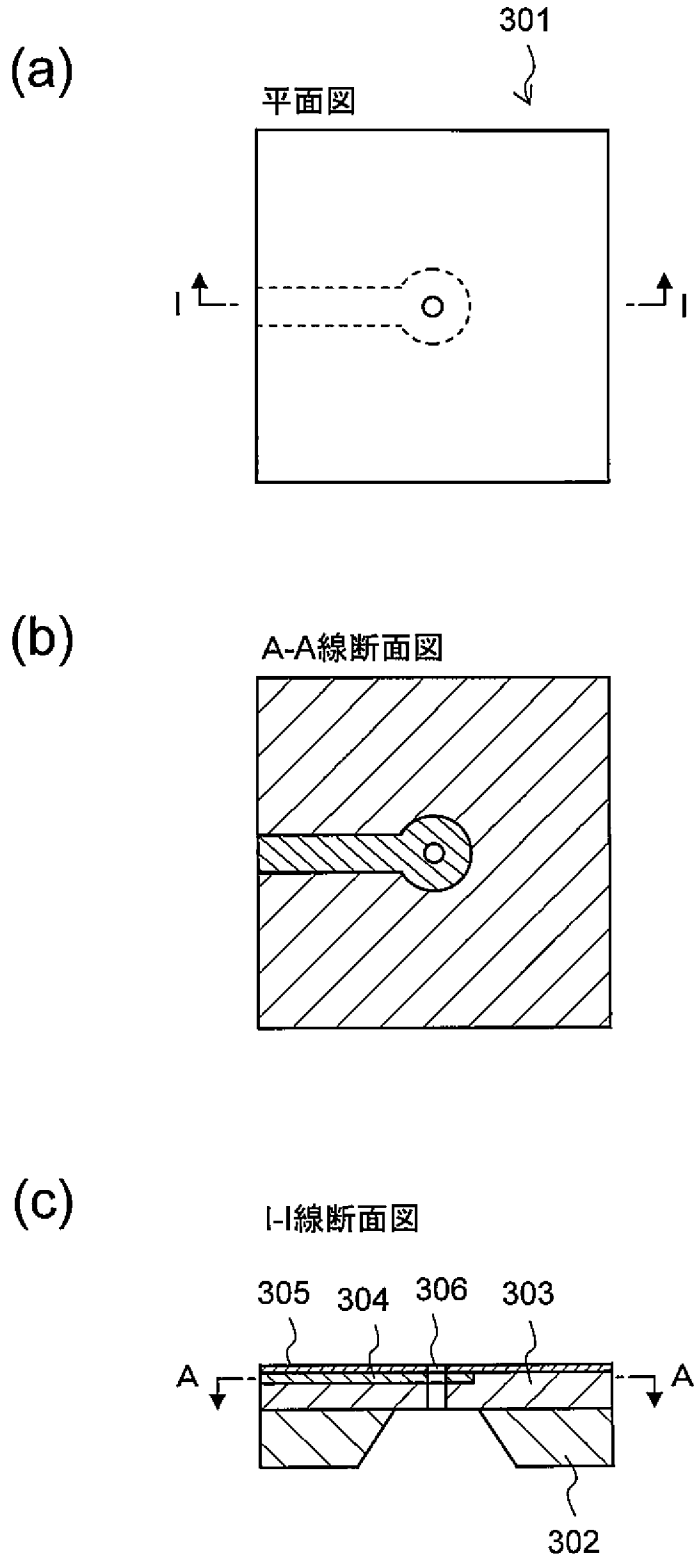
[図2]

図 2


206
213
208
V1
201
204
212
210
215
202
A
203
211
205
V2
207
214
209

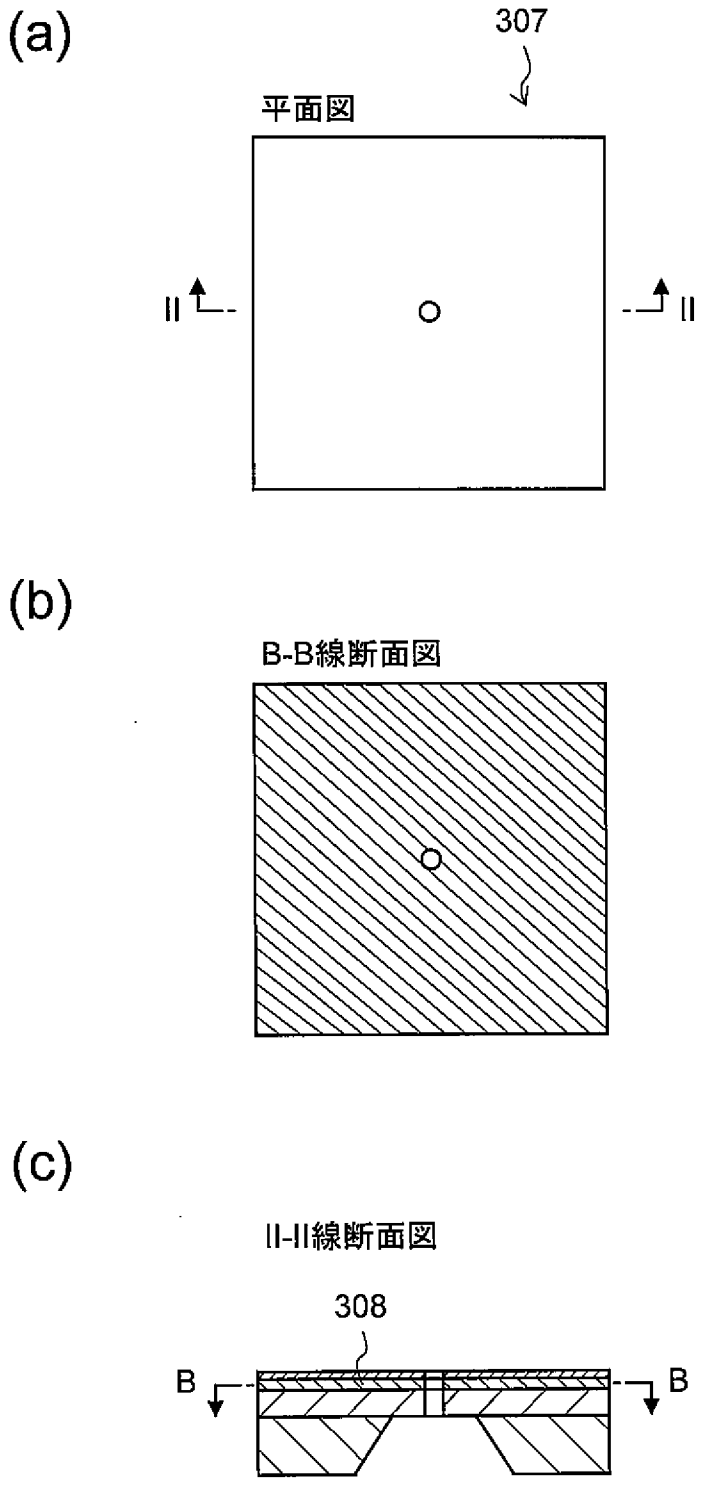
[図3-1]

