

(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
2022年2月3日(03.02.2022)



(10) 国際公開番号

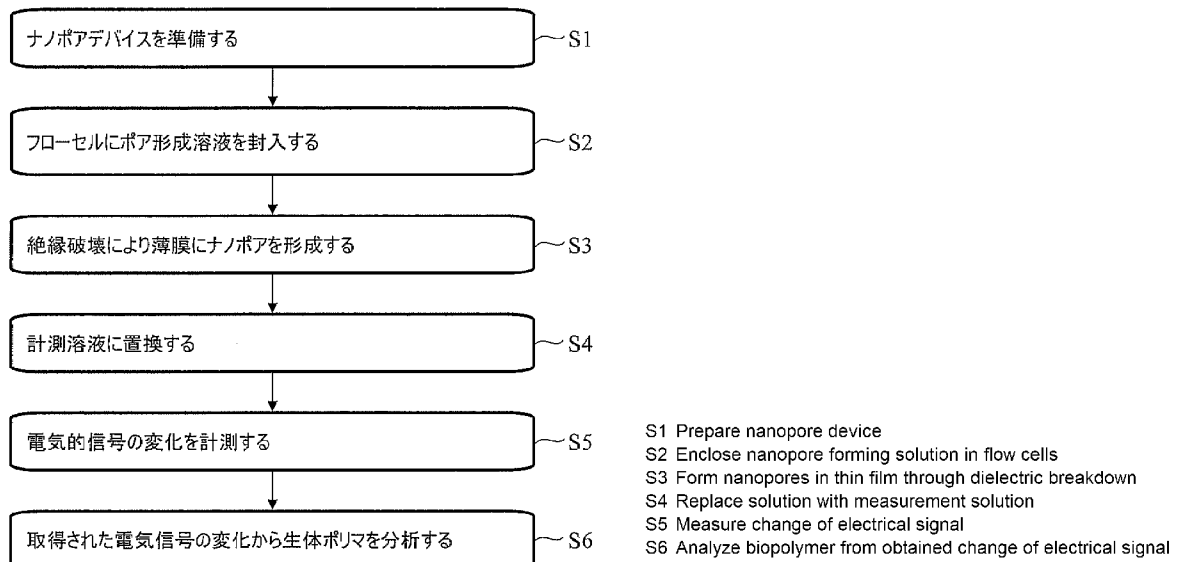
WO 2022/024335 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/029403
- (22) 国際出願日: 2020年7月31日(31.07.2020)
- (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: 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,
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,

(54) **Title:** BIOMOLECULE ANALYSIS METHOD, BIOMOLECULE ANALYZING REAGENT, AND BIOMOLECULE ANALYSIS DEVICE

(54) 発明の名称: 生体分子分析方法、生体分子分析試薬及び生体分子分析デバイス

図 1



(57) **Abstract:** A biomolecule analysis method according to the present disclosure is characterized by comprising: preparing a biomolecule analysis device including a thin film, a first liquid tank and a second liquid tank separated by the thin film, a first electrode disposed in the first liquid tank, and a second electrode disposed in the second liquid tank; and forming nanopores in the thin film by applying a first voltage between the first electrode and the second electrode in a state where a nanopore forming solution is enclosed in the first liquid tank and the second liquid tank, wherein the nanopore

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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

forming solution contains ammonium ions and sulfate ions.

(57) 要約: 本開示の生体分子分析方法は、薄膜と、前記薄膜により隔てられる第1の液槽及び第2の液槽と、前記第1の液槽に配置される第1の電極と、前記第2の液槽に配置される第2の電極と、を備える生体分子分析デバイスを準備することと、前記第1の液槽及び前記第2の液槽にナノポア形成溶液が封入された状態で、前記第1の電極及び前記第2の電極間に第1の電圧を印加して、前記薄膜にナノポアを形成することと、を含み、前記ナノポア形成溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする。

明 細 書

発明の名称：

生体分子分析方法、生体分子分析試薬及び生体分子分析デバイス

技術分野

[0001] 本開示は、生体分子分析方法、生体分子分析試薬及び生体分子分析デバイスに関する。

背景技術

[0002] 次世代DNAシーケンサの分野では、伸長反応や蛍光ラベルを行うことなく、DNAの塩基配列を電氣的に直接計測する方法が注目されている。具体的には、ナノポアDNAシーケンシング方式の研究開発が活発に進められている。この方式は、試薬を用いることなくDNA鎖を直接計測し、塩基配列を決定する方式である。

[0003] ナノポアDNAシーケンシング方式では、薄膜に形成された細孔（以下「ナノポア」という。）をDNA鎖が通過することで生じる封鎖電流を計測することにより、塩基配列を計測する。DNA鎖に含まれる個々の塩基種の違いにより封鎖電流が変化するので、封鎖電流量を計測することで塩基種を順次同定することができる。この方式では、直接DNA鎖の情報を取得することになるため、原理的に長鎖のDNA解読が可能であり、DNA鎖への修飾も直接解読することができる。

[0004] ナノポアDNAシーケンシング方式においてDNAを分析する際に使用する生体分子分析デバイスは、一般的に、電解質溶液が満たされている第1及び第2の液槽と、その第1及び第2の液槽を仕切る薄膜と、第1の液槽に設けられる第1の電極及び第2の液槽に設けられる第2の電極とを備える。生体分子分析デバイスは、アレイデバイスとして構成することもできる。アレイデバイスは、薄膜によって仕切られる液室の組を複数個備えるデバイスという。例えば第1の液槽を共通槽とし、第2の液槽を複数個の個別槽とする。この場合、共通槽と個別槽の各々に電極を配置する。

- [0005] この構成において、第1の液槽と第2の液槽の間に電圧が印加されると、ナノポアにはナノポア径に応じたイオン電流（ベースライン電流）が流れる。また、ナノポアには、印加した電圧に応じた電位勾配が形成される。DNAなどの生体分子を第1の液槽に導入すると、拡散及び電位勾配に応じて、生体分子がナノポアを介して第2の液槽へ搬送される。このとき、ナノポアを封鎖する、各核酸の封鎖率に応じて生体分子内の分析が実施される。なお、生体分子分析装置は、生体分子分析デバイスに設けられた第1及び第2の電極の間に流れるイオン電流（封鎖信号）を測定する測定部を有し、測定部は、測定されたイオン電流（封鎖信号）の値に基づいて生体分子の配列情報を取得する。
- [0006] ここでベースライン電流にノイズが含まれると、封鎖電流にはそのノイズが重畳されるため、ベースライン電流を計測した段階で含まれるノイズの低減に向けた研究開発が進められている。
- [0007] ノイズ源の一つにRTNノイズがある。このノイズは、SiNなどの半導体材料表面に存在する未結合手に対して、電子や電解質を構成するイオンが結合したり乖離したりすることで発生すると考えられている。
- [0008] 特許文献1には、RTNノイズを低減する技術として、「第一の槽と、第二の槽と、前記第一の槽と前記第二の槽を連通するナノポアを有し、前記第一の槽と前記第二の槽の間に配置された薄膜と、前記第一の槽に設けられた第一の電極と、前記第二の槽に設けられた第二の電極と、を備え、前記ナノポアの壁面は、前記第一の槽及び／又は前記第二の槽に充填される溶液に含まれるイオンの脱離吸着を防止するイオン吸着防止構造を有し、前記第一の電極と前記第二の電極の間に電圧を印加することで前記ナノポアを通過するイオン電流を計測する、電流計測装置」が記載されている（同文献の請求項1参照）。
- [0009] また、生体分子を詳細に解読するためには、生体分子をアンプの応答速度以下で搬送する必要がある。生体分子の搬送速度を制御する手法の1つとして、ポリメラーゼやヘリカーゼに代表される酵素を分子モータとして用いる

手法が提案されている（非特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献１：国際公開第２０１８／１３１０６４号

非特許文献

[0011] 非特許文献１：Cherf, G., Lieberman, K., Rashid, H. et al., Nature Biotechnology 30, 344-348 (2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 非特許文献１のように、分子モータとしての酵素の活性を維持するためには、高濃度の基質が必要である。しかしながら、溶液中に存在する基質もベースライン電流のノイズ源となる。基質もマイナスの電荷を有するため、ナノポアを通過することで信号源となってしまう。

[0013] また、特許文献１においては、溶液中の基質に起因するノイズの抑制については、何ら検討されていない。

[0014] そこで、本開示は、ベースライン電流のノイズを抑制しつつ、基質由来のノイズも抑制する技術を提供する。

課題を解決するための手段

[0015] 本開示の一態様に係る生体分子分析方法は、薄膜と、前記薄膜により隔てられる第１の液槽及び第２の液槽と、前記第１の液槽に配置される第１の電極と、前記第２の液槽に配置される第２の電極と、を備える生体分子分析デバイスを準備することと、前記第１の液槽及び前記第２の液槽にナノポア形成溶液が封入された状態で、前記第１の電極及び前記第２の電極間に第１の電圧を印加して、前記薄膜にナノポアを形成することと、を含み、前記ナノポア形成溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする。

[0016] また、本開示の他の態様に係る生体分子分析方法は、ナノポアを有する薄

膜と、前記薄膜により隔てられる第１の液槽及び第２の液槽と、前記第１の液槽に配置される第１の電極と、前記第２の液槽に配置される第２の電極と、を備える生体分子分析デバイスを準備することと、前記第１の液槽及び前記第２の液槽に計測溶液が封入された状態で、前記第１の電極及び前記第２の電極間に電圧を印加して、前記第１の電極及び前記第２の電極間に流れる電流を計測することと、を含み、前記計測溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする。

[0017] 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及び以降の詳細な記述と添付される特許請求の範囲の様態により達成され実現される。

本明細書の記述は典型的な例示に過ぎず、本開示の特許請求の範囲又は適用例を如何なる意味に於いても限定するものではない。

発明の効果

[0018] 本開示の技術によれば、ナノポア形成後のベースライン電流のノイズが低減され、基質由来のノイズも抑制することができる。

上記以外の課題、構成及び効果は、以下の実施形態の説明により明らかにされる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]生体分子分析方法を示すフローチャートである。

[図2]生体分子分析装置の構成を示す概略断面図である。

[図3]生体分子分析装置の他の構成を示す概略断面図である。

[図4]実験例１の結果を示すグラフである。

[図5]実験例２の結果を示すグラフである。

[図6]実験例３の結果を示すグラフである。

[図7]実験例４の結果を示すグラフである。

[図8]実験例５の結果を示すグラフである。

[図9]実験例６の結果を示すグラフである。

[図10]実験例7の結果を示すグラフである。

[図11]実験例8の結果を示すグラフである。

[図12]実験例9の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、図面に基づいて、本開示の実施形態を説明する。なお、添付の図面は、本開示の原理に則った具体的な実施形態を示しているが、それらは本開示の技術の理解のためのものであり、決して本開示の技術を限定的に解釈するために用いられるものではない。

[0021] 本開示において「生体ポリマ（生体分子）」とは、例えば、核酸（DNA、RNA、PNA、オリゴヌクレオチドなど）、タンパク質、又はタンパク質が修飾された核酸を指し、天然物か人工物かを問わない。

[0022] また、本開示において、生体ポリマの「分析」とは、生体ポリマの特性解析を指す。生体ポリマの特性解析には、例えば、核酸のモノマの配列順序の分析（配列決定）、核酸の長さの決定、一塩基多型の検出、生体ポリマ数の決定、生体ポリマ中の構造多型（コピー数多型、挿入、欠失など）の検出などがある。

[0023] [生体分子分析方法]

図1は、第1の実施形態に係る生体分子分析方法を示すフローチャートである。

[0024] （ステップS1：ナノポアデバイスの準備）

ステップS1において、作業者は、ナノポアデバイス（生体分子分析デバイス）を準備する。本実施形態においては、ソリッドステート式ナノポアデバイスを準備することとする。具体的には、例えば、ナノポアデバイスは、ナノポアが形成されるべき薄膜を備え、フローセルに薄膜を設置することにより作成することができる。これにより、薄膜の両側にそれぞれ液槽が形成される。一方の液槽（第1の液槽）には第1の電極が配置され、他方の液槽（第2の液槽）には第2の電極が配置される。第1の電極及び第2の電極には、これらの間に電圧を印加する電源が接続される。また、作業者は、第1

の電極及び第２の電極間の電流を計測する電流計を設置する。

[0025] (ステップＳ２：ナノポア形成溶液の封入)

ステップＳ２において、作業者は、フローセルの供給口から、第１の液槽及び第２の液槽にナノポア開孔用のナノポア形成溶液（電解質溶液）を封入する。

[0026] (ステップＳ３：ナノポアの開孔)

ステップＳ３において、作業者は、電源を駆動して第１の電極及び第２の電極間にナノポア開孔用の電圧を印加し、絶縁破壊により薄膜にナノポアを形成する。

[0027] (ステップＳ４：計測溶液への置換)

[0028] ステップＳ４において、作業者は、フローセルの排出口からナノポア形成溶液を排出させ、フローセルの供給口から、分析対象の生体ポリマを含む、生体ポリマに親和性のある計測溶液（電解質溶液）を封入する。これにより、第１の液槽及び第２の液槽内の電解質溶液を置換する。

