

(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
2012年4月5日(05.04.2012)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2012/043028 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/65 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01) G01N 37/00 (2006.01)
B82Y 15/00 (2011.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/066582
- (22) 国際出願日: 2011年7月21日(21.07.2011)
- (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 2010-218623 2010年9月29日(29.09.2010) 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): 小澤 理(OZAWA Satoshi) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP). 穴沢 隆(ANAZAWA Takashi) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社

日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP). 赤堀 玲奈(AKAHORI Rena) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP). 高橋 智(TAKAHASHI Satoshi) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市市毛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). 大浦 剛(OHURA Takeshi) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市市毛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). 木口 雅史(KIGUCHI Masashi) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19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, 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, JP, 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,

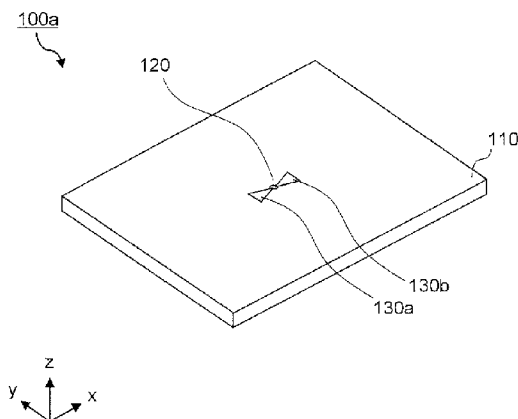
[続葉有]

(54) Title: BIOPOLYMER OPTICAL ANALYSIS DEVICE AND METHOD

(54) 発明の名称: 生体ポリマーの光学的解析装置及び方法

[図9]

図9



(57) Abstract: The present invention provides a device and method for analysing the characteristics of a biopolymer with excellent mechanical stability, high spatial resolution and sensitivity using a simple device construction. Specifically, the Raman scattered light of a biopolymer is measured and the properties of monomer units forming the biopolymer are analysed by using a biopolymer property analysis chip (100a) characterized by comprising: a solid substrate (110); at least one nanopore (120) disposed in the solid substrate (110); and one or more electrically conductive thin films (130a, 130b) disposed on the solid substrate (110). The biopolymer property analysis chip (100a) is characterized in that the electrically conductive thin films (130a, 130b) are disposed in the part of the solid substrate (110) where the nanopore (120) is formed and a biopolymer which has penetrated into the nanopore (120) is caused to generate Raman scattered light by means of irradiation with external light.

(57) 要約: 本発明は、機械的安定性に優れ、高い空間分解能及び感度で、かつ簡単な装置構成で、生体ポリマーの特性を解析するためのデバイス及び方法を提供する。具体的には、本発明では、固体基

板 110 と、固体基板 110 に設けられた少なくとも 1 つのナノポア 120 と、固体基板 110 に配置された少なくとも 1 つの導電性薄膜 130a、130b とを備え、固体基板 110 のナノポア 120 を形成する一部に導電性薄膜 130a、130b が設けられ、外部光を照射することにより、ナノポア 120 に進入した生体ポリマーのラマン散乱光を発生させることを特徴とする生体ポリマーの特性解析チップ 100a を用いて、生体ポリマーのラマン散乱光を計測し、生体ポリマーを構成するモノマー単位の特性を解析する。



WO 2012/043028 A1



PL, PT, RO, RS, RU, 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.

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).

(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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：生体ポリマーの光学的解析装置及び方法

技術分野

[0001] 本発明は、ナノサイズのポアが開いたチップ状のデバイスを用いて生体ポリマーの特性を解析するための装置及び方法に関する。本発明は特に、ナノポアチップにおいて近接場を形成し、核酸などの生体ポリマーを標識することなく光学的に検出することにより特性解析を行うためのデバイス、装置及び方法に関する。

背景技術

[0002] 次々世代DNAシーケンサを実現するアプローチとしてナノポアを用いる手法が注目を集めている。DNAを標識することなく、換言すると酵素や蛍光色素などの試薬を用いずに解析できることがナノポア方式の大きな特長と考えられている。ナノポアはその形成法により大別して2種類に分類される。一方はナノサイズの開口（以下「ナノポア」という）を形成するチャンネルタンパク質を2分子膜に埋設したいわゆるバイオナノポアと、もう一方は半導体材料に微細加工を施してナノポアを形成するいわゆる固体ナノポアである。

[0003] また、このようなナノポアを用いるDNAの解析法として、現在2種類の方法が提案されている。第1の手法は、封鎖電流方式である。すなわち、ナノポアが形成された薄膜の両側に液槽を設け、それぞれの液槽に電解質溶液と電極を設け、電極間に電圧をかけると、ナノポアを通してイオン電流が流れる。イオン電流の大きさは一次近似としてナノポアの断面積に比例する。DNAがナノポアを通過すると、DNAがナノポアを封鎖し、有効断面積が減少するため、イオン電流が減少する。この減少量を封鎖電流と呼ぶ。封鎖電流の大きさを元に、DNAの1本鎖と2本鎖との差異が識別できる。またバイオポアの一形態において、封鎖電流の大きさからDNAの塩基の種類が判別可能と報告されている（非特許文献1、以下「第1の従来例」ともいう）。ただしバイオポアに用いる2分子膜は有機低分子が弱い力で集合して形成される繊細な薄膜であり、機

械的な安定性に課題があると考えられる。またチャンネルタンパク質が2分子膜へ組み込まれる工程が自然現象に依存するため、チャンネルの数の制御や再現性に課題がある。一方、固体ナノポアは薄膜として半導体基板などを用いるため、バイオポアより構造の安定性の点で有利と考えられる。またナノポアを機械的に形成するため、工業的な生産が可能という利点もある。また薄膜材料として半導体基板以外にもグラフェン (graphene) を利用してそれに設けた固体ナノポアを通過する生体分子を分析する装置及び方法も報告されている (特許文献1)。しかし固体ナノポアにおいては、封鎖電流によるDNAの塩基の種類は報告されていない。

[0004] 第2の手法は、トンネル電流方式である。すなわち、ナノポアに面して電極対を対向して設け、電極間に電圧をかけることにより、ナノポアを通過するDNAと電極間のトンネル電流を測定し、トンネル電流の大きさからDNAを解析する方式が提案されている。関連技術として、走査プローブ顕微鏡を用い、糖を修飾したヌクレオシドを有機溶媒に溶解してナノギャップ電極間に導入し、トンネル電流を計測すると、トンネル電流の平均値が塩基の種類によって異なるとの報告がある (非特許文献2、以下「第2の従来例」ともいう)。しかし試料はヌクレオシドである (リン酸を有しない) ため鎖状の核酸ではないこと、試料を修飾する必要があること、試料を有機溶媒に溶解する必要があること、ナノポアを用いていないこと、などの実験条件上の制約があること以外に、トンネル電流には分布があり、塩基の種類の間で重なりがあるため、塩基を識別する能力が低い、という課題もある。

[0005] その他、ナノポアあるいは類似の構造を利用した塩基配列の決定方法として、鎖状の核酸 (ポリマー) からヌクレオチド (モノマー) を酵素を用いて分離させて、銀微粒子などの集合体 (大きさ約100nmから200nm) を充填したナノチャネルまたはマイクロチャネルを通過させ、銀微粒子集合体の表面における表面増強ラマン分光法によりヌクレオチドを同定する方法 (特許文献2)、ナノポア中に酵素などを設け、DNA配列中のヌクレオチドと作用させ、それらの結合をナノポアを利用して制御し、ヌクレオチドを決定する方法 (

特許文献3)などが報告されているが、いずれも酵素などの試薬を使用する必要があったり、装置構成や工程が複雑となっている。

[0006] 一方、単分子の核酸を標識せずに計測する別のアプローチとして、TERS (Tip Enhanced Raman Scattering) 法が報告されている (非特許文献3、以下「第3の従来例」ともいう)。この方法では、AFM (原子間力顕微鏡) のプローブの先端に銀を形成し、マイカ基板に固定した鎖状の核酸分子をAFMによりスキャンして核酸分子のAFM像を取得した後、プローブを核酸に近接させ、レーザー光を照射する。するとプローブ先端に局所的な光の増強場 (近接場) が形成され、核酸を励起する。励起された核酸が放つラマン散乱光を分光計測することにより、核酸のラマン散乱スペクトルを取得する。得られる信号のS/Nは近接場に含まれる核酸塩基の数よりも大きいことから、1塩基の計測が可能な感度を得られる。またラマン散乱スペクトルは波数に対する強度パターンという2次元的情報を有するため、封鎖電流やトンネル電流など1次元の情報と比較して情報量が飛躍的に多く、定性における識別能が高い、という特長をもつ。近接場の大きさはプローブ先端の曲率で決まり、この第3の従来例の空間分解能は約10nmのオーダーとされる。これは核酸の塩基数に換算して約30塩基分の長さに相当するため、この方法で得られる結果には多数の塩基の情報が重複する。重複した情報から個々の塩基の情報を割り出すために、例えばプローブを核酸の鎖に沿って走査し、ラマン散乱スペクトルの変化 (差分) から、近接場に入った塩基と近接場から出た塩基を推察することを繰り返し、配列情報を求める方法 (以下「差分法」と記す) が提案されている。この方法を実施するためには核酸を予め固体基板に固定する必要があり、また計測には高分解能の微動ステージを含むAFM装置が必要であり、AFMのプローブをサブnmの精度で3次元的に走査するという繊細な操作が必要である。すなわち装置構成や操作が複雑であるという課題がある。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開W02009/035647号

特許文献2：国際公開W02005/030997号

特許文献3：国際公開W02008/124107号

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Clarke, J. et al., Nat. Nanotech. (2009年) 第4巻第265-270頁

非特許文献2：Chang, S. et al., Nano Lett. (2010年) 第10巻第1070-1075頁

非特許文献3：Bailo, E. et al., Angew. Chem. Int. Ed. (2008年) 第47巻第1658-1661頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] バイオポアを利用して封鎖電流により生体ポリマーを解析する方法（第1の従来例）は、機械的安定性が低く、再現性のある結果を安定に得ることが困難である。またナノポアを利用してトンネル電流により生体ポリマーを解析する方法（第2の従来例）は、塩基の識別能が低く、核酸の塩基配列を高精度に読み取ることが困難である。TERSを利用して生体ポリマーを解析する方法（第3の従来例）は、装置構成が複雑であり、繊細な操作が必要である。

[0010] 従って、本発明の課題は、機械的安定性に優れ、高い空間分解能及び感度で、かつ簡単な装置構成で、生体ポリマーの特性を解析するためのデバイス及び方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者は上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、固体ナノポアにおいて、基板に適切な導電性薄膜を適切な配置で設けることにより、ナノポアに進入する生体ポリマーの特性をラマン散乱に基づいて解析する際の空間分解能を高め、また感度を改善することができることを見出し、本発明を想到するに至った。すなわち、本発明は以下を包含する。

[0012] [1] 生体ポリマーの特性解析チップであって、

固体基板と、
前記固体基板に設けられた少なくとも1つのナノポアと、
前記固体基板に配置された少なくとも1つの導電性薄膜と
を備え、前記固体基板のナノポアを形成する一部に導電性薄膜が設けられ、
外部光を照射することにより、前記ナノポアに進入した生体ポリマーのラマン
散乱光を発生させることを特徴とする生体ポリマーの特性解析チップ。

[2] 前記外部光を前記導電性薄膜に照射することにより、前記導電性薄膜
が前記ナノポアの開口部に面する端部において近接場を発生させ、前記ナノ
ポアに進入した生体ポリマーのラマン散乱光を発生させることを特徴とする
[1] に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[3] 前記導電性薄膜が鋭角の端部を有し、該鋭角の端部が前記ナノポアの
開口部に面して配置されていることを特徴とする [1] 又は [2] に記載の
生体ポリマーの特性解析チップ。

[4] 前記導電性薄膜を少なくとも2つ備え、少なくとも2つの導電性薄膜が
前記ナノポアの開口部をはさんで互いに対向して配置されていることを特徴
とする [1] ~ [3] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[5] 前記導電性薄膜が金属で形成されていることを特徴とする [1] ~ [4]
のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[6] 前記導電性薄膜がグラファイトで形成されていることを特徴とする [1]
~ [4] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[7] 前記導電性薄膜の厚さが0.1nm~10nmであることを特徴とする [1] ~
[6] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[8] 前記固体基板が光を実質的に透過する薄膜部分を有し、該薄膜部分に
ナノポアが設けられていることを特徴とする [1] ~ [7] のいずれかに記
載の生体ポリマーの解析チップ。

[9] 前記固体基板の表面に前記導電性薄膜が配置されていることを特徴と
する [1] ~ [8] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[10] 前記固体基板の前記ナノポアの中心軸方向における中間の深さに前

記導電性薄膜が配置されていることを特徴とする [1] ~ [8] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[11] 前記ナノポアの深さが、生体ポリマーを構成するモノマー単位の3倍以上の大きさであることを特徴とする [1] ~ [10] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[12] 前記生体ポリマーが、核酸、ペプチド核酸、タンパク質、糖鎖、及びアプタマーからなる群より選択されることを特徴とする [1] ~ [11] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[13] 前記生体ポリマーの特性解析が核酸の塩基配列の決定である、[1] ~ [12] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[14] 生体ポリマーの特性解析装置であって、

[1] ~ [13] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップと、
光源と、

フレームレート1kHz以上の1次元又は2次元検出器と

を備え、前記光源から外部光を前記解析チップに照射し、該解析チップにおける生体ポリマーのラマン散乱光を前記検出器を用いて検出することを特徴とする生体ポリマーの特性解析装置。

[15] 前記検出器からの計測値を記録するフレームバッファメモリをさらに備えることを特徴とする [14] に記載の生体ポリマーの特性解析装置。

[16] 前記検出器として光電子増倍機構を有する検出器を備えることを特徴とする [14] 又は [15] に記載の生体ポリマーの特性解析装置。

[17] 前記フレームレートに同期して、生体ポリマー中のモノマーを1単位ずつ前記ナノポア中に進入させる試料移動機構をさらに備えることを特徴とする [14] ~ [16] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析装置。

[18] [1] ~ [13] のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析チップに外部光を照射し、ナノポアに進入した生体ポリマーのラマン散乱光を発生させる工程と、

前記ラマン散乱光のスペクトルに基づいて生体ポリマーの特性を解析する

工程と

を含むことを特徴とする生体ポリマーの特性解析方法。

[19] 前記生体ポリマーが、核酸、ペプチド核酸、タンパク質、糖鎖、及びアプタマーからなる群より選択されることを特徴とする[18]に記載の生体ポリマーの特性解析方法。

[20] 核酸の塩基配列を決定することを特徴とする[18]又は[19]に記載の生体ポリマーの特性解析方法。

[21] 前記生体ポリマーが、前記ナノポアに進入することができない第2のポリマーを含む試料溶液中に存在することを特徴とする[18]～[20]のいずれかに記載の生体ポリマーの特性解析方法。

発明の効果

- [0013] 本発明により、生体ポリマーの特性解析チップが提供される。本発明の特性解析チップは、固体ナノポア方式に基づくため、2分子膜に基づくバイオナノポア方式と比較して構造の安定性が高く、信頼性が高い。
- [0014] 本発明の解析チップでは、ラマン散乱スペクトルを指標として生体ポリマーを解析し、生体ポリマーに含まれる構成単位（モノマー）の種類を判定を行う。スペクトルは波数又は波長に対する強度パターンという2次元的情報を有するため、トンネル電流強度などの1次元の情報と比較して情報量が飛躍的に多く、定性における識別能が高い。従って、本発明は、トンネル電流によるナノポアと比較して塩基の識別能が極めて高い。
- [0015] また本発明により提供されるマルチナノポアを有する特性解析チップは、複数スペクトルを並列に計測する分光計測系と共に用いることによって、複数の生体ポリマーを同時に並行して解析することができる。従って、従来の解析デバイス及び方法と比較して、高スループットである。
- [0016] さらに本発明により、生体ポリマーの特性解析装置及び特性解析方法が提供される。本発明の特性解析装置では、ナノポアに進入する生体ポリマーの速度を制御することができ、解析対象の生体ポリマーを予め固体基板に固定する必要がなく、高分解能の微動ステージや原子間力顕微鏡（AFM）などの複

雑な装置も必要ない。またAFMのプローブをサブnmの精度で2次元的に走査するという繊細な操作を行う必要がない。そのため、従来のTERS法を利用した解析と比較して装置構成や操作が簡便である。

図面の簡単な説明

- [0017] [図1]生体ポリマー特性解析用のナノポアチップの模式図である。
- [図2]ナノポアチップの断面の模式拡大図である。
- [図3]生体ポリマーの特性解析装置の構成概略図である。
- [図4]試料セルの構成概略を示す断面図である。
- [図5]鋭角を有する三角形状の金属薄膜の構造を示す模式図 (A) と、その金属薄膜の近傍に発生する近接場のシミュレーション結果 (B) を示す。
- [図6]2つの三角形状の金属薄膜の構造を示す模式図 (A) と、それらの金属薄膜の近傍に発生する近接場のシミュレーション結果 (B) を示す。
- [図7]核酸塩基の典型的なラマン散乱スペクトルを示す。
- [図8]1塩基毎のスペクトル情報から、塩基配列を決定する手順に対応する出力画面表示イメージである。
- [図9]生体ポリマー特性解析用のナノポアチップの変形例の模式図である。
- [図10]ナノポアチップの変形例の断面の模式拡大図である。
- [図11]実施例2のマルチナノポアチップの模式図である。
- [図12]マルチナノポアチップを用いた生体ポリマーの特性解析装置の構成概略図である。
- [図13]実施例3のナノポアチップの断面の模式拡大図である。
- [図14]実施例4のナノポアチップの模式図である。
- [図15]実施例5のナノポアチップの模式図である。
- [図16]実施例5のナノポアチップの断面の模式拡大図である。

