(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
2015 年 6 月 11 日(11.06.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/083767 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 27/00 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/082066

(22) 国際出願日: 2014 年 12 月 4 日(04.12.2014)

(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 2013-251993 2013 年 12 月 5 日(05.12.2013) JP

(71) 出願人: 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: 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). 柳 至(YANAGI Itaru); 〒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). 大浦 剛(OOURA Takeshi); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目２４番１４号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 板橋 直志(ITABASHI Naoshi); 〒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). 穴沢 隆(ANAZAWA Takashi); 〒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: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕２丁目５番１号 愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

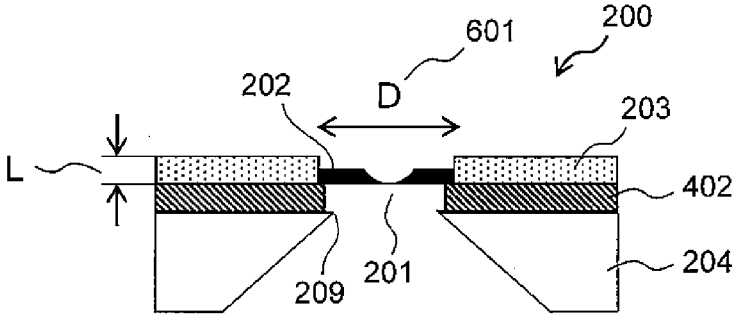
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,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

[続葉有]

(54) **Title**: CHIP FOR ANALYZING BIOMOLECULAR CHARACTERISTICS AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称 : 生体分子特性解析チップ及びその製造方法

図 7



(57) **Abstract**: This chip for analyzing biomolecular characteristics comprises a substrate having an opening, a first membrane formed atop the substrate, a second membrane formed atop the substrate higher than the first membrane, and a third membrane disposed at the location of the opening and having a pore. The second membrane forms a bank portion that surrounds the periphery of the third membrane, and the pore of the third membrane has a crater structure in which the diameter at the lowest point of the pore is smaller than the largest diameter of the pore.

(57) 要約: 生体分子特性解析用チップは、開口部を有する基板と、前記基板上に成膜された第一の膜と、前記基板上に前記第一の膜より上側に成膜された第二の膜と、前記開口部の位置に配置され、ポアを有する第三の膜と、を備える。前記第二の膜は、前記第三の膜の周囲を囲む土手部を形成しており、前記第三の膜の前記ポアは、前記ポアにおける最下の径が前記ポアの最大径よりも小さいようなクレータ構造を有する。

WO 2015/083767 A1

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 ： 生体分子特性解析チップ及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体分子特性解析チップ構造及びその製造方法に関し、特に、測定対象である生体分子と同一またはそれに近いサイズのナノポアを有する生体分子特性解析チップ構造及びそのナノポアを作製する技術に関する。

背景技術

[0002] 次世代ＤＮＡシーケンサとして、伸長反応や蛍光ラベルは行わずに、ＤＮＡの塩基配列を電気的に直接計測する手法が注目を浴びている。直接計測法にはいくつかの手法が提案されているが、その一つに封鎖電流方式がある。薄膜に透過電子顕微鏡などによって数ｎｍのポア（ナノポア）を作製し、その薄膜の両側に電解質溶液を満たした液槽を設ける。それぞれの液槽に電極を設け、これらの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。イオン電流は一次近似としてナノポアの体積に比例する。ＤＮＡがナノポアを通過する際に、ＤＮＡがナノポアを封鎖し、イオンが通過できる有効体積が減少するため、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本鎖との差異や、塩基の種類を判別する。

[0003] 上記方式を採用したセンサが、ＤＮＡシーケンサとして機能するためには、ＤＮＡ分子直径程度に形成されたナノポアおよび一塩基サイズの膜厚を有する薄膜が必要である。封鎖電流方式ではナノポアを通過するイオンを測定対象物が封鎖した量で物性を検出するため、ＤＮＡの塩基識別の場合、塩基種間の違いは、数ｐＡから１０ｐＡ程度の電流差として現れる。そのため、ＳＮ比を高く保つ必要がある。また、封鎖電流として記録される体積変化量から塩基種を識別するため、封鎖量に寄与する分子の領域が一塩基サイズである必要がある。

[0004] ポア径がＤＮＡサイズであることは、副次的にＤＮＡの運動制御の役割も

果たす。ナノポアがＤＮＡ直径程度になると、ＤＮＡとナノポア内壁との相互作用が大きくなるためである。また、ＤＮＡ中の一塩基の情報をセンシングするために、ＤＮＡは高次構造がほぐれた状態、さらには引き伸ばされた状態となる必要があり、ＤＮＡ直径サイズに形成されたナノポアはそれらを実現する。

[0005] 現在主流となっている一塩基分解能を達成するナノポア形成法の一つは、Ｇｒａｐｈｅｎｅ膜を作製し、大きめに形成されたポアの上部に貼り付け、ＴＥＭによりポアを形成する手法である（非特許文献１）。一方で、用途は異なるが、Ｇｒａｐｈｅｎｅやその他材料の選択成長性を用いたポア状欠陥の形成法が提案されている。下地材料に対して膜成長するが、ビーズ表面には膜成長しないような選択成長が起きる材料を用いて、下地上にビーズを蒔いた状態で成膜を行う。このときビーズが接触した下地上には膜成長が起きないことから、膜中にビーズ型のポアを形成する手法が提案されている（非特許文献２）。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Christopher A. Merchant et al.、Nanolett.、10、2915-2921 (2010)

非特許文献2：Min Wang et al.、Sci. Reports、3、1238-1244 (2013)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、非特許文献１の従来技術は、ＴＥＭによるポア形成を行っているという点で量産に向かない作製法であるばかりか、Ｇｒａｐｈｅｎｅが反応性イオンエッチングによるダメージに弱いため、量産プロセスに入れ込むことが困難である。

[0008] また、非特許文献２の従来技術は、ビーズにかたどられた部分を密に集積加工したり、ランダムにパターニングしたりすることでストレージやグラフ

ェンのトランジスタを作製することを目的としている。したがって、そもそも、一つのセンサに一つのポアを設ける形態で測定する必要のある直接計測方式のＤＮＡシーケンサに適応できる形にはなっていない。

[0009] 本発明の目的は、直接計測方式のＤＮＡシーケンサに適応できる生体分子特性解析チップであって、目的の膜に対して任意のポア数が作成された生体分子特性解析チップ及びその製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 上記課題を解決する為に、例えば特許請求の範囲に記載の構成を採用する。本願は上記課題を解決する手段を複数含んでいるが、その一例をあげるならば、開口部を有する基板と、前記基板上に成膜された第一の膜と、前記基板上に前記第一の膜より上側に成膜された第二の膜と、前記開口部の位置に配置され、ポアを有する第三の膜と、を備える生体分子特性解析用チップであって、前記第二の膜は、前記第三の膜の周囲を囲む土手部を形成しており、前記第三の膜の前記ポアは、前記ポアにおける最下の径が前記ポアの最大径よりも小さいようなクレータ構造を有する、生体分子特性解析用チップが提供される。

[0011] また、他の例によれば、基板に少なくとも第一の膜及び第二の膜を成膜し、その後、前記第二の膜に周囲が囲まれた凹部を形成し、前記第一の膜の一部を露出させる第一の工程と、障害物を含む溶液を前記基板に浸すまたは吹きつけることにより、前記凹部に前記障害物を配置する第二の工程と、前記障害物が配置された前記凹部内に第三の膜を成膜する第三の工程と、前記障害物を取り除く第四の工程と、前記基板の裏面をエッチングし、前記凹部の位置に対応する前記第一の膜の部分を露出させる第五の工程と、前記第三の膜の直下にある前記第一の膜をエッチングすることにより、前記第三の膜において前記障害物と前記第一の膜の接点の位置にポアが形成される第六の工程と、を含む生体分子特性解析用チップの製造方法が提供される。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、目的の膜に対して任意のポア数が作成された生体分子特

性解析チップ構造を提供することができる。

[0013] 本発明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、上記した以外の、課題、構成及び効果は、以下の実施例の説明により明らかにされる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]生体ポリマ特性解析装置の構成の一例を示す図である。

[図2A]生体ポリマ特性解析チップの拡大図の一例を示す図である。

[図2B]生体ポリマ特性解析チップの拡大図の一例を示す図である。

[図3]生体ポリマ特性解析チップによって取得される配列読取例である。

[図4A]ナノポア薄膜の形成プロセスの一例である。

[図4B]ナノポア薄膜の形成プロセスの一例である。

[図4C]ナノポア薄膜の形成プロセスの一例である。

[図5A]ナノポア薄膜の形成プロセスの別の例である。

[図5B]ナノポア薄膜の形成プロセスの別の例である。

[図5C]ナノポア薄膜の形成プロセスの別の例である。

[図6A]ポア径とビーズ径の相関を示す図であり、ナノポア薄膜と球体の断面図である。

[図6B]図６Ａの上面図である。

[図6C]ポア径とビーズ径の相関を示す図であり、球体を取り除いたナノポア薄膜の断面図である。

[図6D]図６Ｃの上面図である。

[図7]本発明における生体ポリマ特性解析チップの全体像を示す図である。

[図8A]第１実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図8B]第１実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図8C]第１実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図8D]第１実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図8E]第１実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図8F]第１実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図9A]第２実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図9B]第２実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図9C]第２実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図9D]第２実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図9E]第２実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図9F]第２実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図9G]第２実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図9H]第２実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図9I]第２実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図10A]第３実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図10B]第３実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図10C]第３実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図10D]第３実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図10E]第３実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図10F]第３実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図10G]第３実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図10H]第３実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図11A]第４実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図11B]第４実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図11C]第４実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図11D]第４実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図11E]第４実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図11F]第４実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図11G]第４実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図11H]第４実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

[図11I]第４実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、添付図面を参照して本発明の実施例について説明する。なお、添付

図面は本発明の原理に則った具体的な実施例を示しているが、これらは本発明の理解のためのものであり、決して本発明を限定的に解釈するために用いられるものではない。

[0016] 各実施例で述べる「ナノポア」とは、薄膜に設けたナノサイズの孔であり、薄膜の表裏を貫通する。薄膜は主に無機材料から形成される。薄膜材料の例としては、ＳｉＮ、SiO_2、Ｇｒａｐｈｅｎｅ、Ｇｒａｐｈｉｔｅ、Ｓｉなどが挙げられる。薄膜材料は、他に、有機物質、高分子材料などを含むこともできる。ナノポアを有する薄膜（ナノポア薄膜）は、上下に支持膜を持たずに、宙に浮いた構造となっている（ｆｒｅｅ－ｓｔａｎｄｉｎｇ　ｍｅｍｂｒａｎｅ）。