図３－１



[図3-2]

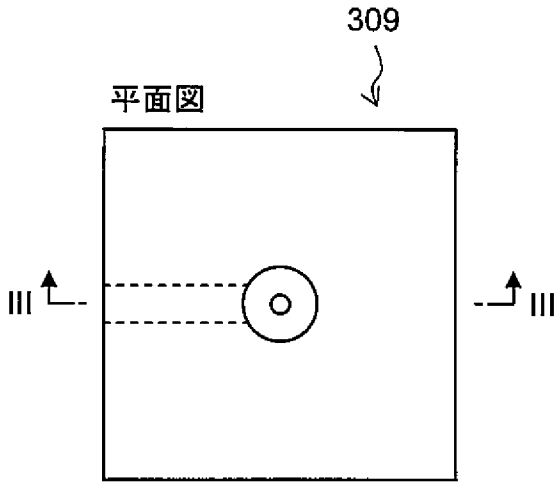
図３－２



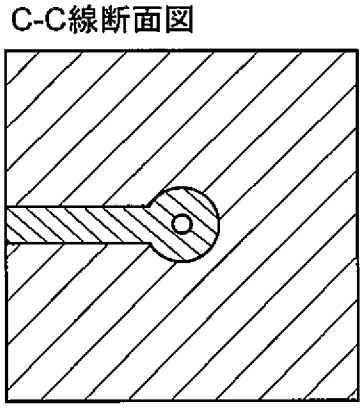
[図3-3]

図３－３

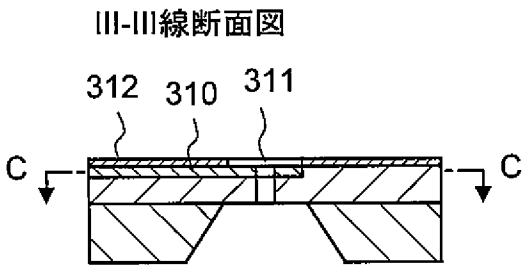
(a)



(b)

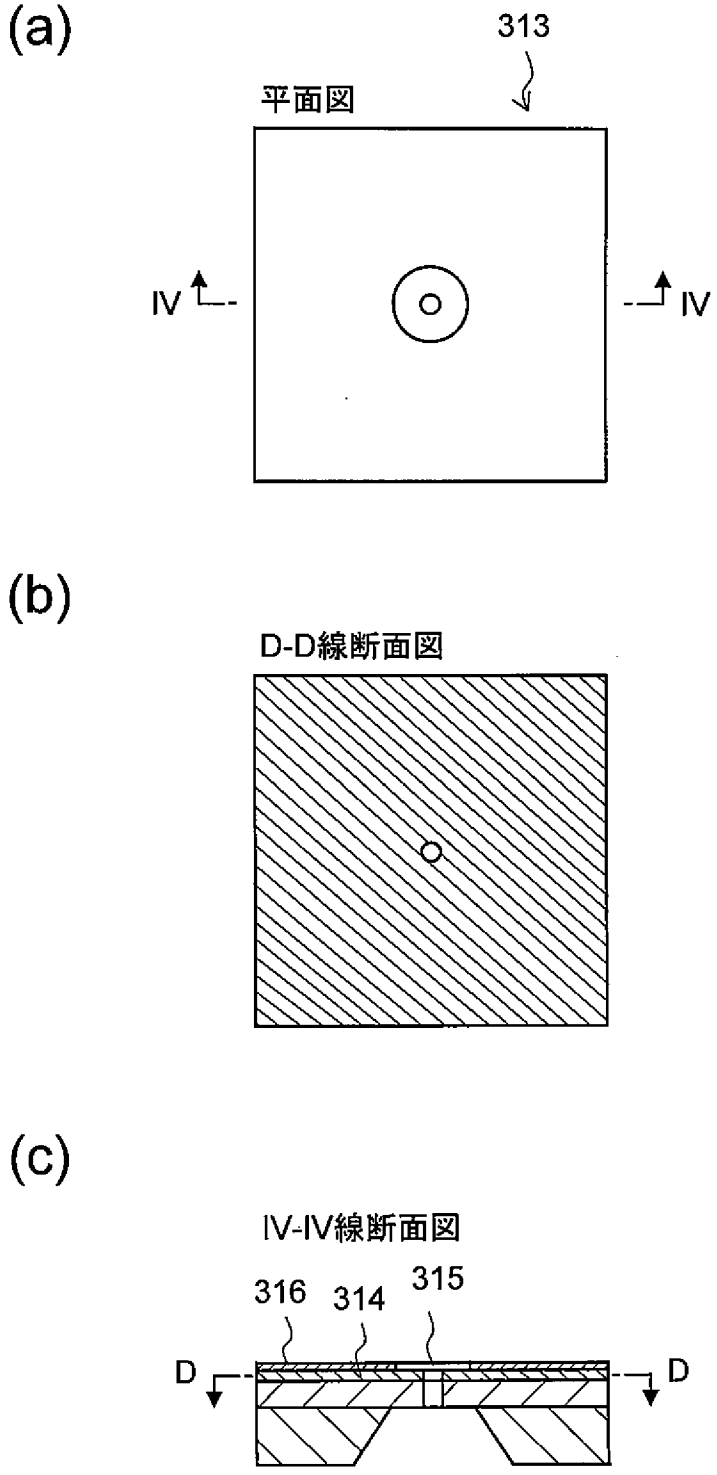


(c)



[図3-4]

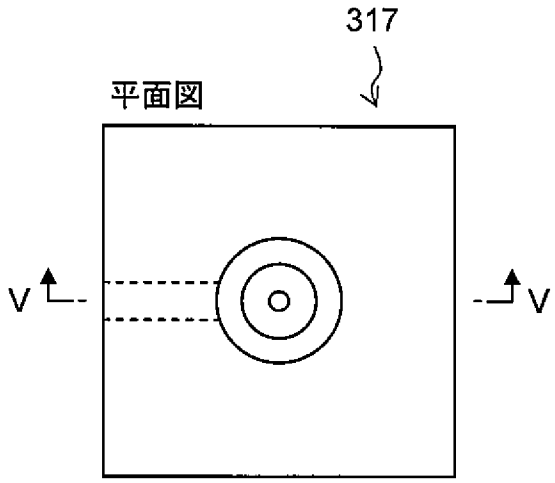
図３－４



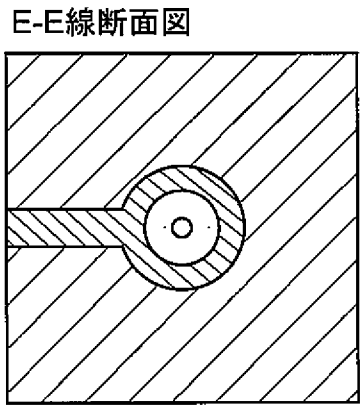
[図3-5]

