

## 磁気マーカーとMRセンサを用いた洗浄工程不要のバイオ物質検出

入江, 康太

Department of Electrical and Electronic Engineering, Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University : Master's Program

秋吉, 一輝

Department of Electrical and Electronic Engineering, Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University : Master's Program

吉田, 敬

九州大学大学院システム情報科学研究院電気システム工学部門

圓福, 敬二

九州大学大学院システム情報科学研究院電気システム工学部門

<https://doi.org/10.15017/2195855>

---

出版情報 : 九州大学大学院システム情報科学紀要. 24 (1), pp.17-22, 2019-01-25. 九州大学大学院システム情報科学研究院

バージョン :

権利関係 :

# 磁気マーカーとMRセンサを用いた洗浄工程不要のバイオ物質検出

入江康太\*・秋吉一輝\*・吉田敬\*\*・圓福敬二\*\*

## Wash-Free Detection of Biomaterial Utilizing Magnetic Markers and MR Sensor

Kohta IRIE\*, Kazuki AKIYOSHI\*, Takashi YOSHIDA\*\* and Keiji ENPUKU\*\*

(Received November 21, 2018)

**Abstract :** We have been developing a wash-free detection of biological targets using magnetic markers and magneto-resistive (MR) sensor. In this method, bound and unbound markers can be magnetically distinguished by using the Brownian relaxation. Thus, conventional time-consuming washing process to separate them can be eliminated. Using the magnetic method, we demonstrated the detection of C-reactive protein (CRP). CRPs with concentration from 0.1 ng/mL to 100 ng/mL were successfully detected, which indicates the usefulness of the present method. Reliability of detection was also studied by conducting 10 times experiment. It was shown that the reliability is high when CRP concentration is higher than 3.0 ng/mL. However, it is necessary to improve the reliability for the case of lower concentrations. A method to improve the reliability at lower concentrations was also discussed.

**Keywords :** Magnetic marker, Immunoassay, MR sensor, Brownian relaxation, CRP

### 1. はじめに

近年、強磁性体をナノメートルサイズの粒子状に分割した磁性ナノ粒子への関心が高まっており、その磁気特性を用いた医療分野への応用が期待されている。応用例としては、医療検査のための磁氣的免疫検査<sup>1,2)</sup>、体内診断を目指した磁気粒子イメージング<sup>3,4)</sup>、及び、疾患の治療のための磁氣的ハイパーサーミアやドラッグデリバリー<sup>5,6)</sup>などが挙げられる。これらの応用では磁性ナノ粒子をポリマーで被覆し、その表面に抗体を付着させた磁気マーカーが用いられる。

本研究ではこの磁気マーカーを用いた免疫検査法を開発している。免疫検査とは血液検査などの医療診断において疾患由来の蛋白質や病原菌等のバイオ物質（抗原と総称、Target）の種類や量を特定する検査のことである。免疫検査においては、検出対象の抗原に対して特異的に結合する抗体（Antibody）との結合反応（抗原・抗体反応）が用いられる。この際、抗体には標識となるマーカーが付着されており、マーカーから発せられる信号を測定することで抗原・抗体反応の検出が行われる。現在、この免疫検査において主に用いられる方法として光を発するマーカーを用いた光学的手法が挙げられる。この手法では、抗原と結合していないマーカーを洗い流すために数回の洗浄工程を必要とし、この工程に手間と時間がかかるといった問題点がある。

このため、本研究では洗浄工程を必要としない磁氣的検査法の開発を行っている。磁氣的手法では溶液中で磁性粒

子の磁気信号が減衰するブラウン磁気緩和<sup>7)</sup>と呼ばれる現象を利用している。この現象には粒子直径により緩和時間が異なる性質がある。この性質を利用することで抗原と結合したマーカー（Bound marker）と結合しなかった未結合マーカー（Free marker）を磁氣的に分離することができ、従来必要であった洗浄工程を省略し、迅速かつ簡便な検査が可能となる。<sup>8-11)</sup>