[0017] はじめに、本発明のナノポア作製プロセスを用いて作製するナノポアデバイスを用いた生体ポリマ特性解析装置を説明する。図１は、生体ポリマ特性解析装置の構成の一例を示す図であり、生体ポリマ特性解析チップによる塩基配列読取機構を示す。

[0018] 図１に示すように、生体ポリマ特性解析装置（例えば、ＤＮＡ解析装置）１００は、仕切り体１０１により分けられた二つの槽１０７Ａ、１０７Ｂを備える。仕切り体１０１には、ナノポアを有する生体ポリマ特性解析チップ（以下、ナノポアデバイスの呼ぶ）２００が設置されている。二つの槽１０７Ａ、１０７Ｂには、電解質溶液１０２が満たされている。二つの槽１０７Ａ、１０７Ｂは、Ａｇ／ＡｇＣｌ電極１０３及び電源１０４で電気的に接続されている。

[0019] ＤＮＡ溶液を注入口１０５から注入すると、液中のＤＮＡ１０６は、ナノポアデバイス２００のナノポアを通して、一方の槽１０７Ａから反対側の槽１０７Ｂに泳動する。塩基配列は、ＤＮＡ１０６がナノポアデバイス２００のナノポアを通過する際に変化する電流値から読み取られる。電流値は、アンプ１０８で増幅されて、ＡＤＣ（図示せず）を介してＰＣ（Ｐｅｒｓｏｎａｌ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ）１０９に記録される。

[0020] 図２Ａ及び図２Ｂは、ナノポアデバイス２００の拡大図を示す。ナノポア

デバイス２００は、ナノポア２０１と、ナノポアが形成された薄膜（ナノポア薄膜）２０２と、ナノポア薄膜の上側に形成された第二の膜（土手部）２０３と、ナノポア薄膜２０２を支持する基板２０４とを備える。ナノポアデバイス２００の上下の槽１０７Ａ、１０７Ｂに電解質溶液１０２（図１参照）を満たし、ナノポアデバイス２００を介して上下に電圧を印加すると、電解質溶液１０２中のイオン由来の、ナノポア２０１のポア径に応じた電流が検出される。

[0021] 図２Ａは、ＤＮＡ１０６がナノポア２０１を通過する例を示す。ＤＮＡ１０６がナノポア２０１を通過すると、イオンの流れが妨げられるため、電流値は、ナノポア２０１中のＤＮＡ１０６の体積分だけ減少する。図２Ｂは、ナノポア２０１の構造を示す概略図である。ナノポア２０１は、以下で説明する球体（ビーズ）を用いて形成される。ナノポア２０１の形状は、ビーズ軌跡２０５で示されるようなクレータ構造を取る。

[0022] ＤＮＡ解析装置１００では、塩基種毎の電流値の変化量の違いから塩基識別を行う。図３は、電極１０３で電圧を印加することにより読み取られる塩基種ごとの電流変化の例である。配列読取例３００に示されるように、４種類の塩基ごとに異なる電流値が検出される。

[0023] 次に、本実施例におけるナノポアの構造について説明する。図４Ａ～図４Ｃは、ナノポア薄膜の形成プロセスの一例である。本実施例におけるナノポアは、障害物によって成膜を妨げられることによって作製される。図４Ａ～図４Ｃは、ポアが形成される際の、薄膜周辺のプロセスを抜き出して示している。

[0024] 障害物は、例えば、球体（ビーズ）である。なお、障害物は、他の形状でもよい。ナノポアが球体で作製された場合は、図２Ｂで示したように、ナノポア薄膜２０２中に形成されたナノポア２０１は、ビーズ軌跡２０５で示されるようなクレータ構造となる。ここで、ナノポア薄膜２０２は、２層以上の原子層で成膜されている。この場合、クレータ構造とは、ポアにおける最下の径がポアの最大径よりも小さい構造を意味する。

[0025] 図４Ａ～図４Ｃは、ナノポア薄膜２０２の膜厚がビーズ半径以下である場合のプロセスを示す。まず、第一の膜４０２上に球体（ビーズ）４０１が配置される（図４Ａ）。次に、第一の膜４０２上に薄膜２０２が製膜される。このとき、薄膜２０２の膜厚は、ビーズ半径以下である（図４Ｂ）。その後、リストオフによって球体４０１を取り除く（図４Ｃ）。なお、図４Ｂにおける４０３は、球体４０１の直径ｄを示す。また、図４Ｃにおける４０４は、球体４０１によって形成された最大ポア径ｒ２であり、４０５は、球体４０１によって形成された最小ポア径ｒ１であり、４０６は、薄膜２０２の膜厚ｔを示す。このように、ナノポアは、ポアにおける最下の径ｒ１が、最大ポア径ｒ２よりも小さい構造となる。

[0026] 図５Ａ～図５Ｃは、ナノポア薄膜の膜厚がビーズ半径以上であり、かつビーズ直径以下である場合のプロセスを示す。まず、第一の膜４０２上に球体４０１が配置される（図５Ａ）。次に、第一の膜４０２上に薄膜２０２が製膜される。このとき、薄膜２０２の膜厚は、ビーズ半径以上であり、かつビーズ直径以下である（図５Ｂ）。その後、リストオフによって球体４０１を取り除く（図５Ｃ）。

[0027] 以上の構成において、ポア形成に利用するビーズ径と、作製されるナノポア径には相関がある。図６Ａ～６Ｄは、ポア径とビーズ径の相関を示す図である。なお、図６Ａ～図６Ｄにおいて、薄膜はグラフェンを用いて作製された構造である。

[0028] 図６Ａの５００は、ビーズを配置した状態で成膜した直後の薄膜の断面図である。図６Ｂの５０１は、５００の上面図である。また、図６Ｃの５０２は、成膜に使用したビーズを取り去った後の薄膜の断面図である。図６Ｄの５０３は、５０２の上面図である。

[0029] 図６Ａ及び図６Ｂにおいて、５０５はナノポアが形成される薄膜（すなわち、図４の薄膜２０２に対応する）であり、５０６は第一の膜である。また、５０４は、薄膜５０５の成膜前に配置されるビーズである。図６Ａ～図６Ｄに示すように、本実施例で作成されるナノポアは、障害物（ビーズ５０４

）が存在する部位にのみ薄膜形成がなされず、ビーズ５０４をかたどった状態で膜形成される。そのため、目的のポア径ｒと、ビーズ５０４の径ｄと、下地（第一の膜５０６）と成膜材（薄膜５０５）との間の原子間距離αには相関があり、以下の式で記述できる。

[数1]

$$d = \frac{r^2 + 4\alpha^2}{4\alpha}$$

[0030] ここで、Ｃｕ上に形成されたグラフェンの場合、Ｃｕ－炭素間の結合距離が、０．３ｎｍであるので、１．４ｎｍのポアを形成したい場合、１．９８ｎｍのビーズを用いれば良いということが分かる。球体の障害物のサイズが０．３ｎｍ以下でＣｕとの接触が揺らぐ場合を含めて、ナノポアは、１．４～１．４１ｎｍのサイズで形成される。

[0031] 求めるポア径が１．４～２ｎｍの場合、ビーズ径は約２ｎｍ～４ｎｍである。求めるポア径が２ｎｍ～５ｎｍの場合、ビーズ径は約４ｎｍ～２５ｎｍである。求めるポア径が５～１０ｎｍの場合、ビーズ径は約２５～１００ｎｍである。

[0032] 図７は、以上の成膜手法及びポア径の作成方法によって形成されるポアを有するナノポアデバイスの全体像を示す。生体分子特性解析用のナノポアデバイス２００には、上述したクレータ構造を有するポアまたは逆円錐型をしたポアが形成されている。ナノポアデバイス２００は、基板２０４と、第一の膜４０２と、第二の膜２０３と、ナノポア２０１を有するナノポア薄膜（第三の膜）２０２とから構成される。

[0033] 基板２０４には開口部２０９が形成されており、基板２０４上に第一の膜４０２と第二の膜２０３とが積層されている。ナノポア薄膜２０２は、基板２０４の開口部２０９の位置で上下に何もない状態で配置されている。ナノポア薄膜２０２は、この例では、第一の膜４０２によって支持されている。別の例として後述するように、第一の膜と第二の膜の間にナノポア薄膜と同じ材料の膜を配置し、この膜とナノポア薄膜とを接続するようにしてもよい

。第二の膜２０３は、ナノポア薄膜２０２の周囲を囲む土手部を形成しており、第二の膜２０３の上面は、ナノポア薄膜２０２の上面よりも高い位置にある。生体分子特性解析を行う際には、ナノポア薄膜２０２の上下が電解質溶液で満たされ、その状態で電圧を印加し、生体分子がナノポア２０１を通過する際に起こる電流変化から特性を解析する。

[0034] 本発明の実施例の一つに、第二の膜２０３に形成する構造のサイズにより球体が配置される個数を制御し、ナノポア薄膜２０２中に形成されるナノポア２０１の個数を制御することがある。図７に示すように、第二の膜２０３に形成した凹部のサイズＤを６０１で示す。このとき、ポア径ｒは、土手部に囲まれた凹部の幅Ｄ（６０１）に対して、以下の関係が成り立つ。

[数2]

$$D < \frac{r^2 + 4\alpha^2}{2\alpha}$$

[0035] ここで、αは、ナノポア薄膜と、その薄膜を形成する際に用いた下地との間の原子間距離である。ナノポア薄膜に対してナノポアの数を一つにしたい場合、かつ土手部で囲まれた凹部の平面視の形状が正方形である場合、土手部に囲まれた凹部の幅D_1（図７のＤに対応する）は、高さに寄らず球体の径ｄに対して、１．２ｄ以下に形成するのがよい（$D_1 \leqq 1.2d$）。また、ナノポア薄膜に対してナノポアの数を一つにしたい場合、かつ、土手部に囲まれた凹部の構造が正方形以外の形状である場合は、例えば、土手部で囲まれた凹部の形状の平面視における最大幅D_2（円の場合は直径）は、球体の径ｄに対して、２ｄより小さくするのがよい（$D_2 < 2d$）。