発明を実施するための形態

- [0018] 以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2010年9月29日に出願された日本国特許出願第2010-218623号の優先権を主張するものであり、上記特許出願の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

[0019] 本発明は、ナノポアとラマン散乱（好ましくはティップ増強ラマン散乱：TERS）を利用して生体ポリマーの特性を解析するためのデバイス（以下、「生体ポリマーの特性解析チップ」又は「本発明の解析チップ」という）と、該デバイスを備えた生体ポリマーの特性解析装置、並びにそれらを用いて生体ポリマーの特性を解析する方法に関する。従って、本発明に係る生体ポリマーの特性解析チップは、固体基板と、前記固体基板に設けられた少なくとも1つのナノポアと、前記固体基板のナノポアを形成する一部に配置された少なくとも1つの導電性薄膜とを備える。

[0020] 固体基板は、電氣的絶縁体の材料、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。電氣的絶縁体材料の例としては、シリコン、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、ポリプロピレンが挙げられる。固体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く、後述する生体ポリマーの解析時に使用する解析装置の構成要素（検出器など）と適合するように調整する。固体基板は、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、固体基板は、フォト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。固体基板は、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。

[0021] 固体基板は、ナノポアを設けるための薄膜部分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部分を固体基板に設けることによって、ナノポアを簡便かつ効率的に固体基板上に形成することができる。そのような薄膜部分は、固体基板と同じ材料であってもよいし、あるいは別の電氣的絶縁体材料から形成されてもよい。ナノポアの形成の点から、薄膜部分の材料は、例えば酸化シリコン（SiO₂）、窒化シリコン（SiN）、酸窒化シリコン（SiON）、金属酸化物、金属ケイ酸塩などが

好ましい。また後述する外部光の励起効率と集光効率の点から、薄膜部分（及び場合によっては固体基板全体）は、実質的に透明であることが好ましい。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。また薄膜部分は、単層であっても複層であってもよく、複層である場合には、後述する導電性薄膜が薄膜部分の層に挟まれて配置されてもよい。固体基板の薄膜部分の厚さは、10nm~200nm、好ましくは15nm~100nm、より好ましくは20nm~50nmである。薄膜部分は、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、固体基板上に形成することができる。

[0022] 固体基板には、少なくとも1つのナノポアが設けられる。本発明において「ナノポア」及び「ポア」とは、ナノメートル（nm）サイズの孔であり、固体基板、好ましくは固体基板の薄膜部分の表裏を貫通する孔である。すなわち、本発明の解析チップは、いわゆる固体ナノポアに区分される。また本発明において「開口」とは、ポアの固体基板表面に出ている部分を指す。生体ポリマーの特性解析時に、試料溶液中の生体ポリマーやイオンなどは一方の開口からナノポアに進入し、同じ又は反対側の開口からナノポア外に出る。

[0023] ポアのサイズ（すなわち開口サイズ）は、解析対象の生体ポリマーの種類によって適切なサイズを選択することができ、例えば1nm~100nm、好ましくは1nm~50nmであり、具体的には1nm以上2nm以下、3nm以上5nm以下、10nm以上50nm以下などである。ssDNA（1本鎖DNA）の直径は約1.5nmであり、ssDNAを解析するためのポア径の適切な範囲は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を解析するためのポアの径の適切な範囲は3nm~10nm程度、好ましくは3nm~5nm程度である。他の生体ポリマー、例えばタンパク質、糖鎖などを解析対象とする場合も同様に、生体ポリマーの外径寸法に応じたポア径を選択することができる。ナノポアの深さは、固体基板又は固体基板の薄膜部分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、生体ポリマーを構成するモノマー単位の2倍以上、好ましくは3倍以上、より好ましくは5倍以上の大

きさとする。例えば生体ポリマー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。これにより、生体ポリマーをその形状と移動速度を制御しながらナノポア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。またポアの形状は、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。

[0024] ポアは、固体基板に少なくとも1つ設けることができ、複数のポアを設ける場合には、規則的に配列することが好ましい。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、固体基板に形成することができる。

[0025] 固体基板のナノポアを形成する一部には、少なくとも1つの導電性薄膜が配置される。導電性薄膜がナノポアに接する部分は、後述する理由により、ナノポアの全周ではなく、全周の一部のみである。導電性薄膜は、導電性又は光散乱特性を有する材料で形成することができる。そのような材料としては、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）などが挙げられる。

[0026] 導電性薄膜は、薄膜の定義から明らかな通り、平面状に形成する。導電性薄膜の厚さは、採用する材料に応じて、0.1nm～10nm、好ましくは0.1nm～7nmとする。導電性薄膜の厚さが小さいほど、発生する近接場を限定することができ、高分解能かつ高感度での解析が可能となる。また導電性薄膜の大きさは特に限定されるものではなく、使用する固体基板及びナノポアの大きさ、使用する励起光の波長などに応じて適宜選択することができる。なお導電性薄膜が平面状でなく、屈曲などが存在すると、その屈曲部において近接場が誘起され光エネルギーが漏出し、目的外の場所においてラマン散乱光を発生させる。すなわち背景光が増大し、S/Nが低下する。そのため、導電性薄膜は平面状であることが好ましく、換言すると断面形状は屈曲のない直線状であ

ることが好ましい。導電性薄膜を平面状に形成することは、背景光の低減、S/N比の増大に効果があるだけでなく、薄膜の均一性や作製における再現性などの観点からも好ましい。

[0027] 導電性薄膜の形状は、外部光を照射することにより近接場を発生し、増強することができる形状であれば、任意の形状とすることができる。このような近接場を発生するプローブは当技術分野で公知であり、例えば、ティップ増強ラマン散乱（TERS）により近接場を発生及び増強することができる鋭角の端部を有する形状、金属ボウタイ構造などが知られている。

[0028] 導電性薄膜の好ましい平面形状の一例として鋭角の端部を有する形状が挙げられ、この端部をナノポアに面して設けることが特に好ましい。この場合、その端部の角度は10～80度、好ましくは20～60度、より好ましくは20～40度とする。このような近接場光を形成するための導電性薄膜（光散乱体）の好ましい形状については、例えば特開2009-150899号公報を参照されたい。なお、導電性薄膜の端部の頂点部分は、厳密な意味での点でなくともよく、一定以下、好ましくは10nm以下の曲率半径を有する丸みを帯びた形状等であってもよい。鋭角の端部以外の導電性薄膜の形状としては、端部の頂点の角度より鈍角な角を採用することができる。ただし角の部分には近接場が誘起され光エネルギーが漏出することから、ナノポアに面する鋭角の端部以外については、複雑な形状は極力回避し、角のない円形や、直線状などを採用することが好ましい。また導電性薄膜の全体の形状は、鋭角の端部を有する限り、任意の形状とすることができ、三角形、四角形及び五角形などの多角形、扇形、円形と三角形の合成形などとするのが可能である。

[0029] 一方、導電性薄膜の形状として金属ボウタイ（bow-tie）構造を採用することも可能である。即ち、円形、楕円形又は多角形の2つの導電性薄膜を、その形状の凸部が互いに対向するように配置する。このような金属ボウタイ構造については、例えば米国特許第6,649,894号を参照されたい。金属ボウタイ構造は、近接場が形成される領域にギャップ（開口）を挿入した構造とみなすことも可能である。ギャップの挿入によって異方性が導入され、検出感度が

改善される。このような技術についての説明は、例えば米国特許第6,768,556号及び米国特許第6,949,732号を参照されたい。

[0030] 導電性薄膜は、その少なくとも一部、特に好ましくは近接場を発生する端部などの構造が、ナノポアに面して設けられる。導電性薄膜は、その少なくとも一部、特に好ましくはその端部がナノポアに面して設けられている限り、固体基板の表面上に配置されてもよいし、あるいは固体基板の間に配置されてもよい。例えば、固体基板の表面上に、ナノポアの開口部に面して配置することができる。あるいは、固体基板上のナノポアの中心軸方向におけるほぼ中間の位置（深さ）に導電性薄膜を配置することができる。この場合、導電性薄膜は、固体基板の薄膜部分によって挟まれた構造となることが好ましい。これにより、近接場はナノポアの中心軸方向（深さ方向）の中間付近に形成されるため、生体ポリマーの形状と移動速度を制御しながらナノポア内で生体ポリマーのラマン散乱光を発生させることができ、高精度及び高感度に解析を行うことが可能である。なお、導電性薄膜を固体基板に配置する場合には、照射される外部光の偏光方向を考慮して配置することが好ましい。

[0031] また、導電性薄膜は、各ナノポアに対して少なくとも1つ配置されていればよく、奇数であっても偶数であってもよい。例えば、導電性薄膜は、各ナノポアに対して1つ、2つ、3つ、4つ又はそれ以上を配置することが可能である。後述する実施例に記載のように、導電性薄膜が複数存在すると、強い光の場が形成されるため、各ナノポアに対して2つ以上の導電性薄膜を配置することが好ましい。あるいは、導電性薄膜は、上述した形状を1単位として、複数の単位を有する1つの薄膜とすることも可能である。具体的な例は、実施例5のような2つの単位が連結されている薄膜構造物とすることができる。

[0032] ここで複数の導電性薄膜を、特に連結して配置する場合の注意点について述べる。複数の導電性薄膜を連結して配置する場合、連結した結果できる導電性薄膜の全体としての形状において、その少なくとも一部、特に好ましくはそのナノポアに面する部分の形状が鋭角の端部を有する必要がある。複数

の導電性薄膜をナノポア付近で連結すると、この鋭角の端部が消失するおそれがあるが、端部は近接場の効率的な形成に必要であるため、その消失は回避しなければならない。関連して、導電性薄膜を1つ用いる場合、それをナノポアの全周を囲むように配置すると、同様の不具合が生じるおそれがある。つまり励起光により導電性薄膜に誘起された電荷が、ナノポアの全周を取り囲む導電性薄膜を通して回り込んでしまい、ナノポア部分に双極子が形成されないという不具合のおそれがある。以上が、本発明に係る生体ポリマーの特性解析チップにおける少なくとも1つの導電性薄膜が、ナノポアの全周でなく、固体基板のナノポアを形成する一部のみ配置される必要がある理由である。

[0033] 導電性薄膜は、その端部がナノポアの開口部に面して配置されていることが好ましい。より具体的には、導電性薄膜を、ナノポア中心軸に対して直交する面内に、かつ薄膜の端部をナノポアの開口部に面して配置する。また少なくとも2つの導電性薄膜を配置する場合には、これらの導電性薄膜が、ナノポアの開口部をはさんで互いに対向して配置されることが好ましい。このような場合、外部光を導電性薄膜に照射することにより、導電性薄膜がナノポアに面する端部において近接場を発生させて、ナノポアを進入する生体ポリマーのラマン散乱光を発生させる。

[0034] 導電性薄膜は、当技術分野で公知の方法により作製し、固体基板に配置することができる。例えば、導電性薄膜を銀で形成する場合には、所望の厚さの銀薄膜をスパッタリングにより基板に形成した後、所望の形状を電子ビームにより形成することができる。また導電性薄膜を単層のグラフェンで形成する場合には、グラファイトから作製したグラフェンを支持基板にのせ、電子ビームを照射して所望の形状のグラフェンを形成することができる。

[0035] 本発明の解析チップに外部光を照射することにより、前記ナノポアに進入した生体ポリマーが励起されてラマン散乱光を発生し、そのラマン散乱光のスペクトルに基づいて生体ポリマーの特性を解析することができる。好ましくは、本発明の解析チップの導電性薄膜に外部光を照射することにより、該

導電性薄膜がナノポアの開口部に面する端部において近接場を形成させ、その近接場光で生体ポリマーを二次元的に走査する。形成される近接場の厚さは基本的に導電性薄膜の厚さと同等である、すなわち導電性薄膜はナノポアの中心軸に直交するため、形成される近接場の中心軸方向の厚さは導電性薄膜の厚さと同程度である。そのため、本発明の解析チップを用いることにより、高空間分解能かつ高感度で生体ポリマーを解析することができる。

[0036] また本発明は、上述した本発明の解析チップを備えた生体ポリマーの特性解析装置（以下、「本発明の解析装置」ともいう）に関する。従って、本発明の解析装置は、上記解析チップと、光源と、フレームレート1kHz以上の1次元又は2次元検出器とを備える。本発明の解析装置では、前記光源から外部光を本発明の解析チップに照射し、該解析チップにおける生体ポリマーのラマン散乱光を前記検出器を用いて検出する。

[0037] 光源は、ラマン散乱光を発生させることができる波長の外部光（励起光）を照射する、当技術分野で公知の光源を使用することができる。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、ネオジウム (Nd) レーザ、アルゴン (Ar) イオンレーザ、YAGレーザ、窒素レーザ、サファイアレーザなどを使用することができ、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。また、光源から外部光を解析チップに照射し収束させるために、光源と組み合わせて、共焦点レンズ及び対物レンズを使用することが好ましい。バックグラウンドシグナル（背景信号）を低下させるために、フィルター、ハーフミラー、共焦点ピンポールなどと組みあわせてもよい。このようなラマン散乱光を検出するための装置構成は、当技術分野において公知であり、当業者であれば適宜好ましい構成要素を選択することができる。

[0038] 発生するラマン散乱光は、通常のラマン散乱、共鳴ラマン散乱、ティップ増強ラマン散乱（TERS）、表面増強ラマン散乱（SERS）などによるものであってよい。

[0039] 検出器は、フレームレート（動作速度）が1kHz以上であり、ラマン散乱光

を検出することができる検出器であれば任意の分光検出器を使用することができる。また使用する解析チップにおけるナノポアの数及び配置に応じて、1又は複数の1次元又は2次元検出器を使用することができる。そのような分光検出器としては、CCD（電荷結合素子）イメージセンサ、CMOS（相補型金属酸化膜半導体）イメージセンサ、他の高感度素子（アバランシェフォトダイオードなど）のイメージセンサなどが挙げられる。検出器は、検出の高速化に伴う感度低下を防ぐために、光電子増倍機構、例えばイメージインテンシファイアを有することが好ましい。

[0040] また、検出器は、ラマン散乱光の画像情報を直接記録することができる大容量メモリを備えることが好ましく、それによりケーブル、ボード、コンピュータなどを介することなく高速に解析を行うことができる。例えば、本発明の解析装置は、検出器からの計測値を記録するフレームバッファメモリをさらに備えることが好ましい。また、本発明の解析装置は、前記検出器からの計測値をデジタル化し、出力するための出力装置（例えばコンピュータ）と接続してもよい。

[0041] また本発明の解析装置は、生体ポリマーの移動速度を制御する機構、すなわち試料移動機構を備えることが好ましい。試料移動機構は、例えば検出器のフレームレートに同期して、生体ポリマー中のモノマーを1単位ずつ、解析チップのナノポア中に進入させる。そのような機構としては、例えば電気泳動により生体ポリマーを駆動する試料駆動装置（任意関数発生器、電極など）を使用することができる。このような試料移動機構によって、生体ポリマー中のモノマーが順次ナノポアに進入し、離脱するように生体ポリマーの移動を制御することができ、個々のモノマー（構成単位）に対応するラマン散乱スペクトルを経時的に取得することができる。

[0042] また生体ポリマーの移動速度を制御する方法として、生体ポリマーを含む試料溶液の粘性を高める方法がある。例えば解析チップ周囲の温度を制御して、試料溶液の温度を低下させ、試料溶液の粘性が高くなることによって、生体ポリマーのブラウン運動が抑えられる。あるいは、試料溶液に測定対象

以外の第2のポリマーを添加することにより、試料溶液の粘性を高くできると同時に、生体ポリマーの立体構造を直鎖状にすることができるため、生体ポリマーの形状と移動速度を制御することが可能となる。その際、第2のポリマーとしては、好ましくはナノポアの内径よりも大きいサイズのポリマー、より好ましくは3次的にクロスリンクされたポリマーを用いることにより、第2のポリマーはナノポアに進入することができず、測定対象でない第2のポリマーによるラマン散乱を排除することが可能となる。

[0043] 生体ポリマーの移動速度を制御する別の方法は、本発明の解析チップの上部及び下部に存在するそれぞれの試料溶液に圧力差を印加する方法である。生体ポリマーが電気泳動によってナノポアを通過しようとする力と反対向きの力を生体ポリマーに印加することにより、生体ポリマーがナノポアを通過する速度を低下させることができる。

[0044] 生体ポリマーの形状及び／又は移動速度を制御しながら解析チップのナノポアに進入させることにより、生体ポリマーの主軸とナノポアの中心軸とは概ね一致する。試料移動機構により生体ポリマーを駆動することにより、生体ポリマーはナノポアを通過し、生体ポリマーを構成する単位要素（モノマー）は順次、解析チップに形成された近接場を通過する。すなわちポリマーの主軸方向に沿って配列するモノマーが順次近接場にさらされ、光を吸収し、ラマン散乱光を生じる。このラマン散乱光を検出器により計測することにより、モノマーに由来するラマン散乱スペクトルが順次得られる。

[0045] 本発明においては、上述した本発明の生体ポリマーの特性解析チップ又は特性解析装置を用いて、生体ポリマーの特性解析を行うことができる。本発明において「生体ポリマー」とは、単位構造の低分子（単量体、モノマー）が複数連結した多量体（オリゴマー）や高分子（ポリマー）のうち、生体中存在するもの及び生体中存在するものから誘導されるものを意味する。具体的には、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；タンパク質及びペプチド、例えばD-及びL-アミノ酸か

らなるタンパク質及びペプチド；糖鎖、例えば多糖、糖タンパク質中の糖鎖；アプタマー、例えばRNAアプタマーなどが含まれる。なお、生体ポリマーには、自然には存在しない配列や構成要素が含まれるポリマーが含まれ、例えばpoly(A)、poly(T)、poly(G)、poly(C)などの配列又は任意の配列を有する人為的に合成されたポリマー分子も含まれる。また、生体ポリマーには、当技術分野で公知の核酸増幅技術（例えばポリメラーゼ連鎖反応）によって調製された核酸や、ベクターにクローニングされている核酸も含まれる。これらの生体ポリマーを含む試料の調製方法は、当技術分野で周知であり、当業者であれば、生体ポリマーの種類に応じて適宜調製方法を選択することができる。