[0029] (ステップＳ５：計測)

ステップＳ５において、作業者は、電源を駆動して第１の電極及び第２の電極間に分析用の電圧を印加し、核酸を搬送してナノポアを通過させる。このとき、電流計により、第１の電極及び第２の電極からの電氣的信号（電流値）の変化を計測する。

[0030] (ステップＳ６：生体ポリマの分析)

ステップＳ６において、例えばコンピュータ装置により、電氣的信号の変化に基づいて、生体ポリマを分析する。生体ポリマがナノポアを通過する際に塩基種別によって電氣的信号が変化するため、その電氣的信号のパターンによって配列決定を行うことが可能である。このような方法の詳細は文献（A .H. Laszlo, et al., Nature Biotechnology 32, 829, 2015）に開示されている。別の用途としては、生体ポリマがナノポアを通過した総数によって溶液中に含まれる生体ポリマの数を決定することも可能である。

[0031] (電解質溶液について)

本発明者は、電解質溶液について鋭意検討を行った結果、予想外にも、電解質のカチオンとしてアンモニウムイオンを含み、かつアニオンとして硫酸イオンを含むナノポア形成溶液又は計測溶液を用いた場合に、ベースライン電流におけるノイズを防ぐことができ、さらに、分子モータを用いる際に溶液中に含まれる基質由来のノイズを防ぐこともできることを見出した。

[0032] したがって、本実施形態の生体分子分析方法において、ナノポア形成溶液及び計測溶液（以下、単に「電解質溶液」という場合がある）の少なくともいずれか一方は、電解質のカチオンとしてアンモニウムイオン（ NH_4^+ ）を含み、かつ、アニオンとして硫酸イオン（ SO_4^{2-} ）を含む。すなわち、電解質溶液の電解質は、カチオンとしてアンモニウムイオンを生成し、アニオンとして硫酸イオンを生成するものである。ナノポア形成溶液及び計測溶液の両方が、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むこともできる。

[0033] アンモニウムイオン及び硫酸イオンを生成する電解質（塩）としては、例えば硫酸アンモニウムを用いることができる。また、電解質として、溶媒中で電離する硫酸塩及びアンモニウム塩を用いることもできる。硫酸塩としては、例えば、電離した際に生じるイオンが一価のカチオンである硫酸塩（例えば硫酸リチウム、硫酸セシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウムなど）、及び、電離した際に生じるイオンが二価のカチオンである硫酸塩（例えば硫酸マグネシウム、硫酸カルシウム、硫酸銅、硫酸鉄など）が挙げられる。アンモニウム塩としては、例えば塩化アンモニウム、炭酸アンモニウムなどが挙げられる。

[0034] 電気伝導度を確保するために、電解質溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオン以外のイオンを含んでいてもよい。カチオンは、例えば任意の金属イオンから選択することができる。ただし、例えばカリウムイオン等の一価の金属イオン類は、S i N表面の未結合手の結合乖離を促進する虞がある。また、二価の金属イオンは、ベースライン電流に重畳されるノイズの低減に一定の効果はあるが、高濃度に存在すると生体ポリマを搬送するために用いる分子モータの活性を低下させる原因となる。したがって、電解質溶液にア

ンモニウムイオン以外のカチオンを含める場合は、その種類及び濃度を適切に調整する必要がある。アニオンは、電極材質との相性によって選定することができる。例えば電極材質としてハロゲン化銀を用いた場合、電解質溶液に含まれるアニオンは、ハロゲン化物イオン（塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン）とすることができる。あるいは、アニオンは、グルタミン酸イオン等に代表される有機アニオン類であってもよい。

[0035] すなわち、電解質溶液には、硫酸アンモニウム、若しくは、硫酸塩及びアンモニウム塩以外の電解質（塩）を共存させることができる。このような電解質には、例えばKCl、NaCl、LiCl、CsClなどが挙げられる。電極にプラチナやAuを用いる際にはフェリシアン、フェロシアンを共存させてもよい。また、生体ポリマの任意の搬送制御を行う場合の一つの手段として分子モータを用いる場合には、第1の液槽の電解質溶液には、基質と、分子モータの駆動に適したバッファとを共存させる。生体ポリマの安定化のため、緩衝剤を混在させることも可能である。一般には緩衝剤としてMgSO₄、MgCl₂、Tween（登録商標）、HEPES、Tris-HCl、EDTA、グリセロールなどを混在させることができる。

[0036] 電解質溶液の溶媒としては、生体ポリマを安定に分散可能であり、かつ電極が溶媒に溶解せず、電極との電子授受を阻害しない溶媒を用いることができる。電解質溶液の溶媒として、例えば、水、アルコール類（メタノール、エタノール、イソプロパノールなど）、酢酸、アセトン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどが挙げられる。生体ポリマとして核酸を測定対象とする場合、典型的には水が用いられる。

[0037] 電解質濃度の下限を設けることで、信号対ノイズ比を向上することができる。具体的には、例えば電解質濃度の下限を0.01Mとすることができる。一方、電解質濃度の上限を妨げる要件はなく、飽和濃度まで許容することができる。すなわち、電解質溶液が電解質（塩）として硫酸アンモニウムのみを含む場合、硫酸アンモニウム濃度は、0.01M以上飽和濃度以下とすることができ、場合に応じて、0.01M以上1M以下、又は0.01M以

上0.2 M以下とすることができる。

[0038] 電解質溶液が電解質（塩）として硫酸アンモニウム及び他の塩を含む場合、塩濃度の合計に対する硫酸アンモニウム濃度の割合は、5%以上100%未満とすることができる。場合に応じて、塩濃度の合計に対する硫酸アンモニウム濃度の割合は、25%以上100%未満、又は50%以上100%未満とすることができる。

[0039] 電解質溶液が電解質として硫酸塩、アンモニウム塩及び他の塩を含む場合、アニオン濃度の合計に対する硫酸イオン濃度の割合は、5%以上100%未満とすることができる。場合に応じて、アニオン濃度の合計に対する硫酸イオン濃度の割合は、25%以上100%未満、又は50%以上100%未満とすることができる。また、カチオンの濃度の合計に対するアンモニウムイオン濃度の割合は、5%以上100%未満とすることができる。場合に応じて、カチオン濃度の合計に対するアンモニウムイオン濃度の割合は、25%以上100%未満、又は50%以上100%未満とすることができる。

[0040] 以上、ナノポア形成溶液及び計測溶液の少なくとも一方を、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含む電解質溶液とすることについて説明した。これに対し、ナノポアは、絶縁破壊に限らず、予め微細加工やTEM装置を用いた加工などにより形成することもできる。この場合、上述のステップS1において、作業者は、予めナノポアが形成された薄膜を用いてナノポアデバイスを組み立て、ステップS2及びS3は実施しない。

[0041] また、ステップS2及びS3で用いたナノポア形成溶液を計測溶液に置換することなく、ナノポア形成溶液を用いて計測することも可能である。また一方で、上述のステップS4のように生体ポリマにより好適な計測溶液に置換することで、より正確に生体ポリマの解析を実現できる。

[0042] さらに、生体分子分析デバイスとしてソリッドステート式ナノポアデバイスを用いる場合について説明したが、バイオ式ナノポアデバイスについても同様の操作を適用することができる。バイオ式ナノポアデバイスを用いる場合には、上述のステップS2及びS3は実施されず、ステップS4において

、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含む計測溶液を導入する。

[0043] (まとめ)

以上のように、本実施形態に係る生体分子分析方法は、ナノポア形成溶液及び計測溶液の少なくともいずれか一方が、カチオンとしてアンモニウムイオンを含み、かつアニオンとして硫酸イオンを含む。それ以外は、従来法と同じ装置、工程及び条件を使用して実施することができる。このようなナノポア形成溶液又は計測溶液を使用することによって、ベースライン電流に対するRTN及び計測溶液中に含まれる基質由来のノイズを防ぐことを可能とし、ナノポアでの封鎖電流を円滑に正しく測定することが可能となる。

[0044] [生体分子分析試薬]

本開示の生体分子分析試薬は、上述した電解質溶液の電解質を構成要素として含む。すなわち、生体分子分析試薬は、溶液とした場合、カチオンとしてアンモニウムイオンを含み、かつアニオンとして硫酸イオンを含む。生体分子分析試薬は、ナノポア形成用試薬及び計測試薬の少なくともいずれか一方として使用される。

[0045] 本開示の生体分子分析試薬は、使用手順や使用量などを記載した説明書と共に提供され得る。生体分子分析試薬は、即時使用可能な状態（上述のナノポア形成溶液及び計測溶液）で提供されてもよいし、使用時に適当な溶媒で希釈するための濃縮液として提供されてもよいし、あるいは使用時に適当な溶媒で再構成するための固形状態（例えば粉末など）であってもよい。そのような生体分子分析試薬の形態及び調製は、当業者であれば理解することができる。

[0046] ナノポア形成用試薬は、薄膜の両側に形成された2つの液槽間に電圧を印加して絶縁破壊によりナノポアを形成する際に使用される。計測試薬は、ナノポアに生体ポリマを通過させ、ナノポアを流れる電流（封鎖電流）を測定する際に使用される。ナノポア形成用試薬の電解質の濃度と、計測試薬の電解質の濃度とは、同じであってもよいし異なってもよい。また、ナノポア形成用試薬及び計測試薬のいずれか一方のみが、上述した電解質溶液の電

解質を構成要素として含み、他の一方は従来の組成の試薬であってもよい。これらの試薬は、ナノポア形成用試薬及び計測試薬のセットとして使用者に提供されてもよいし、それぞれ別個に提供されてもよい。

[0047] (まとめ)

以上のように、本実施形態に係る生体分子分析試薬は、ナノポア形成溶液及び計測溶液の少なくともいずれか一方とした場合に、カチオンとしてアンモニウムイオンを生成し、かつアニオンとして硫酸イオンを生成する。このような生体分子分析用試薬を使用することによって、ベースライン電流に対するRTN及び計測溶液中に含まれる基質由来のノイズを防ぐことを可能とし、ナノポアでの封鎖電流を円滑に正しく測定することが可能となる。

[0048] [生体分子分析装置]

図2は、第1の実施形態に係る生体分子分析装置1の構成を示す概略断面図である。生体分子分析装置1は、封鎖電流方式にてイオン電流を測定する装置である。図2に示すように、生体分子分析装置1は、ナノポアデバイス100、電流計106、電源107及びコンピュータ108を備える。ナノポアデバイス100は、ナノポア101が形成された薄膜102、第1の液槽104A及び第2の液槽104B、第1の電極105A及び第2の電極105Bを備える。第1の液槽104A及び第2の液槽104Bは、薄膜102を挟んで薄膜102と接するように配置され、その内部に電解質溶液103が満たされている。第1の電極105Aは第1の液槽104Aに設けられ、第2の電極105Bは第2の液槽104Bに設けられる。

[0049] ナノポアデバイス100は、例えば、薄膜102をフローセルにより挟持することにより形成することができる。図2のナノポアデバイス100は、薄膜102にナノポア101が形成され、生体ポリマ109（DNA鎖等）が導入された状態である。生体ポリマ109を任意の速度で制御するために、生体ポリマ109の一端には、例えばポリメラーゼなどの酵素からなる分子モータ110が設けられている。

[0050] 生体ポリマ109は、ナノポア通過時に電気的特性、特に抵抗値を変化さ

せる測定対象物であれば良く、典型的には一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、PNA（ペプチド核酸）、オリゴヌクレオチド、並びにこれらの組み合わせ（例えば、ハイブリッド核酸）などの核酸である。ナノポアデバイス100において、モノマ配列を解析する際には、生体ポリマ109はその高次構造が解消された直鎖状高分子の形態をとる必要がある。生体ポリマ109にナノポア101を通過させる手段としては、電気泳動による搬送を採用することができるが、圧力ポテンシャル差などで発生させた溶媒流であってもよい。

[0051] 電解質溶液103は、前述のポア形成溶液又は計測溶液である。電解質溶液103の容量は、例えばマイクロリットルオーダー又はミリリットルオーダーである。

[0052] 電源107は、第1の電極105A及び第2の電極105B間に所定の電圧を印加する。第1の電極105A及び第2の電極105B間に電圧が印加されると、ナノポア101が形成された薄膜102の両面の間に電位差が生じ、上側の第1の液槽104A（cis槽）に溶解している生体ポリマ109が、下側に位置する第2の液槽104B（trans槽）の方向に泳動される。

[0053] 電流計106は、第1の電極105A及び第2の電極105B間に流れるイオン電流（封鎖信号）を計測し、計測値をコンピュータ108に出力する。電流計106は、電圧の印加によって電極間に流れる電流を増幅するアンプと、ADC（Analog to Digital Converter）とを有している（図示せず）。ADCの出力である検出値がコンピュータ108に出力される。

[0054] コンピュータ108は、電源107による第1の電極105A及び第2の電極105Bへの印加電圧を制御する。また、コンピュータ108は、電流計106からの電流の検出値に基づいて、生体ポリマ109を分析する。より具体的には、コンピュータ108は、イオン電流（封鎖信号）の値に基づいて生体ポリマ109の配列情報を取得する。