[0036] また、ナノポア２０１のサイズは、測定対象の分子の実効径にあわせる。例えば、一本鎖ＤＮＡの場合は、ナノポア２０１のサイズは、１．４ｎｍにするとよい。ナノポア薄膜２０２は、ナノポア２０１を形成する際に塗布されたものであり、ナノポア２０１を作製する時に用いられたビーズ４０１の径以下の膜厚で形成される必要がある。

[0037] そのため、ポア径ｒは、土手部に囲まれた凹部の幅Ｄ、土手部の高さＬ（

例えば、第一の膜４０２の上面から第二の膜２０３の上面までの高さ）、ナノポア薄膜２０２とその薄膜を形成する際に用いた下地材料（第一の膜４０２）との間の原子間距離αに対して、Ｌ／Ｄ＝α／ｒの関係が成り立つ。但し、図７中のＤは前述の通り、ポア径に応じて規定される。第一の膜４０２は均一な薄膜を形成するための下地材料であり、ナノポア薄膜２０２に応じて材料が規定される。

[0038] その他の例として、第二の膜２０３と第一の膜４０２との間にナノポア薄膜２０２と同じ材料の膜が成膜されてもよい。これによってナノポア薄膜２０２の強度が増す。その他の例として、第二の膜２０３とナノポア薄膜２０２が同一材料でもよい。

[0039] ［第１実施例］

図８Ａ～図８Ｆを用いて、上記ナノポア構造が作られるプロセスの第１実施例を説明する。まず、第一の膜４０２及び第二の膜２０３を基板２０４上に成膜し、ビーズが一つのみ固定されるサイズで第二の膜２０３をパターニング加工する第一の工程を行う（８１０）。このとき、第二の膜２０３がパターニングされることにより、第二の膜２０３に周囲が囲まれた凹部２０６が形成される。この凹部２０６において第一の膜４０２の一部が露出した状態となる。

[0040] 次に、ビーズなどの球体４０１を凹部２０６に配置する第二の工程を行う（８１１）。このとき、次のプロセスで使う膜材料が、下地材料である第一の膜４０２上には成膜されるが、球体４０１には成膜されないように、第一の膜４０２及び球体４０１の構成材料が選定される。次に、凹部２０６に薄膜（第三の膜）２０２を成膜する第三の工程を行う（８１２）。このとき、薄膜２０２は、球体４０１に成膜されないため、球体４０１で阻害された部位の第一の膜４０２上に薄膜２０２が成膜されることがない。

[0041] 次に、球体４０１を取り除く第四の工程を行う（８１３）。このとき、球体４０１上に薄膜２０２が成膜されていないので、リストオフによって球体４０１を取り除くことが可能である。球体４０１のリフトオフ後、凹部２０

６の位置に対応する基板２０４の一部（凹部２０６の垂直同一軸上の基板２０４の部分）をエッチングする第五の工程を行う（８１４）。このとき、凹部２０６の位置に対応する第一の膜４０２の部分が露出する。このとき、プロテックなどの樹脂材料２０７にて表面のパターンを保護する。最後に、樹脂材料２０７及び薄膜（第三の膜）２０２の直下にある第一の膜４０２をエッチングする第六の工程を行う（８１５）。これにより、薄膜２０２において球体４０１と第一の膜４０２の接点の位置にポアが形成される。以上により、ナノポアを有する凹部構造が形成された薄膜が出来上がる。以下では、上記第一の工程～第六の工程の詳細を説明する。

[0042] ＜第一の工程（８１０）＞

第二の膜２０３からなる土手部の形成のプロセスに先んじて、基板２０４上に第一の膜４０２を形成する。この第一の膜４０２は、第三の工程（８１２）における薄膜２０２の下地になる。例えばグラフェンによって薄膜を形成する場合、表面ラフネスの少ない単結晶上にグラフェン成長を実施する。本実施例のプロセスにおいては、予め原子層成膜法や分子気相成長法、エピタキシャル成長法による薄膜の成膜を行うことで表面ラフネスの少ない下地を得ることが出来る。

[0043] 次に、第一の膜４０２の上に第二の膜２０３を形成し、ドライエッチングにより第二の膜２０３の一部を削り取り、第一の膜４０２を部分的に露出させる工程を行う。第二の膜２０３中に作製する凹部（削り部分）２０６のサイズ及び第二の膜２０３の膜厚は、次の工程において土手部で囲まれた凹部に敷き詰める障害物（ビーズ４０１）のサイズに応じて設計する。なお、第一の工程では、基板２０４の裏面にも成膜を行い、Ｓｉエッチングのハードマスクとなる開口部（図８Ａの２１０）を形成しておく。開口位置は、表面の第二の膜２０３の削り位置と垂直同一軸上である。

[0044] ドライエッチングにより第一の膜４０２を露出させる際、第一の膜４０２がダメージを受けて、平坦性が損なわれる可能性がある。これは、第三の膜の膜成長の阻害要因となるため、二つの手法により平坦性を回復させる。一

つは、ドライエッチング後に水素アニールを実施する。一般に走査トンネル顕微鏡や原子間力顕微鏡で使用される試料支持基板の表面は平坦である必要がある。そこでサンプル固定前に支持基板に用いられる材料の単結晶を水素アニールすることで平坦面を出すことが行われている。

[0045] その他の手法は、第二の膜２０３の成膜の仕方をリフトオフ型にすることである。予め水素アニールによって第一の膜４０２を平坦にし、樹脂成膜する。次に、開口予定位置のみが残るようにパターニングを行い、第二の膜２０３を成膜する。最後に、樹脂膜溶剤にて樹脂を溶かし出し、目的の開口部が保護された状態で、第二の膜２０３からなる土手部の形成が達成される。この手法を用いたフローは後述する。

[0046] ＜第二の工程（８１１）＞

次に、目的のポア径に応じたサイズを有する障害物（球体４０１）を第一の工程（８１０）で作製した構造（以降、凹部と呼ぶ）に敷き詰める。障害物は、塗布剤として溶液中に溶かしたものを使用する。塗布剤に含まれている障害物の濃度は、基板（ウエハ）の面積に対する凹部の面積率以上の濃度であることが好ましい。この場合、基板上の複数の凹部に対してより確実に１つの障害物が配置され易くなるためである。この工程では、塗布剤にウエハを浸した後に、傾けつつ引き上げることや、パルス噴射によって塗布剤をウエハ表面に吹きつけることで凹部２０６にビーズ（球体４０１）が固定される。

[0047] 封鎖電流は、薄膜２０２に対してポアが一つであることにより、取得されるシグナルが一分子由来であることを保証する。したがって、薄膜２０２内のポア位置がずれていることによるシグナルへの影響はない。そのため、土手部に囲まれた凹部２０６に配置されるビーズは、凹部２０６の底部で固定されれば固定位置は問わない。このとき、ビーズは、凹部２０６の底部と静電相互作用で固定される。

[0048] ここで土手部内の凹部の底への球体４０１の配置の仕方の他の形態として、球体４０１を磁気性のものにし、かつ基板２０４を磁気性の部材に配置す

ることで、磁気力相互作用によって球体４０１を凹部２０６の底部に引き寄せる手法がある。その他の形態として、凹部２０６の底部、球体４０１の表面に修飾分子を固定することで、水素結合や、共有結合、イオン結合などで固定することも可能となる。

[0049] ＜第三の工程（８１２）＞

第一の膜４０２に選択的に成膜可能で、かつ障害物（球体４０１）に成膜されない材料によって、凹部２０６に薄膜（第三の膜）２０２を成膜する。その組合せとして第一の膜４０２にＣｕ（１００）単結晶、障害物にＣｕ球、第三の成膜ガスにCH_4とするとよい。一般に、グラフェンの成膜としては、Ｃｕ（１００）面に対する、CH_4ガスによるＣＶＤ成長が用いられている。グラフェンの成長には、単結晶かつ面方位が限定されている必要がある。障害物の側面と第一の膜４０２は、単結晶であり、かつ結晶方位面が異なるようにする。障害物に面方位の持たないＣｕ球を用いれば、障害物を避けて第一の膜４０２上に第三の膜が成膜される。グラフェン成長がおきる単結晶の材料として、Ｒｕ、Ｉｒなども挙げられる。また、Al_2O_3とＳｉＯに対するCH_4によるグラフェンの選択成長も発表されており、第一の膜４０２にAl_2O_3、障害物にＳｉＯを用いることで同様の効果を得られる。

[0050] ＜第四の工程（８１３）＞

次に、障害物（球体４０１）のみをリフトオフすると、障害物の形にかたどられた薄膜（第三の膜）２０２が残る。リフトオフに用いる溶液には、第三の膜を削らずに、障害物を溶かし出すことが可能な溶液を用いる。例えば、第三の膜と障害物に選択性のある溶液を用いる。第二の膜２０３がグラフェン、第一の膜４０２がＣｕである場合、クロムのエッチング溶液を用いるとよい。また、第二の膜２０３が炭素、第一の膜４０２がＳｉＯである場合、フッ酸を用いるとよい。

[0051] ＜第五の工程（８１４）＞

次に、球体４０１をリフトオフした後に、ナノポアが形成された薄膜（第三の膜）２０２をプロテックなどの樹脂材料２０７でカバーし、基板２０４

の裏面のＳｉ層をエッチングする。これにより、凹部２０６の位置に対応する第一の膜４０２の部分が露出する。Ｓｉのエッチングには８５℃に熱したＫＯＨや、同じく８５℃下でシリコンのエッチングに腐食作用を有するＴＭＡＨやNH_2OHを含んだエッチング液に長時間浸すことで達成される。このとき、Ｓｉ以外にも表面の材料に対して腐食作用が働くことがあるため、プロテックなどの樹脂材料２０７にて表面のパターンを保護する。

[0052] ＜第六の工程（８１５）＞

最後に、基板２０４の裏面側から第一の膜４０２をエッチングすることで、ナノポア薄膜２０２を得る。このとき、ナノポア薄膜２０２と第一の膜４０２に選択性のある溶液を用いる。第二の膜２０３がグラフェン、第一の膜４０２がＣｕである場合、第四の工程（８１３）と同じくクロムのエッチャントを用いるとよい。また第二の膜２０３が炭素、第一の膜４０２がAl_2O_3である場合、フッ酸を用いるとよい。