[0046] 本発明において「解析」とは、生体ポリマーの特性解析を指す。好ましい実施形態においては、「解析」とは、生体ポリマーを構成する単位であるモノマーの配列順序を解析すること、例えば核酸の塩基配列を解析することを指す。生体ポリマーの特性解析を行うために、生体ポリマーを構成するモノマー（生体ポリマーが核酸の場合には塩基）ごとの分光スペクトルを測定し、スペクトルがピークを示す波数や波長（以下「特徴帯」ともいう）との比較などに基づいて、モノマーの定性（識別）を行う。従って、本発明により、生体ポリマーを構成するモノマーのラマン散乱光を順次得て、得られたラマン散乱スペクトルを標準スペクトルと比較し、モノマーの定性（すなわち種類）を判定し、これらの工程を時系列的に順次実行することにより、生体ポリマーにおいてモノマーが配列する順序を決定する、すなわち配列解析を行うことができる。

実施例

[0047] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。ただし、以下の実施例は、本発明を限定するものではない。

[0048] [実施例1] ナノポアチップとそれを用いた生体ポリマーの特性解析

本発明による生体ポリマー特性解析用のナノポアチップの構成の一例を図1を用いて説明する。図1は、本実施例の生体ポリマー特性解析用のナノポ

アチップ100の模式図である。図示のようにナノポアチップ100は、基板110、ナノポア120、及び導電性薄膜130、などから構成される。図示の通り、基板110の最も広い面（以下基板面）と平行な平面をxy面、導電性薄膜130とナノポア120を結ぶ方向をx軸、xy面と垂直な方向をz軸と定義する。ナノポア120は、基板面と概垂直に形成される、換言するとナノポアの中心軸はz軸と平行である。

[0049] 図2は本実施例のナノポアチップ100のナノポア120の中心軸121を含むxz断面の模式拡大図である。基板110はz軸上方の基板面に薄膜部分111を有し、さらにその上方に導電性薄膜130を有する。また基板はz軸下方にテーパ状の窪み（以下「窓部112」という）を有し、そこに基板の薄膜部分111が露出している。この窓部112の薄膜部分111にナノポア120が形成される。図示の通り、導電性薄膜130の1つの端部131は、ナノポア120の開口部の上端に面している。図1に略記した通り、この端部131の平面形状は先鋭端となっており、この先鋭端がナノポア120に面している。

[0050] 次に本発明による生体ポリマーの特性解析装置の構成の一例を図3を用いて説明する。図3は、本実施例の生体ポリマーの特性解析装置200の構成概略図である。解析装置200は、光源210、レンズ220、ハーフミラー230、対物レンズ240、フィルター250、分光検出器260、終端270、xyz微動ステージ600、試料駆動装置700、試料セル300、パソコンなどの計測制御装置（不図示）などから構成される。試料セル300にはナノポアチップ100が収納される。

[0051] 図4は、試料セル300の構成概略を示すxz断面図である。試料セル300は、ナノポアチップ100、上部部材310、下部部材320、ねじ類（不図示）などから構成される。下部部材320は、その内部にOリング330、試料用流路410、420、430、試料用チャンバー440、電極用チャンバー450が形成され、また試料用接続ポート460、470、電極用接続ポート480が形成される。下部部材320には試料用接続ポート460、470を介して試料送液チューブ（不図示）が気密に接続され、また電極用接続ポート480を介して銀塩化銀電極（不図示）が気密に接続される。銀塩化銀電極の塩化銀を有する端は電極用チャンバー450に収

納され（不図示）、その銀を有する端（以下、銀端）は電極用接続ポート480の外部に露出する。前記試料送液チューブ、試料用接続ポート460、試料用流路410、試料用チャンバー440、試料用流路420、電極用チャンバー450、試料用流路430、試料用接続ポート470、試料送液チューブには、試料溶液（不図示）が隙間なく（気泡の混入なしに）満たされる。従って、試料用チャンバー440内の試料溶液は電極用チャンバー450において銀塩化銀電極と接触し、両者は電気化学的に導通する。上部部材310についても下部部材320と同様である。

[0052] 次に本発明によるナノポアチップの動作の概要を図1から図8を用いて説明する。まず試料セル300の準備を行う。具体的には上部部材310と下部部材320との間にナノポアチップ100をはさんでOリング330で圧接し、上部及び下部の試料用チャンバー540及び440を気密に形成する。試料送液チューブから試料溶液として100mM KCl水溶液を導入し、試料用チャンバー540、440、電極用チャンバー450に試料溶液を満たす。

[0053] 次に試料セル300を解析装置200へ設置する。具体的には試料セル300を微動ステージ600に固定する。微動ステージ600と、図示しない目視用光学系を用いて、試料セル300内のナノポアチップ100の薄膜部分111に光学系の焦点を合わせる。試料セル300に設置した2つの銀塩化銀電極を試料駆動装置700に接続する。試料駆動装置700は電圧源又は電流源を内蔵し、上部試料用チャンバー540を基準として、下部試料用チャンバー440に電圧を印加することができる。

[0054] 解析装置の光学系は以下の通り動作する。具体的には光源210から出射したレーザー光を、レンズ220を通して整形した後、ハーフミラー230により反射し、対物レンズ240により、ナノポアチップ100の薄膜部分111に集光する。レーザー光は薄膜部分111を通過して導電性薄膜130を照射し、その端部131（ナノポア120の開口部に面する）に強い近接場光が生じる。この近接場光が形成される領域（以下近接場）に化学物質（生体ポリマー）を導入すると近接場光は化学物質を励起し、化学物質特有のラマン散乱光を生じる。ラマン散乱光を

対物レンズ240で集光し、ハーフミラー230を通過し、フィルター250によりレイリー散乱光並びにアンチストークス線を除去し、ラマン散乱光のうちストークス線を分光検出器260に入射し、分光検出器260を用いて（ストークス線の）ラマン散乱スペクトルを分光し、検出する。薄膜部分111や導電性薄膜130を通過した光は、終端270で吸収又は無関係な方向に拡散する。主要な光路を図3中の破線で示した。

[0055] 測定対象である生体ポリマーの一例として、DNAの測定手順は以下の通りである。すなわち、試料として例えば長さ10kb (knt) の1本鎖DNAを1nMの濃度となるよう100mM KCl水溶液に溶解したものを使用した。これを下部試料溶液として、試料用チャンバー440に導入する。試料駆動装置700を用いて下部試料用チャンバー440に100mVの負電圧を印加すると、ナノポア120を通して、試料溶液中のイオンが電気泳動され、電流（イオン電流）が流れる。近接場には当初は水とKClのみが存在するため、水のみがラマン散乱スペクトルが観測される。DNAは電気泳動によって下部試料用チャンバー440からナノポア120を通して上部試料用チャンバー540へと電気泳動される。DNAがナノポア120を通過する際、DNAの構成要素である核酸塩基は、導電性薄膜130の端部131に形成される近接場の中に進入する。すると当該塩基特有のラマン散乱光が発生し、分光検出器260によりそのラマン散乱スペクトルが取得される。DNAの電気泳動を続けると、核酸塩基も移動し、近接場の外に離脱する。すると当該塩基特有のラマン散乱光が消滅する。さらに泳動を続けるとDNAの配列上の次の塩基が同様に順次近接場に進入し、離脱する工程を繰り返し、塩基の配列に対応するラマン散乱スペクトルが経時的に取得される。各塩基に特徴的な波数（以下特徴帯）における散乱光強度を経時的に取得し、その時間変化から非特許文献3に記載の差分法などを用いて1塩基毎のスペクトル情報に還元して解析することにより、DNAの塩基配列を求める。以上が本実施例の動作の概要である。

[0056] 以下、各構成要素について詳細に説明する。

本実施例におけるナノポアチップ100は以下の手順で作製した。基板110と

してシリコン基板を用い、その表面にLPCVD（減圧化学気相成長）により厚さ約20nmの酸化膜を形成した（この酸化膜は最終的に薄膜部分111となる）。電子ビーム（EB）リソグラフィにより基板底面に窓部のパターンを形成し、リアクティブイオンエッチングにより表面層を除去した後、KOH（水酸化カリウム）ウエットエッチによりシリコンを除去することにより、薄膜部分111を有する窓部112を形成した。導電性薄膜130として、銀の薄膜をスパッタリングにより基板表面に形成した。銀の膜厚は約5nmとした。銀の薄膜の上にレジストを塗布し、図1に示す三角形様のパターンをEBリソグラフィにより形成し、三角形様パターン以外の領域の銀をエッチングにより除去し、レジストを除去した。最後に、透過型電子顕微鏡（TEM）で基板を観察し、三角形の端部131にTEMの電子ビームを照射することにより、ナノポア120を形成した。ナノポアの内径は約10nmであった。本実施例では薄膜部分111を酸化シリコンを用いて形成したが、窒化シリコン等も同様に使用できる。

[0057] 本実施例における導電性薄膜130は、光学的には光の散乱体としても定義されうる。本実施例では導電性薄膜130の材料として銀を用いたが、この材料は銀に限定されず、一般に導電性を有する材料又は光散乱特性を有する材料であれば任意の材料を用いることができ、一般には金属が好適に使用できる。導電性薄膜として使用可能な他の金属として、白金、パラジウム、ロジウム、ルテニウムなどの白金族の金属や、金、銅などがある。

[0058] 本実施例における導電性薄膜130の形状は、三角形形状であり、その端部131の頂点の角度として30度を、また三角形のx方向の長さとして、後述する励起光の波長（531nm）より十分に短い100nmを採用した。近接場光を形成するための導電性薄膜（散乱体）の好ましい形状について特開2009-150899号公報（以下「第4の従来例」ともいう）に詳述されており、本発明における導電性薄膜130の形状についても第4の従来例に従って選択可能である。例えば第4の従来例に記載の通り、端部131の頂点の角度は小さい（鋭角である）方が端部に電荷が集中しやすく近接場の増強効果が高い。ただし本発明においては導電性薄膜の端部131以外の端の部分（以下他端部）は、基板110で遮蔽する配置

を採用可能であり、この場合は他端部に形成される近接場光の影響を受けない。従って、頂点の角度の適正值は、第4の従来例よりも小さい方向に拡張できる。もっとも、この角度を小さくしすぎると導電性薄膜の面積が減少し、入射光のエネルギーの利用効率が低下する。したがって頂点の角度として10度ないし80度、より好ましくは20度ないし60度が好適に採用可能である。

[0059] 第4の従来例に記載の通り、三角形の端部131の頂点部分は、厳密な意味での点でなくともよく、一定以下、好ましくは10nm以下の曲率半径を有する丸みを帯びた形状等であってもよい。三角形の端部131以外の角については端部131の角度より鈍角であることが好ましい。また導電性薄膜130の形状は三角形に限らず、頂点の角度が上述したような鋭角である端部131を有すればよく、その他の部分の形状は、角が無い円形や、角を有する場合には端部131の頂点の角度より鈍角であれば、自由に選択することができる。すなわち、導電性薄膜130の形状としては、扇形、円形と三角形の合成形、三角形、四角形及び五角形などの多角形、など各種の形状から選択可能である。また本実施例においては基板110で遮蔽される領域でたとえ近接場光が形成されてもそれは測定に影響を及ぼさないため、その遮蔽領域における導電性薄膜の形状は自由に選択できる。

[0060] 本実施例では試料セル300、特に上部部材310と下部部材320の中央部（試料用チャンバー440、540を外部と隔てる部分）に透明な部材を採用した。採用できる透明部材として、ガラス、石英、光源波長において透明度の高いアクリルなどのプラスチック材料がある。下部部材320の中央部に透明な部材を採用することにより、光源210からのレーザ光を効率よくナノポアチップ100に照射することが可能である。また上部部材310の中央部に透明な部材を採用することにより、ナノポアチップ100を通過した透過光や散乱光を反射することなしに通過させ、背景光を抑制することが可能である。関連して、図3では簡単のために光源210から出射したレーザ光をハーフミラー230により反射した後、ナノポアチップ100に対して概ね垂直な方向に入射させるごとく図示しているが、実際にはレーザ光の入射角度をナノポアチップ100の法線に対して

傾けることが好ましい。また、図3では簡単のために対物レンズ240とナノポアチップ100の間には何も設置していないがごとく図示しているが、対物レンズ240とナノポアチップ100の間の適切な位置に、適切な形状のスリットを設けることが好ましい。これらの構成を採用することにより、ナノポアの薄膜部分111からの反射光が分光検出器260に入射する不具合を回避し、背景光を抑制し、高いS/Nが得られる、という効果がある。

[0061] 図3及び図4において対物レンズ240と試料セル300（に含まれるナノポアチップ100）とをやや離して図示したが、実際の装置では両者は極力近づけることが望ましい。好ましくは対物レンズ240とナノポアチップ100との距離は3mm以下、好ましくは1mm以下に近接することが望ましい。これにより、励起光による励起効率と、散乱光の集光効率を上げ、高感度な測定を行うことが可能である。また対物レンズ240は液浸タイプが好ましく用いられる。対物レンズは高開口が好ましく、開口数 ≥ 0.8 が特に良好である。

[0062] 本実施例における生体ポリマーの特性解析装置は、第3の従来例と同様の顕微鏡一体型レーザラマン分光装置を元に構築した。ただしxyz微動ステージ600としては顕微鏡に付属のステージを使用し、AFM用のピエゾステージは使用しなかった。本実施例では光源210として出力1mW、波長531nmのKrイオンレーザを使用した。レーザ及びその波長は適宜選択可能である。試料駆動装置700としては任意関数発生器を使用し、必要に応じて任意関数発生器をアッテネータ（抵抗分圧器）と組み合わせて使用した。試料駆動装置700は、出力電圧範囲は0から ± 10 VのDC、又は任意の波形を出力可能である。任意波形の典型例としてパルス波が挙げられ、パルスのピークの時間幅は10ナノ秒単位で、パルスのピークの電圧値も前述の出力電圧範囲で、任意に出力可能である。

[0063] 以下、本実施例の動作について詳細に説明する。

ナノポアチップ100の基板110は主としてシリコン（Si）で形成される。基板の厚さは約700 μ mである。基板の薄膜部分111は酸化シリコン（SiO₂）で形成され、厚みも約20nmと薄い。従って、基板の窓部112において、レーザ光は薄膜部分111を通過して導電性薄膜130を照射する。導電性薄膜130をレーザ光

で照射することにより、その端部131に強い近接場が生じる。レーザ光は端部先端に向かう方向、すなわちx軸方向に偏光させたものを用いることが好ましい。この近接場のz方向の厚みは導電性薄膜130の厚みと同程度、すなわち5～10nm程度である。

[0064] 窓部112以外において、基板110は約700 μm の厚みがある。基板110材料であるSiがレーザ光を吸収、反射、散乱するため、窓部112以外の領域の上に形成される薄膜部分111やその上に形成される導電性薄膜130には、レーザ光がほとんど到達しない。したがって、この窓部112以外の領域については導電性薄膜130における近接場の形成が抑制される。つまり上記の構成により、導電性薄膜130における近接場の形成を、主に窓部112の領域、特に目的とする端部131に限定でき、目的以外の領域における背景光の発生を抑制できる、という特長がある。また、窓部112以外の領域における基板110の表面に反射防止処理を施す、具体的には例えば粗面にしたり、あるいは吸光性材料を塗布したりすることが好ましい。この構成により、レーザ光が目的とする窓部112以外において反射することを抑制し、背景光を抑制できる、という効果がある。

[0065] 以下、本実施例及び後述する変形例で採用した構造について、近接場の形成をシミュレーションにより解析し比較した結果を述べる。

[0066] 本実施例のごとく三角形の導電体に光を入射させたとき、その近傍に発生する近接場光分布をFDTD法（時間領域光伝播ソルバーOptiFDTD, Optiwave System Inc.）を用いて計算した。この計算においては、解析領域の大きさをX、Y、Zそれぞれの方向に、 $0.3 \times 0.2 \times 2.6 \mu\text{m}$ とした（なお、X、Y、Zは図5及び図6だけで使用する座標系であり、YはXZ平面に垂直な方向である）。また導電体の材料は銀とし、厚さは10nm、先端尖り角は90度とした。入射波は波長780nmの平面波とし、導電体の面から一波長離れた位置に波源を発生させた（ $\lambda = 780\text{nm}$ ）。入射波の偏光方向はX方向とした。境界条件はXY側面は周期的境界条件、Z方向側面は吸収境界条件とした。メッシュサイズは計算領域全体で均一に2.6nmとした。

[0067] 図5のAは解析した構造の模式図である。また図5のBに、近接場強度密度

(1) の計算結果と、入射波の強度密度 (I_{in}) との比のXY平面分布を、縦軸にプロットした。図示の通り薄膜三角形の先端に最も強い光の場が生じ、その最大値は入射強度比で約1100倍となった。

[0068] また、この三角形の薄膜を2つ設けて頂点を互いに3nm隔てて対向させた場合についても計算を行い、その結果を図6のA及びBに示した。これは後述する変形例に相当する。この場合、約7100倍の増強効果が得られた。

[0069] 以上のシミュレーションの結果をまとめると、本実施例や、特に後述する変形例のごとき構造及び形状の導電性薄膜を用いることにより、光電場の増強効果を強く有する近接場が形成されることが示唆された。