我々はこれまで磁気マーカーと SQUID 磁気センサを用いた洗浄工程不要の免疫検査システムの開発を行い、本手法の有効性を示してきた。<sup>10,11)</sup>しかし、SQUID 磁気センサは高感度であるが高コスト、装置が大きい、冷却に液体窒素を用いるため取扱いに注意が必要といった問題点がある。そのため、今回、感度は SQUID に比べて数十倍落ちるが低コストで取扱いのしやすい磁気抵抗（Magneto-Resistive: MR）センサを用いて、CRP（C 反応性タンパク質）の検出実験を行った。

第2章では磁氣的免疫検査法の基本となるブラウン磁気緩和と検査手順について述べる。次に、第3章では CRP の検出結果を示す。CRP 濃度が 3.0 ng/mL 以上の場合には検出の再現性は高いことが示された。一方、それ以下の濃度では検出の再現性が低いことが分かった。このため、第4章では免疫検査の高感度化に向けての取り組みを示す。具体的には、検出感度に及ぼすサンプル反応手順と投入する磁気マーカー濃度の影響を調べた。これらを最適化する事により CRP の最小検出感度として 0.1 ng/mL が可能となることを示した。

### 2. 磁氣的液相免疫検査法

本章では本検査法の基盤となる磁性ナノ粒子のブラウン緩和現象について簡単に説明し、次にこの現象を用いた測

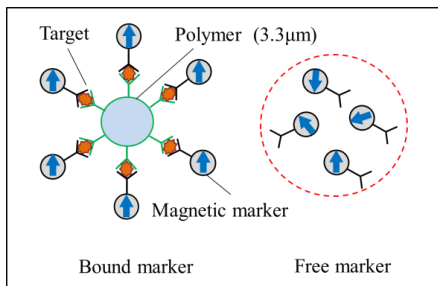
平成30年11月21日受付

\* 電気電子工学専攻修士課程

\*\* 電気システム工学部門

定手順について述べる。また、磁気マーカーの凝集を防止するための磁場中結合反応と分散処理について述べる。

**Fig. 1** に本測定で用いる結合マーカーと未結合マーカーの模式図を示す。図に示すように検出対象の抗原に対して特異的に結合する抗体の付着したポリマービーズと磁気マーカーを抗原の入った試料溶液に投入すると、抗原を介してポリマービーズと磁気マーカーが結合する。これを結合マーカーと呼び、未反応のマーカーを未結合マーカーと呼ぶ。本研究では結合マーカーと未結合マーカーの共存した液相状態においてブラウン緩和現象を用いることでこれらを磁氣的に識別する。



**Fig. 1** Principle of wash-free detection of biological targets. Bound and free markers are magnetically distinguished by using the difference in their Brownian relaxation times.

### 2. 1 ブラウン緩和現象

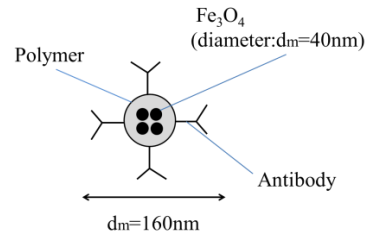
溶液中に複数の磁性ナノ粒子が存在する場合、外部磁界を印加するとそれぞれの磁性ナノ粒子の磁気モーメントは外部磁界に沿った向きに揃う。その後、外部磁界を取り払うと磁性ナノ粒子は不規則な回転運動(ブラウン回転運動)を行い、それに伴って粒子の磁気モーメントの向きも不規則な方向に向く。その結果、磁性ナノ粒子全体の磁気モーメントの和はゼロとなる。このようにブラウン回転運動により磁気信号が減衰する現象をブラウン磁気緩和と呼ぶ。ブラウン緩和による信号の減衰はブラウン緩和時間 $\tau_B$ を用いて次式で表される。

$$M(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_B}\right) \quad (1)$$

ここで  $M_0$  は飽和磁化である。ブラウン緩和は、粒子の回転による信号緩和を意味しているため、ブラウン緩和時間は次式で表される。<sup>7)</sup>

$$\tau_B = \frac{\pi\eta d_H^3}{2k_B T} \quad (2)$$

ここで  $\eta$  は溶液の粘度、 $d_H$  は粒子の流体力学的直径、 $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  は絶対温度である。この式から、ブラウン緩和時間は粒子直径に強く依存し、粒子直径が大きいほど長く、小さいものほど短くなることが分かる。