[0053] ［第２実施例］

図９Ａ～図９Ｉは、第２実施例におけるナノポア構造を作成するフローであり、第二の膜２０３の成膜の仕方をリフトオフ型にした場合のナノポア構造を作成するフローを示す。なお、図９Ａ～図９Ｉにおいて、図８Ａ～図８Ｆと同一の工程には同一の符号を付し、それらの説明を省略する。ここでは、図９Ａ～図９Ｃの工程を説明する。

[0054] まず、予め水素アニールによって第一の膜４０２を平坦にする（８０１）。次に、第一の膜４０２上に樹脂（保護膜）２０８を成膜する（８０２）。次に、次の工程で成膜される第二の膜２０３の開口予定位置（凹部を形成する予定の部分）のみが残るように樹脂２０８をパターニングする（８０３）。その後、第二の膜２０３を成膜し、樹脂膜溶剤にて樹脂２０８を溶かし出す。これにより、目的の開口部の位置が樹脂２０８で保護された状態で、第二の膜２０３からなる土手部の形成が達成される。８０１～８０３の工程により、第一の膜４０２の上に第二の膜２０３の土手部が形成され、第一の膜４０２が部分的に露出した構造となる（図９Ｄ）。

[0055] ［第３実施例］

前述の通り、球体４０１の材料と第一の膜４０２の材料が同一である場合、第四の工程（８１３）及び第六の工程（８１５）で用いる溶剤が同一になるため、図１０Ａ～図１０Ｈに示すような工程によって、ナノポア薄膜を得ることも可能である。なお、材料が異なっていてもエッチング溶液が同一である場合にも適応可能である。

[0056] 図１０Ａ～図１０Ｈは、第３実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。なお、図１０Ａ～図１０Ｈにおいて、図８Ａ～図８Ｆ及び図９Ａ～図９Ｉと同一の工程には同一の符号を付し、それらの説明を省略する。図１０Ａ～図１０Ｆの工程は、図９Ａ～図９Ｆと同一工程であるが、その後、球体４０１を取り去らずに、基板２０４の裏面のＳｉ層の裏面エッチングを行う（８２０）。その後、球体４０１及び第一の膜４０２を同時に溶かすことが可能な溶液にてエッチングを行う（８２１）。以上の工程により、ナノポアを有する凹部構造が形成された薄膜が出来上がる。

[0057] ［第４実施例］

図１１Ａ～図１１Ｉは、第４実施例におけるナノポア構造を作成するフローである。なお、図１１Ａ～図１１Ｉにおいて、図９Ａ～図９Ｉと同一の工程には同一の符号を付し、それらの説明を省略する。

[0058] 本実施例では、ナノポア薄膜２０２の安定性を強化するために、第二の膜２０３からなる土手の下部に薄膜２０２と同一の材料を配置する。図１１Ａ～図１１Ｃの工程は、図９Ａ～図９Ｃと同一工程であるが、その後、第一の膜４０２上に、ナノポア薄膜（第三の膜）と同一の材料の膜（第四の膜）２０２を成膜する。その後、薄膜２０２上に、第二の膜２０３を成膜する（８３０）。

[0059] 次に、障害物（球体４０１）を８３０の工程で作製した構造（凹部２０６）に敷き詰める（８３１）。次に、土手部に囲まれた凹部２０６に薄膜（第三の膜）２０２を成膜する（８３２）。その後、第二の膜２０３からなる土手部の下部の薄膜２０２と、凹部に成膜された薄膜（第三の膜）２０２を接

続させるためにアニールをし、これらの膜を再配置させる。

[0060] 次に、球体４０１をリフトオフする（８３３）。その後、土手内の凹部の垂直同一軸上の基板２０４の一部の裏面をエッチングし、第一の膜４０２の一部を露出させる（８３４）。最後に、第一の膜４０２をエッチングすることにより、ナノポアを有する凹部構造が形成された薄膜が出来上がる（８３５）。

[0061] 以上のように、上述した実施例において、任意の個数のポアが目的の薄膜中に形成されるように、その薄膜周辺部に、次の工程で用いられるビーズのサイズ及び数に応じたサイズを有する土手部（第二の膜２０３）を形成する。これにより、目的の薄膜に対して、任意のポア数の作成された生体分子特性解析チップを提供することができる。

[0062] Ｓｉの結晶方位面エッチングを利用した従来のテーパー型のポアの場合、エッチング開始部位の歩留が最小ポア径の形成歩留に転写されてしまうが、上述の実施例では、ビーズ径をそろえて作製することで、歩留が高くかつ均一なポアを形成することが可能となる。

[0063] また、上述の実施例より製造された生体分子特性解析チップによれば、最小ポア径を達成する部位のみが実効的に薄膜となるため、膜強度を保つことが可能となる。更に、薄膜全域が極薄膜とならないため、封鎖電流測定時のノイズを低減することが可能となる。

[0064] なお、本発明は上述した実施例に限定されるものではなく、様々な変形例が含まれる。例えば、上述した実施例は本発明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ものに限定されるものではない。また、ある実施例の構成の一部を他の実施例の構成に置き換えることがあり、また、ある実施例の構成に他の実施例の構成を加えることも可能である。また、各実施例の構成の一部について、他の構成の追加・削除・置換をすることが可能である。

符号の説明

[0065] １００ ：生体ポリマ特性解析装置（ＤＮＡ解析装置）

１０１　：仕切り体

１０２　：電解質溶液

１０３　：電極

１０４　：電源

１０５　：注入口

１０６　：生体ポリマ（ＤＮＡ）

１０７Ａ、１０７Ｂ　：槽

１０８　：アンプ

１０９　：ＰＣ

２００　：生体ポリマ特性解析チップ（ナノポアデバイス）

２０１　：ナノポア

２０２　：薄膜（第三の膜、第四の膜）

２０３　：第二の膜（土手部）

２０４　：基板

２０５　：ビーズ軌跡（鋳型痕跡）

２０６　：凹部

２０７　：樹脂材料

２０８　：樹脂（保護膜）

２０９　：開口部

２１０　：開口部

３００　：特性解析例

４０１　：球体（ビーズ）

４０２　：第一の膜

４０３　：球体の直径

４０４　：球体によって形成された最大ポア径

４０５　：球体によって形成された最小ポア径

４０６　：薄膜の膜厚

５０４　：球体（ビーズ）

５０５　　：薄膜（ナノポア薄膜）

５０６　　：第一の膜

６０１　　：土手部に囲まれた凹部の幅Ｄ

請求の範囲

[請求項1] 開口部を有する基板と、

前記基板上に成膜された第一の膜と、

前記基板上に前記第一の膜より上側に成膜された第二の膜と、

前記開口部の位置に配置され、ポアを有する第三の膜と、

を備え、

前記第二の膜は、前記第三の膜の周囲を囲む土手部を形成しており、前記第三の膜の前記ポアは、前記ポアにおける最下の径が前記ポアの最大径よりも小さいようなクレータ構造を有することを特徴とする生体分子特性解析用チップ。

[請求項2] 請求項１に記載の生体分子特性解析用チップにおいて、

前記クレータ構造の底に形成された前記ポアの前記最下の径をｒとし、前記土手部に囲まれた凹部の幅のサイズをＤとし、前記第一の膜と前記第三の膜との間の原子間距離をαとすると、以下の関係

[数1]

$$D < \frac{r^2 + 4\alpha^2}{2\alpha}$$

が成り立つことを特徴とする生体分子特性解析用チップ。

[請求項3] 請求項１に記載の生体分子特性解析用チップにおいて、

前記クレータ構造の底に形成された前記ポアの前記最下の径をｒとし、前記土手部で囲まれた凹部のサイズをＤとし、前記第一の膜と前記第三の膜との間の原子間距離をαとし、前記第一の膜の上面から前記第二の膜の上面までの高さをＬとすると、Ｌ／Ｄ＝α／ｒの関係が成り立つことを特徴とする生体分子特性解析用チップ。

[請求項4] 請求項１に記載の生体分子特性解析用チップにおいて、

前記第一の膜と前記第二の膜との間に前記第三の膜と同じ材料の第四の膜を更に備え、前記第三の膜と前記第四の膜とが接続されていることを特徴とする生体分子特性解析用チップ。

[請求項5] 基板に少なくとも第一の膜及び第二の膜を成膜し、その後、前記第二の膜に周囲が囲まれた凹部を形成し、前記第一の膜の一部を露出させる第一の工程と、

障害物を含む溶液を前記基板に浸すまたは吹きつけることにより、前記凹部に前記障害物を配置する第二の工程と、

前記障害物が配置された前記凹部内に第三の膜を成膜する第三の工程と、

前記障害物を取り除く第四の工程と、

前記基板の裏面をエッチングし、前記凹部の位置に対応する前記第一の膜の部分を露出させる第五の工程と、

前記第三の膜の直下にある前記第一の膜をエッチングすることにより、前記第三の膜において前記障害物と前記第一の膜の接点の位置にポアが形成される第六の工程と、

を含むことを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

[請求項6] 請求項５に記載の生体分子特性解析用チップの製造方法において、

前記第一の工程は、

前記基板に前記第一の膜及び前記第二の膜を当該順で成膜する工程と、

パターニングによって前記第二の膜の一部をエッチングすることにより前記凹部を形成する工程と、

を含むことを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

[請求項7] 請求項５に記載の生体分子特性解析用チップの製造方法において、

前記第一の工程は、

前記基板に前記第一の膜及び保護膜を成膜する工程と、

前記凹部を形成する予定の部分を残して前記保護膜をエッチングする工程と、

前記第一の膜上に前記第二の膜を成膜する工程と、

前記保護膜をエッチングすることにより前記凹部を形成する工程と

、

を含むことを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

[請求項8] 請求項５に記載の生体分子特性解析用チップの製造方法において、

前記第一の工程は、

前記基板に前記第一の膜及び保護膜を成膜する工程と、

前記凹部を形成する予定の部分を残して前記保護膜をエッチングする工程と、

前記第一の膜上に前記第三の膜と同じ材料の第四の膜と前記第二の膜を成膜する工程と、

前記保護膜をエッチングすることにより前記凹部を形成する工程と、

を含み、

前記第三の工程は、前記第三の膜と前記第四の膜とを接続させるためにアニールすることを含むことを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

[請求項9] 請求項５に記載の生体分子特性解析用チップの製造方法において、

前記第五の工程の後に、同一のエッチング溶液を用いてエッチングすることにより、前記第四の工程と前記第六の工程を同時に行うことを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