[0055] ナノポア計測方式として、上記のように封鎖電流を計測する方式以外に以

下の方法を採用することも可能である。一つは、第1の電極105A及び第2の電極105B以外にもう一对の電極をナノポア近傍に設け、該一对の電極の間に電圧を印加し、生体分子が通過した際に発生するトンネル電流の変化を計測する方法である。その他に、FETデバイスをナノポアメンブレンに設け、デバイスで取得されるトランジスタの信号変化を計測する方法がある。また、ナノポア近傍に照射された光の吸収、反射、蛍光特性などの光学的信号を計測することも可能である。

[0056] コンピュータ108は、典型的には、イオン電流計測装置、アナログデジタル出力変換装置、データ処理装置、データ表示出力装置、入出力補助装置を備える。イオン電流計測装置には電流電圧変換型の高速増幅回路が搭載される。データ処理装置には演算装置、一時記憶装置、不揮発性記憶装置が搭載される。ナノポアデバイス100をファラデーケージで覆うことで、外部ノイズを低減することができる。

[0057] なお、図2に示すように、電流計106、電源107及びコンピュータ108をナノポアデバイス100に対して別部材とするのではなく、ナノポアデバイス100と一体構成としても良い。

[0058] 以下では、前述した生体分子分析装置1の作製方法について説明する。いわゆる封鎖電流方式で生体分子の分析に用いられる生体分子分析装置の基本的な構成自体は当技術分野で既知であり、その構成要素も当業者であれば容易に理解することができる。例えば、米国特許第5795782号、“Scientific Reports 4, 5000, 2014, Akahori, et al.”、“Nanotechnology 25(27):275501, 2014, Yanagi, et al.”、“Scientific Reports, 5, 14656, 2015, Goto, et al.”、“Scientific Reports 5, 16640, 2015”に具体的なデバイスが開示されている。

[0059] ナノポア101が形成される薄膜102は、中心に細孔を有するタンパク質が埋め込まれた両親媒性分子層からなる脂質二重層（バイオポア）であってもよいし、半導体微細加工技術で形成できる材質からなる薄膜（ソリッドポア）であってもよい。半導体微細加工技術で形成できる材質としては、例

例えば窒化ケイ素 (SiN)、酸化ケイ素 (SiO_2)、酸窒化ケイ素 (SiON)、酸化ハフニウム (HfO_2)、二硫化モリブデン (MoS_2)、グラフェンなどがある。薄膜102の厚さは、 $1\text{ \AA}$ (オングストローム) $\sim 200\text{ nm}$ とすることができ、場合に応じて $1\text{ \AA} \sim 100\text{ nm}$ 、又は $1\text{ \AA} \sim 50\text{ nm}$ とすることができ、具体的には例えば約 5 nm とすることができる。

[0060] 薄膜102の面積は、電圧の印加によるナノポア101の形成の際に2個以上のナノポア101が形成され難い面積であり、かつ、強度上許容される面積とすることができる。一例として、当該面積は、例えば $100 \sim 500\text{ nm}$ 程度とすることができる。また、薄膜102の膜厚は、一塩基相当の実効膜厚を有するナノポア101を形成可能な膜厚とすることによって、DNAの一塩基分解能を達成することができる。一例として、膜厚は 7 nm 程度かそれ以下とすることができる。なお、薄膜102は、貫通孔を有する他の薄膜によって両面が挟まれた構造であってもよく、この場合は、両面側の貫通孔によって露出する薄膜102の面積を、上記のように設定すればよい。

[0061] ナノポア101の寸法(径)は、分析対象である生体ポリマ109の種類に応じて適切な寸法を選択することができる。一例として、ナノポア101の寸法は、例えば $0.9\text{ nm} \sim 100\text{ nm}$ とすることができ、場合に応じて $0.9\text{ nm} \sim 50\text{ nm}$ とすることができる。生体ポリマ109として一本鎖DNAを測定対象とする場合には、一本鎖DNAが通過可能な径とし、具体的にはおよそ 0.9 nm 以上 10 nm 以下にすることができる。例えば直径が約 1.4 nm であるssDNA(一本鎖DNA)の分析に用いるナノポア101の径は、 $1.4\text{ nm} \sim 10\text{ nm}$ とすることができ、場合に応じて $1.4\text{ nm} \sim 2.5\text{ nm}$ 程度、具体的には約 1.6 nm とすることができる。

[0062] また、例えば直径が約 2.6 nm であるdsDNA(二本鎖DNA)の分析に用いるナノポア101の径は、 $3\text{ nm} \sim 10\text{ nm}$ 程度とすることができ、場合に応じて $3\text{ nm} \sim 5\text{ nm}$ 程度とすることができる。

[0063] ナノポア101の深さは、薄膜102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101の深さは、生体ポリマ109を構成するモ

ノマ単位の2倍以上とすることができ、場合に応じて3倍以上、又は5倍以上の大きさとすることができる。例えば生体ポリマ109が核酸から構成されている場合には、ナノポア101の深さは、塩基3個以上の大きさ、例えば約1 nm以上とすることができる。これにより、生体ポリマ109をその形状と移動速度を制御しながらナノポア101に進入させることができ、高感度及び高精度な解析が可能となる。また、ナノポア101の形状は、基本的には円形であるが、楕円形や多角形とすることも可能である。

[0064] ナノポア101を有する薄膜102を複数枚備えるアレイ型の装置構成の場合には、ナノポア101を有する薄膜102を規則的に配列することが好ましい。複数の薄膜102を配置する間隔は、使用する電極、電気測定系の能力に応じて、0.1 μm ~ 1 mm、又は1 μm ~ 700 μm とすることができる。

[0065] なお、薄膜102中にナノポア101を形成する方法は、特に限定されるものではなく、例えば透過型電子顕微鏡（TEM）などによる電子ビーム照射や、電圧（パルス電圧など）印加による絶縁破壊などを用いることができる。ナノポア101を形成する方法は、例えば“Itaru Yanagi et al., Sci. Rep. 4, 5000 (2014)”や“A. J. Storm et al., Nat. Mat. 2 (2003)”に記載されている方法を使用することができる。

[0066] 上下2つの液槽に設けられた電極に電源から電圧が印加されると、ナノポアの近傍に電場が生じ、液中で負に帯電した生体ポリマは、ナノポア内を通過する。その際、前述した封鎖電流 I_b が流れる。

[0067] 薄膜102に接触する計測溶液を収納できる第1の液槽104A及び第2の液槽104Bは、封鎖電流の測定に影響を及ぼさない材質、形状及び大きさで、適宜設けることができる。これらの第1の液槽104A及び第2の液槽104Bを仕切る薄膜102に接液するように計測溶液が注入される。

[0068] 第1の電極105A及び第2の電極105Bは、計測溶液中の電解質と電子授受反応（ファラデー反応）を行うことが可能な材質で作製することができ、典型的には、ハロゲン化銀又はハロゲン化アルカリ銀で作製される。電

位安定性及び信頼性の観点からは、銀又は銀塩化銀を使用することができる。

[0069] 第1の電極105A及び第2の電極105Bは、分極電極となる材質で作製されてもよく、例えば金や白金などで作製されてもよい。その場合、安定的なイオン電流を確保するために計測溶液に電子授受反応を補助することができる物質、例えばフェリシアン化カリウム又はフェロシアン化カリウムなどを添加することができる。あるいは、電子授受反応を行うことが可能な物質、例えばフェロセン類をその分極電極表面に固定化することもできる。

[0070] 第1の電極105A及び第2の電極105Bの構造は、全てが前記材質で構成されていてもよく、あるいは前記材質が下地材（銅、アルミニウムなど）の表面に被覆されていてもよい。第1の電極105A及び第2の電極105Bの形状は特に限定されるものではないが、計測溶液と接液する表面積が大きくなる形状を採用することができる。第1の電極105A及び第2の電極105Bは配線と接合されて、測定回路（電流計106）へと電気的信号が送られる。

[0071] 生体分子分析装置1は、上記の構成を要素として含む。上述のナノポア方式の生体分子分析装置1は、使用手順や使用量などを記載した説明書と共に提供され得る。分子モータ110とともに用いられる制御鎖は、即時使用可能な状態で提供されてもよいし、計測対象となる生体ポリマのみが結合していない状態で構成・提供されてもよい。そのような形態及び調製は、当業者であれば理解することができる。ナノポアデバイス100に関しても同様に、即時使用可能な状態でナノポアが形成されている状態で提供されてもよいし、提供先で形成される状態で提供されてもよい。

[0072] （まとめ）

以上のように、本実施形態に係る生体分子分析装置は、薄膜の両側に封入される電解質溶液が、カチオンとしてアンモニウムイオンを含み、かつアニオンとして硫酸イオンを含む。このような生体分子分析装置を使用することによって、ベースライン電流に対するRTN及び計測溶液中に含まれる基質

由来のノイズを防ぐことを可能とし、ナノポアでの封鎖電流を円滑に正しく測定することが可能となる。

[0073] 図2に例示した生体分子分析装置1のナノポアデバイス100は、1つの薄膜102が1つのナノポア101のみを有している。しかしながら、これはあくまでも一例であり、薄膜102に複数個のナノポア101を形成し、複数個のナノポア101の各々の領域を隔壁で分離して構成されるアレイデバイスとすることも可能である。そこで、以下においては、アレイデバイスの構成例について説明する。

[0074] 図3は、生体分子分析装置2の構成を示す概略断面図である。図3において、図2に示した生体分子分析装置1と同一の構成要素については同一の符号を付しているので、重複する説明は省略する。図3に示すように、生体分子分析装置2は、アレイデバイスであるナノポアデバイス200を備える点で、図2の生体分子分析装置1と異なっている。

[0075] ナノポアデバイス200においては、薄膜102Aが複数のナノポア101を有しており、薄膜102Aの下第2の液槽104Bが隔壁（具体的には薄膜102Cの側壁）により複数の空間に分割されている。薄膜102Aを固定する薄膜102B及び102Cにおいて、ナノポア101に対応する位置に貫通穴が設けられ、薄膜102Cの貫通穴の側壁により、複数の空間（個別槽）が形成されている。複数の空間の各々には、第2の電極105Bが設けられている。なお、第1の液槽104Aは、下側に位置する複数の空間に対する共通液槽として用いられる。複数の空間は隔壁により互いに絶縁されている。このため、各ナノポア101を流れる電流を独立に計測することができる。

[0076] ナノポア形成溶液又は計測溶液（電解質溶液103）は上述のものをいれればよい。これにより、ベースライン電流に重畳したRTNノイズ及び、基質由来のノイズの抑制において効果が発揮される。生体分子分析装置2では並列して計測を行うことができるため、高い解析精度を保持したまま、非常に高いスループットで生体分子のモノマ配列解析を行うことが可能となる。

[0077] 本開示に係る生体分子分析方法、生体分子分析試薬及び生体分子分析デバイスは、例えば核酸から構成される生体ポリマの分析、並びにその分析を利用する試験、診断、治療、創薬、基礎研究などの分野に有用である。

実施例

[0078] 以下、実施例を用いて本開示の技術をより詳細に説明するが、本開示の技術はこれら実施例に限定されるものではない。

[0079] [生体分子分析装置の準備]

以下の実施例において、図2に示した構成の単一ポアの生体分子分析装置を使用することとする。まず、以下のようにしてナノポアデバイスを作製した。

[0080] 以下の手順で、半導体微細加工技術により薄膜を作製した。まず、厚さ725mmの8インチSiウエハの表面に、 Si_3N_4 ／poly Si／ Si_3N_4 をそれぞれ膜厚5nm／150nm／100nmの順に成膜した。また、Siウエハの裏面に、 Si_3N_4 を105nm成膜した。なお、中間層のpoly SiはSiOであってもよい。

[0081] 次に、Siウエハ表面最上部の Si_3N_4 を500nm四方で反応性イオンエッチングにより除去した。同様に、Siウエハ裏面の Si_3N_4 を1038 μm 四方で反応性イオンエッチングにより除去した。裏面については更に、エッチングにより露出したSi基板をTMAH (Tetramethylammonium hydroxide) により更にエッチングした。Siエッチングの間は、表面側のpoly Siのエッチングを防ぐため、ウエハ表面を保護膜 (ProTEK (登録商標) B3 primer 及びProTEK (登録商標) B3、Brewer Science 社製) で覆った。

[0082] 次に、当該保護膜を取り除いた後、500nm四方で露出しているpoly Si層を NH_4OH 溶液で取り除いた。これにより、膜厚5nmの Si_3N_4 薄膜が露出した仕切り体を得られた。SiOが犠牲層に選択された場合は、BHF溶液 ($\text{HF} : \text{NH}_4\text{F} = 1 : 60$) によるエッチングにより薄膜が露出される。この段階では、薄膜にナノポアは設けられていない。