[0070] DNAがナノポア120に進入した直後、塩基由来のラマン散乱光が観測された時点において、試料駆動装置700を用いて、下部試料用チャンバー440に印加する電圧の絶対値を低下させ、DNAの電気泳動速度を低下することができる。また印加電圧の絶対値を低下させた状態で電圧の極性を反転する（下部試料用チャンバー440を陽電圧とする）ことにより、DNA鎖を低い速度で逆向きに泳動することができる。この条件で塩基由来のラマン散乱光が観測されなくなるまで泳動することにより、DNA鎖の先端を近接場の外まで押し戻すことができる。この状態から印加電圧の絶対値を低下させたまま電圧の極性を元に戻す（下部試料用チャンバー440を陰電圧とする）ことにより、DNA鎖の先頭からゆっくりと泳動し、ラマン散乱計測を繰り返すことが可能である。これによりラマン散乱スペクトルを十分な精度で計測するに必要な時間にわたって、測定対象である塩基を近接場の中に留めることができる。

[0071] 試料駆動装置700を用いて下部試料用チャンバー440に印加する電圧は一定（DC）とすることが可能である他、パルス波とし、DNAの泳動と停止を短い周期で繰り返すことも可能である。この場合、パルス波のパルス幅を調節することが可能である（パルス幅変調）。1周期の内のパルスがONの時間の割合（デューティ比）を低くし同OFFの時間の割合を高くすることにより、1周期の内の泳動時間を短くし同停止時間を長くすることが可能である。例えば周波数帯域100MHzの任意関数発生器を用いることにより、パルス幅を10ns単位で

可変であるため、1周期の長さを例えば10msとした場合、デューティ比を1/1,000,000の分解能で調節可能である。すなわち、DNA鎖の平均移動速度をデューティ比に応じて極めて高い分解能で（低く）調節することが可能となる。またパルス波高の調節（パルス高変調）と組み合わせることにより、泳動速度をさらに精密に調節することも可能である。泳動電圧や、そのパルス幅の制御により、ラマン散乱スペクトルを十分な精度で計測に必要な時間にわたり、測定対象である塩基を近接場の中に留めることができる。また停止時間内にラマン散乱スペクトルを取得することにより、測定対象が計測中に近接場に進入したり離脱したりすることにより信号が変動する不都合を回避し、計測値を高精度化することも可能である。

[0072] また、下部試料用チャンバー440に印加する電圧が正圧と負圧の間を周期的に繰り返すことも可能である。この際、時間平均した電圧がやや負圧になるように調節することにより、電圧を単純に一定の負圧とする場合と比較して、DNA鎖を安定に引き伸ばし、かつゆっくりとナノポア120を通して上部試料用チャンバー540に泳動させることができ、DNA鎖中の個々の塩基に基づくラマン散乱を感度良く計測することが可能となる。

[0073] DNA鎖の泳動速度を制御する別の手段として、試料溶液の粘性を高めることが効果的である。ナノポアチップ周辺の温度を制御する機構を追加し、試料溶液の温度を低下させれば、試料溶液の粘性が高くなると同時に、DNA鎖のブラウン運動が抑えられるため、DNA鎖のラマン散乱計測に良好な条件となる。また、試料溶液に測定対象以外のポリマーを添加することにより、試料溶液の粘性を高くできると同時に、DNA鎖の立体構造を直鎖状にすることができるため、DNA鎖のラマン散乱計測に良好な条件となる。ポリマーとしてはキャピラリー電気泳動用の分離媒体を用いてもよい。好ましくはナノポアの内径よりも大きい、さらに好ましくは3次的にクロスリンクされたポリマーを用いることにより、測定を妨害することなく、粘性のみを高くすることができる。特に後述の実施例の図13によれば、増強場すなわち計測領域をナノポア内部に閉じ込めることが可能であり、この場合、測定対象でないポリマーは計測

領域に進入させずに、測定対象である生体ポリマー、例えばDNA鎖のみを測定領域に進入させることが可能となり、測定対象でないポリマーによるラマン散乱を排除することが可能となる。

[0074] DNAの電気泳動速度を低下する目的のため、微小な泳動速度を実現し、かつそれを正確に制御する他の方法も採用できる。第1の方法として上下の試料用チャンバー（440及び540）間の電圧を高感度に検出する計測電極の対を、上下の試料用チャンバーにそれぞれ新たに（既存の銀塩化銀電極とは別に）設けることができる。この場合、計測電極の対を用いて計測した実際の電圧を元に、銀塩化銀電極に印加する電圧をフィードバック制御することにより、上下の試料用チャンバーの間に所定の微小電圧を正確に印加できる。第2の方法として、ポテンショスタット方式を採用可能である。この場合、既存の1対の銀塩化銀電極をそれぞれ試料極と対極とみなし、対極側の試料用チャンバー440及び540に新たに参照極を設け、試料極と参照極の間の電圧が設定した値になるように、試料極と対極に流れる電流を制御することができる。以上の方法により所定の微小電圧を上下の試料用チャンバー440及び540間に正確に印加でき、微小な泳動速度を実現し、かつそれを正確に制御することができる。第3の方法として、ガルバノスタット方式を採用可能である。この場合、既存の1対の銀塩化銀電極をそれぞれ試料極と対極とみなし、片方からもう片方へ流れる電流をモニターしながら所定値になるようにフィードバック制御することができる。この方法により、所定の微小電流を上下の試料用チャンバー440及び540間に正確に流すことができ、微小な泳動速度を実現し、かつそれを正確に制御することができる。第5の方法として、不純物をドーピングした半導体を用いてナノポア基板を作製することにより、ナノポア基板に導電性を持たせ、ナノポア基板表面の電位を制御する方法を採用可能である。ポテンショスタットなどを用いることにより液中の電位に対してナノポア基板表面の電位を制御することが可能であり、例えば基板に陽電圧を印加することにより、陰電荷を持つ試料DNAを基板に吸着させ、その運動速度を抑制することが可能である。基板の電圧をパルス状に制御することにより、試料のス

トップ送りを実現することも可能である。また逆に基板に陰電圧を印加することにより、DNAの非特異的な吸着を抑制し、試料交換を容易にすることも可能である。

[0075] DNA鎖がナノポア120を通過する速度を制御するさらに別の方法を説明する。下部試料用チャンバー440に満たされる試料溶液と、上部試料用チャンバー540に満たされる試料溶液に圧力差を持たせることにより、DNA鎖が電気泳動によってナノポアを通過しようとする力と、反対向きの力がDNA鎖に加えられようになれば、DNA鎖がナノポアを通過する速度を低下させることができる。例えば、下部試料用チャンバー440に満たされる試料溶液は大気圧にする一方で、上部試料用チャンバー540に満たされる試料溶液にポンプ機構やピエゾ機構により大気圧以上の圧力を印加すると、上部試料用チャンバー540から下部試料用チャンバー440に向かう方向、すなわちDNA鎖の電気泳動と逆方向の圧力を生じさせることができる。この圧力差は、上部と下部の試料溶液の組成差、例えばイオン濃度差などに基づく浸透圧によって制御してもよい。この圧力差により、DNA鎖の電気泳動と逆方向に、つまり上部試料用チャンバー540から下部試料用チャンバー440に向かう方向に、試料溶液をナノポア120中にバルクとして流動させ、DNA鎖の通過速度を低下させてもよい。この試料溶液流動は、ナノポア120の内表面に電荷を持たせ、ナノポア120内部に電気浸透流を生じさせることによっても実現できる。試料溶液流動は、さらに以下のような効果を生じさせることも可能である。試料溶液がDNA鎖を包み込むように流動し、DNA鎖をナノポア120内部でその中心軸付近に局在させると同時に、DNA鎖を中心軸方向に引き伸ばすことが可能である。これはDNA鎖の各塩基を安定に増強場の中央を通過させることを可能とし、精度の高いラマン散乱計測を実現できる。

[0076] 図7に、核酸塩基の典型的なラマン散乱強度（スペクトル）の例を示す。4種類の塩基A、C、T及びGは、それぞれ特徴的な波数（以下「特徴帯」ともいう）において散乱光強度がピークを示す。この例におけるA、T、Gの特徴帯のピークはそれぞれa1、t1、g1で示され、波数はそれぞれ約730、1180、650 cm^{-1}

である。Cのピーク位置 c_1 （すなわち約 1730cm^{-1} ）は、Tのピーク位置 t_2 （すなわち 1600cm^{-1} ）とやや重複するが、Tに固有の特徴帯 t_1 の有無を勘案することによりTとCを判別可能である。上記以外にも、CとTの特徴帯として、C： 1260cm^{-1} 、T： 1360cm^{-1} を適用できる可能性もある。

[0077] 図8を用いて、差分法の結果として得られる1塩基毎のスペクトル情報から、塩基配列を決定する手順を説明する。図8は、この手順に対応するPCの出力画面表示イメージである。画面下部には差分法の結果として得られる1塩基毎のスペクトル情報が、横軸：時間、縦軸：信号強度（波数）として、各特徴帯 a_1 、 t_1 、 g_1 、 c_1 、 t_2 について表示される。特徴帯 c_1 と t_2 は前述の通り重複があるため、両者を含む波数範囲 $c_1\sim t_2$ について表示する。時間とともに出現する各特徴帯のピーク、図8の例では a_1 、 $c_1\sim t_2$ （ t_1 無し）、 g_1 、 a_1 、 $c_1\sim t_2$ （ t_1 あり）に応じて、それぞれA、C、G、A、Tと決定される。決定された配列は画面上部に表示されるとともに、PCに記憶され、結果として外部に出力される。

[0078] 本実施例ではA、C、T、Gのスペクトルを取得してDNAの解析を行う場合について例示したが、本発明の応用範囲はこれに限定されない。例えばUのスペクトルを解析することにより、RNAの解析を行うことができる。またメチル化Cのスペクトルを取得することにより、DNAのメチル化を直読可能となる。さらにアミノ酸のスペクトルを取得することにより、ペプチドやタンパク質の解析が、また糖のスペクトルを取得することにより、糖鎖の解析が可能となる。

[0079] 本実施例による生体ポリマーの特性解析チップは、固体ナノポアに基づくため、構造の安定性が高く信頼性が高い、という特長がある。また本実施例はラマンスペクトルを指標としてモノマーの種類の判定を行う。スペクトルは波数に対する強度パターンという2次元的情報を有するため、トンネル電流強度などの1次元の情報と比較して情報量が飛躍的に多く、定性における識別能が高く、従って塩基の識別能が高い、という特長がある。本実施例は近接場をナノポア120の開口部に固定し、試料駆動装置700を用いることにより、D

NAを泳動し、近接場との相対位置関係を制御した。これにより、核酸を予め固体基板110に固定する必要が無く、高分解能の微動ステージやAFMも必要ない。またAFMのプロブをサブnmの精度で2次元的に走査するという繊細な操作も必要ない。すなわち装置構成や操作が簡便である、という特長がある。

[0080] [実施例1の変形例]

実施例1の変形例として、下記の構成のごときナノポアチップ100aを実施することが可能である。図9は、本変形例によるナノポアチップ100aの模式図である。図示のようにナノポアチップ100aは、基板110、ナノポア120、及び導電性薄膜130a、130b、などから構成される。すなわち、実施例1における導電性薄膜130に相当する導電性薄膜を2つ有し、それら（導電性薄膜130a、130b）の片方を180度回転させ、端部をナノポアに向き合わせて配置した点が、実施例1と異なる。図10は本変形例のナノポアチップ100aのナノポア120の中心軸121を含むxz断面の模式拡大図である。図示の通り、導電性薄膜130a、130bは薄膜部分111のz軸上方に形成され、それらの端部131a、131bは、ナノポア120の開口部の上端にそれぞれ面し、互いに対向している。つまり導電性薄膜130aと130bは、ナノポア120の孔径とほぼ同じ距離を隔てて設置される。

[0081] 本変形例によるナノポアチップ100aのための解析装置や、動作は実施例1と同様である。レーザ光も実施例1同様、2つの端部を結ぶ方向、すなわちx軸方向に偏光させたものを用いることが好ましい。異なるのは、レーザ光照射によって生じる近接場光が、導電性薄膜130a、130bの端部131a、131bの間隙に生じることである。また実施例1で示したシミュレーション結果（図6）から示唆される通り、両方の導電性薄膜に由来する近接場光が互いに強め合い、近接場の強度が増強する。また導電性薄膜130a、130bの存在により、近接場のx方向の分布が制限され、ナノポア120の孔径程度に局限される。結果として、本変形例の近接場の形状の対称性が高く、従って均一性が高い。また本変形例は、近接場の強度が前述のとおり入射光量比で約7,000倍程度と高い（図6）ため、高感度であり、近接場が空間的に均一で、空間分解能も

高い、という特長がある。

[0082] 本変形例のさらなる応用として、導電性薄膜を3つ以上用いる構成も採用可能である。例えば導電性薄膜を4つ、それぞれの端部をナノポアに向き合わせて十字型に配置する構成を採用できる。この場合、導電性薄膜が中心軸を中心に90度の回転対称を有する形で配置されるため、レーザ光を中心軸の方向に入射すれば、レーザの偏光のxy方向に関する向きを制御しなくても、向かい合う導電性薄膜の対のいずれかの端部に強い近接場を誘起できるという特長がある。

[0083] [実施例2] マルチナノポア解析装置構成

本発明による生体ポリマー特性解析用のマルチナノポアチップの構成の一例を図11を用いて説明する。図11は、本実施例2の生体ポリマー特性解析用のマルチナノポアチップ1100の模式図である。図示のようにマルチナノポアチップ1100は、基板1110、ナノポア1120、1121、及び導電性薄膜1130a、1130b、1131a、1131b、などから構成される。図示の通り、本実施例のマルチナノポアチップ1100は、ナノポア及び対向する導電性薄膜などからなる上記変形例の単位構造、すなわち図10に例示される単位構造を、1つの基板1110に複数有する。

[0084] 次に本実施例における生体ポリマーの特性解析装置の構成の一例を図12を用いて説明する。図12は、本実施例2の生体ポリマーの特性解析を行うマルチ解析装置2000の構成概略図である。マルチ解析装置2000は、光源210、レンズ220、ハーフミラー230、対物レンズ240、フィルター250、プリズム2261、結像レンズ2262、2次元検出器2263、終端270、xyz微動ステージ600、試料駆動装置700、試料セル300、パソコンなどの計測制御装置（不図示）などから構成される。試料セル300にはマルチナノポアチップ1100が収納される。

[0085] 次に本実施例の動作の概略を説明する。本実施例2の動作は実施例1と同様であるが、ナノポアチップとして複数の単位構造を有するマルチナノポアチップ1100を用いる。従って、マルチナノポアチップ1100上の複数の場所において、試料に由来するラマン散乱光がそれぞれ独立に生じる。このラマン

散乱光は対物レンズ240で集光し、ハーフミラー230を通過し、フィルター250によりレイリー散乱光を除去した後、プリズム2261で分光し、結像レンズ2262を用いて二次元検出器2263の検出面上に結像する。プリズム2261で分光したレイリー線は図12の z' 軸の方向に屈折する。マルチナノポアチップ1100上の x 軸方向、 y 軸方向の各单位構造のナノポア開口部からのレイリー散乱光は、二次元検出器2263の検出面上ではそれぞれ x' 軸方向、 y' 軸方向に結像する。またプリズム2261の作用により、ラマン散乱光（ストークス線）は x' 軸方向に分散される。ラマン散乱光のうち相対的に強度の強い水のラマン線（ストークス線、ラマンシフト約 -3000cm^{-1} ）が、 x' 軸方向に隣接する隣のナノポアのレイリー線に届かない様に波長分散を空間的に調節することにより、各单位構造のナノポアに由来するラマン散乱光を、二次元検出器2263の検出面上に重複することなく2次的に展開し、同時に取得できる。また、フィルター250としてレイリー散乱光を除去するものだけでなく、さらにバンドパスフィルターも加えたフィルターを採用することにより、水のラマン線などの不必要な光を予め排除し、目的とするラマン線のみを二次元検出器2263の検出面上に重複することなく2次的に展開し、同時に取得できる。

[0086] 本実施例では、図11に示した通り、基板1100上で x 方向及び y 方向に多数のナノポアを規則正しく、格子状に配列した。また、その内の一方向である x 方向の検出面上での方向と、波長分散方向、及び二次元検出器の画素配列の一方向を一致させた（ x' 方向）。さらに、基板1100上の多数のナノポアの x 方向の配列間隔を dx 、 y 方向の配列間隔を dy とするとき、 $dx \geq dy$ とした。これら個々の条件により、二次元検出器2263の画素を無駄なく有効に活用できるようになる。言い換えれば、同じサイズの画素を持つ二次元検出器を用いながら、より多くのナノポアからのラマン散乱信号を取得できるため、解析のスループットを向上させることができる。

[0087] マルチナノポアチップ1100の光学系中心軸に対する設置位置は測定毎に変動し得るため、その都度、ナノポア毎に、その検出面上での位置から、画素座標と波長の関係、すなわち波長校正を行う必要がある。そこで、測定対象

のポリマーのラマン散乱スペクトルの計測に先だって、測定対象を含まない試料溶液、すなわち参照溶液の散乱スペクトルを取得した。参照溶液の組成はあらかじめ分かっているため、その結果を元にナノポア毎に波長校正を行うことができる。例えば、参照溶液には水が含まれているため、水のラマン散乱、あるいは水のレイリー散乱の検出画素座標を基準にして、単位画素あたりの波長分散から波長校正を行った。レイリー散乱がフィルターによって遮断され、検出できない場合は、この時だけフィルターを外してもよい。この工程により、各ナノポアで得られる光検出結果をラマン散乱スペクトルに変換することができる。この際、参照溶液の散乱スペクトルを差し引く処理を行えば、測定対象正味のラマン散乱スペクトルが得られるため、より高精度な解析が可能になる。ただし、ナノポア毎の被測定体積（増強場体積）と、測定対象ポリマーがそれを横切る体積が同等である場合、すなわち測定対象ポリマーが被測定領域に進入する際に参照溶液中の分子の多くを排除する場合、上記の処理はむしろ行わないか、あるいは部分的に行う方がよい。測定対象ポリマーのラマン散乱スペクトルは、取得可能な全波長域について取得してもよいが、塩基識別に必要な波長域に限定して、すなわち特定の画素領域に限定して取得すれば、検出速度を高速化できるだけでなく、その後のデータ量を削減することが可能になる。