[請求項10] 請求項５に記載の生体分子特性解析用チップの製造方法において、

前記第三の工程では、前記第三の膜が、前記障害物には成膜されず、前記第一の膜に選択的成長することを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

[請求項11] 請求項１０に記載の生体分子特性解析用チップの製造方法において、

前記第一の膜はグラフェン又はAl_2O_3であり、前記障害物はＳｉＯであることを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

[請求項12] 請求項１０に記載の生体分子特性解析用チップの製造方法において

、

前記第一の膜と前記障害物とは同じ材料であり、前記障害物の側面と前記第一の膜は、単結晶であり、かつ結晶方位面が異なることを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

[請求項13] 請求項５に記載の生体分子特性解析用チップの製造方法において、

前記障害物は球体であることを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

[請求項14] 請求項１３に記載の生体分子特性解析用チップの製造方法において

、

前記球体の直径をｄとし、前記第一の膜と前記第三の膜との間の原子間距離をαとし、ポア径ｒとすると、以下の関係

[数2]

$$d = \frac{r^2 + 4\alpha^2}{4\alpha}$$

が成り立つことを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

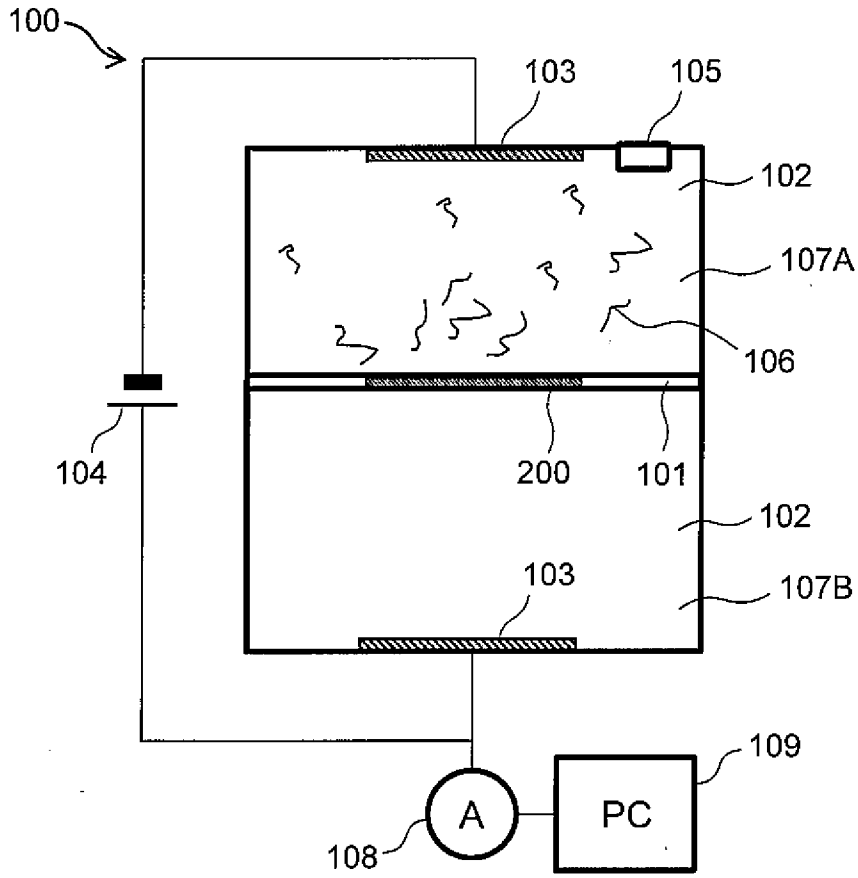
[請求項15] 請求項１３に記載の生体分子特性解析用チップの製造方法において

、

前記第三の膜に形成した前記ポアの数が１つである場合、前記凹部の形状の平面視における最大幅をＤとし、前記球体の直径をｄとすると、Ｄ＜２ｄの関係が成り立つことを特徴とする生体分子特性解析用チップの製造方法。

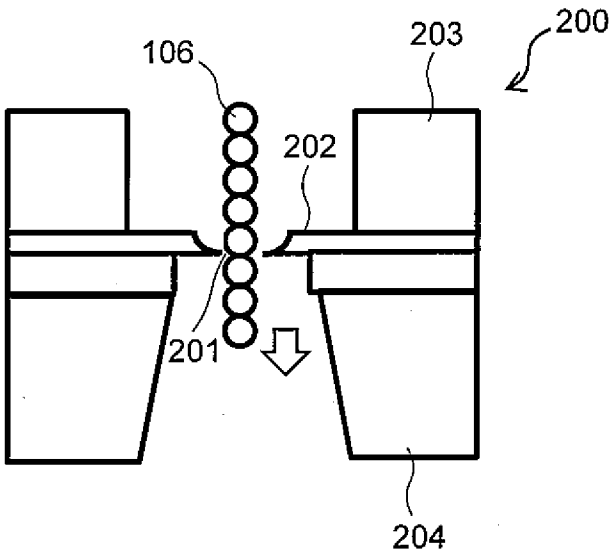
[図1]

図１


100
103
105
102
107A
106
104
200
101
102
103
107B
109
A
PC
108

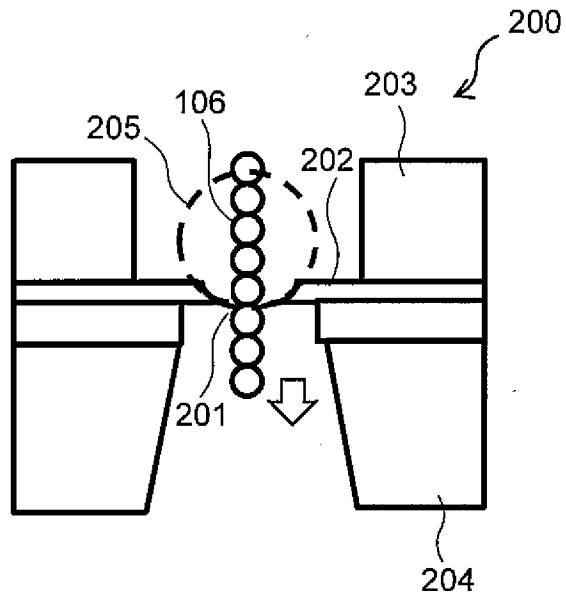
[図2A]

図２Ａ


106
203
200
202
201
204

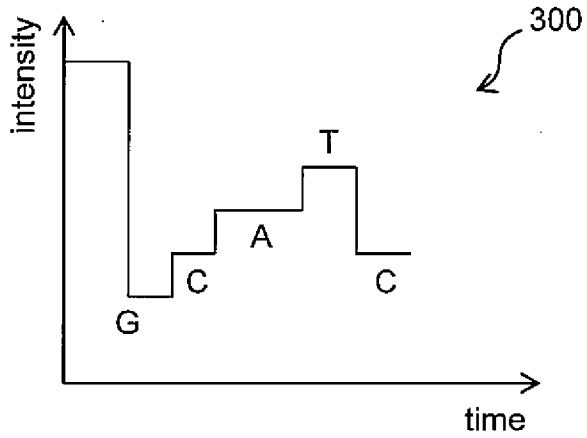
[図2B]

図２Ｂ



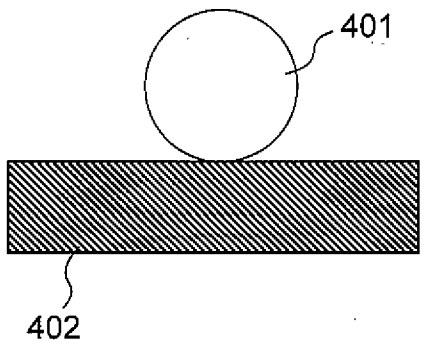
[図3]

図３



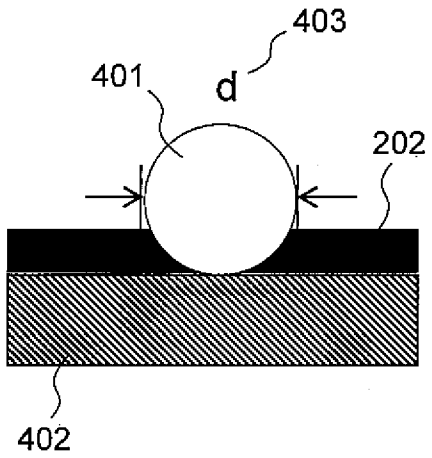
[図4A]

図４Ａ



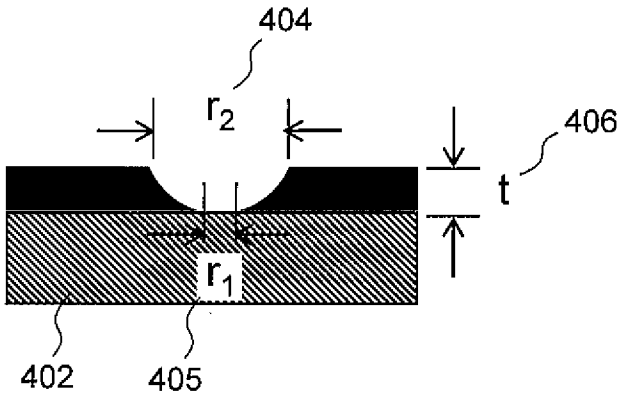
[図4B]

図４Ｂ



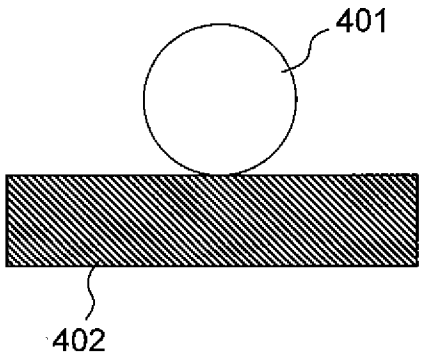
[図4C]

図４Ｃ



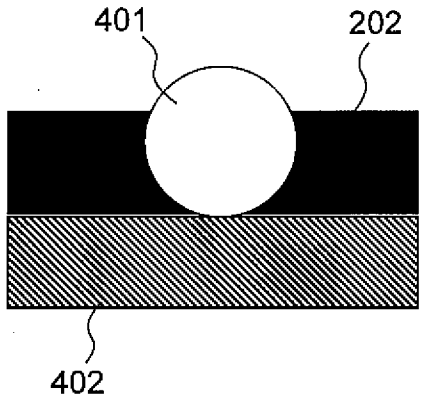
[図5A]