[0083] 以下の手順でナノポアを形成した。上記の仕切り体を生体分子分析デバイス等にセットする前に、ピラニア溶液 ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 = 3 : 1$) に3分間浸漬することで Si_3N_4 薄膜を親水化した。浸漬後は5分以上純水にて流水洗浄を行った。親水化は Ar/O_2 plasma (サムコ社製) により、10W、20sccm、20Pa、45secの条件でも実施可能である。次に、生体分子分析デバイスに仕切り体をセットした。その後、薄膜を挟む上下の液槽を、ナノポア形成溶液で満たし、各液槽のそれぞれに電極を導入した。電極としては銀塩化銀電極を用いた。ナノポア形成溶液の溶媒としては水を用いた。

[0084] 電圧の印加は、ナノポアの形成時だけでなく、ナノポアが形成された後にナノポアを介して流れるイオン電流の計測時にも行われる。ここでは、下側に位置する液槽を cis 槽と呼び、上側に位置する液槽を trans 槽と呼ぶ。また、cis 槽側の電極に印加する電圧 V_{cis} を 0V に設定し、trans 槽側の電極に電圧 V_{trans} を印加する。電圧 V_{trans} は、パルス発生器 (例えば 41501B SMU AND Pulse Generator Expander、アジレントテクノロジー社製) により発生する。

[0085] パルス印加後の電流値は、電流計 (例えば 4156B PRECISION SEMICONDUCTOR ANALYZER、アジレントテクノロジー社製) で読み取ることができる。パルス電圧の印加前に形成されたナノポアの直径に応じて電流値条件 (閾値電流) を選択し、順次、ナノポアの直径を大きくしつつ、目的とする直径を得ることができる。

[0086] ナノポアの直径は、イオン電流値から見積もることができる。条件選択の基準は表 1 の通りである。

[0087]

[表1]

表 1. 電圧印加条件

パルス電圧印加前の ナノポア径	非開口～Φ0.7 nm	～Φ1.4 nm	～Φ1.5 nm
印加電圧 (V_{cis}) [V]	5	3	2.5
初期印加時間 [s]	0.01	0.01	0.001
閾値電流	0.2 nA / 0.4 V	0.5 nA / 0.1 V	0.6 nA / 0.1 V

[0088] ここで、 n 番目のパルス電圧印加時間 t_n (ただし、 $n > 2$ の整数。) は、次式で決定される。

[0089] [数1]

$$t_n = 10^{-3+(1/6)(n-1)} - 10^{-3+(1/6)(n-2)} \quad \text{For } n > 2$$

[0090] [実験例 1 : 計測溶液の変更]

(実施例 1)

実施例 1 において、ナノポア形成溶液として、1 M $\text{CaCl}_2 + 10 \text{ mM}$ Tris 溶液 (pH 7.5) を用いて、ナノポアを形成した。その後、ナノポア形成溶液を排出し、計測溶液として、0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0.5 \text{ M}$ $\text{KCl} + 10 \text{ mM}$ Tris 溶液 (pH 7.5) に置換した。計測溶液に置換後、ベースライン電流の時間変化を計測した。その後、ssDNA (polyT 60mer) を添加してイオン電流の時間変化を計測した。

[0091] (比較例 1)

比較例 1 においては、計測溶液として 1 M $\text{KCl} + 1 \times \text{TE}$ 溶液を用いたこと以外は実施例 1 と同様にして、ベースライン電流の時間変化と、ssDNA (polyT 60mer) の添加後のイオン電流の時間変化とを計測した。

[0092] (結果)

図 4 は、実験例 1 の結果を示すグラフである。図 4 (a) は、比較例 1 における ssDNA 添加前のベースライン電流を示し、図 4 (b) は、比較例

1におけるssDNA添加後のイオン電流を示す。図4(c)は、実施例1におけるssDNA添加前のベースライン電流を示し、図4(d)は、実施例1におけるssDNA添加後のイオン電流を示す。

[0093] 図4(a)及び(c)に示されるように、比較例1では、KCl溶液に置換した際のベースラインノイズが $I_{rms} = 4.68 \text{ pA}$ (LPF 100 Hz)であるのに対して、実施例1では、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 混合液に置換した際のベースラインノイズが $I_{rms} = 1.22 \text{ pA}$ (LPF 100 Hz)まで低減した。

[0094] また、図4(b)及び(d)に示されるように、実施例1において $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 混合液中で取得したssDNA由来の封鎖信号量は、比較例1においてKCl溶液中で取得したssDNA由来の封鎖信号量と比較して、封鎖量のヒストグラム分布にピークを確認することができるまでに均一になった。

[0095] [実験例2：ナノポア形成溶液の変更]

(実施例2)

実施例2において、ナノポア形成溶液として、0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液を用いてナノポアを形成した。ここで、別の溶液に置換せずに、ベースライン電流の時間変化を計測した。その後、ナノポア形成溶液を排出し、計測溶液として、1 M KCl溶液に置換した。計測溶液に置換後、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0096] (比較例2)

比較例2においては、1 M $\text{CaCl}_2 + 10 \text{ mM Tris}$ 溶液 (pH 7.5)を用いてナノポアを形成した。その後、ナノポア形成溶液を排出し、計測溶液として、1 M KCl溶液に置換した。計測溶液に置換後、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0097] (結果)

図5は、実験例2の結果を示すグラフである。図5(a)は、比較例2におけるベースライン電流を示している。図5(b)は、実施例2において1

M K C l 溶液に置換後のベースライン電流を示す。図5 (a) 及び (b) に示されるように、比較例2では、C a C l₂ 溶液でナノポア形成した際のベースライン電流ノイズが $I_{rms} = 4.68 \text{ pA}$ であったのに対し、実施例2では、0.5 M (N H₄)₂ S O₄ 溶液でポア形成した際のベースラインノイズが $I_{rms} = 3.13 \text{ pA}$ まで低減した。このことから、上述の実施例1の効果は、絶縁破壊によるポア形成時に用いる電解質に硫酸アンモニウム添加溶液を用いた場合にも確認できたことがわかる。

[0098] 図5 (c) は、実施例2においてナノポア形成後に溶液を置換せずに測定したベースライン電流を示している。このときのベースラインノイズは $I_{rms} = 2.62 \text{ pA}$ であり、図5 (b) の場合よりもさらにベースラインノイズが低減したことがわかる。

[0099] 以上の実験例1 及び2の結果から、絶縁破壊によるナノポア形成時、及び、イオン電流計測時、またはこれらの両方において (N H₄)₂ S O₄ を含む溶液を用いることで、イオン電流計測時の R T N が抑制できることが確認できた。

[0100] [実験例3：基質の導入]

D N A の塩基配列をイオン電流にて解析する際、D N A のナノポアの通過速度をアンプの応答速度以下に抑制する必要がある。実現手段の一つは、例えば、分子モータの一つであるポリメラーゼを用いてD N A をナノポア近傍で搬送させることである。ポリメラーゼはD N A の搬送のために基質を必要とする。基質はd N T P 等である。ナノポアデバイスを用いた解析では、c i s 槽内の電解質にd N T P を溶解しておくことで、ポリメラーゼの駆動を実現する。しかしながらこの基質はマイナス電荷を帯びているため、ナノポアを通過できる。また、生体ポリマの配列解読のために微小なポアを形成しているため、基質も信号として取得できてしまう。

[0101] そこで、本実験例においては、計測溶液にポリメラーゼ駆動のためのバッファ及び基質を混入させた場合のベースライン電流を計測する。

[0102] (実施例3)

上記の条件で作成した3つのナノポアデバイス（*device 1*～3）において、それぞれナノポア形成後、計測溶液として0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.5 M KCl + 1×buffer + 100 μM dNTP溶液を用いて、ベースライン電流の時間変化を計測した。dNTPの濃度を1 mMとした場合も同様に、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0103] （比較例3）

ナノポア形成後、計測溶液として1 M KCl + 1×buffer + 10 mM MgCl_2 + 100 μM dNTP溶液を用いて、ベースライン電流の時間変化を計測した。KClの濃度を3 Mとした場合も同様に、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0104] （結果）

図6は、実験例3の結果を示すグラフである。図6（a）は、比較例3におけるベースライン電流を示している。図6（a）に示すように、ポア電流に100～200 pA程度の抵抗成分が入り封鎖信号に対しても重畳している様子が見られる。

[0105] 図6（b）は、実施例3においてdNTP濃度が100 μMである場合のベースライン電流を示している。図6（b）に示すように、図6（a）と比較して、ベースラインに重畳していた基質由来のノイズは減少したことがわかる。図6（b）において、ベースライン電流のノイズは平均して24 pA（LPF 1 kHz）であった。

[0106] 図6（c）は、実施例3においてdNTP濃度が1 mMである場合のベースライン電流を示している。図6（c）に示すように、基質濃度1 mMまで添加しても、50 pA程度のノイズレベルとなり、比較例3のノイズレベルに対し、30%程度抑えられることが分かった。

[0107] [実験例4：分子モータの活性の確認]

本実験例においては、液温37℃の計測溶液でのポリメラーゼの伸長反応活性を確認する。

[0108] （実施例4）

1 x DNA polymerase buffer (バッファ) に対し、100 μ M dNTPと、0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.4 M又は0.5 Mの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ とを添加して、計測溶液とした。鋳型／プライマ濃度は250 nMとした。

[0109] (比較例4)

実施例4の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の代わりに、0.15 M、0.2 M、0.3 M、0.5 M又は1 MのKClを用いて、計測溶液とした。

[0110] (活性の確認)

酵素の活性を知るために、まず等温増幅過程において、DNAの伸長に伴い取り込まれる蛍光強度の時間依存性から、酵素の反応速度を取得し、酵素添加量に対する依存性を求めた。

[0111] 図7(a)は、KCl(比較例4)の塩濃度を変えた際の、酵素添加量に応じた蛍光強度増加速度、すなわち反応速度(/time)の変化を示している。図7(b)は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (実施例4)の塩濃度を変えた際の、酵素添加量に応じた蛍光強度増加速度、すなわち反応速度(/time)の変化を示している。各条件は、酵素添加量が多くなるほど、反応速度が速くなるため、右肩上がりとなる。

[0112] ここで、添加塩濃度が高くなると、一分子の酵素活性が下がってしまうため、同じDNA長を得る際に必要とされる時間が長くなり、また酵素集団中の失活率が上がるため、必要な酵素添加量も増える傾向にある。

[0113] このように、代表的に、図7(a)及び(b)の傾きが大きいほど、酵素活性が高く、傾きが低いほど酵素活性が低いとみなすことができる。そのため、各塩種、塩濃度における、酵素の活性を比較するため、図7(a)及び図7(b)で得られた各塩種、塩濃度におけるグラフの傾きを求め、規格化傾きとする。

[0114] 図7(c)は、使用した溶液のイオン強度に応じて規格化傾きをプロットしたグラフである。なお、バッファのイオン強度が0.075 Mであるため、これを各点の電解質濃度に足している。また、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の場合は、

塩濃度の2倍をイオン強度とみなしてプロットしている。

[0115] 図7(c)より、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ （実施例4）においては、塩添加無し時に対して、イオン強度0.5Mまで活性が変化しないことが分かった。これは従来使用されてきたKCl（比較例4）の場合はイオン強度0.3Mまで活性が変化しないのに対し、より多くの塩が添加できることを意味している。これはナノポアを用いたイオン電流計測においてはSNを確保する点においても有用な知見である。

[0116] [実験例5：硫酸アンモニウムの添加量及び添加率の変更]

本実験例においては、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の添加量及び添加率を変えた場合の、ノイズ低減効果の変化を確認する。

[0117] (実施例5)

実施例5において、電解質（塩）として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ のみを用い、総塩濃度が0.2M及び0.05Mの計測溶液（硫酸アンモニウムの割合が100%）を準備した。また、総塩濃度を0.2Mとして、0.05M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0.15\text{M KCl}$ 溶液（硫酸アンモニウムの割合が25%）と、0.012M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0.188\text{M KCl}$ 溶液（硫酸アンモニウムの割合が6%）とを準備した。

[0118] CaCl_2 溶液をナノポア形成溶液としてナノポアを形成した後、総塩濃度に対する硫酸アンモニウム濃度の割合が100%の計測溶液（0.2M及び0.05M）、総塩濃度に対する硫酸アンモニウム濃度の割合が25%の計測溶液、総塩濃度に対する硫酸アンモニウム濃度の割合が6%の計測溶液のそれぞれに置換して、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0119] (比較例5)

比較例5においては、 CaCl_2 溶液をナノポア形成溶液としてナノポアを形成した後、1M KCl溶液に置換して、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0120] (結果)

図8は、実験例5の結果を示すグラフである。図8(a)は、比較例5の

結果を示しており、図8（b）は実施例5の結果を示している。

[0121] 図8（b）に示すように、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の塩濃度が下がることでノイズが上昇することが分かった。また、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の濃度が0.05M以上であることにより、ノイズの低減効果が高いことが分かる。また、同じ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度であっても、KClが存在することでノイズ量の明らかな上昇が確認されるものではない。また、塩濃度の合計に対する $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の割合が25%以上の場合に、ノイズの低減効果が高いことが分かる。

[0122] [実験例6：基質の導入時の硫酸アンモニウムの添加量及び添加率の変更]
(実施例6)

実施例6においては、実施例5の各計測溶液に対し100 μM のdNTPを添加した。それ以外は実施例5と同様にして、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0123] (比較例6)