**Fig. 2** Magnetic marker.

### 2. 2 サンプル作製と測定手順

本研究では磁気マーカーとして酸化鉄微粒子 ( $Fe_3O_4$ ) をポリマーコーティングした FG beads (多摩川精機) を使用している。FG beads の概略図を **Fig. 2** に示す。また、CRP を検出対象としているため、これに特異的に結合する抗体として FG beads に C6cc 抗体、ポリマービーズに C2 抗体を用いている。

サンプル作製手順としてはまず、検出対象の抗原 (CRP) と磁気マーカー (FG beads)、ポリマービーズを混ぜ合わせる。その後、磁場中結合反応を行うことで **Fig. 1** に示すような結合マーカーが生じる。次に分散処理を行い、強い励起磁界 (40 mT) を 1 回印加し、結合マーカー内部の磁気モーメントの向きを揃える。最後に、再び分散処理を行う。磁場中結合反応と分散処理については後述する。

**Fig. 3** に本手法における測定システムの概略図を示す。測定手順としては分散処理後のサンプル 60  $\mu$ L を **Fig. 3** に示すような円盤状のプレートのウェルに入れ、MR センサの垂直方向に磁気マーカーの磁気モーメントが向くように外部から測定磁界 (2 mT) を永久磁石で印加する。その後、プレートを回転させる。プレートの回転 (1 回転/6 秒) により永久磁石からサンプルが離れる際に磁気マーカーにブラウン緩和が起きる。結合マーカーと未結合マーカーそれぞれのブラウン緩和時間は、FG beads の粒子直径が約 160 nm、ポリマービーズの粒子直径が約 3.3  $\mu$ m であることから、(2)式に当てはめると結合マーカーが約 14 s、未結合マーカーが約 1.6 ms となる。このように結合マーカーと未結合マーカーのブラウン緩和時間に大きな差がある。

このため、サンプルが測定磁界を印加されてから MR センサの真上に来るまでの約 3.0 秒間で未結合マーカーのブラウン緩和は完了し、未結合マーカーからの磁気信号はゼロになる。一方、結合マーカーからの磁気信号は保持され、MR センサ真上を通過するとき信号は検出される。

このように、ブラウン緩和時間の差を利用することで結合マーカーと未結合マーカーが共存した液相中であっても抗原と結合したマーカーの信号のみを検出できるため、従来の光学的手法で必要とされていた洗浄工程が不要となり、より高速に検査が可能となる。<sup>10, 11)</sup>

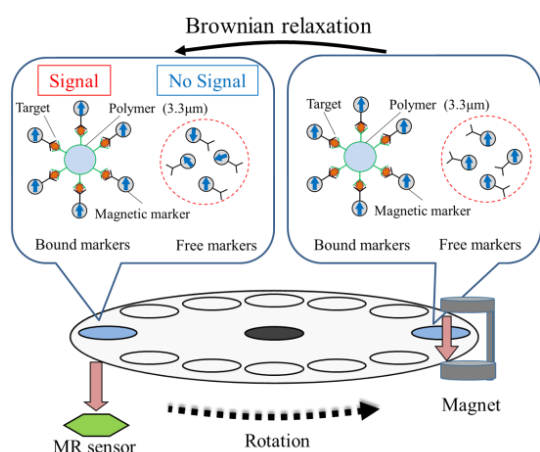


Fig. 3 Detection system using Brownian relaxation.