図５Ａ



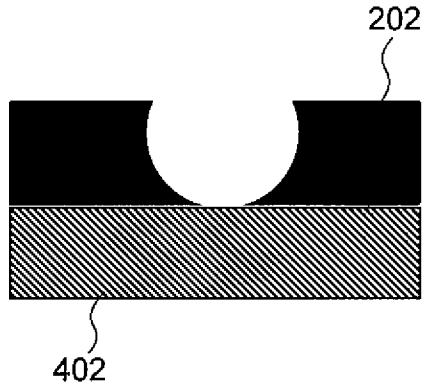
[図5B]

図５Ｂ



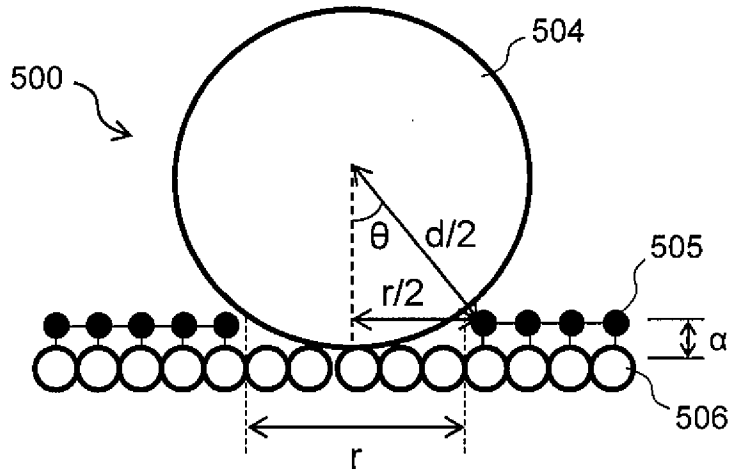
[図5C]

図５Ｃ



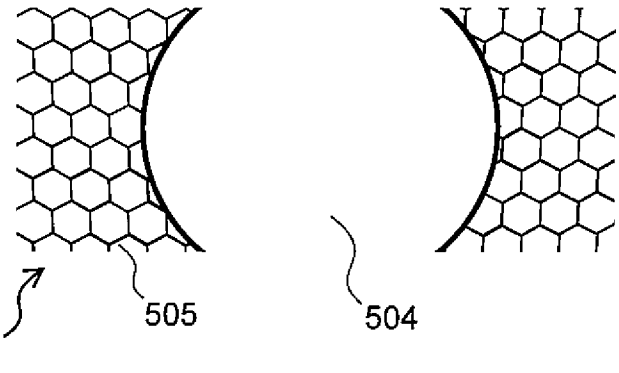
[図6A]

図６Ａ



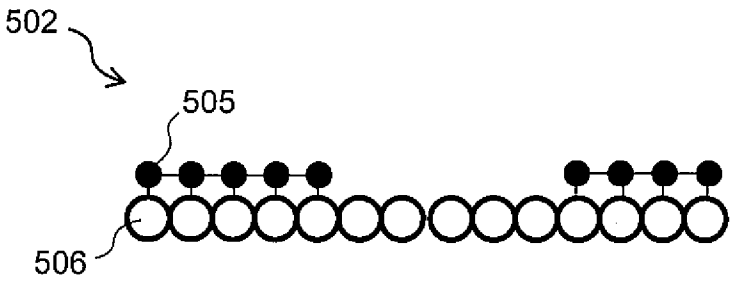
[図6B]

図６Ｂ



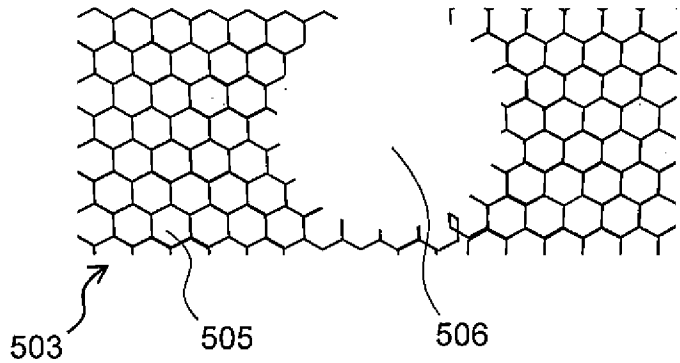
[図6C]

図６Ｃ



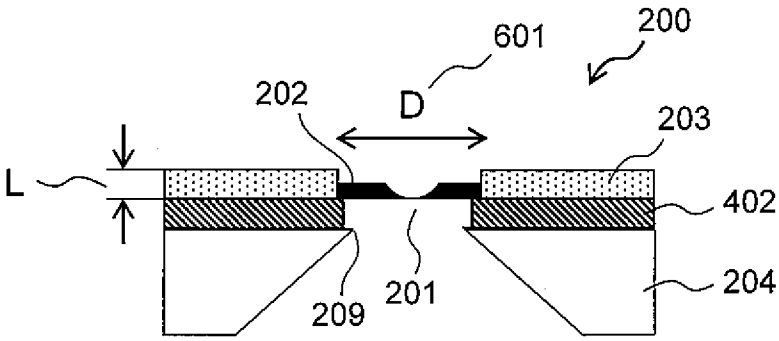
[図6D]

図６Ｄ



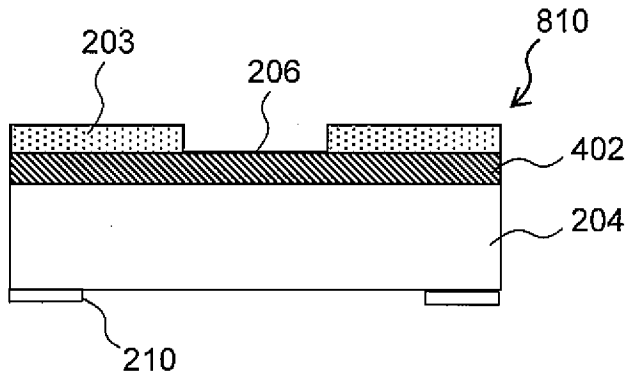
[図7]

図７



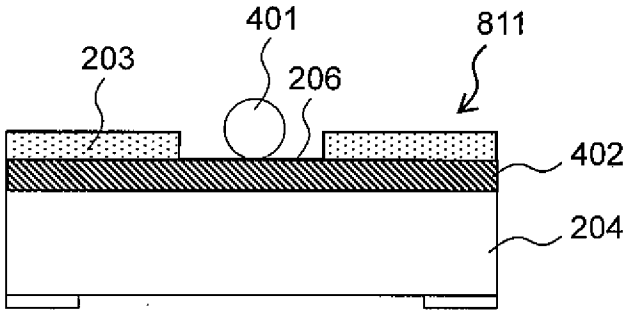
[図8A]

図８Ａ



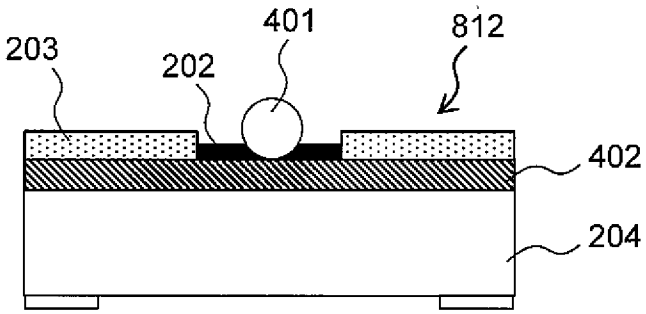
[図8B]

図８Ｂ



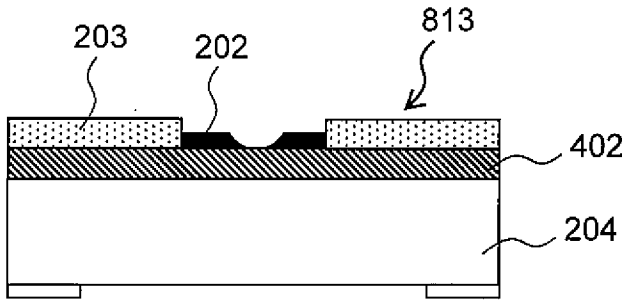
[図8C]

図８Ｃ



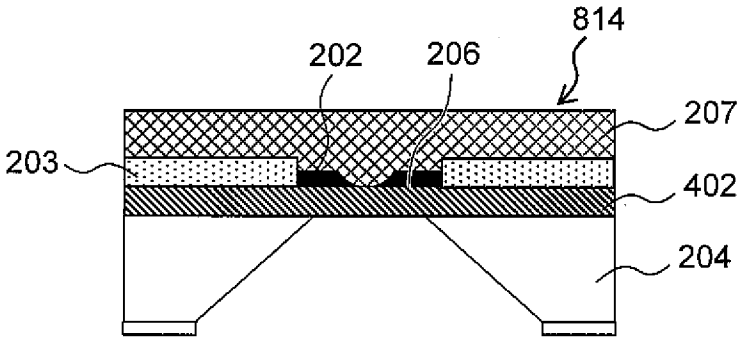
[図8D]

図８Ｄ



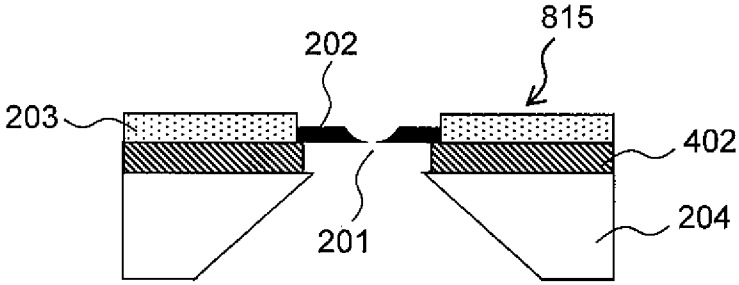
[図8E]

図８Ｅ



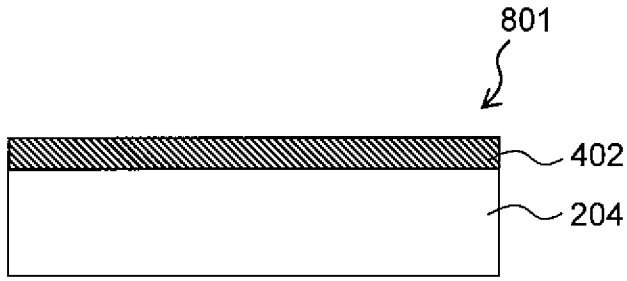
[図8F]