比較例6においては、比較例5の各計測溶液に対し100mMのdNTPを添加した。それ以外は比較例5と同様にして、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0124] (結果)

図9は、実験例6の結果を示すグラフである。図9（a）は、比較例6の結果を示しており、図9（b）は実施例6の結果を示している。

[0125] 図9（a）及び（b）に示すように、いずれの塩添加量、及び塩添加率においても、計測溶液が $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む場合（実施例6）は基質由来のノイズが抑制されることが確認された。図9（a）における $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の添加率が6%未満であることを踏まえると、少なくとも12mM以上または6%以上の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含むことで、ノイズの低減効果が向上することがわかる。

[0126] [実験例7： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液でのナノポア形成]
(実施例7)

実施例7において、ナノポア形成溶液として、0.05M $(\text{NH}_4)_2\text{S}$

$\text{O}_4 + 0.15 \text{ M KCl}$ 溶液（硫酸アンモニウムの割合が25%）を用いて、絶縁破壊によるナノポア形成を行った。その後、計測溶液として1 M KCl 溶液に置換して、ベースライン電流の時間変化を計測した。計測溶液として1 M KCl + 100 mM dNTP 溶液に置換した場合も同様に、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0127] 図10は、実験例7の結果を示すグラフである。図10の左図に示すように、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液でナノポア形成後、1 M KCl 溶液に置換した場合、ノイズ量は35.7 pAとなり、十分にノイズを抑制できていることが分かった。また、図10の右図に示すように、dNTPを含む溶液に置換した場合にも、dNTP由来のノイズを抑制できていることが分かった。したがって、少なくとも添加率25%の硫酸アンモニウム添加溶液を絶縁破壊の際に用いるナノポア形成試薬として用いることにより、ノイズ低減の効果が期待されることが分かる。

[0128] [実験例8：電解質の変更]

以上の実験例においては、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを生成する電解質（塩）として硫酸アンモニウムを使用した。これに対し、本実験例8においては、アンモニウムイオン源として塩化アンモニウムを用い、硫酸イオン源として硫酸マグネシウムを用いることとする。

[0129] （参考例1）

参考例1において、ナノポア形成溶液として、1 M $\text{CaCl}_2 + 10 \text{ mM Tris}$ 溶液（pH 7.5）を用いて、ナノポアを形成した。その後、ナノポア形成溶液を排出し、計測溶液として、0.2 M MgSO_4 溶液に置換した。計測溶液に置換後、ベースライン電流の時間変化を計測した。計測溶液として、0.2 M NH_4Cl 溶液に置換した場合も同様に、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0130] （比較例8）

比較例8においては、計測溶液として1 M KCl + 1×TE 溶液を用いたこと以外は実施例8と同様にして、ベースライン電流の時間変化を計測し

た。

[0131] (結果)

図11は、実験例8の結果を示すグラフである。図11(a)は、0.2 M MgSO_4 溶液を用いた場合におけるベースライン電流を示し、図11(b)は、0.2 M NH_4Cl 溶液を用いた場合におけるベースライン電流を示し、図11(c)は、KCl 溶液を用いた場合におけるベースライン電流を示している。図11に示すように、硫酸イオン又はアンモニウムイオンのいずれかを含む溶液の場合(参考例1)には、これらを含まない場合(比較例8)と比較して、ベースライン電流のノイズが小さいことがわかる。

[0132] [実験例9：基質の導入]

(参考例2)

参考例2において、参考例1の計測溶液のそれぞれに対し、100 μM dNTPを添加した。それ以外は参考例1と同様にして、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0133] (比較例9)

比較例9においては、比較例8の計測溶液に対し100 μM dNTPを添加したこと以外は比較例8と同様にして、ベースライン電流の時間変化を計測した。

[0134] (結果)

図12は、実験例9の結果を示すグラフである。図12(a)は、0.2 M $\text{MgSO}_4 + 100 \mu\text{M}$ dNTP 溶液を用いた場合におけるベースライン電流を示し、図12(b)は、0.2 M $\text{NH}_4\text{Cl} + 100 \mu\text{M}$ dNTP 溶液を用いた場合におけるベースライン電流を示し、図12(c)は、KCl + 100 μM dNTP 溶液を用いた場合におけるベースライン電流を示している。図12に示すように、硫酸イオン又はアンモニウムイオンのいずれかを含む溶液の場合(参考例2)には、これらを含まない場合(比較例9)と比較して、基質が混合されていたとしても、ベースライン電流のノイズが小さいことがわかる。

[0135] [変形例]

本開示は、上述した実施形態に限定されるものでなく、様々な変形例を含んでいる。例えば、上述した実施形態は、本開示を分かりやすく説明するために詳細に説明したものであり、必ずしも説明した全ての構成を備える必要はない。また、ある実施形態の一部を他の実施形態の構成に置き換えることができる。また、ある実施形態の構成に他の実施形態の構成を加えることもできる。また、各実施形態の構成の一部について、他の実施形態の構成の一部を追加、削除又は置換することもできる。

[0136] 本明細書中で引用した全ての刊行物及び特許文献の内容は、そのまま参照により本明細書中に組み込まれるものとする。

符号の説明

[0137] 1、2…生体分子分析装置、100、200…ナノポアデバイス、101…ナノポア、102…薄膜、103…電解質溶液、104A…第1の液槽、104B…第2の液槽、105A…第1の電極、105B…第2の電極、106…電流計、107…電源、108…コンピュータ、109…生体ポリマ、110…分子モータ

請求の範囲

- [請求項1] 薄膜と、前記薄膜により隔てられる第1の液槽及び第2の液槽と、前記第1の液槽に配置される第1の電極と、前記第2の液槽に配置される第2の電極と、を備える生体分子分析デバイスを準備することと、
- 前記第1の液槽及び前記第2の液槽にナノポア形成溶液が封入された状態で、前記第1の電極及び前記第2の電極間に第1の電圧を印加して、前記薄膜にナノポアを形成することと、を含み、
- 前記ナノポア形成溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする生体分子分析方法。
- [請求項2] ナノポアを有する薄膜と、前記薄膜により隔てられる第1の液槽及び第2の液槽と、前記第1の液槽に配置される第1の電極と、前記第2の液槽に配置される第2の電極と、を備える生体分子分析デバイスを準備することと、
- 前記第1の液槽及び前記第2の液槽に計測溶液が封入された状態で、前記第1の電極及び前記第2の電極間に電圧を印加して、前記第1の電極及び前記第2の電極間に流れる電流を計測することと、を含み、
- 前記計測溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする生体分子分析方法。
- [請求項3] 前記ナノポアの形成後、前記第1の液槽及び前記第2の液槽に計測溶液が封入された状態で、前記第1の電極及び前記第2の電極間に第2の電圧を印加して、前記第1の電極及び前記第2の電極間に流れる電流を計測することをさらに含み、
- 前記計測溶液は、前記アンモニウムイオン及び前記硫酸イオンを含むことを特徴とする請求項1記載の生体分子分析方法。
- [請求項4] 前記ナノポア形成溶液又は前記計測溶液は、硫酸アンモニウム溶液であり、

前記硫酸アンモニウムの濃度が0.01 M以上飽和濃度以下であることを特徴とする請求項1～3いずれか1項記載の生体分子分析方法。

[請求項5] 前記ナノポア形成溶液又は前記計測溶液は、硫酸アンモニウム溶液であり、

前記硫酸アンモニウムの濃度が0.01 M以上1 M以下であることを特徴とする請求項1～3いずれか1項記載の生体分子分析方法。

[請求項6] 前記ナノポア形成溶液又は前記計測溶液は、硫酸アンモニウム溶液であり、

前記硫酸アンモニウムの濃度が0.01 M以上0.2 M以下であることを特徴とする請求項1～3いずれか1項記載の生体分子分析方法。

[請求項7] 前記ナノポア形成溶液又は前記計測溶液は、塩として硫酸アンモニウム及び他の塩を含み、

前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、5%以上100%未満であることを特徴とする請求項1～3いずれか1項記載の生体分子分析方法。

[請求項8] 前記ナノポア形成溶液又は前記計測溶液は、塩として硫酸アンモニウム及び他の塩を含み、

前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、25%以上100%未満であることを特徴とする請求項1～3いずれか1項記載の生体分子分析方法。

[請求項9] 前記ナノポア形成溶液又は前記計測溶液は、塩として硫酸アンモニウム及び他の塩を含み、

前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、50%以上100%未満であることを特徴とする請求項1～3いずれか1項記載の生体分子分析方法。

[請求項10] 前記計測溶液がdNTPをさらに含むことを特徴とする請求項2又

は3記載の生体分子分析方法。

[請求項11] 前記dNTPの濃度が100 μ M以上であることを特徴とする請求項10記載の生体分子分析方法。

[請求項12] 前記電流を計測する際に、前記計測溶液に生体分子を導入することと、

前記電流の計測結果に基づいて、前記生体分子を分析することと、
をさらに含む請求項2又は3に記載の生体分子分析方法。

[請求項13] 前記生体分子は、核酸、タンパク質又はタンパク質が修飾された核酸であることを特徴とする請求項12記載の生体分子分析方法。

[請求項14] 前記薄膜は、SiN、SiO、Siのうち少なくとも1つを含むことを特徴とする請求項1～3いずれか1項記載の生体分子分析方法。

[請求項15] 絶縁破壊により薄膜にナノポアを形成する用途、及び前記ナノポアに生体分子を通過させて前記生体分子を分析する用途のうち少なくともいずれか一方に使用される生体分子分析試薬であって、

アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする生体分子分析試薬。

[請求項16] 前記生体分子分析試薬は、硫酸アンモニウム溶液であり、
前記硫酸アンモニウムの濃度が0.01M以上飽和濃度以下であることを特徴とする請求項15記載の生体分子分析試薬。

[請求項17] 前記硫酸アンモニウムの濃度が0.01M以上1M以下であることを特徴とする請求項16記載の生体分子分析試薬。

[請求項18] 前記硫酸アンモニウムの濃度が0.01M以上0.2M以下であることを特徴とする請求項17記載の生体分子分析試薬。

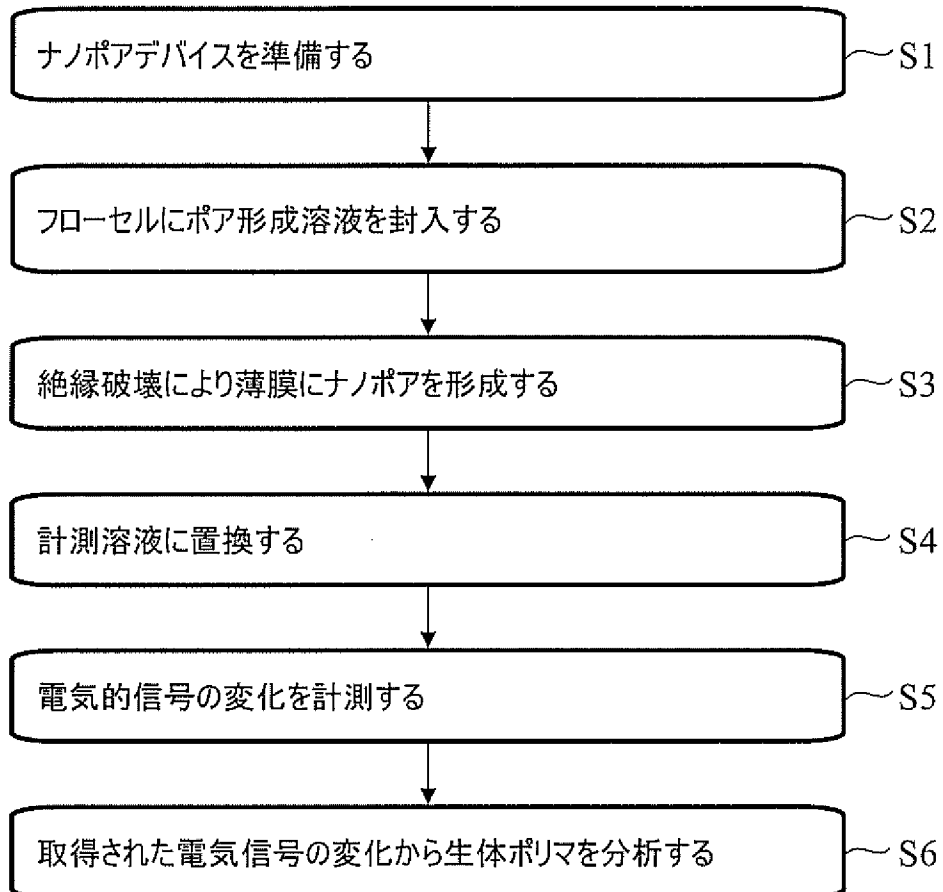
[請求項19] 前記生体分子分析試薬は、塩として硫酸アンモニウム及び他の塩を含み、

前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、5%以上100%未満であることを特徴とする請求項15記載の生体分子分析試薬。