### 2. 3 磁場中結合反応と分散処理

磁氣的液相免疫検査法の問題点として未結合マーカーの凝集が挙げられる。本手法では信号を取得するために外部から磁界を印加し、磁気マーカーを磁化している。しかしながら、この磁界印加により磁気マーカー同士の凝集も引き起こされる。未結合マーカーの凝集が起これるとその粒子直径が大きくなり、ブラウン緩和時間が長くなるため、信号が十分に緩和されず残ってしまう。その結果、未結合マーカーからも疑似信号が発生することになり、この疑似信号を未結合マーカーからの信号 (Blank Signal) と呼んでいる。この未結合マーカーからの信号は免疫検査の感度の低下を引き起こす。

この未結合マーカーの凝集を軽減するため磁場中結合反応と分散処理を導入している。磁場中結合反応法とは弱い外部磁界 (1 mT) を印加しながら反応を行う方法である。<sup>12)</sup> 凝集の起こりづらい弱い磁界を印加しながら抗原・抗体反応を行うことでマーカーの磁気モーメントの向きがある程度揃った状態で結合する。従って、磁気マーカーの磁気モーメントを揃えるための励起磁界の印加回数を減らすことができ、凝集の抑制に繋がる。また分散処理とは、磁界印加直後に試料に振動・攪拌を与え、凝集した未結合マーカーの凝集を解く手法のことである。

## 3. 免疫検査実験

本章では MR センサと磁気マーカーを使った本免疫検査システムで測定した波形について説明し、取得した波形から CRP 濃度を推定する方法を説明する。また免疫検査の再現性について述べる。

### 3. 1 CRP の検出結果

本研究では前述したように 12 個のウェルのある円盤状のプレートを\_using\_しているため、一度に 12 個のサンプル

を測定することができる。実際にはサンプルを 6 種類作製し、1 種類につき 120  $\mu\text{L}$  使用して、線対称の位置にあるウェルに 60  $\mu\text{L}$  ずつ入れている。そして、線対称の位置にあるサンプルからの信号を平均することで信頼性を上げている。また、沈殿したゴミによる影響を軽減するため、測定磁界の方向を正負逆にしてそれぞれの波形を取得している。測定の際には雑音の低減のため、正負それぞれでプレートを 40 回ずつ回転させ、計 80 回の加算平均を行っている。

なお、信号測定は 3 個直列に接続した MR センサ (HMC1001, Honeywell) で行った。このセンサの磁界雑音スペクトルは  $S_B^{1/2} = 20 \text{ pT/Hz}^{1/2}$  であり、測定帯域を  $f_w = 16 \text{ Hz}$ 、加算回数を  $N = 80$  回とした場合の測定システムの雑音磁界の大きさ (実効値) は、 $B_n = (S_B f_w / N)^{1/2} = 9 \text{ pT}$  程度となる。

CRP 濃度を 0, 1.0, 3.0, 10, 30, 100 ng/mL としたサンプルを測定した場合の加算平均後の波形を Fig. 4 に示す。グラフの横軸は時間を、縦軸は信号磁束密度を表している。図に示す波形は時間が 0~3 s, 3~6 s でそれぞれ CRP 濃度 0~100 ng/mL の波形となっている。本研究ではこの波形からそれぞれの peak-to-peak 値を取得し、信号値としている。

Fig. 4 に示す様に、CRP 濃度 0 ng/mL のサンプルにおいても信号が発生しており、前述したようにこの信号は磁気マーカーの凝集作用によるものだと考えられる。この信号を未結合マーカーからの信号としている。また、CRP の入っているサンプルの信号値から未結合マーカーからの信号の信号値を引いたものを結合マーカーからの信号 (Bound Signal) としている。

Fig. 4 から取得した結合マーカーからの信号を Fig. 5 に示す。グラフの横軸は CRP 濃度を、縦軸は結合マーカーからの信号を表している。このグラフから CRP 濃度の増加に伴い、結合マーカーからの信号が増加しており、1.0~100 ng/mL の範囲においては CRP の濃度検出が可能であることが確認できた。