[0088] 電気泳動によりナノポアを通過するDNA鎖は一般に高速である。例えば電圧100mVを印加時、塩基長10kb (knt) の1本鎖DNAのナノポア通過時間は約1msであり、一塩基あたりの増強場滞在時間（増強場の空間的な広がりは無微小と仮定）は0.1 μ sに過ぎない。したがって、この条件下で各塩基からのラマン散乱信号を独立に計測するためには、2次元検出器2263の動作速度を1MHz以上にする必要がある。従来の顕微鏡システムで蛍光、燐光、散乱光等を高感度に計測する場合、特に2次元状に分布する測定対象を同時計測する場合には、検出器の動作速度（フレームレート）は通常30Hz以下、特に速い速度で1KHz未満である。したがって検出器の動作速度（フレームレート）を1KHz以上、好ましくは1MHzにすることは、本発明においてナノポアとそれを通過するDNA

鎖のラマン散乱スペクトル計測とを組み合わせることによって生じる新しい課題である。このような超高速検出を実現する手段としては、従来の顕微鏡システムで一般に用いられているCCD（電荷結合素子）よりも、CMOS（相補型金属酸化膜半導体）の方が好ましい。CCDでは検出素子1個単位、あるいは1列単位でAD変換を行うのに対して、CMOSでは2次元状に配列するすべて検出素子についてAD変換を同時に行うことができ、AD変換に要する時間を数百～数千倍短縮することができるためである。CMOSに限らず、検出素子毎にAD変換機能を有する検出器であれば同様の効果を得ることができる。また、検出器で取得される大量の信号をケーブルやボードを介して制御用コンピュータに転送し、内臓のハードディスク等へ書き込むに要する時間を削減するため、検出器に大容量のメモリを内蔵させることにより、上記を介さずに大量の信号を保管することも有効である。一方、検出の高速化に伴い、個々の計測の露光時間が著しく低下する。これによる感度低下を防ぐため、増強場を導入すること、液浸形の高開口対物レンズを用いること、あるいは検出器にアバランシェフォトダイオードなどの高感度素子を用いたり、イメージインテンシファイアなどの増倍機能を持たせること等は、本発明にとって好ましい構成である。すなわち、本発明においては、光電子増倍機構を有する検出器を使用することが好ましい。また本実施例においては各ナノポアを通過するDNA鎖の運動を互いに同期させることが好ましく、さらに全てのナノポアにおけるDNA鎖の運動を停止させる時間を設け、その時間においてラマン散乱信号を同時に計測することが特に好ましい。この構成により、全てのナノポアにおけるDNA鎖のラマン散乱信号を高精度に計測できる、という効果がある。

[0089] 本実施例ではラマン散乱スペクトルを得るための波長分散手段にプリズム2261を用いたが、波長分散の分解能を上げるために、回折格子を用いることも可能である。これにより、より精度の高い塩基種の識別が可能になる。

[0090] 波長分散手段を用いなくてラマン散乱スペクトルの相違に基づく塩基識別を行うことも可能である。例えば、ダイクロイックミラーを用いてマルチナノポアの2分割像を取得し、それらの強度比からラマン散乱スペクトルの相違

を抽出することが可能である。複数のダイクロイックミラーを組み合わせ、3分割像又は4分割像を取得すれば、それらの強度比から、より高精度に塩基種識別が可能になる。この方法は波長分散を用いる方法と比較して、画素あたりの信号強度が大きくなるため感度が向上すること、同じ画素サイズの2次元検出器を用いて、より多くのナノポアを同時計測できることがメリットである。

[0091] 本実施例2によると複数のナノポアについてラマン散乱スペクトルを同時に取得可能であるため、計測の多重度が高く、結果の信頼性が高い、という特長がある。多重度の高い計測を行う場合におけるスループットが高い、という特長がある。

[0092] 本実施例の変形例として、個々のナノポア毎に独立した試料用チャンバーを設け、それぞれのナノポアを用いて異なる試料を同時に計測することも可能である。また、この変形例は、複数の試料を並列に計測できるため、スループットが高い、という特長がある。

[0093] [実施例3] サンドイッチ構造のナノポアチップ

本発明による生体ポリマー特性解析を行うナノポアチップの構成の一例を図13を用いて説明する。図13は、本実施例3のナノポアチップ100bのナノポア120の中心軸121を含むxz断面の模式拡大図である。基板110はz軸上方の基板面に薄膜部分111aを有し、その上に導電性薄膜130a、130bを有し、さらにその上に薄膜部分111bを有する。その他は実施例1の変形例（図10）と同様である。

[0094] 本実施例3のナノポアチップ100bの作製法は実施例1（の変形例）と類似であるが、導電性薄膜130a、130bのパターンをEBリソグラフィで形成した後に、膜厚約20nmのSiO₂からなる薄膜部分111bをスパッタリングにより形成し、その後TEMによりナノポアを形成した点が異なる。薄膜部分111bは薄いため、ナノポアチップ100bの外観は、実施例1（の変形例）と同様、すなわち図9のごとくである。

[0095] 本実施例3の動作は実施例1（の変形例）と同様であるが、以下の点が異

なる。第1に、導電性薄膜130a、130bが薄膜部分111bにより被覆されているため、試料と相互作用可能な近接場はナノポア120の内部に局限される。残りの近接場は薄膜部分111aや薄膜部分111bの内部に封じ込められるため、生体ポリマーを含む試料と相互作用できない。従って目的とするナノポア120内部以外の空間に存在する試料からの背景信号が生じず、S/Nが高い、という特長がある。なお本実施例においては薄膜部分111bの材料をSiO₂とし、それをスパッタリングにより形成したが、薄膜部分111bの材料や形成方法は上記に限定されない。薄膜部分111bの材料としては各種の非導電性材料が採用でき、それらを適切な表面コート法により形成することができ、それにより同様の効果を得られる。第2に、近接場はナノポア120の中心軸方向のちょうど中央付近に形成されるため、試料であるDNA等の生体ポリマーのxy方向の運動がナノポアによって制限されており、従って試料が均一な近接場と相互作用することができるため、得られる信号の再現性が高い、という特長がある。第3に、ナノポア120を通過する過程においてDNAが軸方向に伸長されるため、高次構造が解消され、個々の塩基を順番に近接場に導入でき、試料の配列上の観測領域と測定時刻との対応関係が単純化し、解析が容易になる、という特長がある。

[0096] [実施例4] 導電性薄膜に通電するナノポアチップ

本発明による生体ポリマー特性解析用のナノポアチップの構成の一例を図14を用いて説明する。図14は、本実施例4の生体ポリマー特性解析用のナノポアチップ100cの模式図である。図示のようにナノポアチップ100cは、基板110、ナノポア120、及び導電性薄膜130a、130b、配線パターン132a、132b、コンタクト133a、133b、などから構成される。配線パターン132a、132b、コンタクト133a、133bは、それぞれ導電性薄膜130a、130bと電氣的に導通する。

[0097] 配線パターン132a、132b、コンタクト133a、133bは、前述の実施例における導電性薄膜130a、130bと同様に形成した。異なるのは、配線パターンやコンタクトの材質として金を用いたことと、厚さとして配線パターンは1マイクロン、コンタクトは100マイクロンを採用したことなどである。

[0098] 本実施例4による生体ポリマーの特性解析装置は実施例1～3と同様であるが、以下の点異なる。すなわち、本実施例4はコンタクト133a、133bからカードエッジコネクタ（不図示）を介して、試料駆動装置700の第2の電圧出力に逆位相となるように接続した。

[0099] 本実施例4の動作は前述の各実施例と同様であるが、以下の点異なる。すなわち、本実施例4では試料駆動装置700からパルス状の電圧を試料用チャンバーに印加することにより、生体ポリマーをナノポア120を通して泳動した。またレーザ照射によって近接場を導電性薄膜130a、130bの端部に形成した。試料駆動装置700のパルスがOFFの時は、泳動電圧が解除されるとともに、コンタクト133a、133bには逆位相、すなわちONパルスが印加され、このパルス電圧は配線パターン132a、132bを通じて導電性薄膜130a、130bに伝達され、その端部131a、131b（不図示）に印加される。すると生体ポリマーであるDNAのリン酸基は導電性薄膜130a、130bの陽極側の端部に誘引されるため、この間、DNAの泳動が一時的に強制的に停止させられる。この間に、生体ポリマーのラマン散乱スペクトルを取得する。同様に、試料駆動装置700のパルスがONの時は、泳動電圧が印加されるとともに、コンタクト133a、133bには逆位相、すなわちOFFパルスが印加され、DNAの泳動の一時強制停止が解除されるため、DNAの泳動が再開する。この間はラマン散乱スペクトルを取得しない。

[0100] 本実施例4では泳動電流のパルス駆動だけでなく、導電性薄膜への電圧印加による生体ポリマーの強制停止／解除を泳動電流のパルスと同期して行うことにより、生体ポリマーのナノポアを通した移動をより精密に制御できる、という特長がある。

[0101] [実施例5] 導電性薄膜としてグラフェンを使用したナノポアチップ

本発明による生体ポリマー特性解析用のナノポアチップの構成の一例を図15及び図16を用いて説明する。図15は、本実施例5のナノポアチップ100dの模式図である。ナノポアチップ100dは、基板110、ナノポア120、及び導電性薄膜130c、130d、などから構成される。図示のように本実施例5は実施例3と類似であるが、主に以下の点異なる。第1に、導電性薄膜130c、130dとして

単層のグラファイト、すなわちグラフェン (graphene) を用いた。第2に、導電性薄膜130c、130dの平面形状は、枠状の構造により周囲を取り囲む形で互いに連結されている。換言すると、導電性薄膜130c、130dは、空隙134a、134bを有する1枚の薄膜状の構造物である。(空隙134a、134bもナノポア120の部分で互いに連結している)。第3に、ナノポア120の直径として2nmのものを採用した点が異なる。なお枠状の構造と、ナノポア120との距離は、プラズモンの減衰距離と同等かやや長い距離とした。このように2つの導電性薄膜130cや130dの長さをプラズモンの減衰距離と同程度の距離とすることにより、導電性薄膜130cや130dで発生したプラズモンをナノポア近傍に十分到達させることができる。

[0102] 図16は、ナノポア120の中心軸121を含むxz断面の模式拡大図である。拡大率が高いため、導電性薄膜130c、130dの外枠は図示されていない。

[0103] 本実施例5のナノポアチップ100dの作製法は実施例3と類似であるが、基板110に薄膜部分111aを形成した後の工程が異なる。すなわち、別途、機械的剥離法を用いてグラファイトからgrapheneを作製し、単層であることを光学顕微鏡により確認した。Schneiderら、Nano Letters (2010) 10, 1912に記載のwedging法を用いて、このgrapheneを、作業用の支持基板の上に転送した。高焦点のTEM (加速電圧300kV) を用いて、支持基板ごとgrapheneに対して電子ビームを照射してカーボンを打ち抜き、空隙134a、134bとその連結部分を形成した。支持基板をTEMから取り出し、再度wedging法を用いて、基板110の薄膜部分111aの上に上記加工を施したgrapheneを転送した。その後は実施例3と同様に、薄膜部分111bをスパッタリングにより形成し、さらにTEMを用いて(空隙134a、134bの連結部分に電子ビームを照射して)ナノポア120を形成した。このように、2つの導電性薄膜130c、130dを枠に連結した形で形成することにより、両者間の極めて狭い間隙や、空隙134a、134bの複雑な形状などを再現性良くかつ容易に形成できる。

[0104] 本実施例5の動作は実施例3と同様であるが、以下の点が異なる。第1に、導電性薄膜130c、130dをgrapheneで形成したため、その厚みが約0.3nmと極め

て薄い。従って、その端部131a、131bの間に形成される近接場の厚みも1nm以下と極めて薄く、DNAの塩基数にして1~3塩基程度と、空間分解能が高い、という特長がある。つまり前述の差分法による解析の誤差が少なく、塩基の種類をより高い確度で識別できる、という特長がある。第2に、導電性薄膜130c、130dをgrapheneで形成したため、その端部131a、131bの厚みが極めて薄く、厚み方向で考えると鋭く尖っている。近接場は先端が鋭く尖っていると電場が集中して増強効果が高まる、という特長がある。第3に、導電性薄膜130c、130dをgraphene（すなわち炭素）で形成したため、銀と比較して水溶液中での酸化などに対する安定性が高い、という特長がある。なお本実施例では単層のgrapheneを用いたが、2層ないし15層程度のgrapheneを用いることも可能である。これら複層のgraphene又はgraphiteを用いる場合でも、5nm以下の極めて薄い導電性薄膜を形成することができるため、上記と同様の効果を得ることができるばかりでなく、強度が高いという特有の効果もある。第4に、ナノポアの内径が小さいため、試料の通過速度を抑制することができる、という特長がある。

[0105] 本実施例5の変形例として、導電性薄膜130c、130dの外枠を撤去してそれぞれ独立させ、実施例4のごとく配線を引き出して外部装置に接続する方法を採用可能である。外部装置としてトンネル電流の計測装置を採用することにより、導電性薄膜130c、130dの端部131a、131b間の試料を通して流れるトンネル電流を計測することが可能となる。この変形例は、端部の厚みが薄いため、トンネル電流計測における空間分解能が高い、という特長がある。この変形例を実施例1ないし実施例5と組み合わせることにより、ラマン測定とトンネル電流測定を同時に行うことができる。両者の結果を相補的に用いることにより、解析結果の信頼性を向上することが可能である。また一方の結果を用いてDNAの塩基の存在を検出し、他方の計測タイミングの同期を取ることにより、計測のS/Nを高め、解析結果の信頼性を向上することも可能である。

[0106] また本発明による導電性薄膜を設けたナノポアチップを、蛍光計測方式、

例えば蛍光プローブを用いるナノポアシーケンサに適用することも可能である。この場合、導電性薄膜によって形成される近接場を活用することにより、高感度で、かつ高い空間分解能を達成可能である。

[0107] さらに上述した本発明を構成する各要素や従来技術を2種類以上組み合わせ、さらに解析精度を向上することも有効である。

[0108] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、その全文を参考として本明細書中に取り入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0109] 本発明により、生体ポリマーの特性解析チップ及び特性解析装置が提供される。本発明の解析チップ及び解析装置は、固体ナノポア方式に基づくため、構造の安定性が高く、信頼性が高いものであり、またラマン散乱により2次元的に、高空間分解能及び高感度で生体ポリマーの特性を解析することができる。従って、本発明は、生体ポリマーの特性を解析することが望まれる分野、例えばバイオテクノロジー、生化学、医療などの分野で有用である。

符号の説明

[0110] 100、100a、100b、100c、100d ナノポアチップ

110 基板

111、111a 基板の薄膜部分

111b 薄膜部分

112 基板の窓部

120 ナノポア

121 ナノポアの中心軸

130、130a、130b、130c、130d 導電性薄膜

131、131a、131b 導電性薄膜の端部

132a、132b 配線パターン

133a、133b コンタクト

134a、134b 空隙

200 解析装置

- 210 光源
- 220 レンズ
- 230 ハーフミラー
- 240 対物レンズ
- 250 フィルター
- 260 分光検出器
- 270 終端
- 300 試料セル
- 310 上部部材
- 320 下部部材
- 330 Oーリング
- 410、420、430 試料用流路
- 440 (下部) 試料用チャンバー
- 450 電極用チャンバー
- 460、470 試料用接続ポート
- 480 (下部) 電極用接続ポート
- 540 (上部) 試料用チャンバー
- 580 (上部) 電極用接続ポート
- 600 xyz微動ステージ
- 700 試料駆動装置
- 1100 マルチナノポアチップ
- 1110 基板
- 1120、1121 ナノポア
- 1130a、1130b、1131a、1131b 導電性薄膜
- 2000 マルチ解析装置
- 2261 プリズム、
- 2262 結像レンズ
- 2263 2次元検出器

請求の範囲

- [請求項1] 生体ポリマーの特性解析チップであって、
固体基板と、
前記固体基板に設けられた少なくとも1つのナノポアと、
前記固体基板に配置された少なくとも1つの導電性薄膜と
を備え、前記固体基板のナノポアを形成する一部に導電性薄膜が設けられ、外部光を照射することにより、前記ナノポアに進入した生体ポリマーのラマン散乱光を発生させることを特徴とする生体ポリマーの特性解析チップ。
- [請求項2] 前記外部光を前記導電性薄膜に照射することにより、前記導電性薄膜が前記ナノポアの開口部に面する端部において近接場を発生させ、前記ナノポアに進入した生体ポリマーのラマン散乱光を発生させることを特徴とする請求項1に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。
- [請求項3] 前記導電性薄膜が鋭角の端部を有し、該鋭角の端部が前記ナノポアの開口部に面して配置されていることを特徴とする請求項1又は2に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。
- [請求項4] 前記導電性薄膜を少なくとも2つ備え、少なくとも2つの導電性薄膜が前記ナノポアの開口部をはさんで互いに対向して配置されていることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。
- [請求項5] 前記導電性薄膜が金属で形成されていることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。
- [請求項6] 前記導電性薄膜がグラファイトで形成されていることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。
- [請求項7] 前記導電性薄膜の厚さが0.1nm～10nmであることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。
- [請求項8] 前記固体基板が光を実質的に透過する薄膜部分を有し、該薄膜部分