図３－５

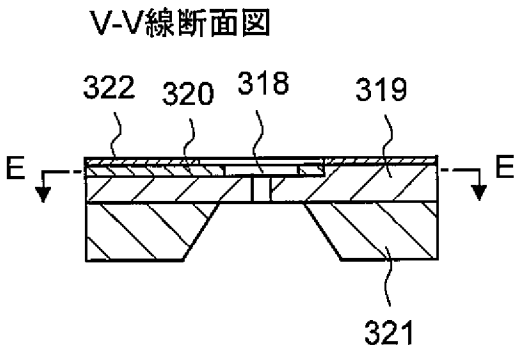
(a)



(b)



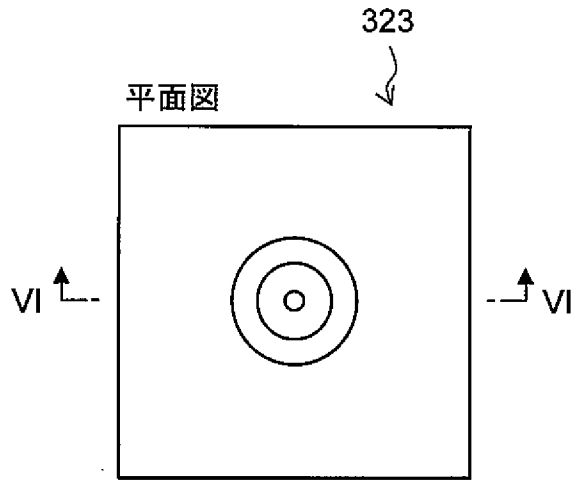
(c)



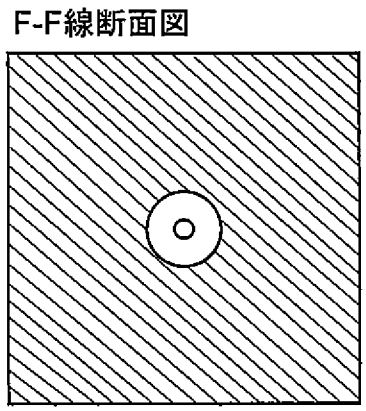
[図3-6]

図３－６

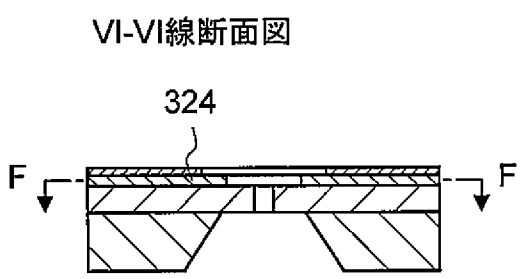
(a)



(b)



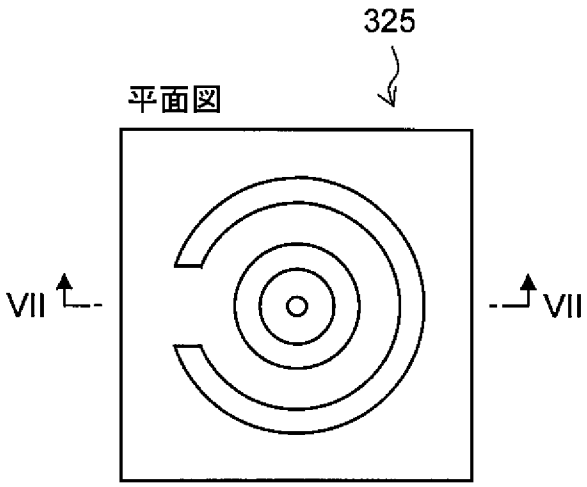
(c)



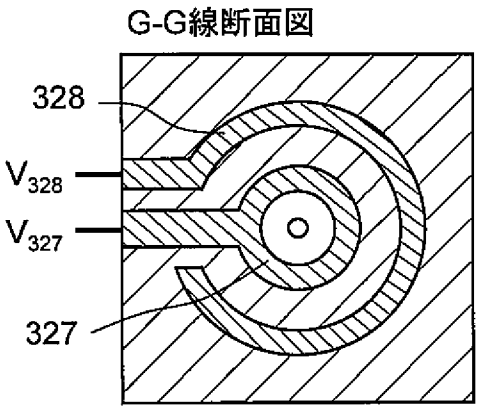
[図3-7]

図３－７

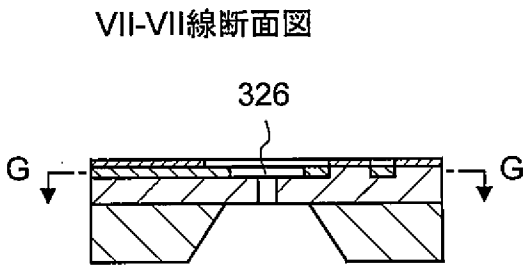
(a)



(b)