図８Ｆ



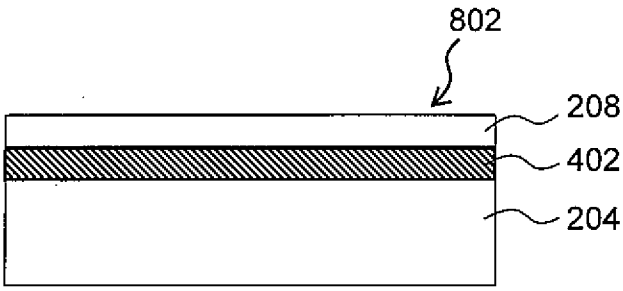
[図9A]

図９Ａ



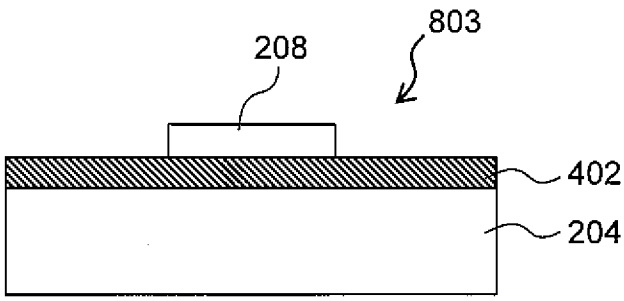
[図9B]

図９Ｂ



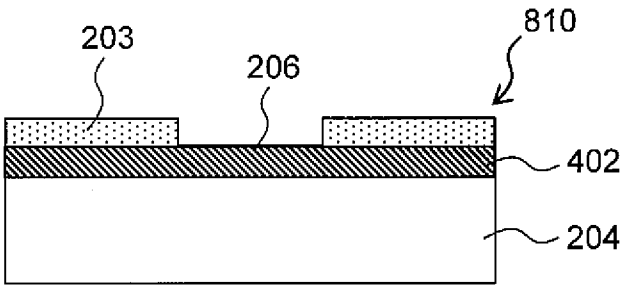
[図9C]

図９Ｃ



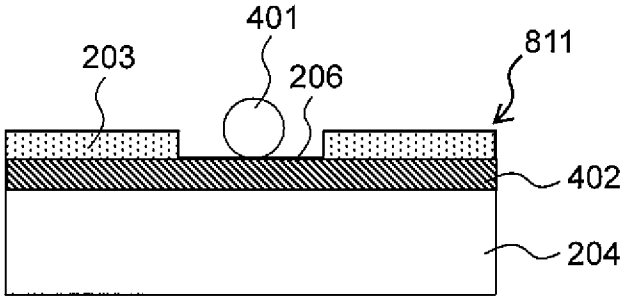
[図9D]

図９Ｄ



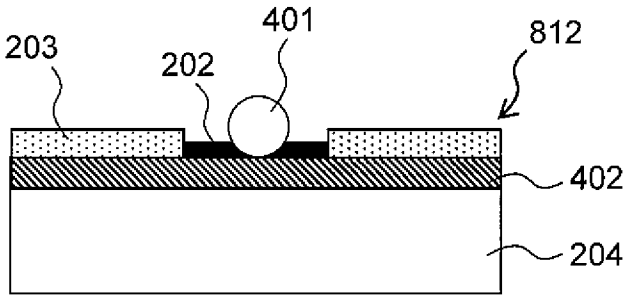
[図9E]

図９Ｅ



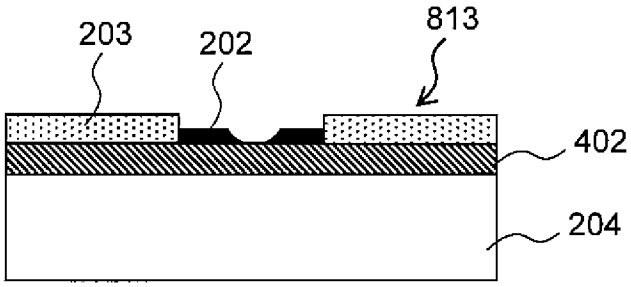
[図9F]

図９Ｆ



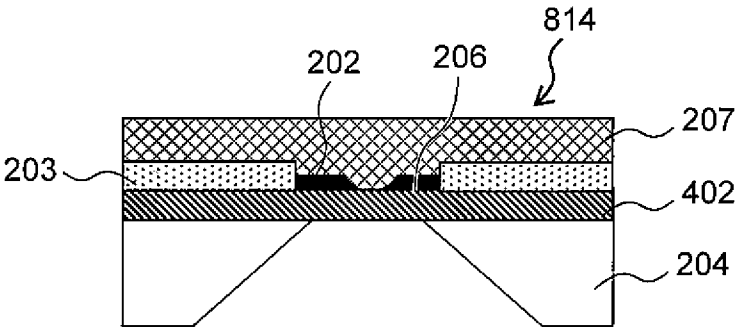
[図9G]

図９Ｇ



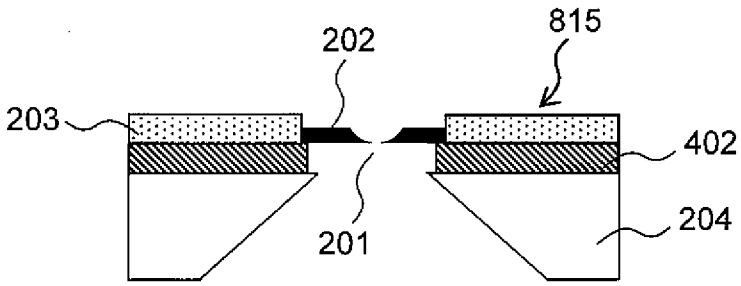
[図9H]

図９Ｈ



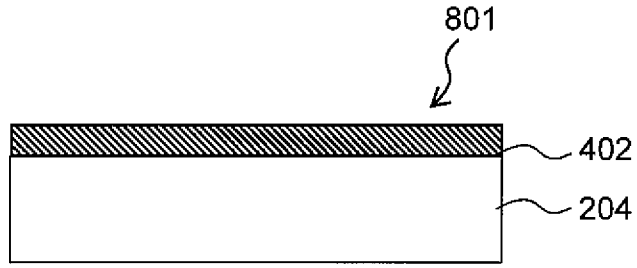
[図9I]

図９Ｉ



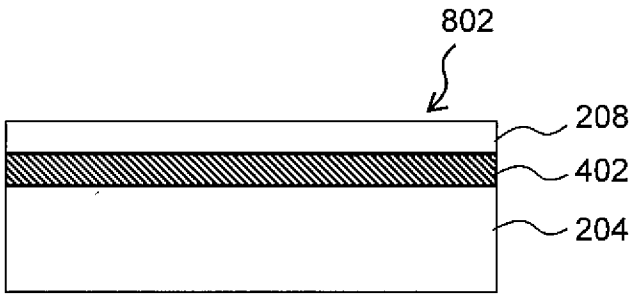
[図10A]

図１０Ａ



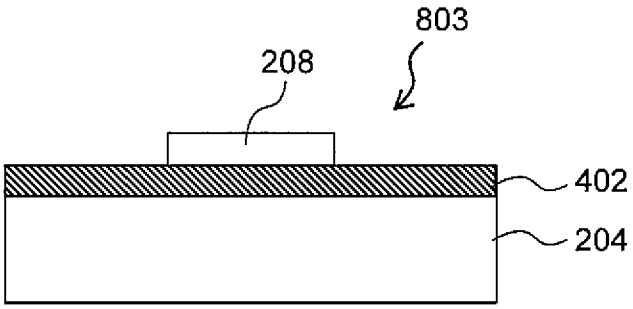
[図10B]

図１０Ｂ



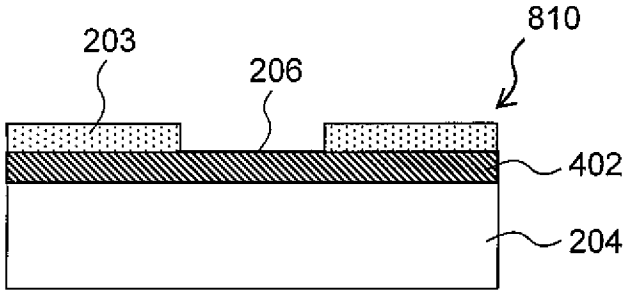
[図10C]

図１０Ｃ



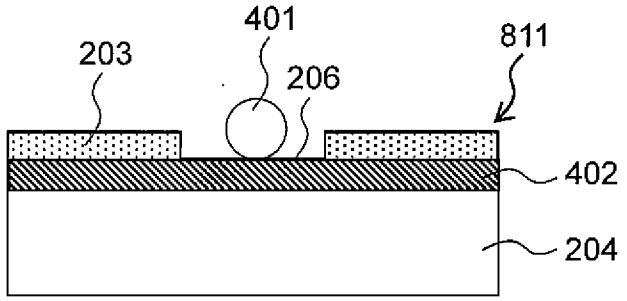
[図10D]

図１０Ｄ



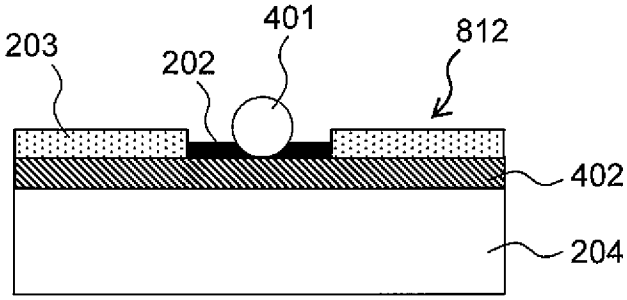
[図10E]

図１０Ｅ



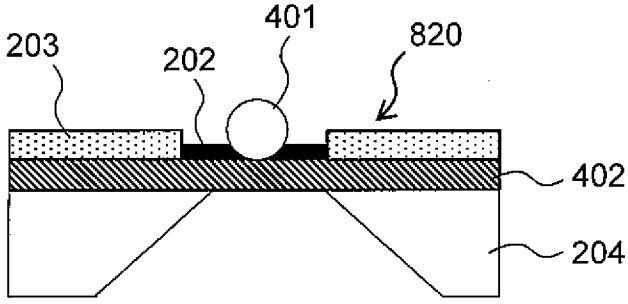
[図10F]