にナノポアが設けられていることを特徴とする請求項1～7のいずれか1項に記載の生体ポリマーの解析チップ。

[請求項9] 前記固体基板の表面に前記導電性薄膜が配置されていることを特徴とする請求項1～8のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[請求項10] 前記固体基板の前記ナノポアの中心軸方向における中間の深さに前記導電性薄膜が配置されていることを特徴とする請求項1～8のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[請求項11] 前記ナノポアの深さが、生体ポリマーを構成するモノマー単位の3倍以上の大きさであることを特徴とする請求項1～10のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[請求項12] 前記生体ポリマーが、核酸、ペプチド核酸、タンパク質、糖鎖、及びアプタマーからなる群より選択されることを特徴とする請求項1～11のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[請求項13] 前記生体ポリマーの特性解析が核酸の塩基配列の決定である、請求項1～12のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップ。

[請求項14] 生体ポリマーの特性解析装置であって、
請求項1～13のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップと、

光源と、

フレームレート1kHz以上の1次元又は2次元検出器と

を備え、前記光源から外部光を前記解析チップに照射し、該解析チップにおける生体ポリマーのラマン散乱光を前記検出器を用いて検出することを特徴とする生体ポリマーの特性解析装置。

[請求項15] 前記検出器からの計測値を記録するフレームバッファメモリをさらに備えることを特徴とする請求項14に記載の生体ポリマーの特性解析装置。

[請求項16] 前記検出器として光電子増倍機構を有する検出器を備えることを特

徴とする請求項 14 又は 15 に記載の生体ポリマーの特性解析装置。

[請求項17] 前記フレームレートに同期して、生体ポリマー中のモノマーを1単位ずつ前記ナノポア中に進入させる試料移動機構をさらに備えることを特徴とする請求項 14～16 のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析装置。

[請求項18] 請求項 1～13 のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析チップに外部光を照射し、ナノポアに進入した生体ポリマーのラマン散乱光を発生させる工程と、

前記ラマン散乱光のスペクトルに基づいて生体ポリマーの特性を解析する工程と

を含むことを特徴とする生体ポリマーの特性解析方法。

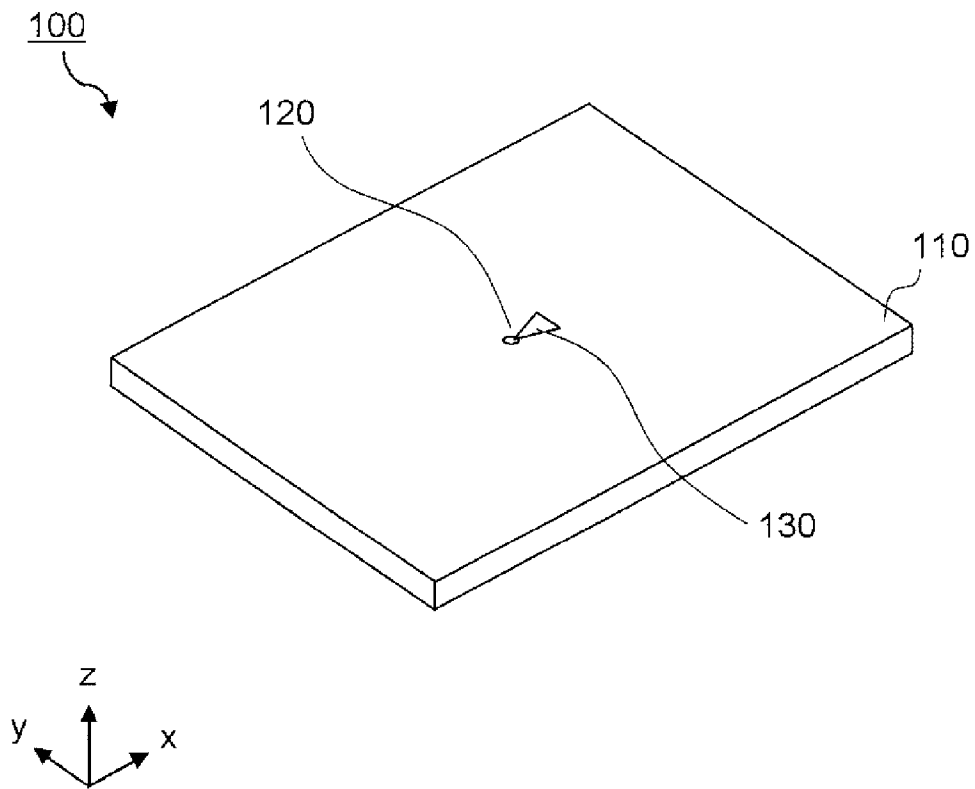
[請求項19] 前記生体ポリマーが、核酸、ペプチド核酸、タンパク質、糖鎖、及びアプタマーからなる群より選択されることを特徴とする請求項 18 に記載の生体ポリマーの特性解析方法。

[請求項20] 核酸の塩基配列を決定することを特徴とする請求項 18 又は 19 に記載の生体ポリマーの特性解析方法。

[請求項21] 前記生体ポリマーが、前記ナノポアに進入することができない第2のポリマーを含む試料溶液中に存在することを特徴とする請求項 18～20 のいずれか1項に記載の生体ポリマーの特性解析方法。

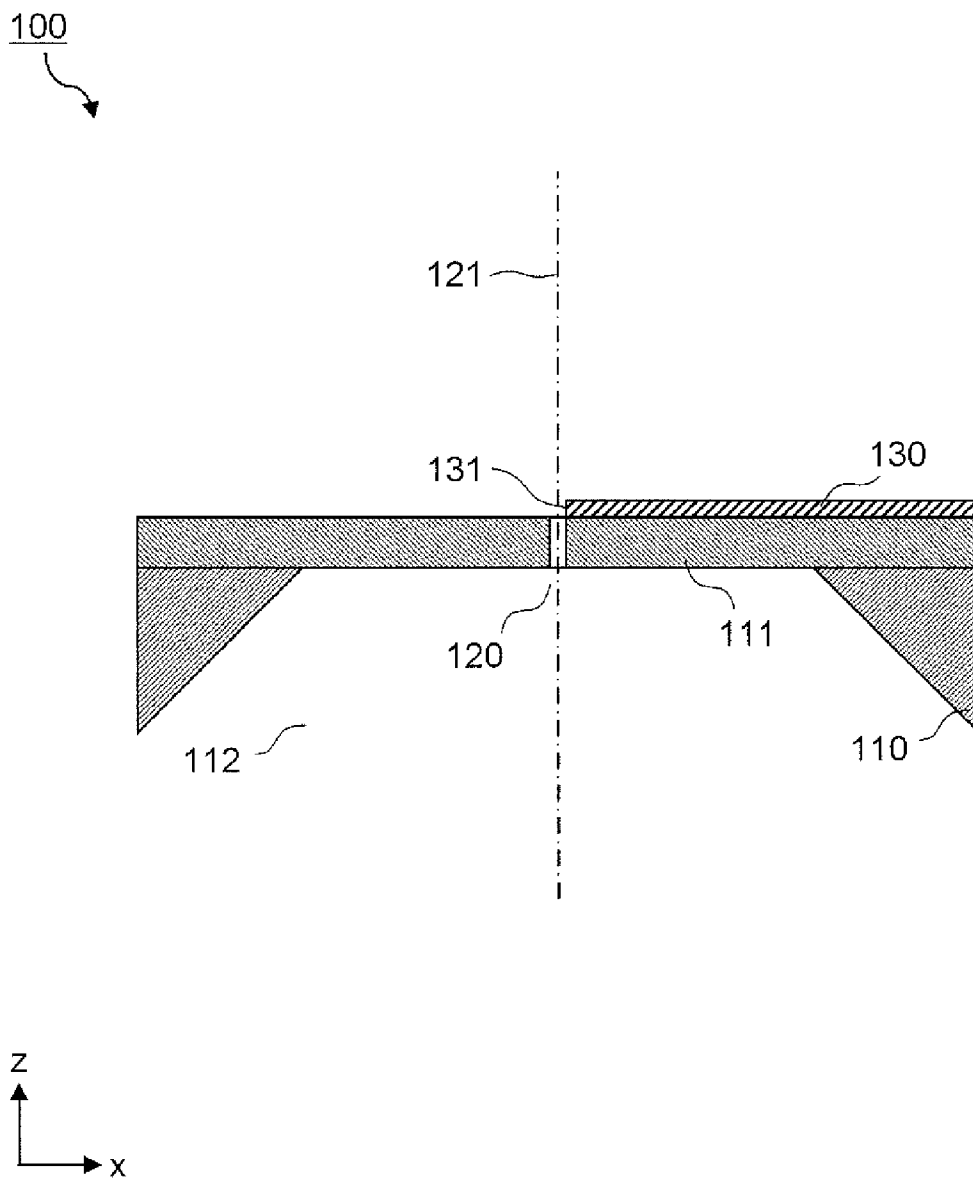
[図1]

図 1



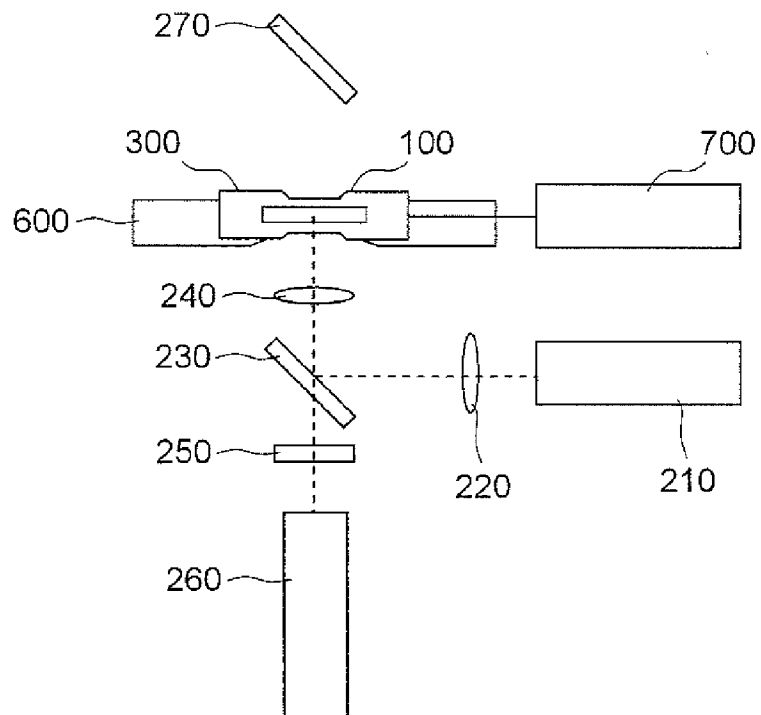
[図2]

図 2



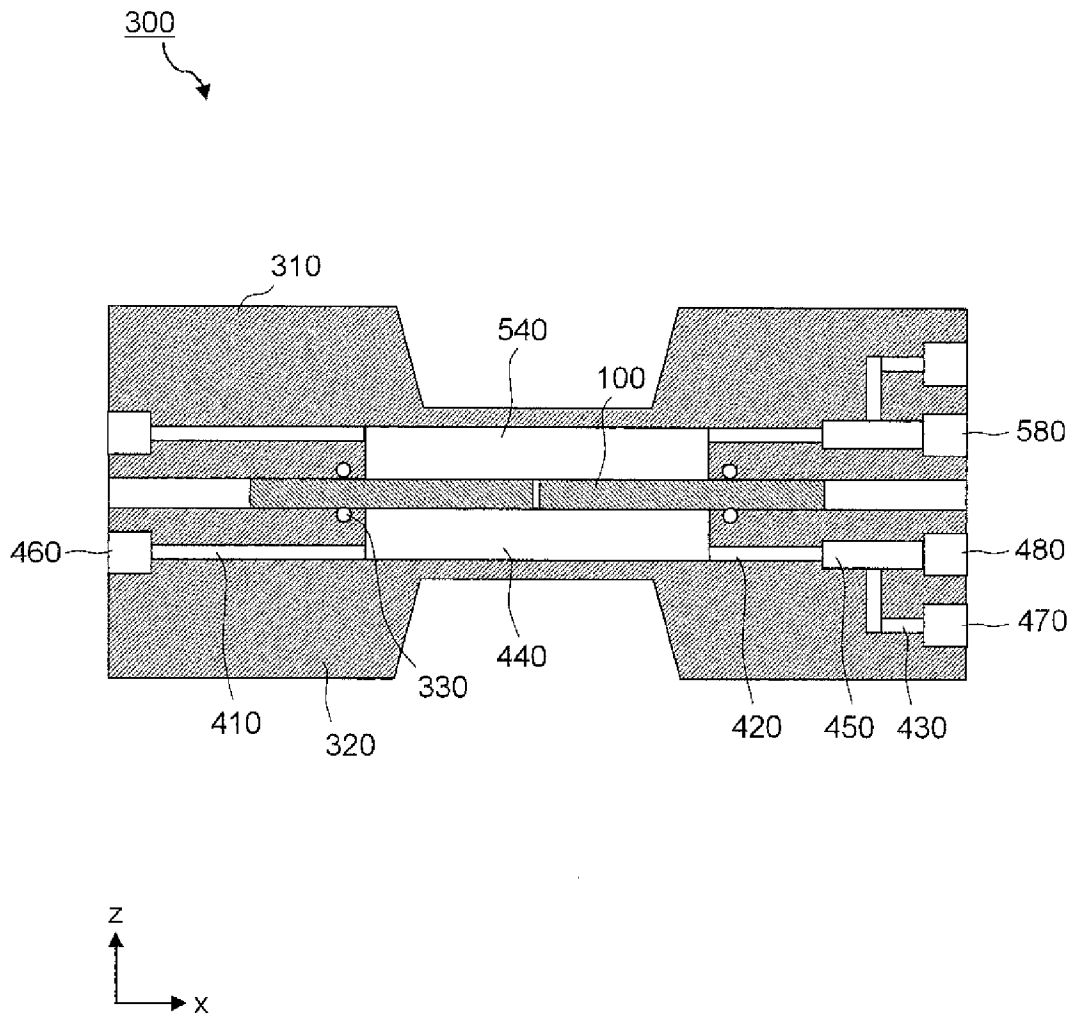
[図3]

図 3

200
↘

[図4]

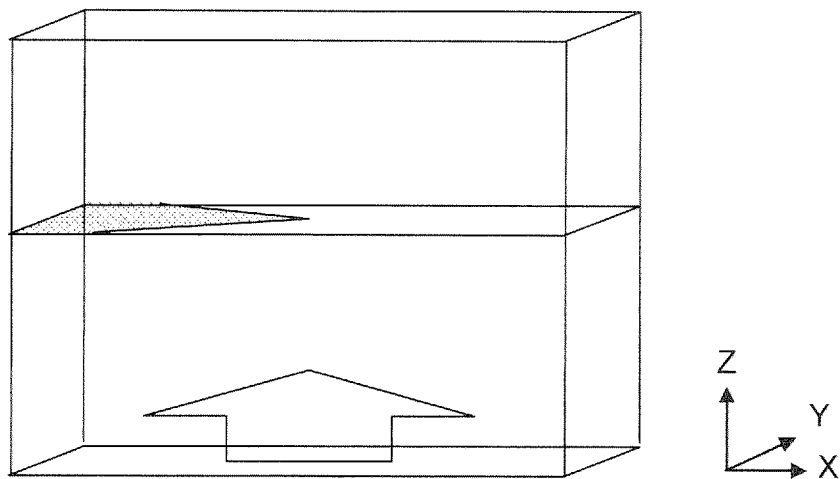
図 4



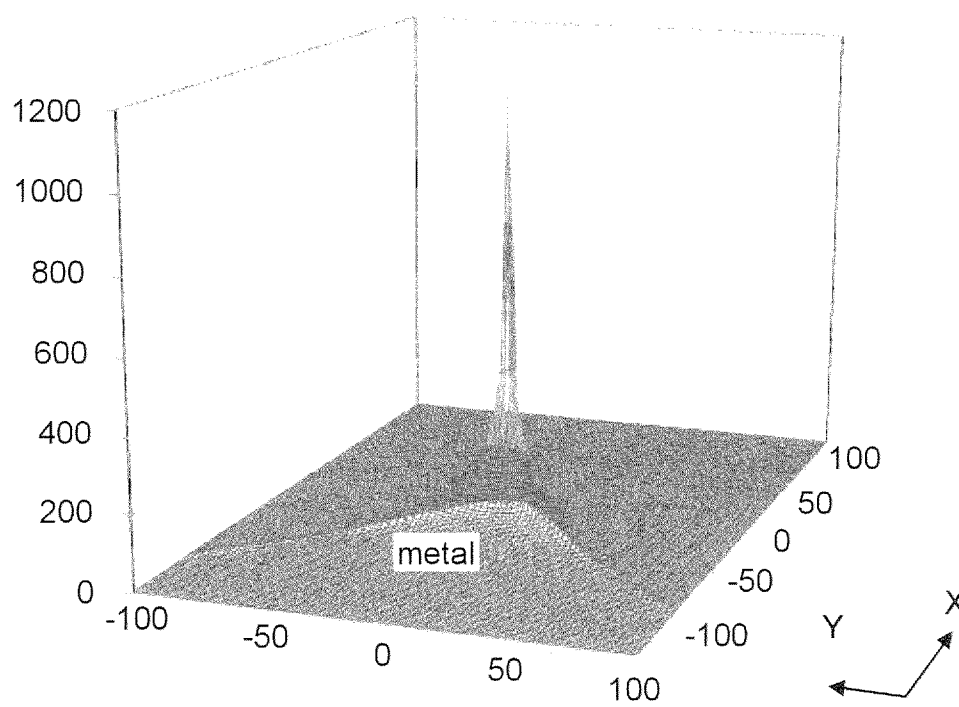
[図5]