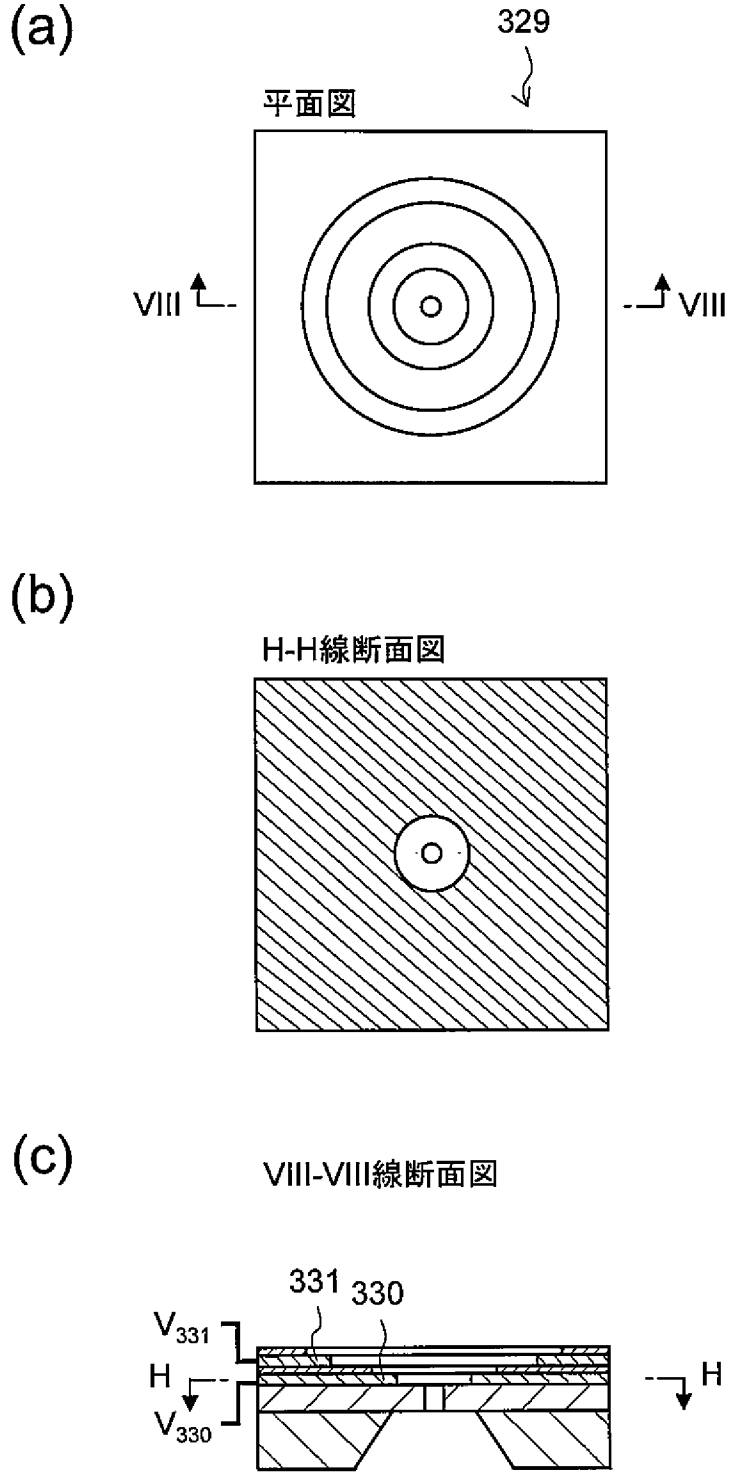


(c)



[図3-8]

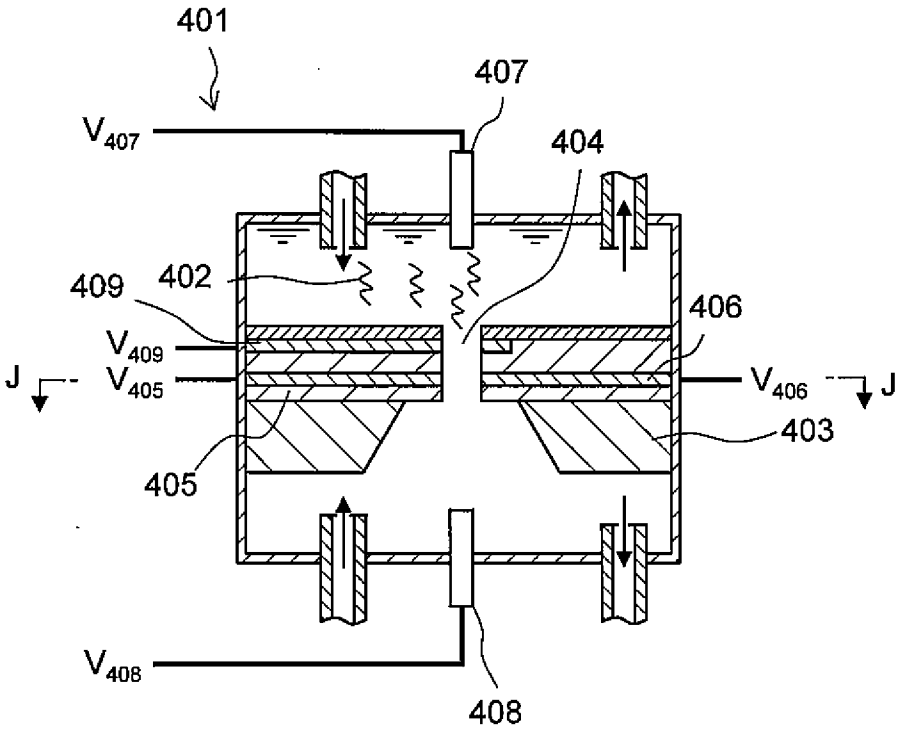
図３－８


(a)
329
平面図
VIII
VIII
(b)
H-H線断面図
(c)
VIII-VIII線断面図
331
330
V_{331}
H
V_{330}
H

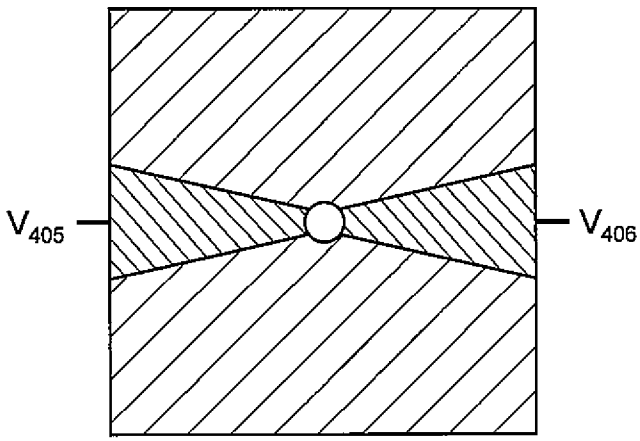
[図4]

図 4

(a)


401
407
V_{407}
404
409
402
406
V_{409}
J
V_{405}
V_{406}
J
403
405
V_{408}
408

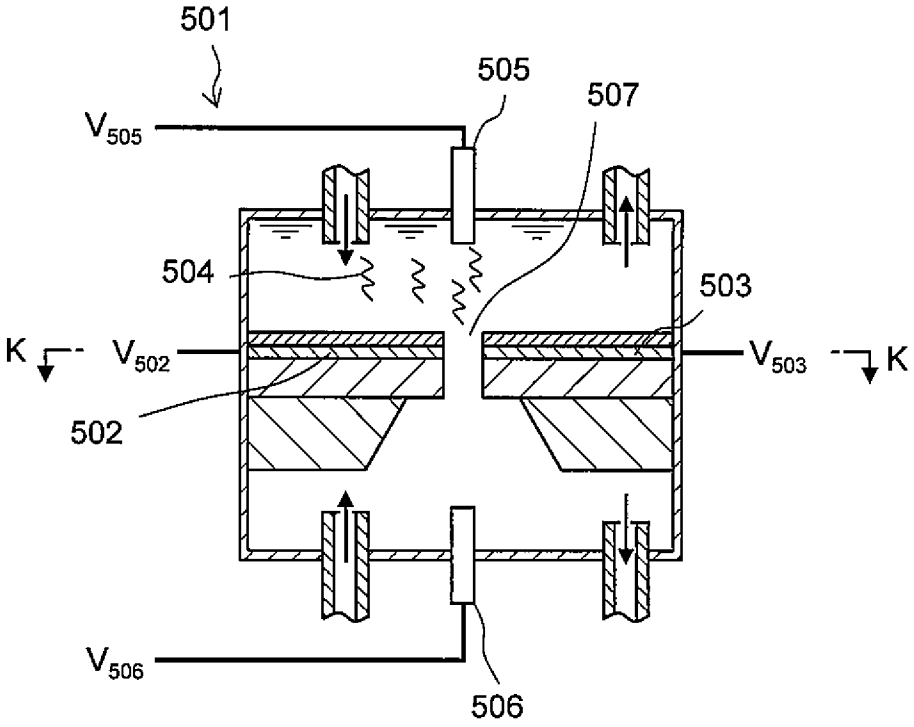
(b)