図１０Ｆ



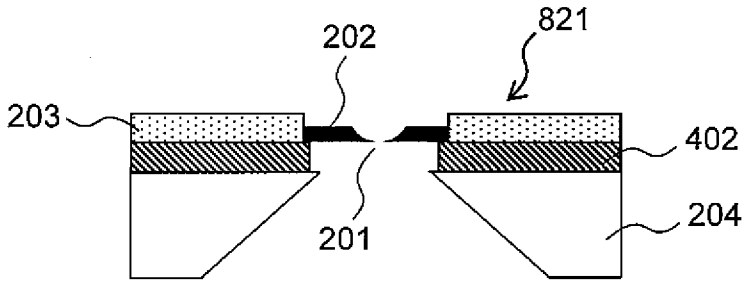
[図10G]

図１０Ｇ



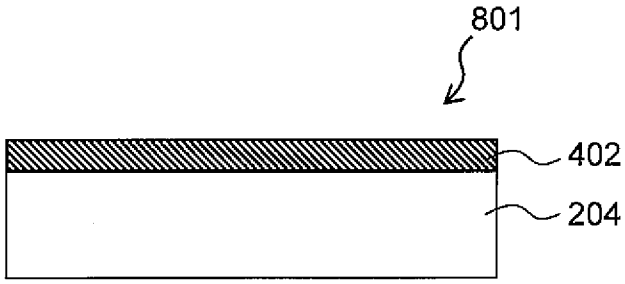
[図10H]

図１０Ｈ



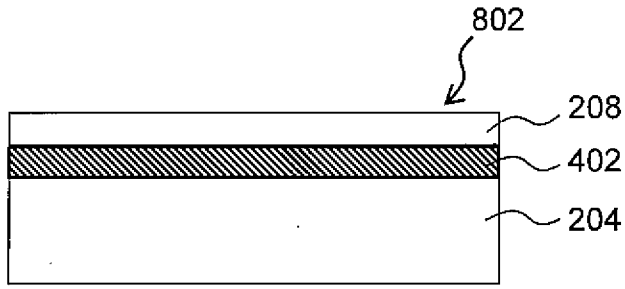
[図11A]

図１１Ａ



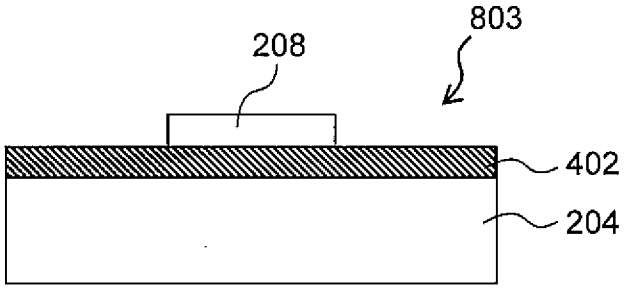
[図11B]

図１１Ｂ



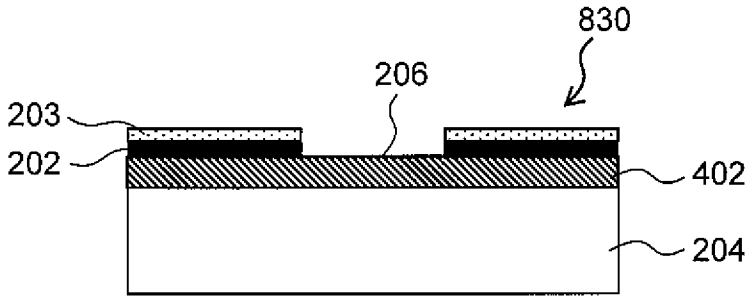
[図11C]

図１１Ｃ



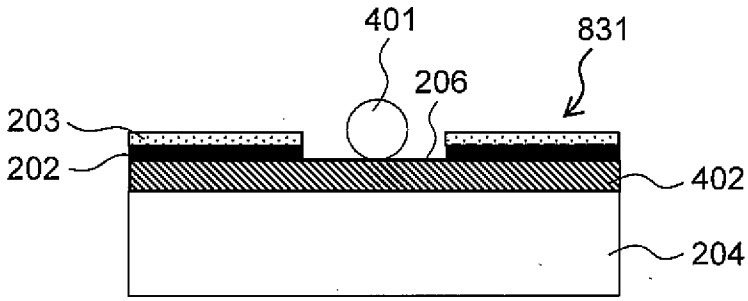
[図11D]

図１１Ｄ



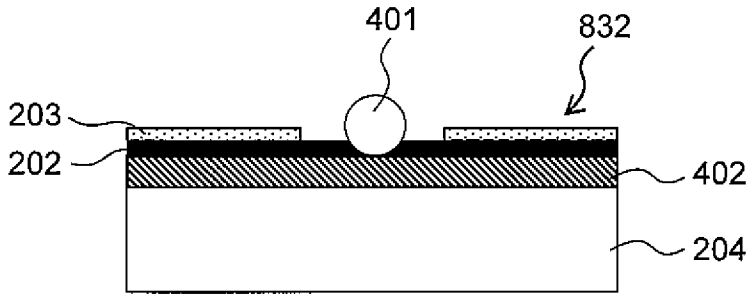
[図11E]

図１１Ｅ



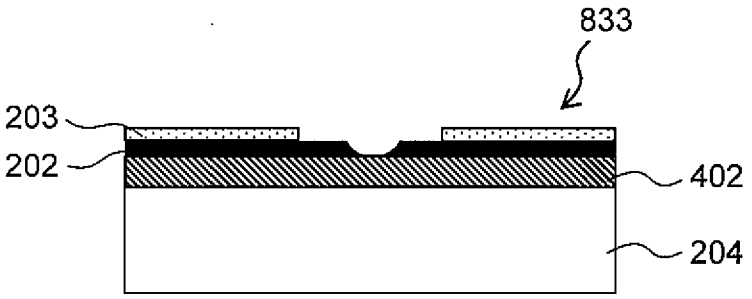
[図11F]

図１１Ｆ



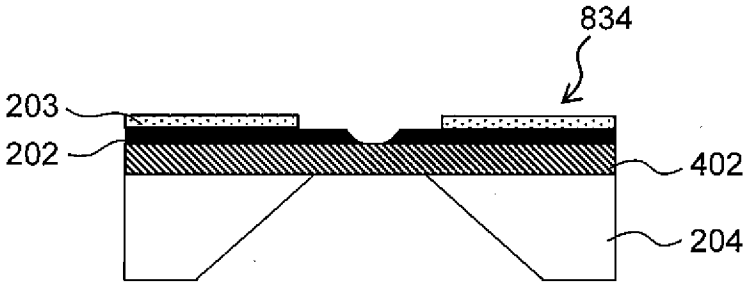
[図11G]

図１１Ｇ



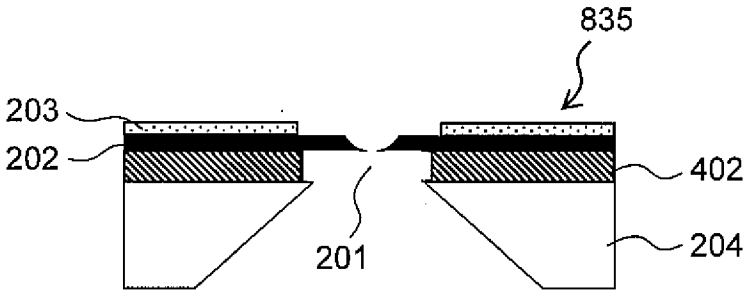
[図11H]

図１１Ｈ



[図11I]

図１１Ｉ



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/082066

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N27/00(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N27/00-27/10, G01N27/14-27/24, G01N33/48-33/98, C12M1/00-1/34

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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.
Y	JP 2013-013413 A (Life Technologies Corp.), 24 January 2013 (24.01.2013), paragraphs [0020] to [0043]; fig. 1 to 16 & US 2003/0003609 A1 & EP 2278317 A1 & WO 01/81908 A1	1-4
Y	JP 2003-502166 A (President and Fellows of Harvard College), 21 January 2003 (21.01.2003), paragraphs [0020] to [0026]; fig. 1 & US 6627067 B1 & US 2004/0229386 A1 & EP 2383776 A1 & WO 00/78668 A1 & WO 00/079257 A1	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 March 2015 (04.03.15)	17 March 2015 (17.03.15)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/082066

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-090576 A (Hitachi, Ltd.), 16 May 2013 (16.05.2013), entire text; all drawings (Family: none)	1-15
A	US 2005/0176245 A1 (Anatoli V. Melechko), 11 August 2005 (11.08.2005), entire text; all drawings (Family: none)	1-15
A	JP 2013-540569 A (Industry-University Cooperation Foundation Sogang University), 07 November 2013 (07.11.2013), entire text; all drawings & US 2013/0149492 A1 & WO 2012/023724 A2 & CN 103079989 A	1-15
A	JP 2013-520655 A (Atwood, Christopher Gordon), 06 June 2013 (06.06.2013), entire text; all drawings & US 2012/0181176 A1 & WO 2011/106198 A1 & CA 278813 A1 & CN 201762746 A	1-15

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０８２０６６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N27/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N27/00-27/10, G01N27/14-27/24, G01N33/48-33/98, C12M1/00-1/34

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	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamⅢ)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2013-013413 A (ライフ　テクノロジーズ　コーポレーション) 2013.01.24, 段落【0020】-【0043】, 図 1-16 & US 2003/0003609 A1 & EP 2278317 A1 & WO 01/81908 A1	1-4
Y	JP 2003-502166 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) 2003.01.21, 段落【0020】-【0026】, 図 1 & US 6627067 B1 & US 2004/0229386 A1 & EP 2383776 A1 & WO 00/78668 A1 & WO 00/079257 A1	1-4

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０４．０３．２０１５	１７．０３．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　２Ｗ　３６０２
蔵田　真彦
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５０

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2013-090576 A (株式会社日立製作所) 2013.05.16, 全文全図 (ファミリーなし)	1-15
A	US 2005/0176245 A1 (Anatoli V. Melechko) 2005.08.11, 全文全図 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 2013-540569 A (インダストリ-ユニヴァーシティ　コオペレーション　ファウンデイション　ソガン　ユニヴァーシティ) 2013.11.07, 全文全図 & US 2013/0149492 A1 & WO 2012/023724 A2 & CN 103079989 A	1-15
A	JP 2013-520655 A (アトウッド, クリストファー　ゴードン) 2013.06.06, 全文全図 & US 2012/0181176 A1 & WO 2011/106198 A1 & CA 278813 A1 & CN 201762746 A	1-15