図 5

A



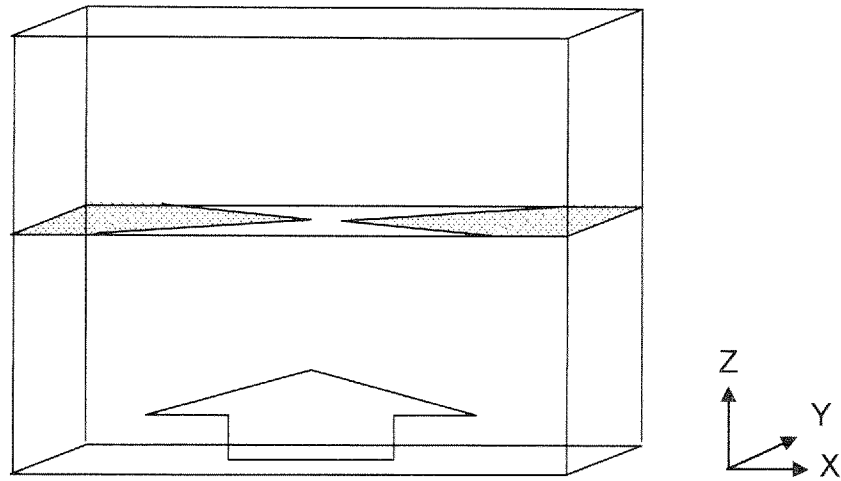
B



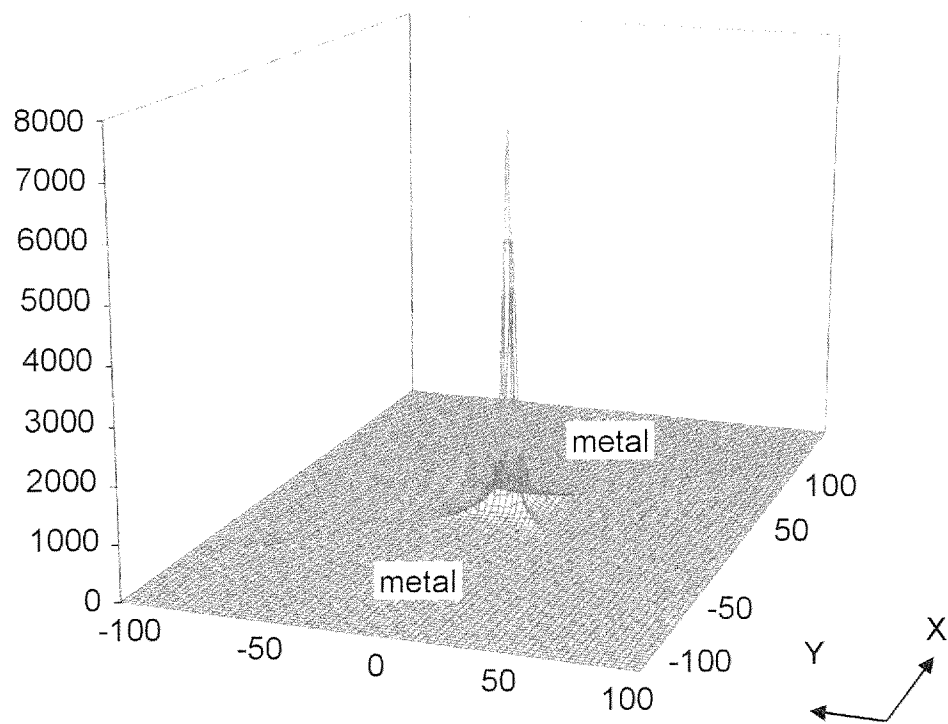
[図6]

図 6

A

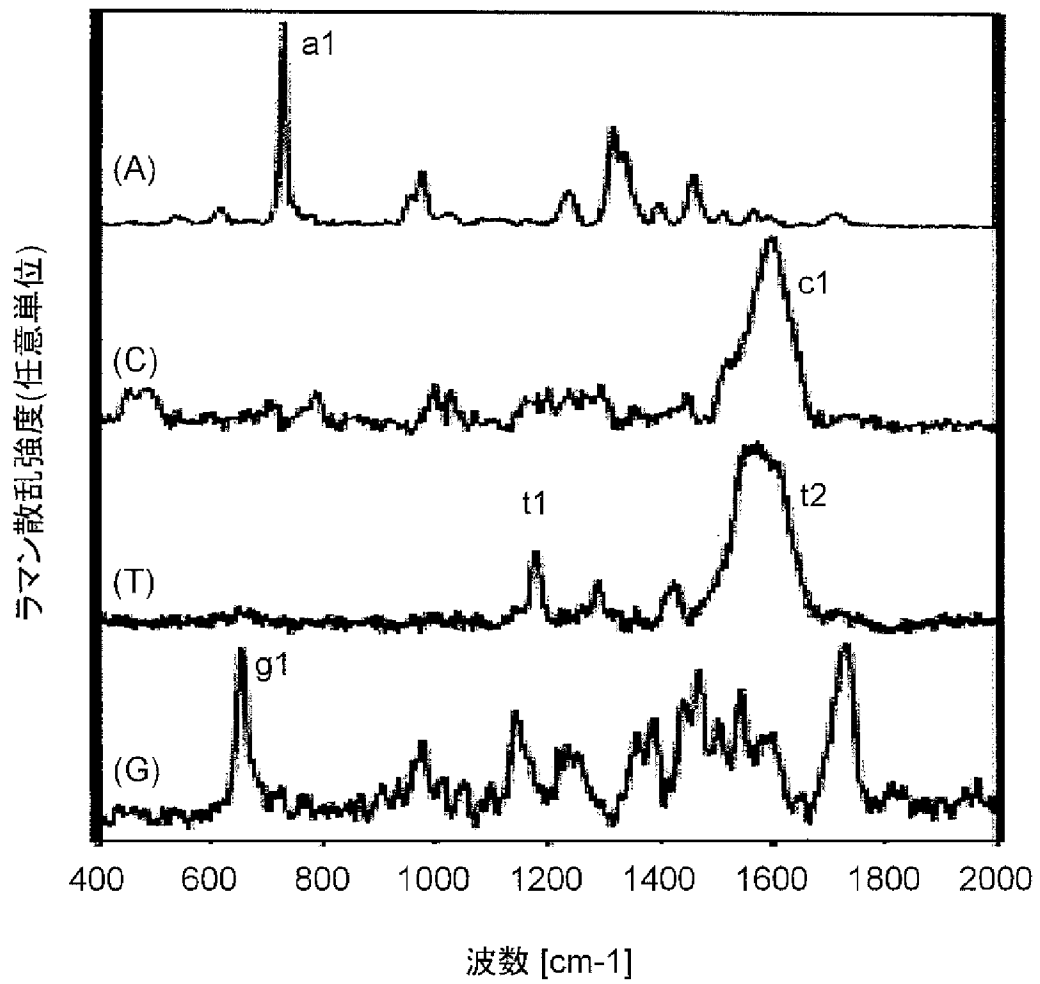


B



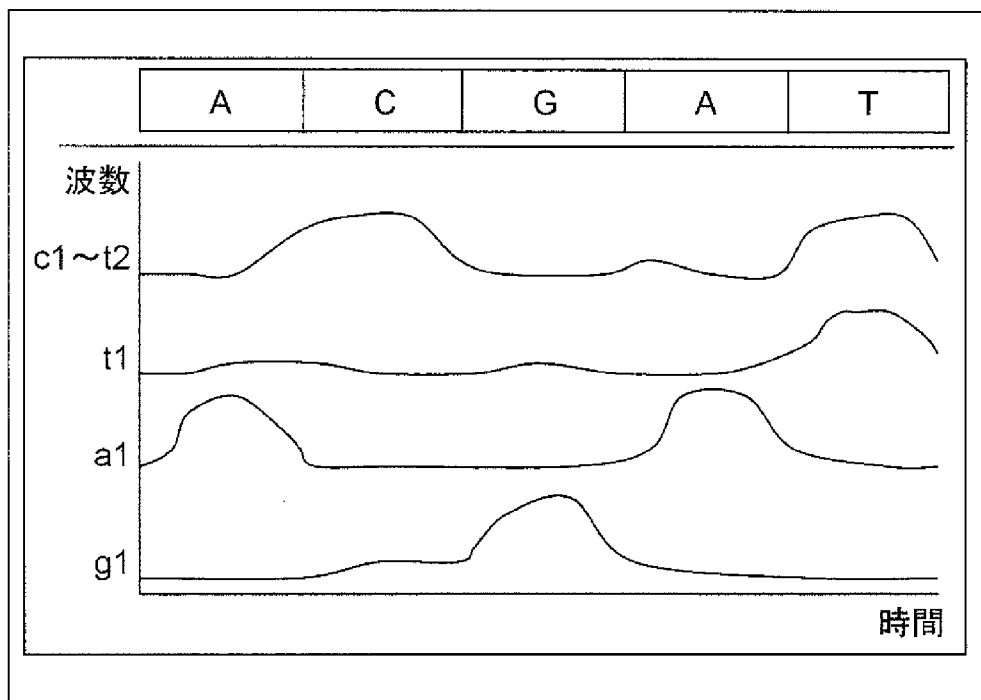
[図7]

図 7



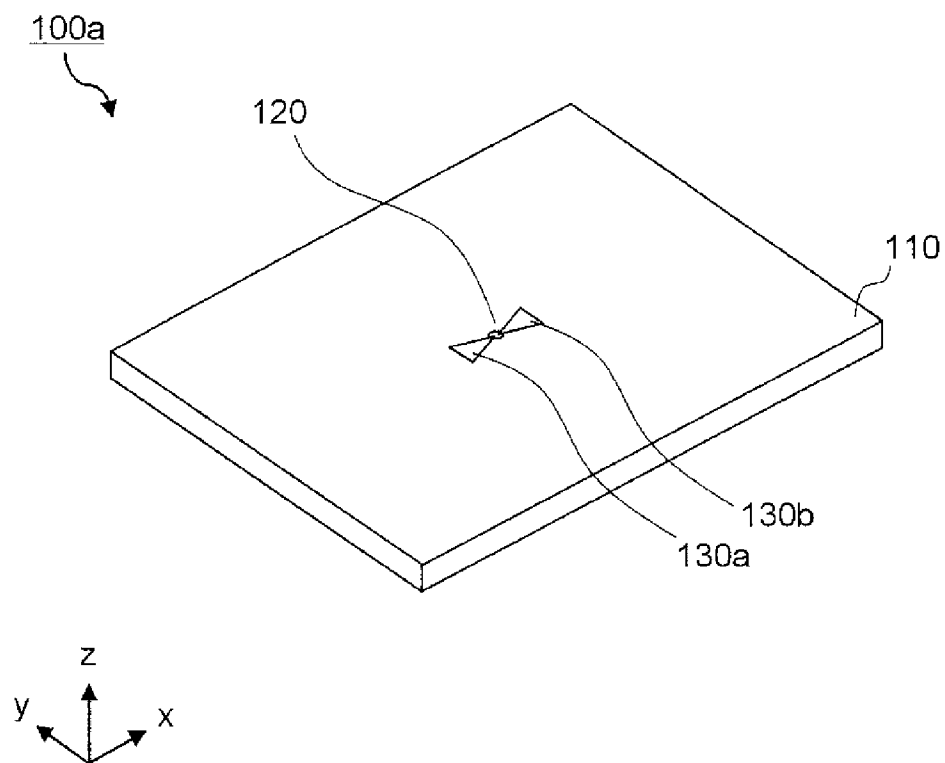
[図8]

図 8



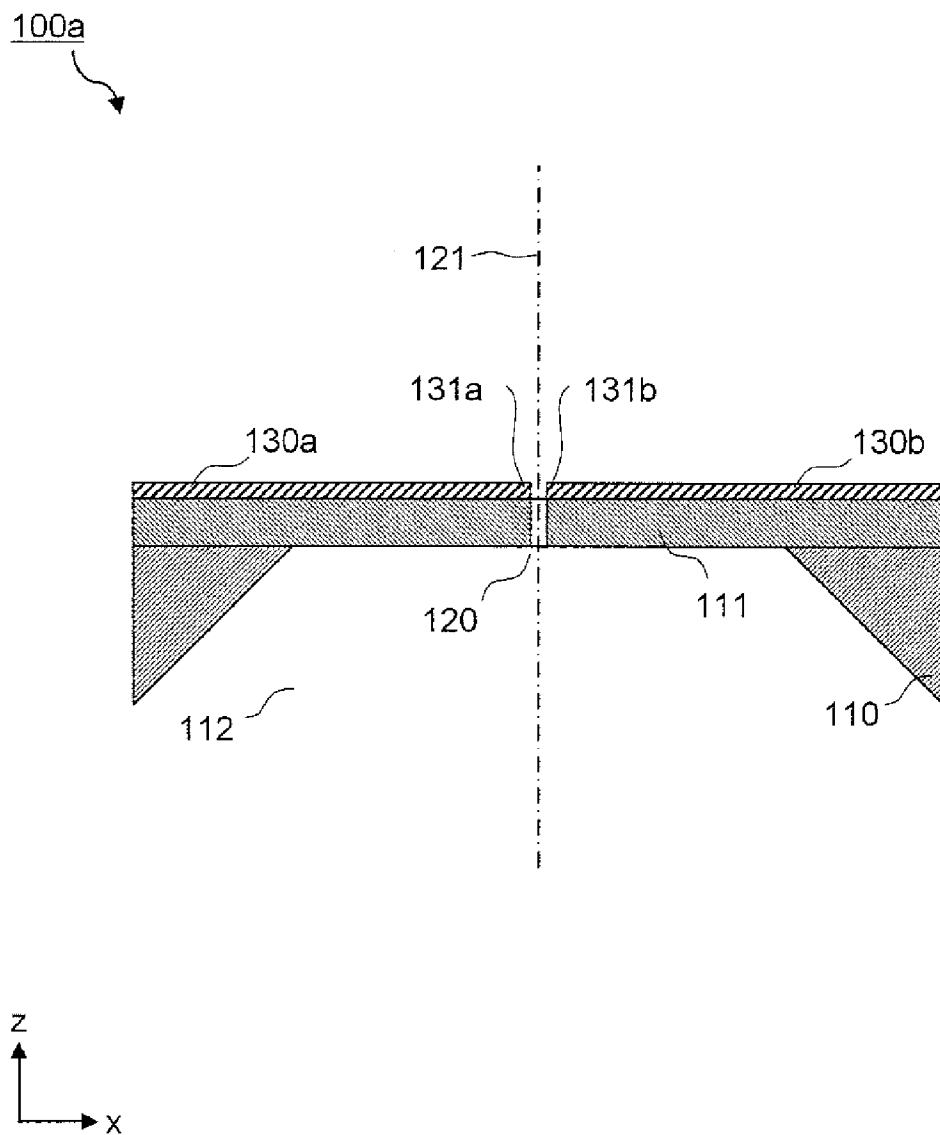
[図9]

図 9



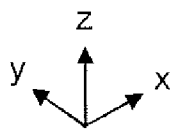
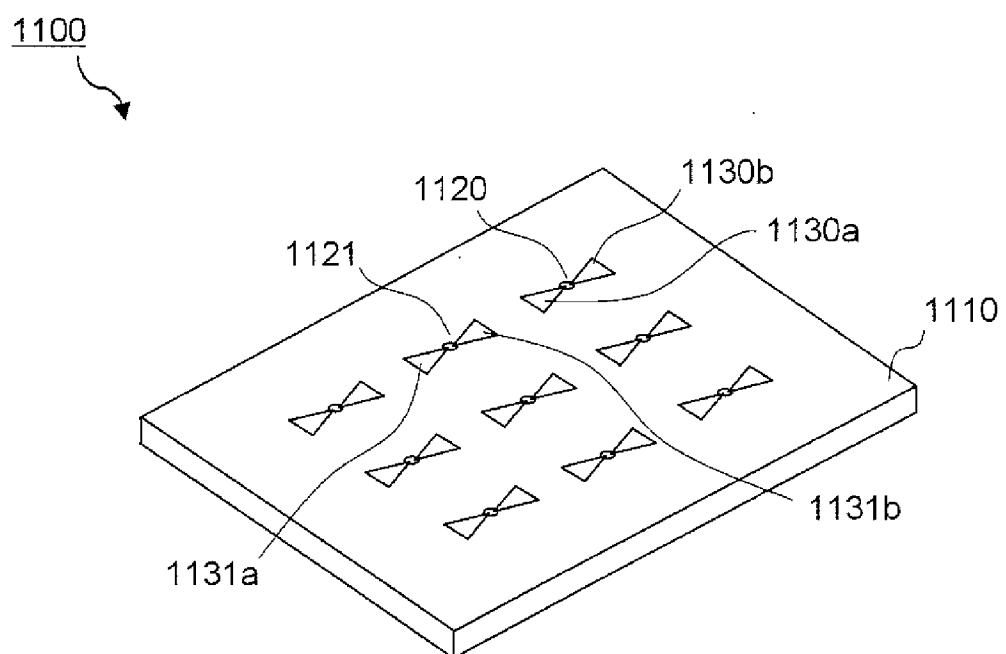
[図10]