V_{405}
V_{406}

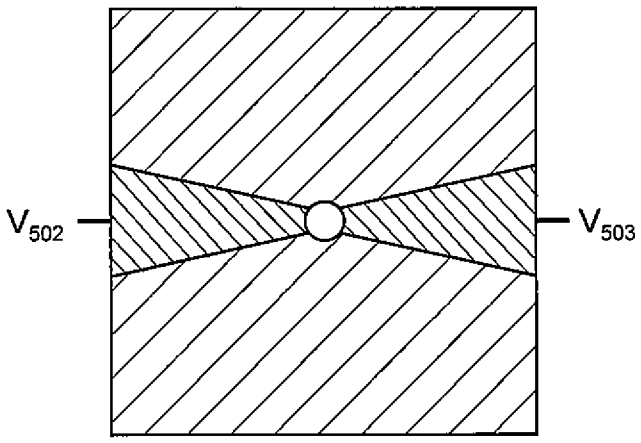
[図5]

図5

(a)

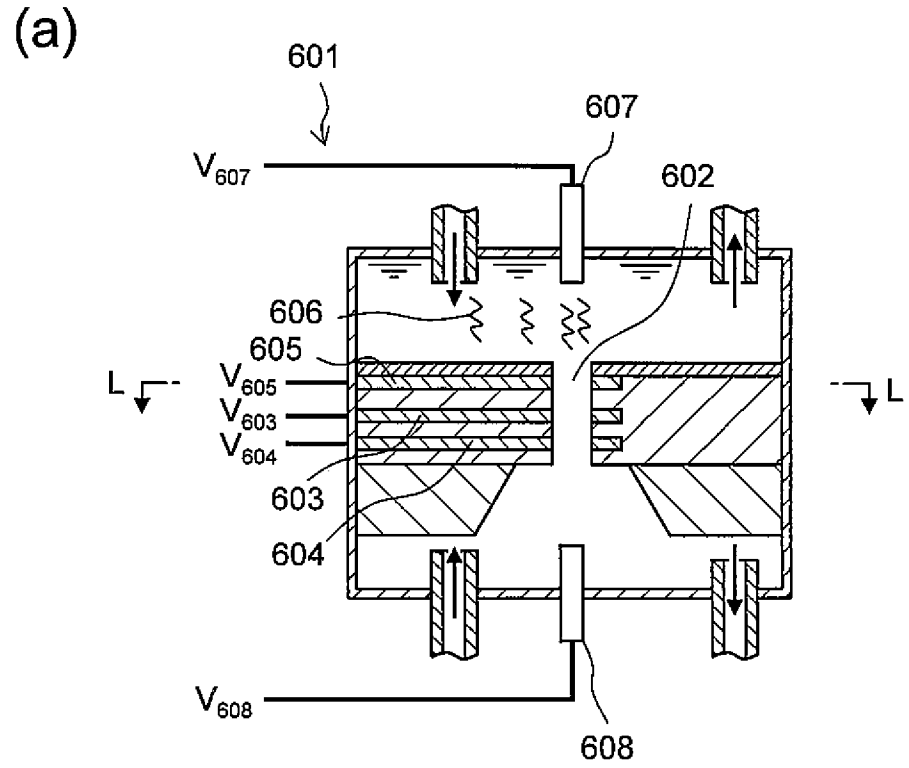


(b)



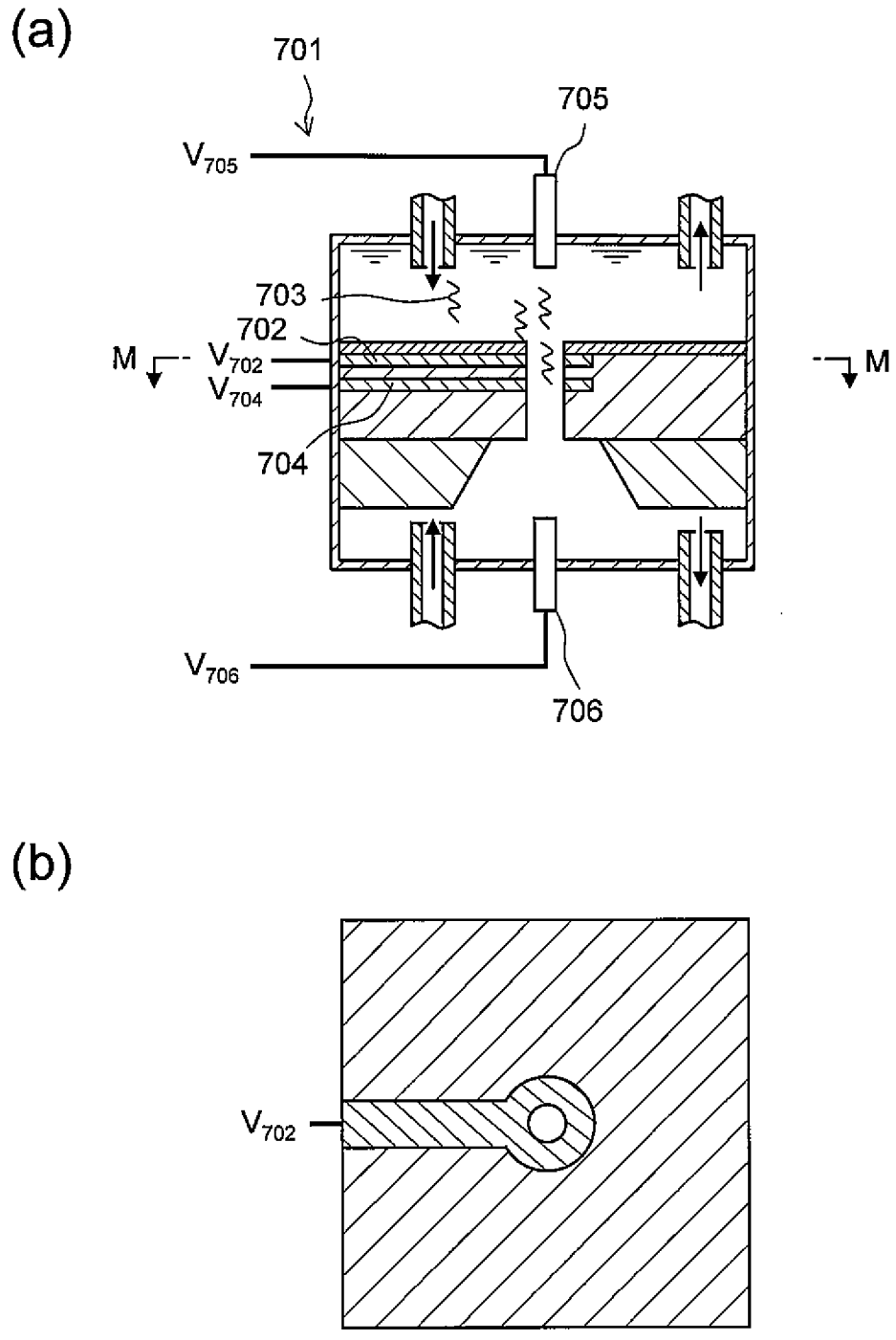
[図6]