- [請求項20] 前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、25%以上100%未満であることを特徴とする請求項19記載の生体分子分析試薬。
- [請求項21] 前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、50%以上100%未満であることを特徴とする請求項20記載の生体分子分析試薬。
- [請求項22] dNTPをさらに含むことを特徴とする請求項15記載の生体分子分析試薬。
- [請求項23] 前記dNTPの濃度が100 μ M以上であることを特徴とする請求項22記載の生体分子分析試薬。
- [請求項24] 薄膜と、
前記薄膜により隔てられ、電解質溶液を収容する第1の液槽及び第2の液槽と、
前記第1の液槽に配置される第1の電極と、
前記第2の液槽に配置される第2の電極と、を備え、
前記電解質溶液が、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする生体分子分析デバイス。

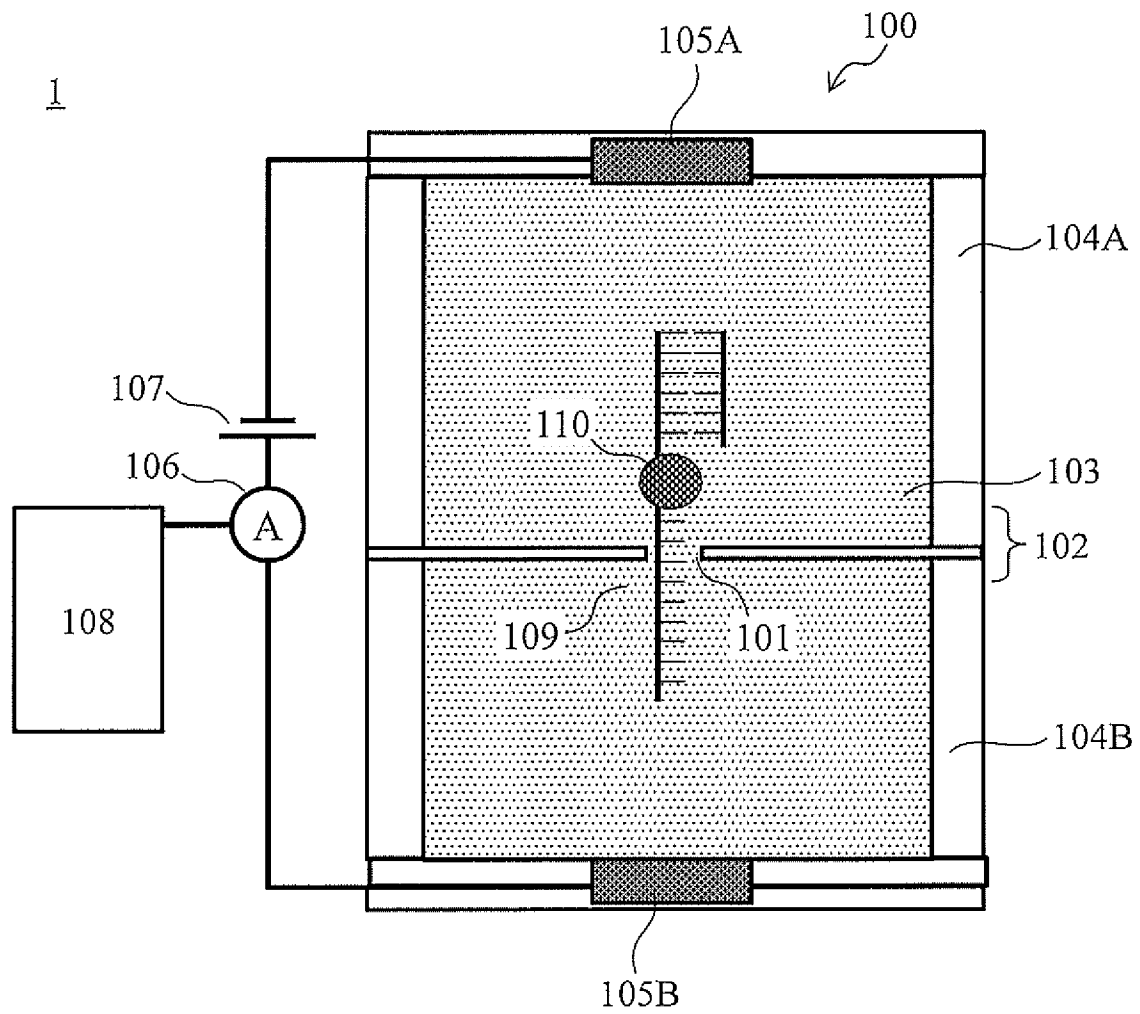
[図1]

図 1



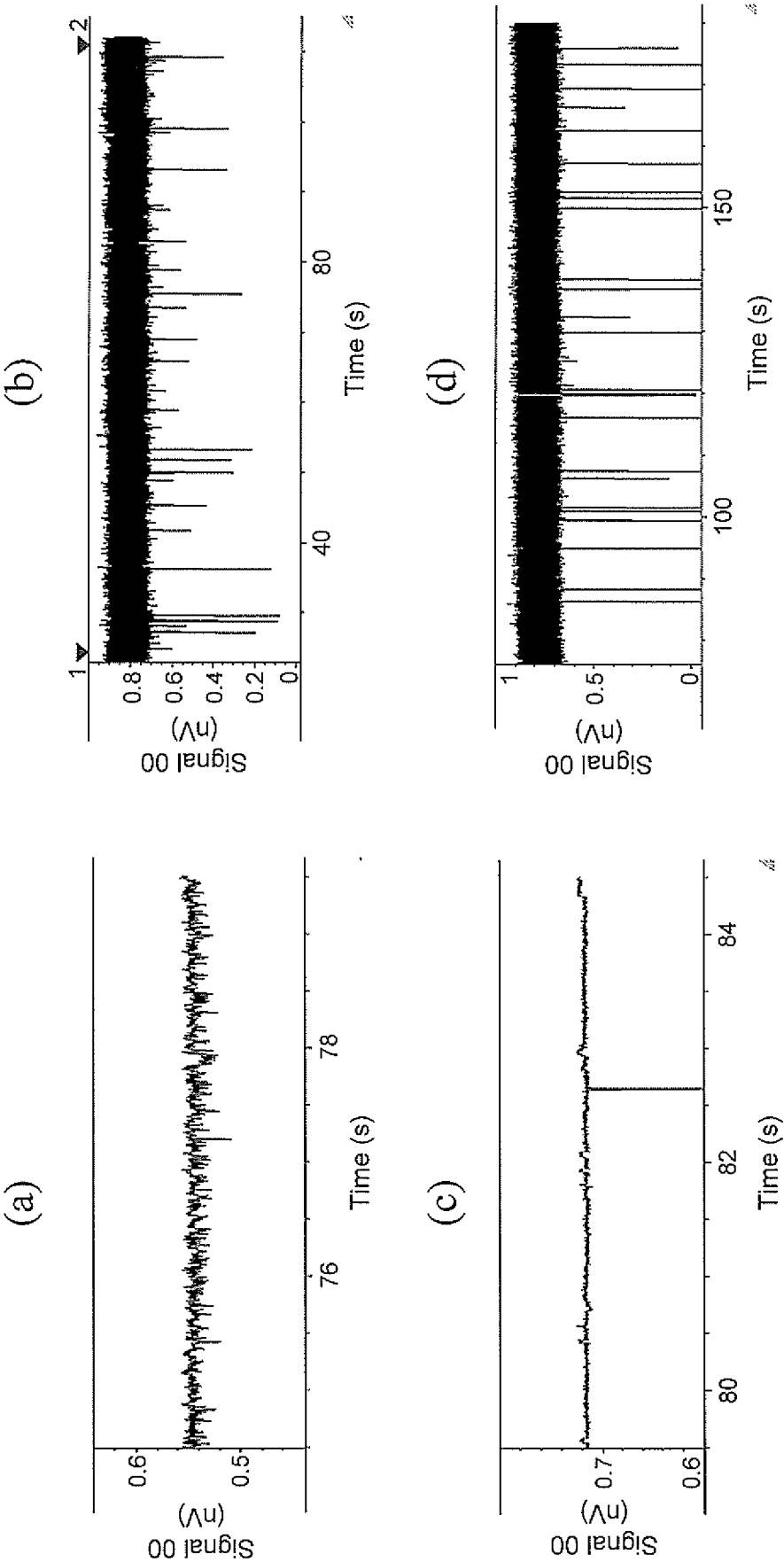
[図2]

図 2



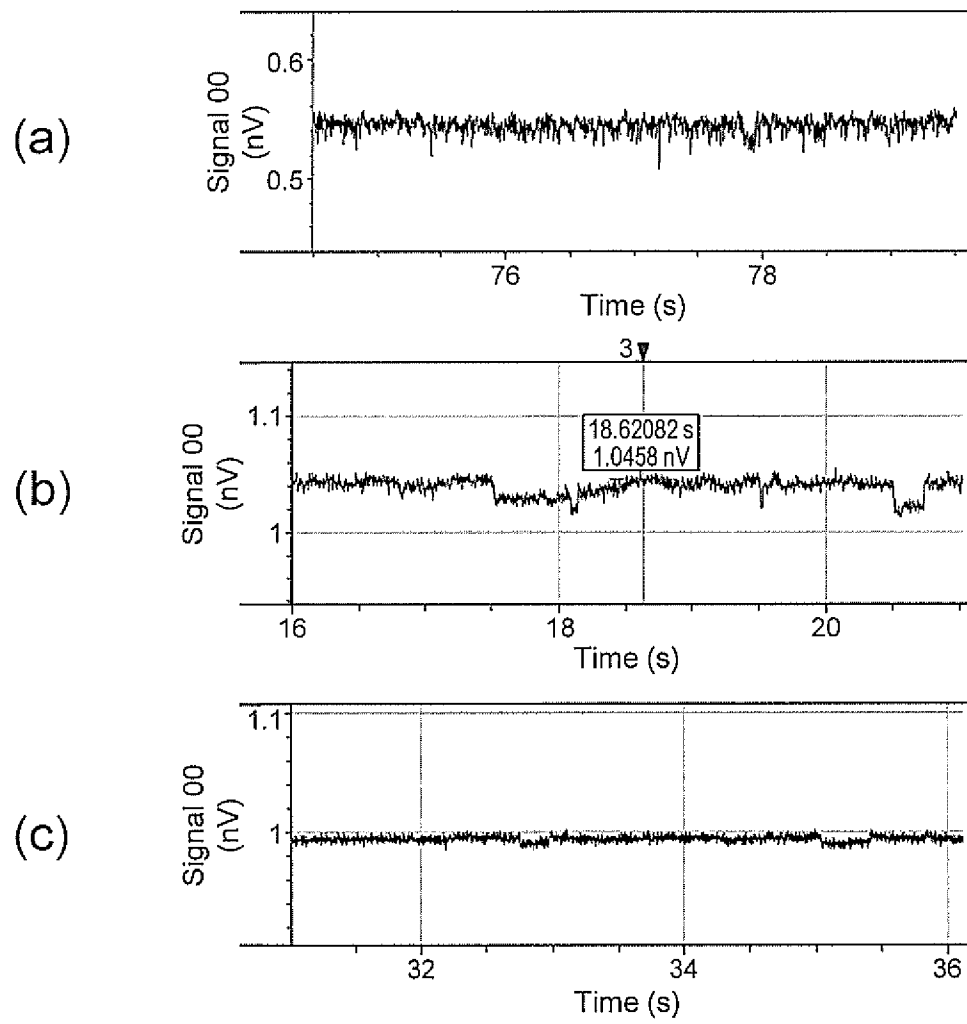
[図4]