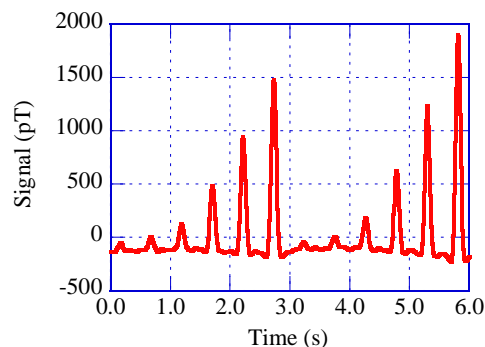
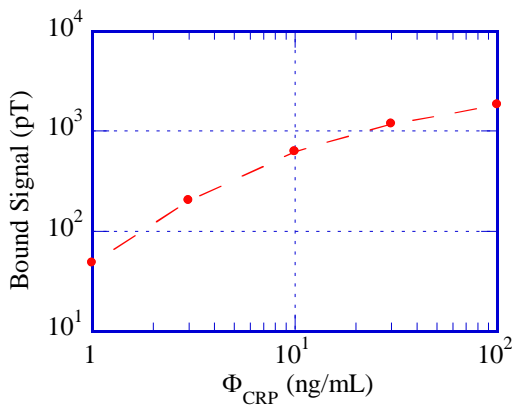


Fig. 4 Waveform of the magnetic field detected by the MR sensor when sample stage is rotated.



**Fig. 5** Relationship between the signal from the bound makers and the concentration of CRPs.

### 3. 2 再現性の確認

磁気的免疫検査法を実際の医療現場で応用していくにあたり、検査の再現性は極めて重要である。我々は再現性を考慮し、測定の際にサンプルの濃度や測定方法などの細かい点まで注意して実験を行っている。そこでどの程度再現性を有しているのかの確認を行った。

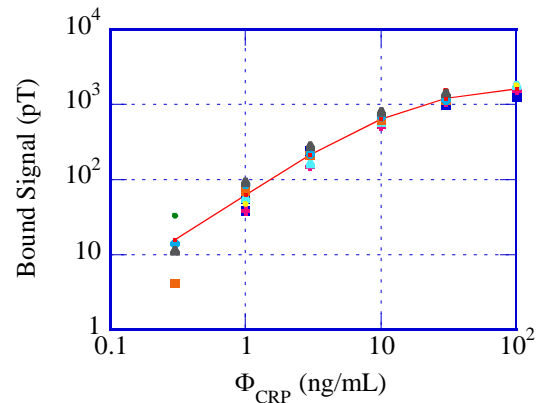
再現性の確認のため、検査条件を揃え、複数回の検査実験を行った。条件としては磁気マーカー濃度 2.0 μg/60 μL、ポリマービーズ濃度 10 μg/60 μL、磁場中結合反応の反応時間を 60 分とし、サンプル作製手順、測定手順は 2 章に述べた手順で行った。また、CRP の濃度としては 0, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30 ng/mL の実験を 4 回, 0, 1.0, 3.0, 10, 30, 100 ng/mL の実験を 6 回行った。

**Fig. 6** に測定結果を示す。グラフの縦軸は結合マーカーからの信号、横軸は CRP 濃度を表している。**Fig. 6** に示す点は測定結果を示し、実線は平均値を結んだものを示す。図に示すように CRP 濃度が高濃度側では測定結果のバラつきは少ないが、低濃度では測定間のバラつきが比較的大きいことが分かった。

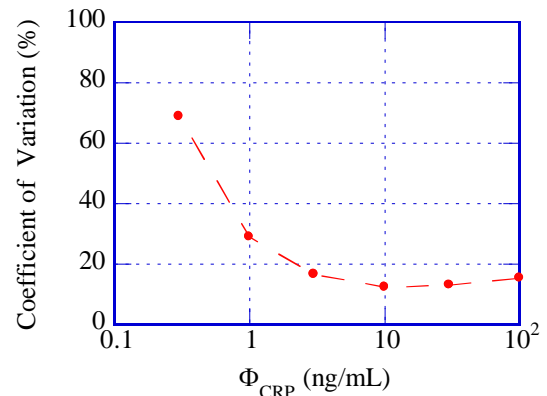
今回、それぞれの CRP 濃度でのバラつきを比較するため、標準偏差を平均値で割った変動係数を用いた。その結果を **Fig. 7** に示す。縦軸は変動係数 (CV)、横軸は CRP 濃度を表している。図に示すように CRP 濃度が 3.0~100 ng/mL の範囲での変動係数は約 15%程度であった。一方、低濃度になるにつれ変動係数が増加していることが確認できた。この変動の原因として 2 つのことが考えられる。1 つ目は未結合マーカーからの信号の変動による影響である。本手法では結合マーカーからの信号を算出する際に、測定した信号値から未結合マーカーからの信号値を差し引いている。そのため、測定した信号値が未結合マーカーからの信号値に比較的に近い低濃度の場合だと未結合マーカーからの信号の変動の影響が大きくなるものとなる。2 つ目は測定時に