図 6


(a)
601
607
V607
602
606
605
L
V605
V603
V604
L
603
604
V608
608
(b)
V605

[図7]

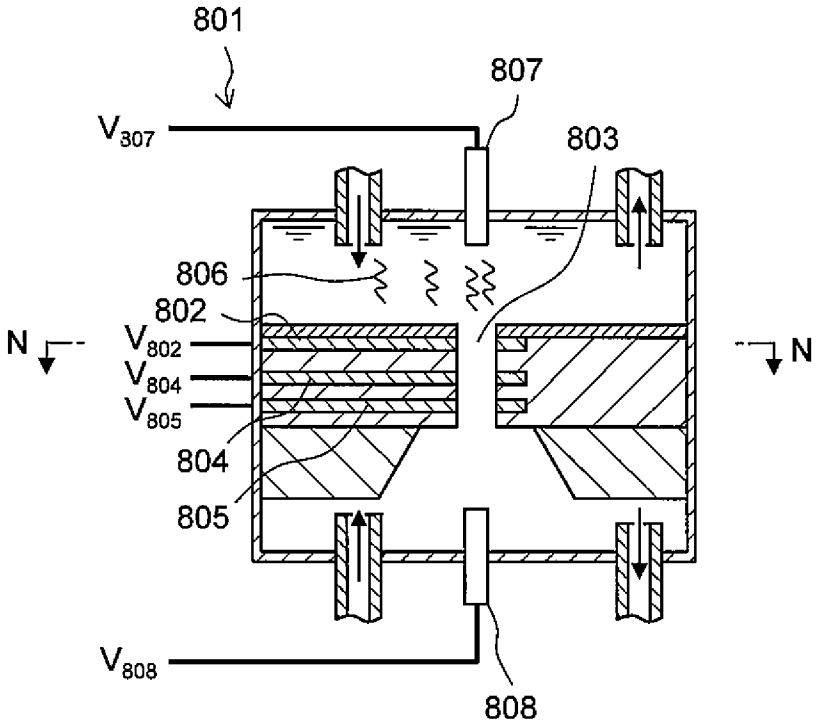
図 7



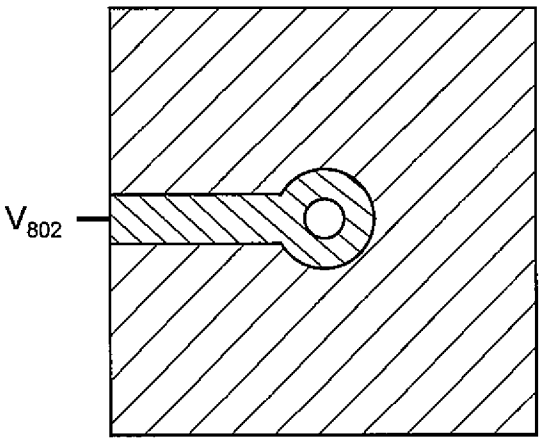
[図8]

図 8

(a)


801
807
V_{307}
803
806
802
N
V_{802}
V_{804}
V_{805}
N
804
805
V_{808}
808

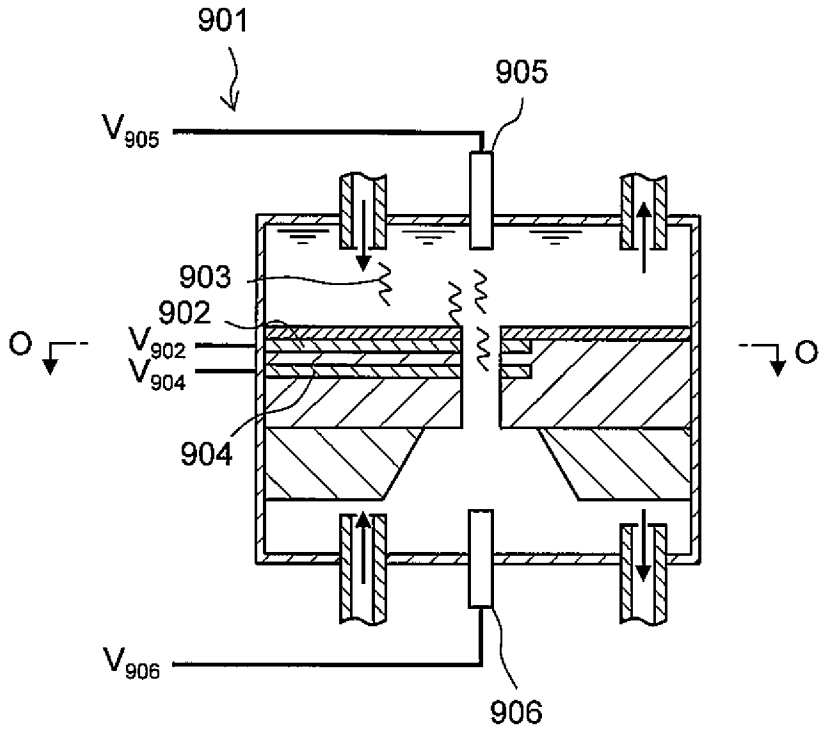
(b)


V_{802}

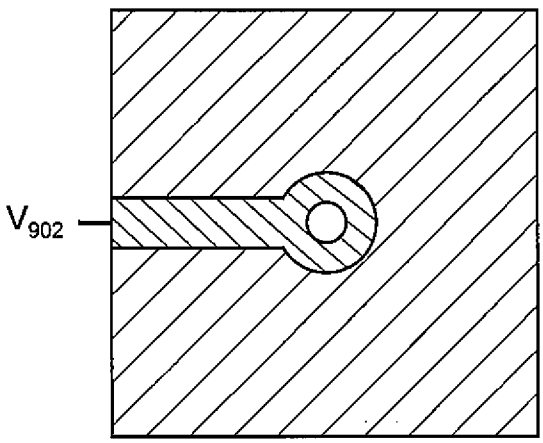
[図9]

図９

(a)