図 4



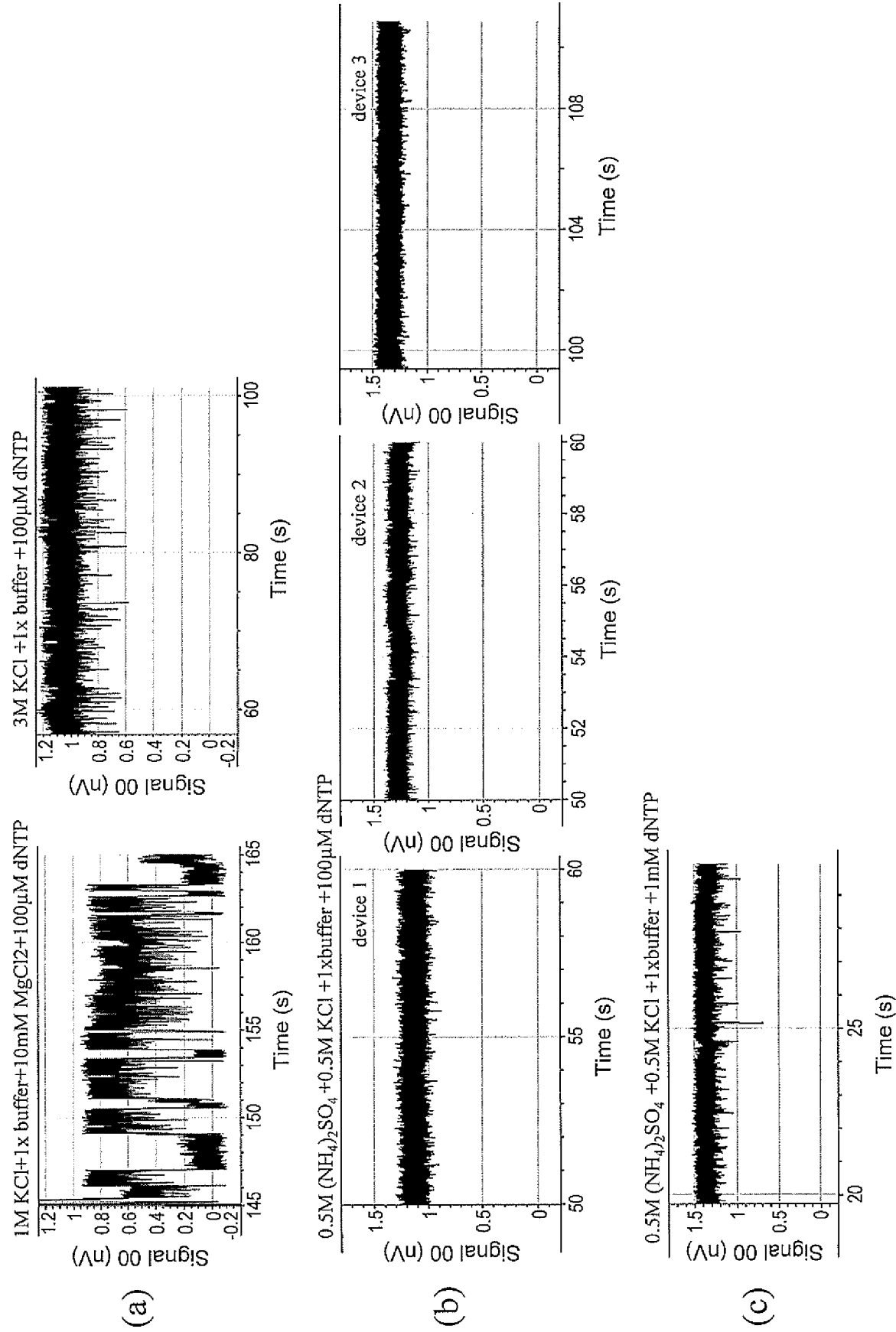
[図5]

図 5



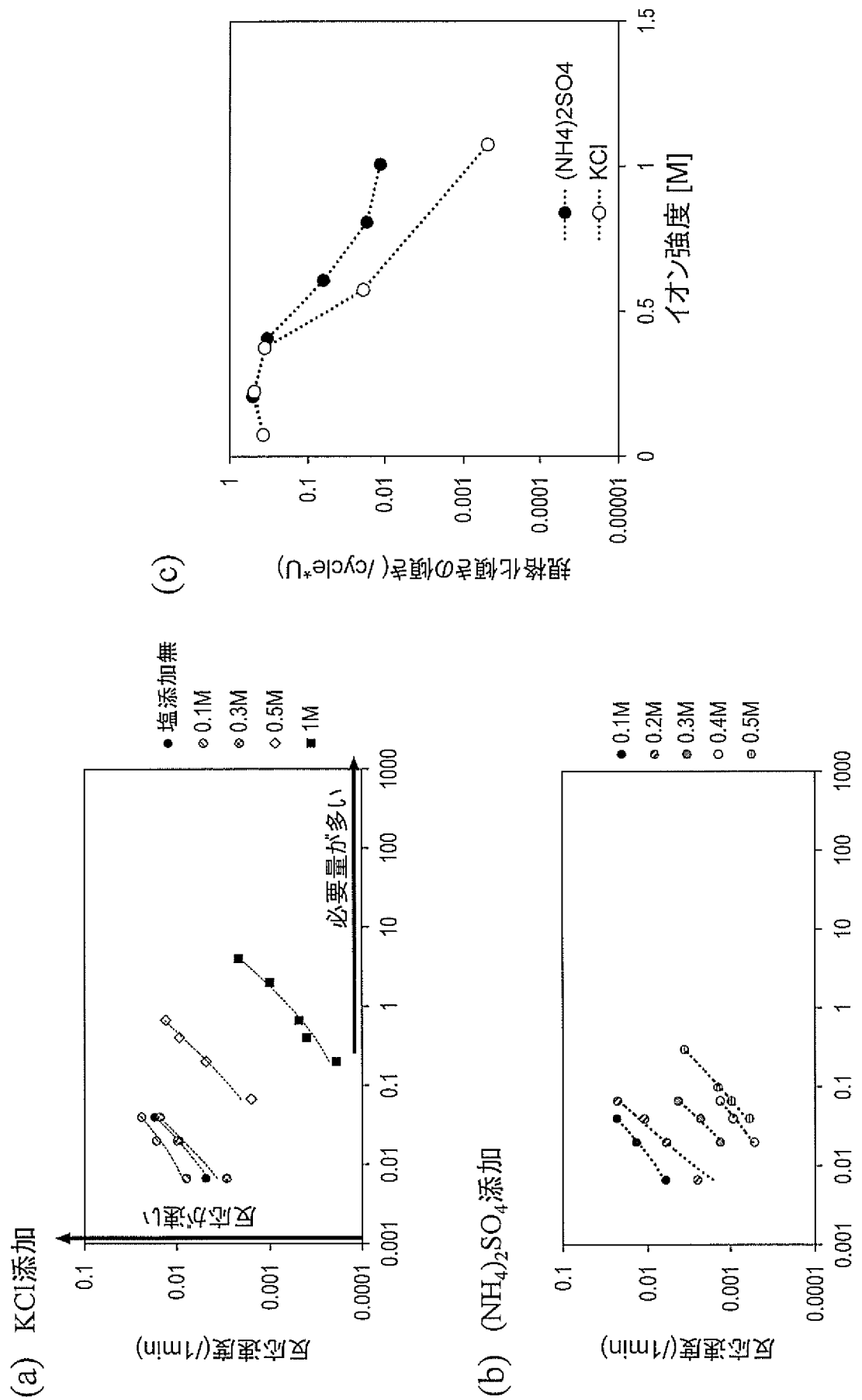
[図6]

図 6



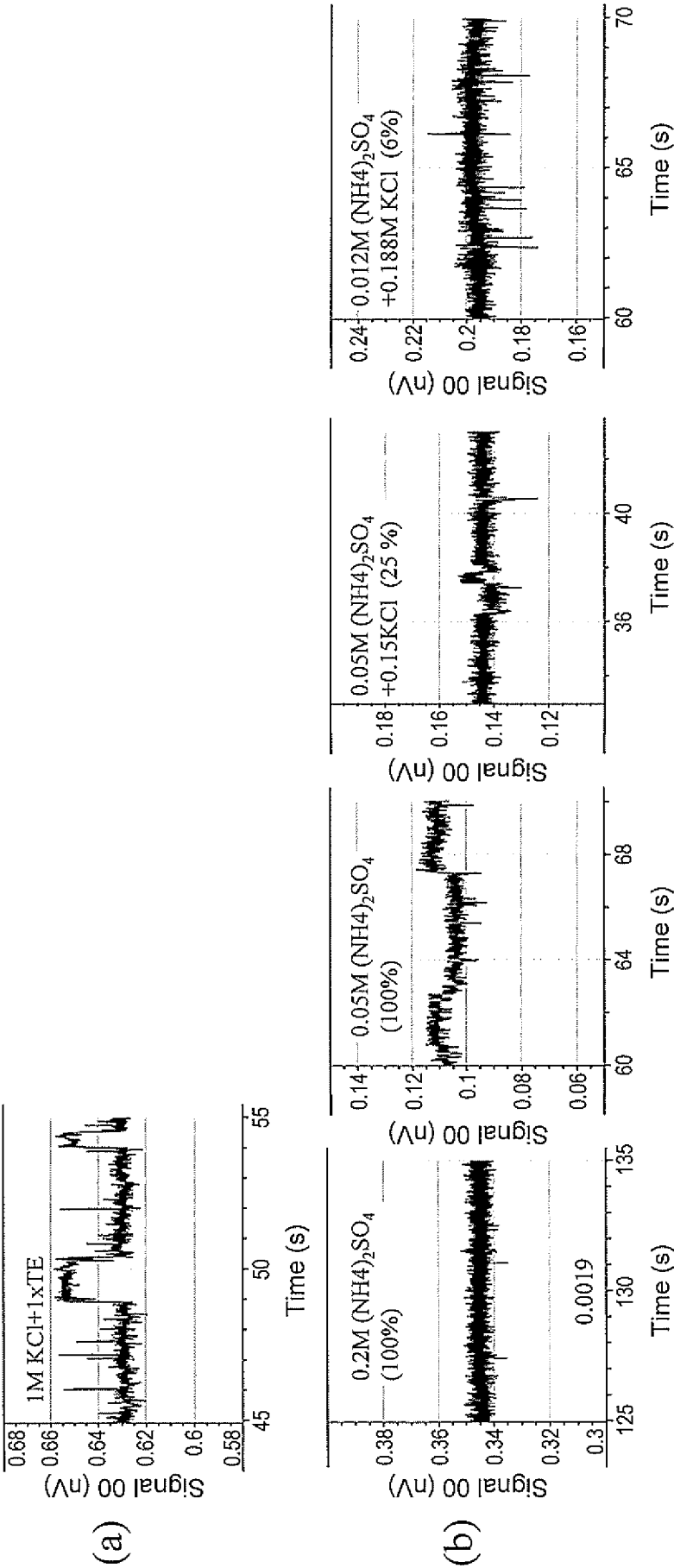
[図7]

図 7



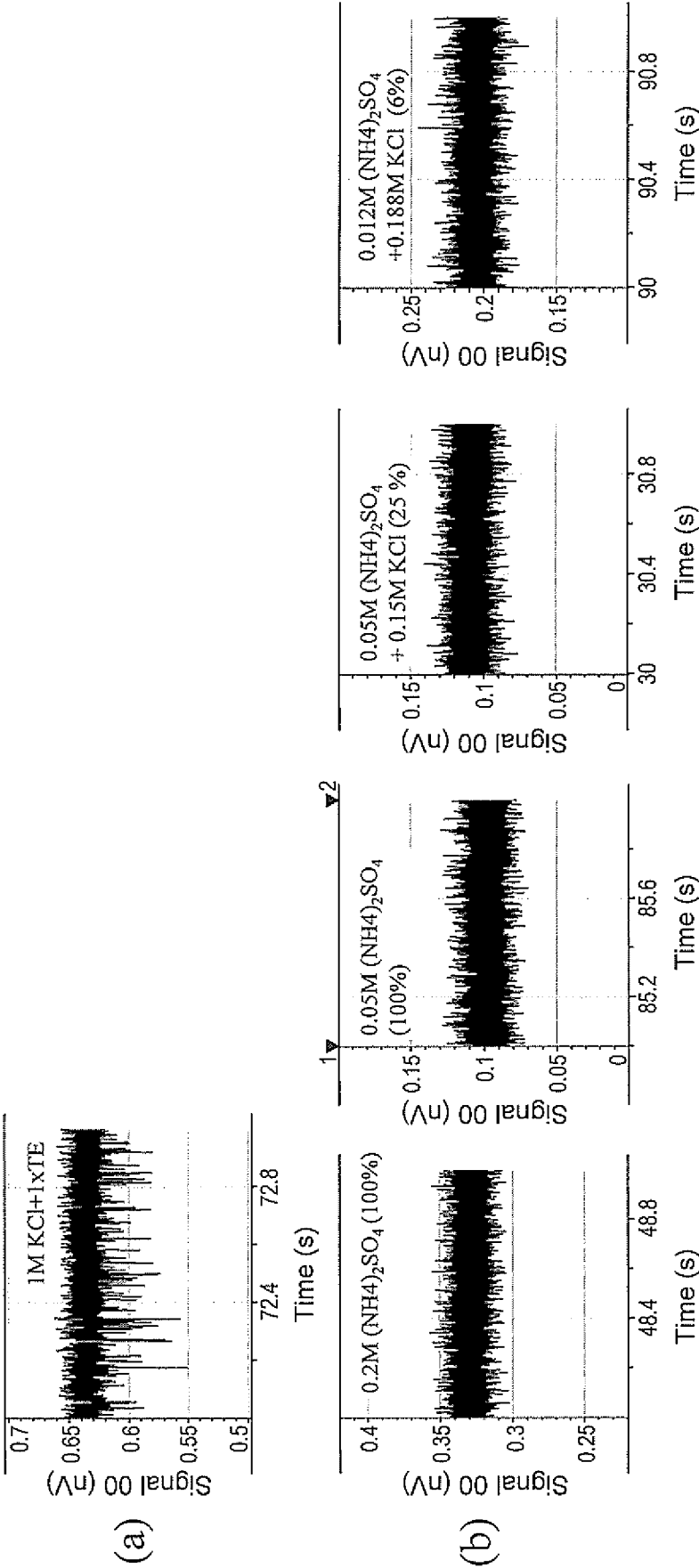
[図8]