ける距離設定の誤差やプレート回転時によるブレによって生じる距離変動の影響である。センサの取得する信号は対象物からの距離に依存するため、一定の距離に保つことが重要である。しかし、現状では毎回の測定を同じ距離に保つことは難しい。結果として信号値に誤差が生まれ、全体的なバラつきに影響を及ぼしていると考えられる。

このため、今後は結合マーカーからの信号を大きくかつ未結合マーカーからの信号を小さくする方法の模索、また、ウェルからセンサまでの距離を一定に保つための機構の導入によって距離変動を減らすことが課題である。



**Fig. 6** Relationship between the bound signal and the concentration of CRPs. The results obtained with ten experiments are shown.



**Fig. 7** Relationship between the coefficient of variation (CV) and the concentration of CRPs. The results were obtained with ten experiments.

### 4. 免疫検査の高感度化に向けて

低濃度側での検査性能を向上するためには、結合マーカーからの信号を大きくすることが重要となる。結合マーカーからの信号は反応手順などに大きく依存する事が考えられる。このため、検査を高感度化するための二つの手法に



ついて調べた。1 つはサンプル作製時における反応手順の効果について調べ、もう 1 つは、サンプルに投入する磁気マーカー濃度の効果について調べた。

#### 4.1 サンプル反応手順の影響

本研究では検出対象となる抗原 (CRP) とポリマービーズ、磁気マーカーを混ぜ合わせてサンプルを作製している。今回、次の 3 パターンの反応手順における信号値の変化について検証を行った。

- ① 抗原、ポリマービーズ、磁気マーカーを同時に混ぜ合わせ、120 分間反応を行ったもの。
- ② ポリマービーズと抗原を 60 分間反応させ、その後、磁気マーカーを入れ、さらに 60 分間反応を行ったもの。
- ③ 磁気マーカーと抗原を 60 分間反応させ、その後、ポリマービーズを入れ、さらに 60 分間反応を行ったもの。

サンプルとしては磁気マーカー濃度  $2.0 \mu\text{g}/60 \mu\text{L}$ 、ポリマービーズ濃度  $10 \mu\text{g}/60 \mu\text{L}$ 、CRP 濃度  $0.3 \sim 30 \text{ ng/mL}$  において測定を行った。

Fig. 8 に測定結果を示す。グラフの縦軸は結合マーカーからの信号、横軸は CRP 濃度を表している。図に示すように Sample③の信号が最も大きく、高濃度における飽和傾向が強いことが分かった。これはポリマービーズに比べ、磁気マーカーの粒子径が小さいため拡散しやすく、結果として抗原と結合しやすくなるため、このように信号が大きくなったと考えられる。また、Sample③の飽和傾向は高濃度になるにつれ磁気マーカー 1 つに結合する抗原の数が増えることによって検出されない抗原の数が増えてしまうからだと考えられる。磁気マーカーに抗原が複数結合している場合、その中の 1 つの抗原がポリマービーズと結合すると考えると抗原の検出量は複数の抗原が結合しているのにも拘らず 1 つとなる。この状態が高濃度になると顕著となるため、飽和傾向を示すと考えられる。

Sample②の信号については最も信号が小さく、信号が直線的に増加していることが分かった。前述のように磁気マーカーに比べポリマービーズのほうが抗原と結合しづらいためと考えると Sample②では最初の反応の際にポリマービーズに結合している抗原の数が少なく、磁気マーカーを入れた反応において結合する磁気マーカーが少なくなってしまうため、信号が小さくなったと考えられる。