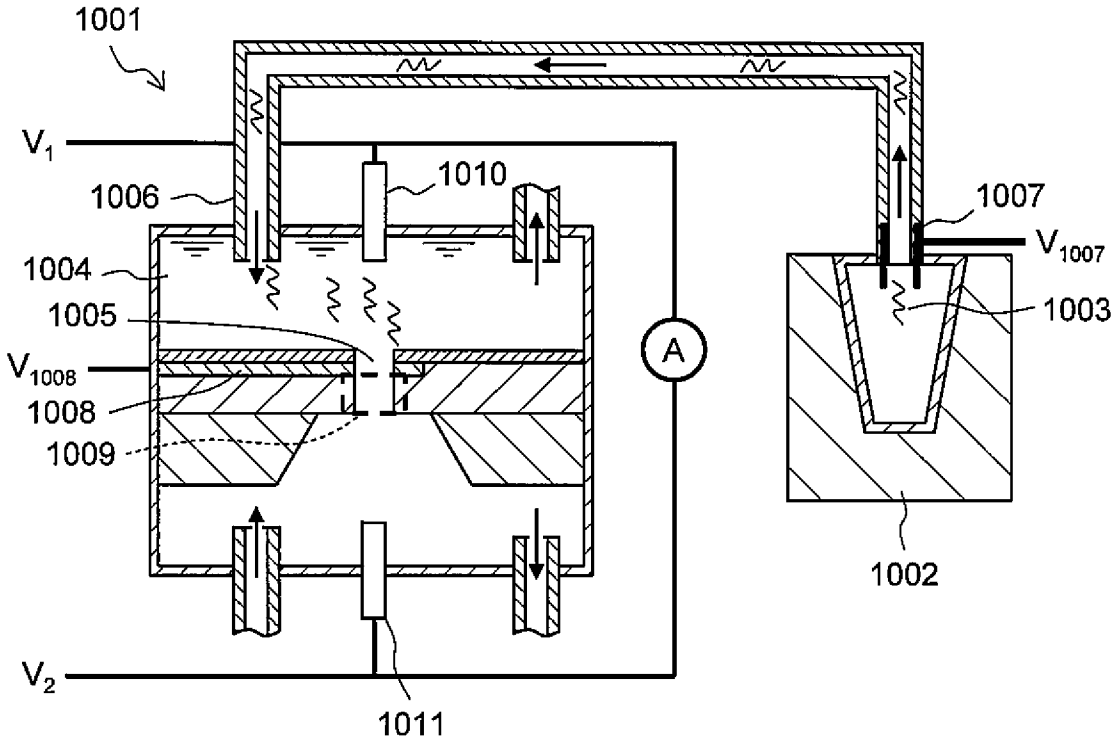


(b)



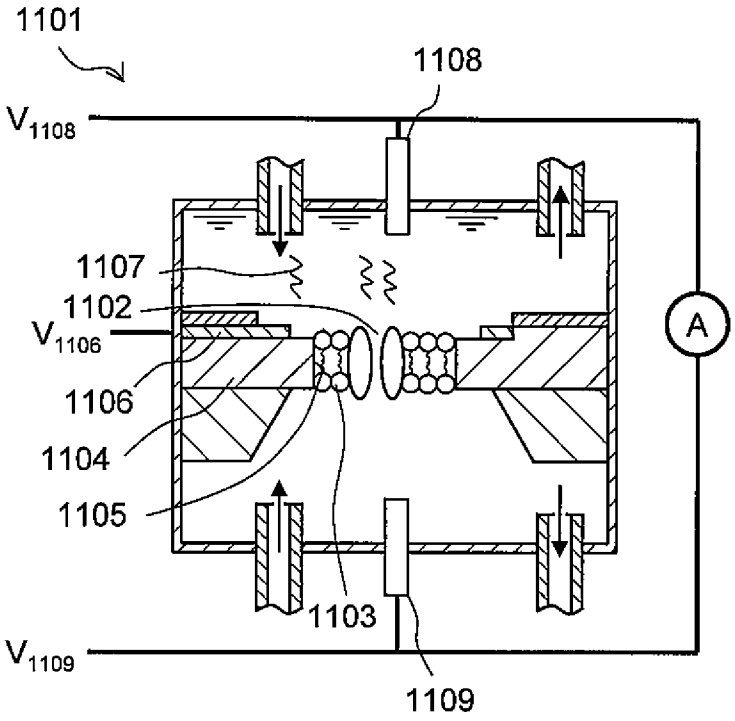
[図10]

図１０


1001
V1
1006
1010
1007
V1007
1004
1005
1003
V1008
1008
1009
A
1002
V2
1011

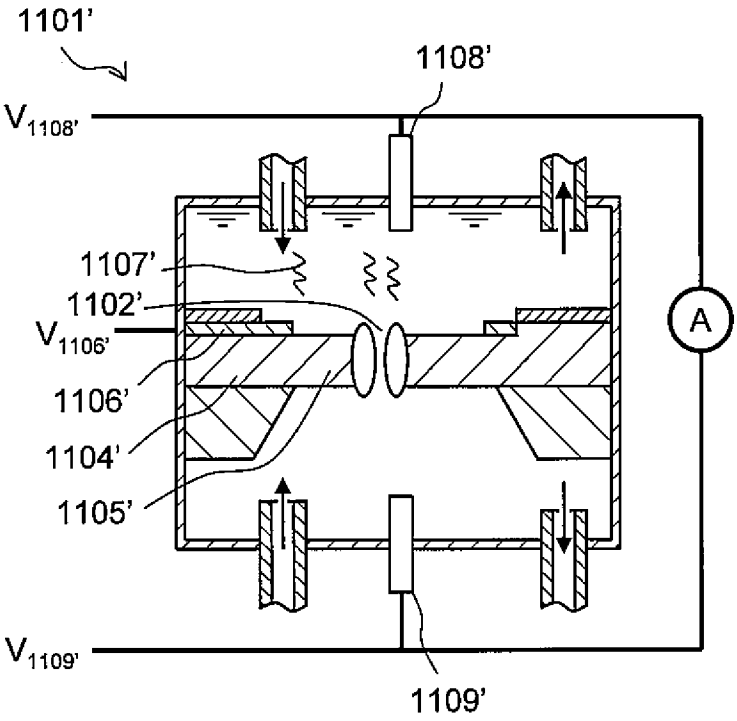
[図11-1]