8



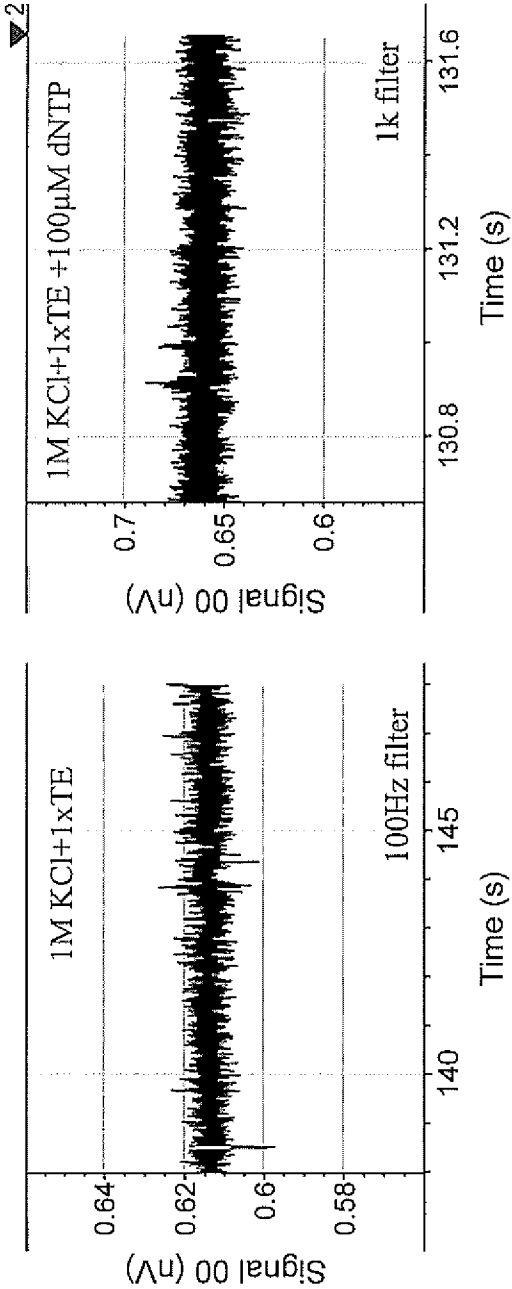
[図9]

図 9



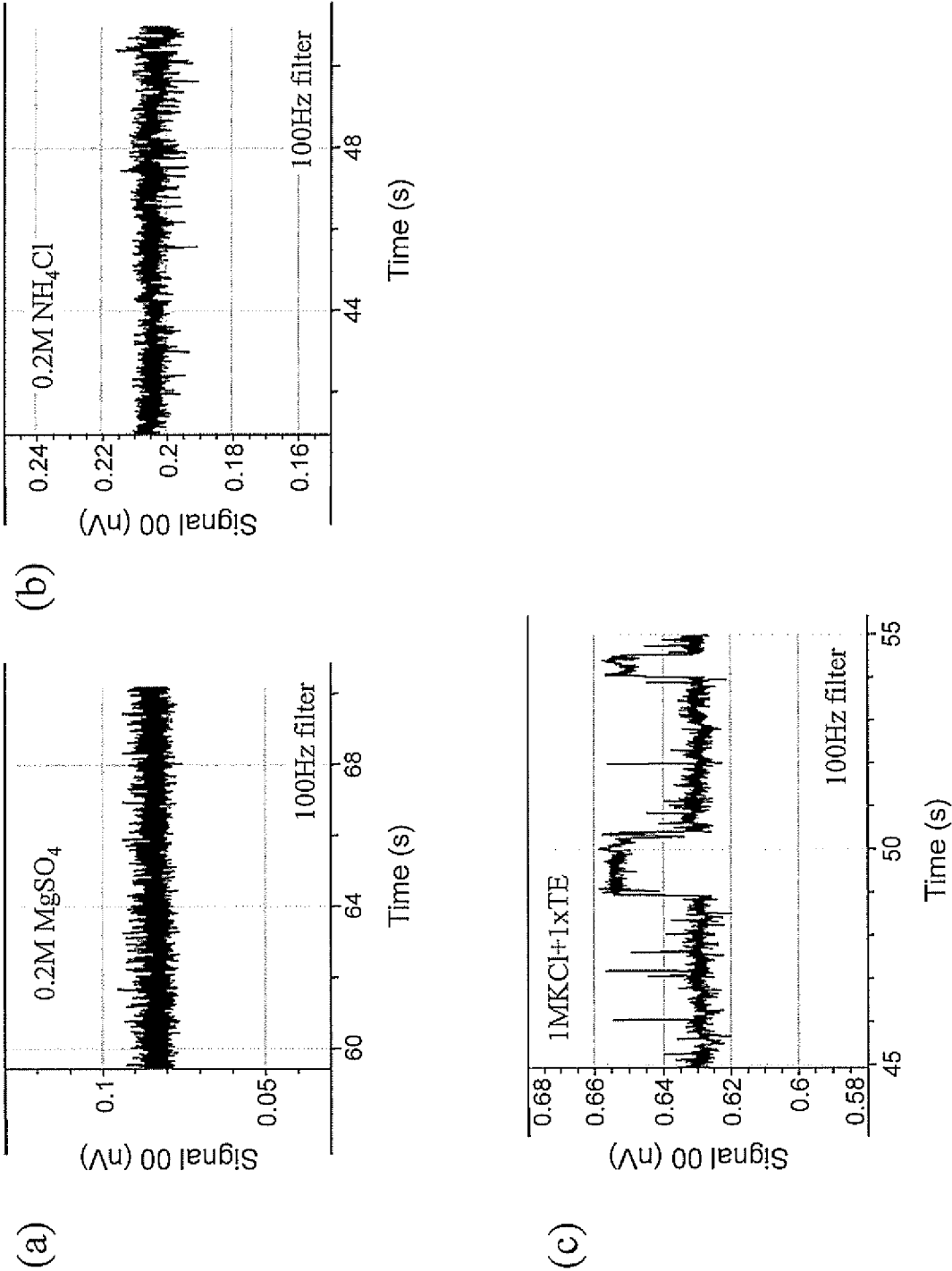
[図10]

図 10



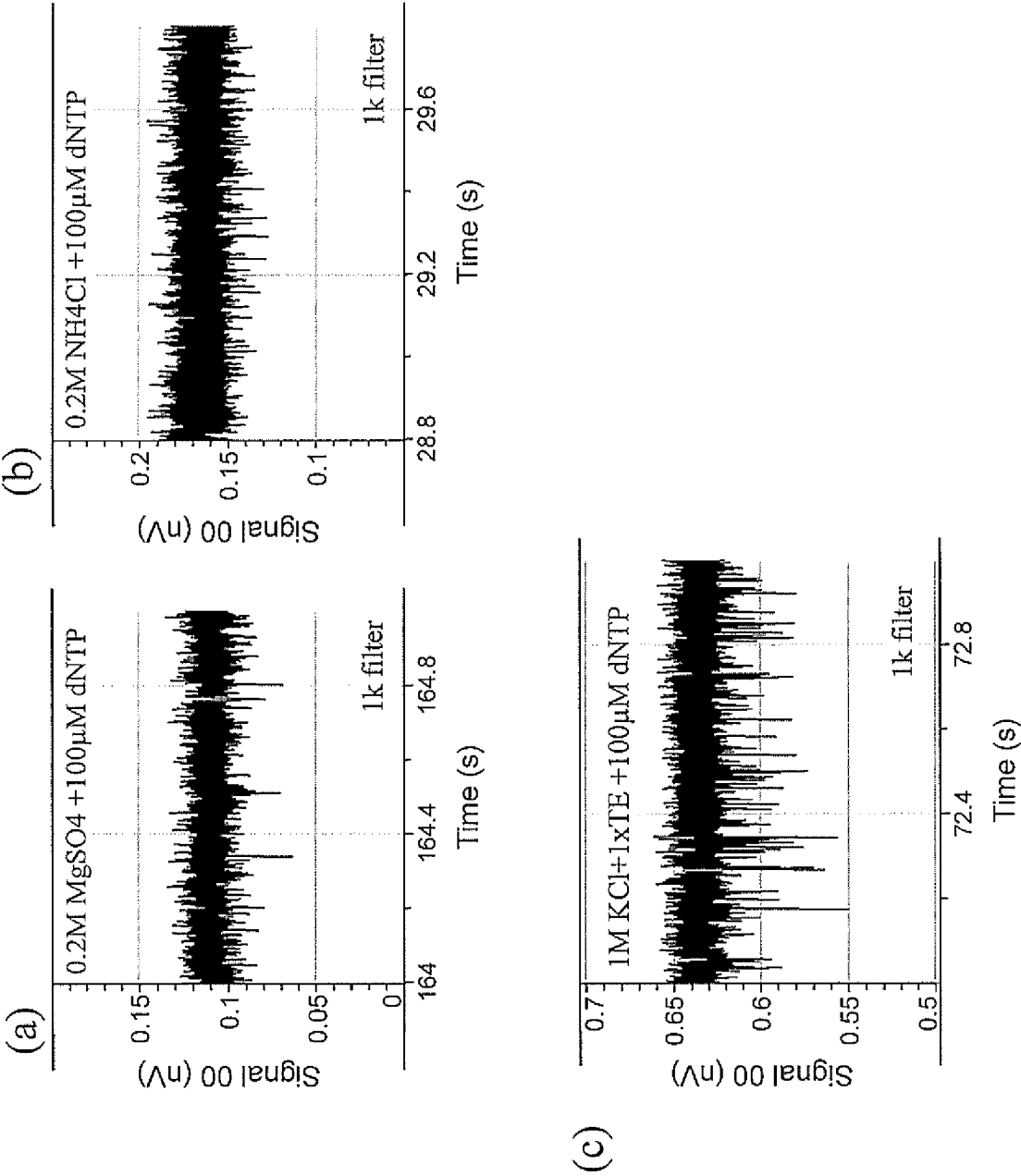
[図11]

図 11



[図12]

図 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/029403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. G01N27/00 (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)

Int. Cl. G01N15/00-15/14, G01N27/00-27/24, G01N33/483-33/497, C12M1/00-1/42, C12Q1/00-1/70

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 1971-2020

Registered utility model specifications of Japan 1996-2020

Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

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.
X	JP 2020-85578 A (HITACHI, LTD.) 04 June 2020, paragraphs [0017]-[0041], fig. 1, paragraphs [0017]-[0041], fig. 1	1-9, 12-21, 24
Y		10-11, 22-23
Y	WO 2020/044780 A1 (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORP.) 05 March 2020, paragraph [0037]	10-11, 22-23
A	JP 2016-522735 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HAVARD COLLEGE) 04 August 2016	1-24
A	JP 2015-517401 A (THE UNIVERSITY OF OTTAWA) 22 June 2015	1-24



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
06.10.2020

Date of mailing of the international search report
20.10.2020

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/JP2020/029403

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2020-85578 A	04.06.2020	(Family: none)	
WO 2020/044780 A1	05.03.2020	JP 2020-31557 A	
JP 2016-522735 A	04.08.2016	US 2014/0262820 A1	
		WO 2014/144818 A2	
		AU 2014228529 A	
		CA 2906781 A	
JP 2015-517401 A	22.06.2015	US 2015/0108008 A1	
		WO 2013/167952 A1	
		AU 2013257756 A	
		CA 2872600 A	
		CN 104411386 A	
		KR 10-2015-0037748 A	
		MX 2014013410 A	
		ES 2629952 T	
		BR 112014027829 A	
		SG 11201407249X A	

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）） G01N15/00-15/14; G01N27/00-27/24; G01N33/483-33/497; C12M1/00-1/42; C12Q1/00-1/70 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table> 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)			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年													
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												
X	JP 2020-85578 A (株式会社日立製作所) 04.06.2020 (2020 - 06 - 04) 段落 [0017] - [0041] , 図1	1-9, 12-21, 24												
Y	段落 [0017] - [0041] , 図1	10-11, 22-23												
Y	WO 2020/044780 A1 (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 05.03.2020 (2020 - 03 - 05) 段落 [0037]	10-11, 22-23												
A	JP 2016-522735 A (プレジデント アンド フェローズ オブ ハーバード カレッジ) 04.08.2016 (2016 - 08 - 04)	1-24												
A	JP 2015-517401 A (ジ ユニバーシティ オブ オタワ) 22.06.2015 (2015 - 06 - 22)	1-24												
☐ 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。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"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	"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"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	"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	"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	"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）	"&" 同一パテントファミリー文献	"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	
* 引用文献のカテゴリー	"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													
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"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													
"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	"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													
"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）	"&" 同一パテントファミリー文献													
"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														
国際調査を完了した日 06.10.2020	国際調査報告の発送日 20.10.2020													
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） 蔵田 真彦 2W 3602 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/JP2020/029403

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2020-85578	A	04.06.2020	(ファミリーなし)			
WO	2020/044780	A1	05.03.2020	JP	2020-31557	A	
JP	2016-522735	A	04.08.2016	US	2014/0262820	A1	
				WO	2014/144818	A2	
				AU	2014228529	A	
				CA	2906781	A	
JP	2015-517401	A	22.06.2015	US	2015/0108008	A1	
				WO	2013/167952	A1	
				AU	2013257756	A	
				CA	2872600	A	
				CN	104411386	A	
				KR	10-2015-0037748	A	
				MX	2014013410	A	
				ES	2629952	T	
				BR	112014027829	A	
				SG	11201407249X	A	