Sample①については Sample②、③の結合が同時に起こるため、2 つの特徴を合わせた信号の増加の仕方をしていられると考えられる。

3 つのサンプルを比較した結果、Sample③の信号値が高く、さらなる低濃度検出を目指せると考えられる。

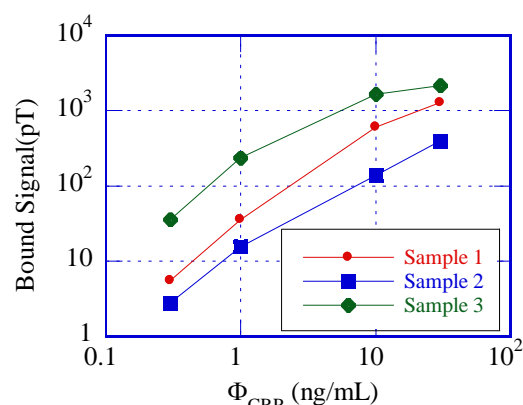


Fig. 8 Relationship between the bound signal and the concentration of CRPs. The results obtained with 3 types of sample are shown.

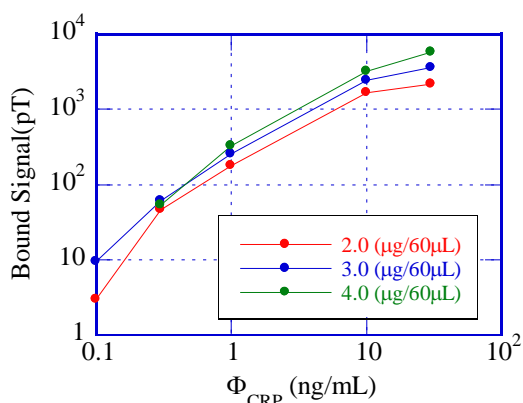
#### 4.2 磁気マーカー濃度の影響

前述したように低濃度検出における反応手順としては、抗原を磁気マーカーと先に反応させた後にポリマービーズと反応させることが適切であることが分かった。そこでさらなる高感度化に向け、磁気マーカーと抗原を 60 分間反応させ、その後、ポリマービーズを入れ、さらに 60 分間反応という手順で磁気マーカー濃度を  $2.0 \sim 4.0 \mu\text{g}/60 \mu\text{L}$  と変化させた場合の、CRP 濃度  $0.1 \sim 30 \text{ ng/mL}$  での測定を行った。

その結果を Fig. 9 に示す。グラフの縦軸は結合マーカーからの信号、横軸は CRP 濃度を表している。図に示すように CRP 濃度  $0.1 \sim 30 \text{ ng/mL}$  においては磁気マーカー濃度が高いほど結合マーカーからの信号が大きくなることが確認できた。また、磁気マーカー濃度が高くなるにつれ高濃度における飽和傾向が小さくなっていることが分かった。これは磁気マーカーが増え、1 つの磁気マーカーに結合する抗原の数が減ったこと、そして、磁気マーカー自体の数が増えているためだと考えられる。

また、CRP 濃度  $0.3 \text{ ng/mL}$  以下の低濃度の場合、磁気マーカー濃度  $4.0 \mu\text{g}/60 \mu\text{L}$  では凝集による未結合マーカーの信号が大きくなってしまい検出が困難となった。一方、磁気マーカー濃度  $2.0 \mu\text{g}/60 \mu\text{L}$  では信号値が小さく安定的な検出が困難であることが確認できた。これらのことから低濃度検出においては比較的信号が大きく、CRP 濃度に対して直線的に増加する磁気マーカー濃度  $3.0 \mu\text{g}/60 \mu\text{L}$  が適切であることが分かった。

今回の測定によって MR センサを用いた本免疫システムにおいて CRP 濃度  $0.1 \text{ ng/mL}$  の検出が可能であることが分かった。なお、医療検査における高感度 CRP 検査には濃度  $0.1 \sim 10 \text{ (ng/mL)}$  以上の CRP を検出する必要があるが、本研究で得られた感度はこの要求を満たしている。



**Fig. 9** Dependence of the bound signal on the concentration of CRPs. Results obtained for three concentrations of the markers are shown.