図１１－１



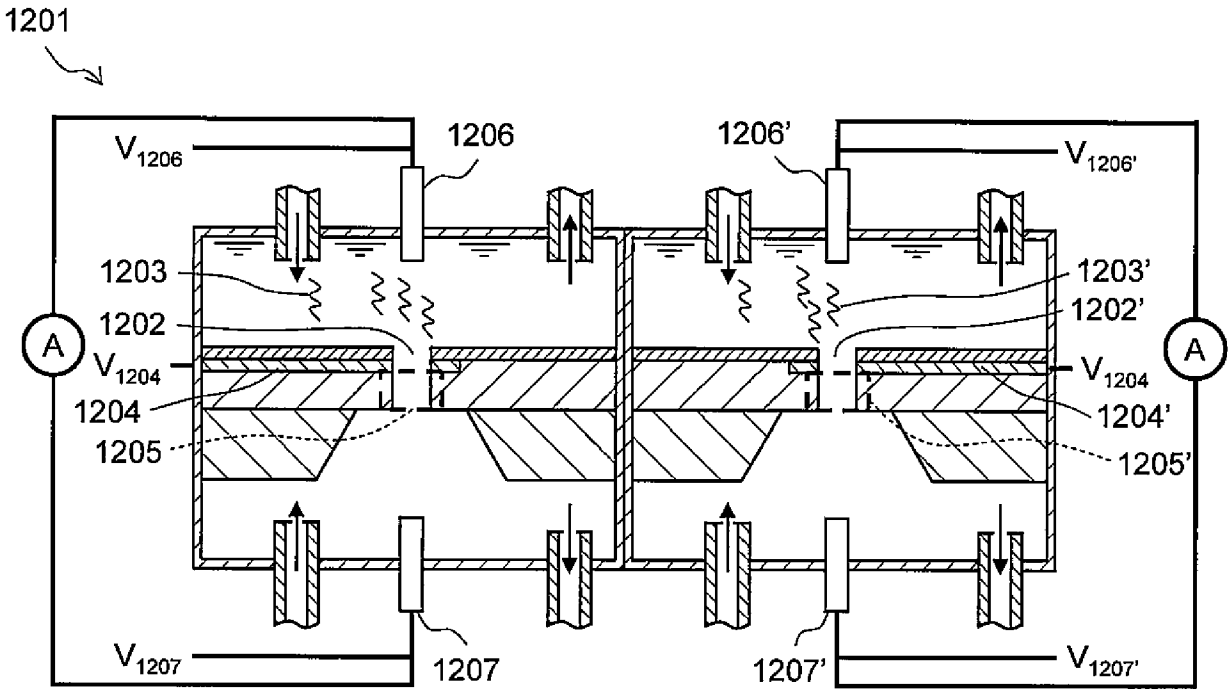
[図11-2]

図１１－２



[図12]

図１２


1201
V_{1206}
1206
1206'
$V_{1206'}$
1203
1203'
1202
1202'
A
A
V_{1204}
V_{1204}
1204
1204'
1205
1205'
V_{1207}
1207
1207'
$V_{1207'}$

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/068765

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N27/00(2006.01)i, *G01N27/28*(2006.01)i, *G01N27/416*(2006.01)i, *G01N27/447*(2006.01)i, *G01N33/483*(2006.01)i

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)
G01N27/00-27/24, G01N27/28, G01N27/416, G01N27/447, G01N33/483

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-230614 A (Hitachi High-Technologies Corp.), 14 October 2010 (14.10.2010), paragraphs [0019], [0027] to [0030]; fig. 3, 4 & WO 2010/116595 A1	1-20
A	JP 2011-501806 A (President and Fellows of Harvard College), 13 January 2011 (13.01.2011), paragraphs [0039], [0055]; fig. 3 & US 2009/0136958 A1 & EP 2205765 A & WO 2009/045472 A1 & AU 2008307485 A & CA 2700859 A & IL 204812 D	1-20

☒ 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	Date of mailing of the international search report
22 October, 2012 (22.10.12)	30 October, 2012 (30.10.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/068765

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-536124 A (The President and Fellows of Harvard College), 04 September 2008 (04.09.2008), paragraph [0013]; fig. 1 & JP 2012-21996 A & JP 4891313 B & US 2008/0171316 A1 & US 2008/0248561 A1 & US 2008/0257859 A1 & EP 1877762 A & EP 2348300 A2 & WO 2007/084163 A2 & CA 2603352 A & CN 101203740 A & AU 2006336262 A & CN 102183630 A & AT 529734 T	1-20
A	JP 2006-113057 A (Agilent Technologies Inc.), 27 April 2006 (27.04.2006), paragraphs [0066] to [0079]; fig. 1 & US 2006/0073489 A1 & EP 1645628 A1	1-20
A	JP 2005-257687 A (Agilent Technologies Inc.), 22 September 2005 (22.09.2005), paragraphs [0026] to [0029]; fig. 2 & US 2005/0202444 A1 & EP 1574837 A1 & CN 1667401 A	1-20
A	JP 2004-233353 A (Agilent Technologies Inc.), 19 August 2004 (19.08.2004), entire text; all drawings & US 2004/0149580 A1 & EP 1443318 A1	1-20
A	JP 2004-233356 A (Agilent Technologies Inc.), 19 August 2004 (19.08.2004), entire text; all drawings & US 2004/0144658 A1 & EP 1441213 A1	1-20

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０６８７６５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N27/00(2006.01)i, G01N27/28(2006.01)i, G01N27/416(2006.01)i, G01N27/447(2006.01)i, G01N33/483(2006.01)i

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））

Int.Cl.　G01N27/00-27/24, G01N27/28, G01N27/416, G01N27/447, G01N33/483

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	１９７１－２０１２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１２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(JDreamII)

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	JP 2010-230614 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 2010.10.14, 【００１９】,【００２７】－【００３０】段落,【図３】,【図４】 & WO 2010/116595 A1	１－２０
A	JP 2011-501806 A (プレジデント　アンド　フェロウズ　オブ　ハーバード　カレッジ) 2011.01.13, 【００３９】,【００５５】段落,【図３】 & US 2009/0136958 A1 & EP 2205765 A & WO 2009/045472 A1 & AU 2008307485 A & CA 2700859 A & IL 204812 D	１－２０

☑　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矛盾するものではなく、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 ２２．１０．２０１２	国際調査報告の発送日 ３０．１０．２０１２
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　２Ｗ　４４０５ 中村　祐一 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２９２

Ｃ（続き）．　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	JP 2008-536124 A (ザ　プレジデント　アンド　フェロウズ　オブ　ハーバード　カレッジ) 2008.09.04, 【００１３】段落,【図１】 & JP 2012-21996 A & JP 4891313 B & US 2008/0171316 A1 & US 2008/0248561 A1 & US 2008/0257859 A1 & EP 1877762 A & EP 2348300 A2 & WO 2007/084163 A2 & CA 2603352 A & CN 101203740 A & AU 2006336262 A & CN 102183630 A & AT 529734 T	１－２０
Ａ	JP 2006-113057 A (アジレント・テクノロジーズ・インク) 2006.04.27, 【００６６】－【００７９】段落,【図１】 & US 2006/0073489 A1 & EP 1645628 A1	１－２０
Ａ	JP 2005-257687 A (アジレント・テクノロジーズ・インク) 2005.09.22, 【００２６】－【００２９】段落,【図２】 & US 2005/0202444 A1 & EP 1574837 A1 & CN 1667401 A	１－２０
Ａ	JP 2004-233353 A (アジレント・テクノロジーズ・インク) 2004.08.19, 全文、全図 & US 2004/0149580 A1 & EP 1443318 A1	１－２０
Ａ	JP 2004-233356 A (アジレント・テクノロジーズ・インク) 2004.08.19, 全文、全図 & US 2004/0144658 A1 & EP 1441213 A1	１－２０