図 10



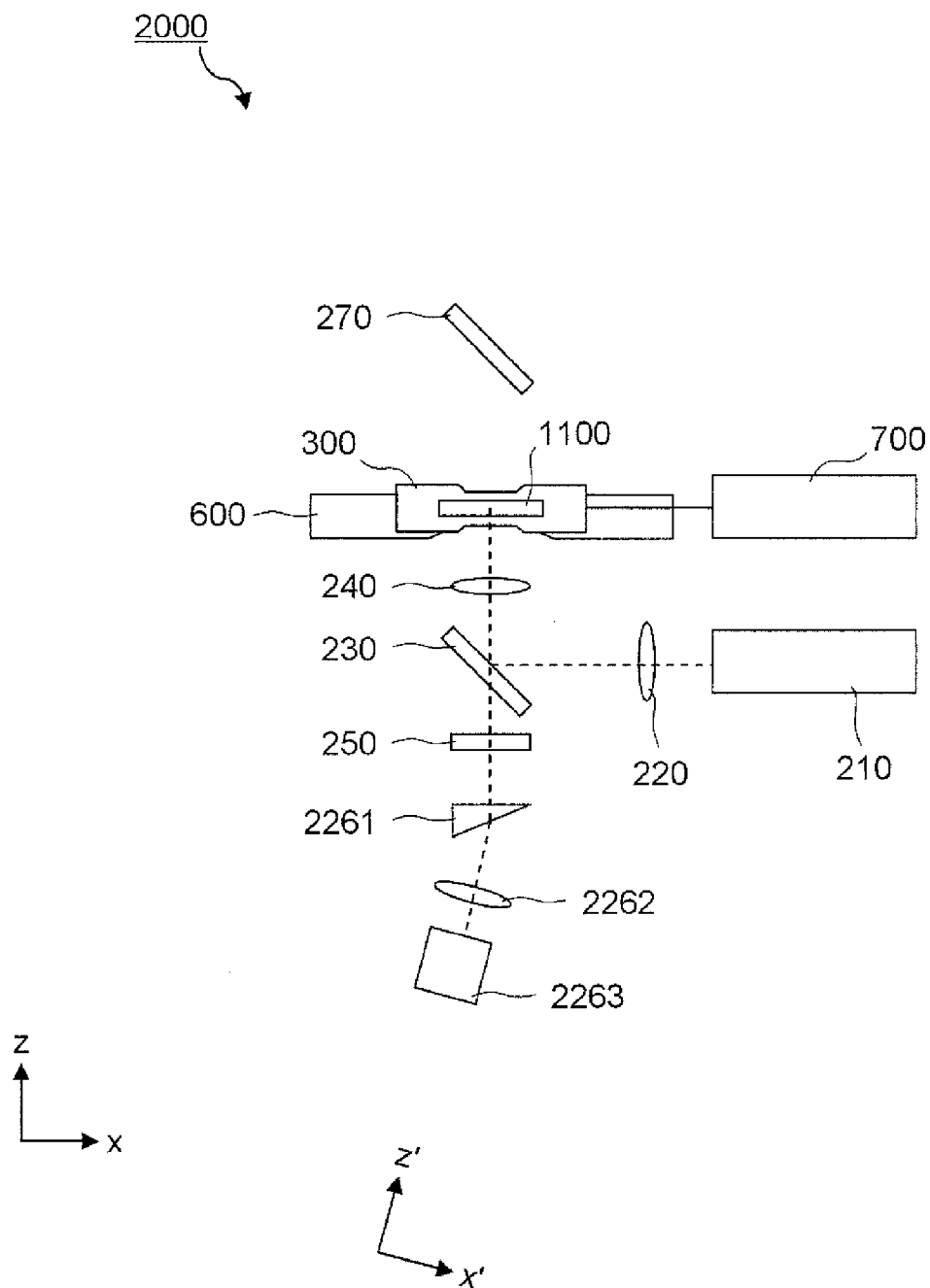
[図11]

図 1 1



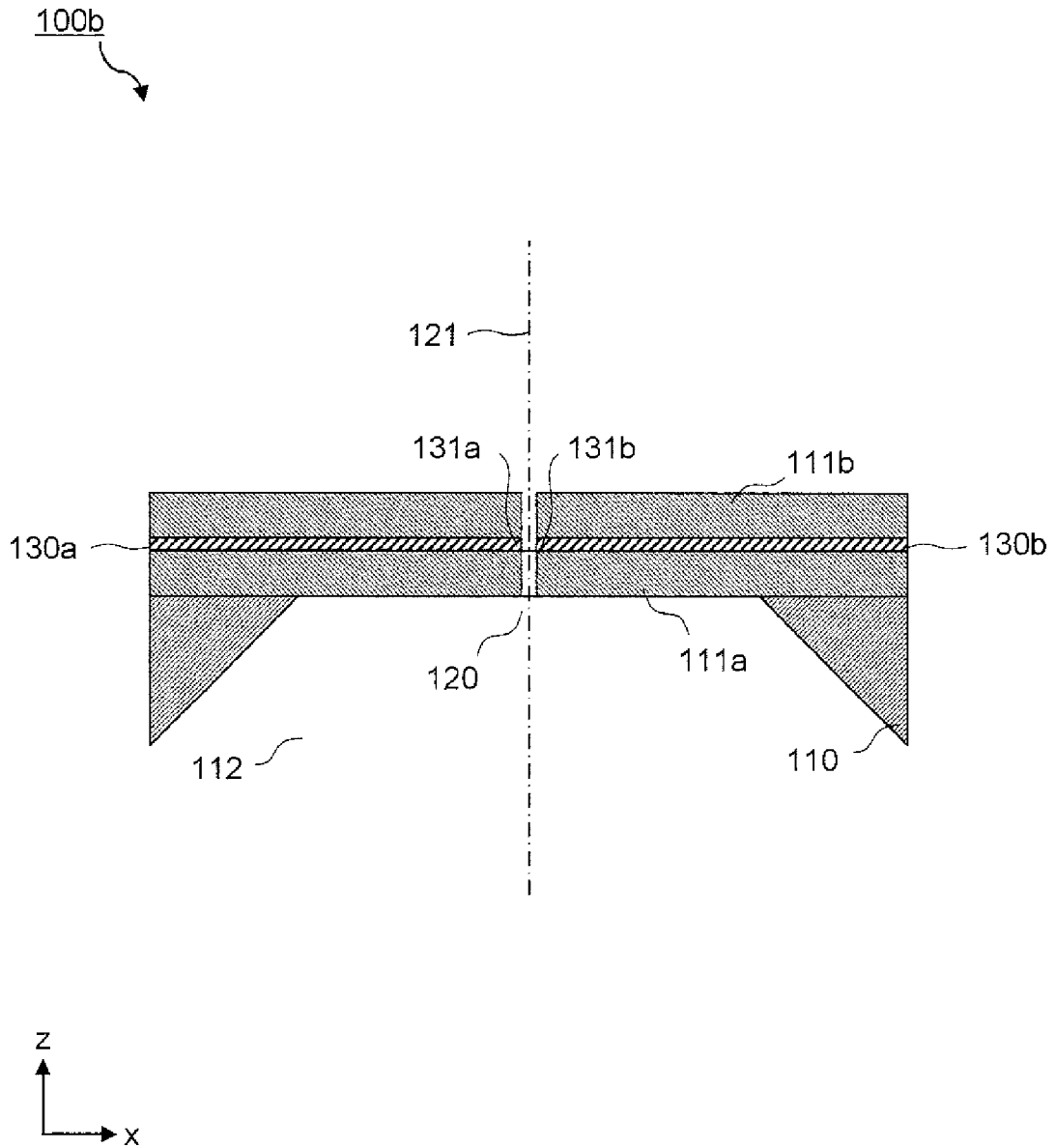
[図12]

図 1 2



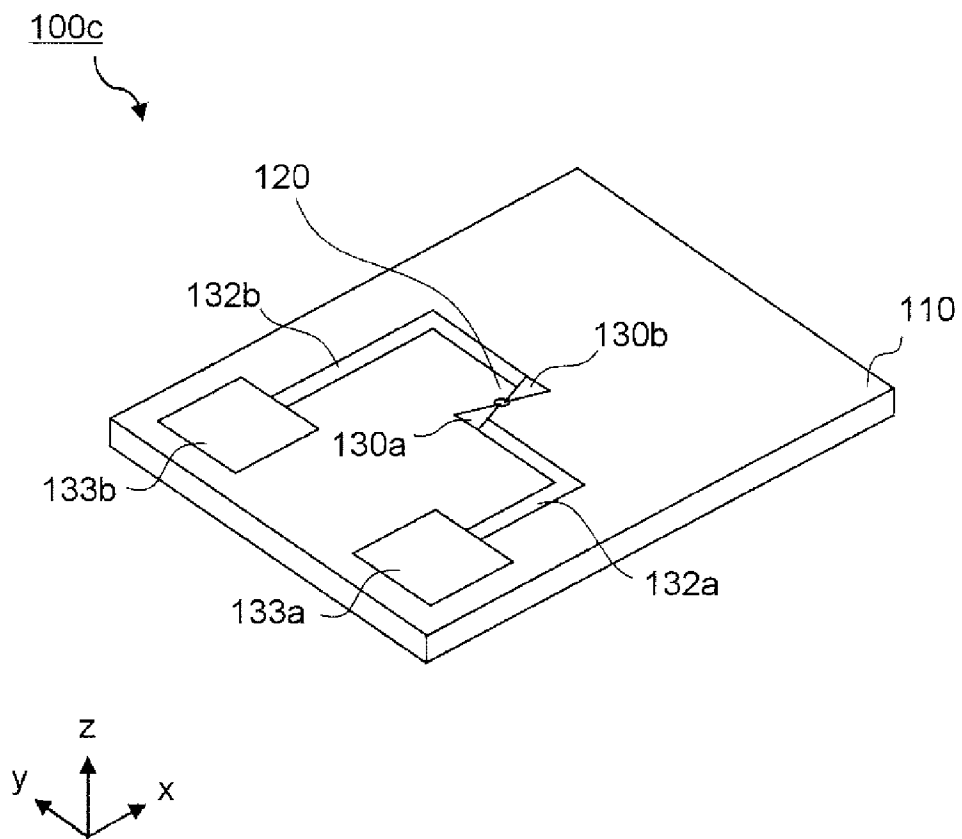
[図13]

図 13



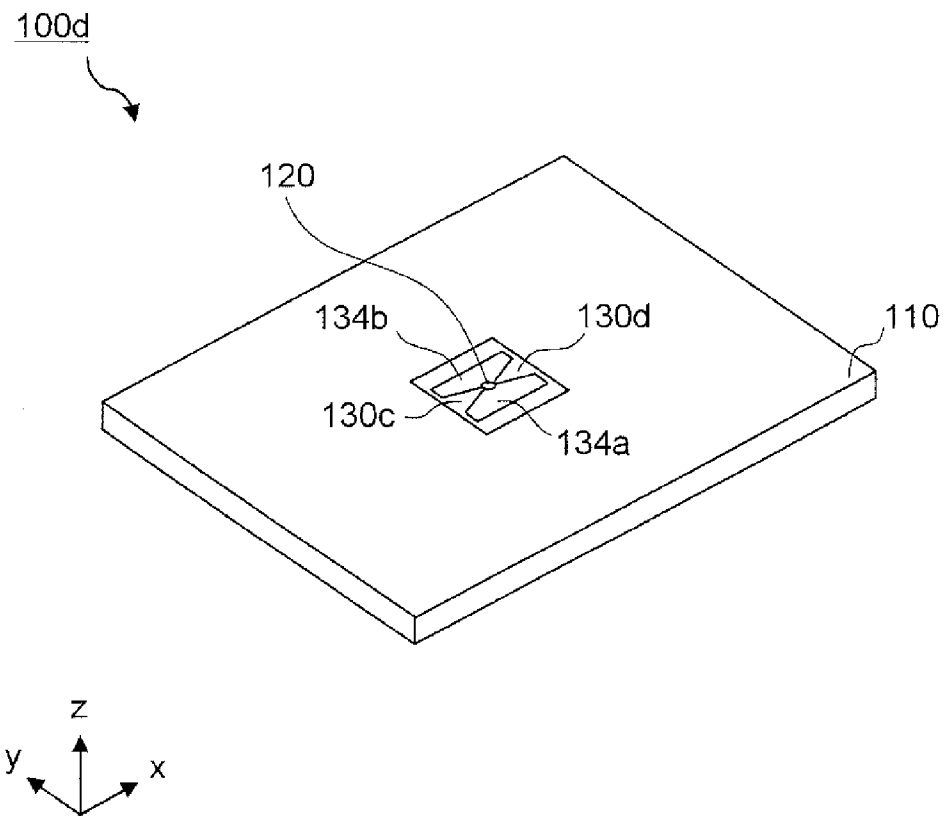
[図14]

図 1 4



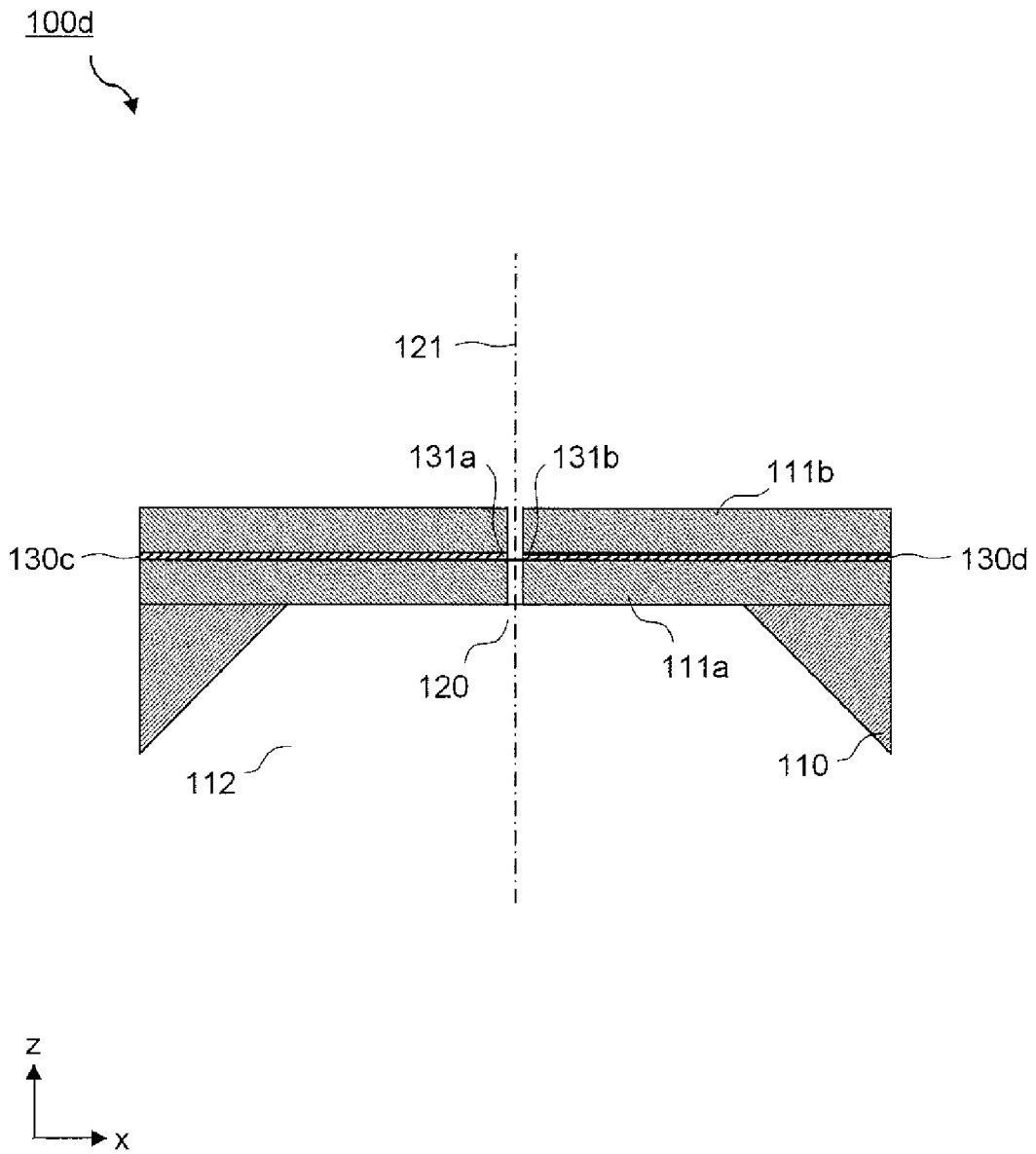
[図15]

図 15



[図16]

図 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/65(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y15/00(2011.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N37/00(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)
G01N21/65, B82Y5/00, B82Y15/00, C12N15/09, G01N37/00

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 1996-2011
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-516237 A (VP Holding, L.L.C.), 15 May 2008 (15.05.2008), paragraphs [0013], [0024], [0032] to [0033], [0059] to [0062]; fig. 2, 9 & EP 1807684 A & WO 2007/011389 A2 & CA 2583467 A & KR 10-2007-0083996 A & CN 101036039 A & RU 2378627 C & AU 2005334507 B	1-21
Y	JP 2003-114184 A (Hitachi, Ltd.), 18 April 2003 (18.04.2003), paragraphs [0010], [0012], [0031]; fig. 1 & US 2003/0066944 A1	1-21

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
09 August, 2011 (09.08.11)

Date of mailing of the international search report
23 August, 2011 (23.08.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066582

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/030953 A1 (UNIVERSITY OF WARWICK) , 12 March 2009 (12.03.2009) , description, pages 4, 9, 26 to 28; fig. 7 & JP 2010-538290 A & US 2011/0036994 A & GB 717150 D & EP 2188618 A & CA 2698876 A & CN 101842692 A	7, 8, 10, 11, 21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N21/65(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y15/00(2011.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N37/00(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. G01N21/65, B82Y5/00, B82Y15/00, C12N15/09, G01N37/00

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	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011年

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

JSTPlus/JMEDPlus(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
Y	JP 2008-516237 A (ブイピー ホールディング、エルエルシー) 2008.05.15, 【0013】、【0024】、【0032】 - 【0033】、 【0059】 - 【0062】、図2、図9 & EP 1807684 A & WO 2007/011389 A2 & CA 2583467 A & KR 10-2007-0083996 A & CN 101036039 A & RU 2378627 C & AU 2005334507 B	1-21

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、一般的な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

09.08.2011

国際調査報告の発送日

23.08.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
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)

波多江 進

2W

9508

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
Y	JP 2003-114184 A (株式会社日立製作所) 2003.04.18, 【0010】、 【0012】、【0031】、図1 & US 2003/0066944 A1	1-21
Y	WO 2009/030953 A1 (UNIVERSITY OF WARWICK) 2009.03.12, 明細書 4, 9, 26-28頁、図7 & JP 2010-538290 A & US 2011/0036994 A & GB 717150 D & EP 2188618 A & CA 2698876 A & CN 101842692 A	7, 8, 10, 11, 21