## 5. ま と め

MR センサと磁気マーカーを用いた洗浄工程不要の免疫検査を行った。対象の抗原としては CRP を用いた。10 回の検出実験の結果、CRP 濃度が 3.0 ng/mL 以上では変動係数は約 15%程度であり検査の再現性は比較的高いことが確認できた。しかしながら、それ以下の低濃度では変動係数は 20~70%程度となり再現性はまだ低いことが分かった。低濃度検出の再現性を高めるためには結合マーカーからの信号を増大させることが有効であるため、サンプル作製手順や磁気マーカー濃度の影響を調べた。これらの条件を最適化する事により結合マーカーからの信号を大きく出来、CRP 濃度 0.1 ng/mL までの検出が可能となった。今後の課題としては新たな反応手順での再現性の確認と向上、測定時間短縮に向けた反応時間の最適化などが挙げられる。

## 参 考 文 献

- 1) R. S. Gaster, L. Xu, S. J. Han, R.J. Wilson, D. A. Hal, S. J. Osterfeld, H. Yu, and S. X. Wang, "Quantification of protein interactions and solution transport using high-density GMR sensor arrays", *Nature Nanotech.* **6** 314-320 2011.
- 2) K. Enpuku, Y. Tsujita, K. Nakamura, T. Sasayama, and T. Yoshida, "Biosensing utilizing magnetic markers and superconducting quantum interference device", *Supercond. Sci. Technol.* **30** 053002 2017.
- 3) B. Gleich and J. Weizenecker, "Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles", *Nature* **435** 1214-1217 2005.
- 4) E. U. Saritas, P. W. Goodwill, L. R. Croft, J.J. Konklw, K. Lu, B. Zheng and S. M. Conolly, "Magnetic particle imaging (MPI) for NMR and MRI researchers", *J. Magnetic Resonance* **229** 116-126 2013.
- 5) Q. A. Pankhurst, N. T. K. Thanh, S. K. Jones and J. Dobson, "Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine", *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42** 224001 2009.
- 6) Nguyen T. K. Thanh Ed, *Magnetic nanoparticles from fabrication to clinical applications*, CRC Press, New York, 2012.
- 7) J. L. Dormann, D. Fiorani, and E. Tronc, "Magnetic Relaxation in Fine-Particle Systems", I. Prigogine and S. A. Rice, Eds. *Advances in Chemical Physics* **98**,283-494, Wiley, New York, 1997.
- 8) S. Y. Yang, J. J. Chieh, C. C. Yang, S. H. Liao, H. H. Chen, H. E. Horng, H. C. Yang, C. Y. Hong, M. J. Chiu, T. F. Chen, K. W. Huang and C. C. Wu, "Clinic applications in assaying ultra-low-concentration biomarkers using HTS SQUID-based AC magnetosusceptometer", *IEEE Trans Appl. Supercond.*, **23**, 1600604, 2013.
- 9) S. Schrittwieser, B. Pelaz, WJ. Parak, S. Lentijo-Mozo, K. Soulantica, J. Dieckhoff, F. Ludwig, A. Guenther, A. Tschöpe and J. Schotter, "Homogeneous biosensing based on magnetic particle labels", *Sensors*, **16**, 828, 2016.
- 10) S. Uchida, Y. Higuchi, Y. Ueoka, T. Yoshida, K. Enpuku, S. Adachi, K. Tanabe, A. Tsukamoto, and A. Kandori, "Highly sensitive liquid-Phase detection of biological targets with magnetic markers and high  $T_c$  SQUID", *IEEE Trans. Appl. Supercond.*, **24**, 1600105 2014.
- 11) M. Ura, K. Noguchi, Y. Ueoka, K. Nakamura, T. Sasayama, T. Yoshida and K. Enpuku, "Improved liquid-phase detection of biological targets based on magnetic markers and high-critical-temperature superconducting quantum interference device", *IEICE Trans. Electronics*, **E99C**, 669-675, 2016.
- 12) K. Enpuku, Y. Ueoka, T. Sakakibara, M. Ura, T. Yoshida, T. Mizoguchi, and A. Kandori, "Liquid-phase immunoassay utilizing binding reaction between magnetic markers and targets in the presence of a magnetic field", *Appl. Phys. Express*, **7**, 097001, 2014.