

## RT-LAMP法によるメロン黄化えそウイルス(MYSV)の検出

竹内良彦\*・福田至朗\*・大矢俊夫\*

摘要：メロン黄化えそウイルス（MYSV）を、罹病葉から簡易に検出できる方法を開発した。この方法は新しいDNA増幅技術であるLAMP法を利用したものである。サンプルの葉を緩衝液（Tris-HCl）とともにすり潰し、この懸濁液を、今回開発したLAMPプライマーを含むRT-LAMP反応液に混合して、63℃で1時間保温するだけの簡単な操作により検出が可能である。また、つまようじで葉をつつき、反応液に浸すだけでも検出が可能であった。LAMPプライマーの設計に際しては、愛知県で発生したMYSVの遺伝子を解析し、塩基配列の一部を決定した。この塩基配列を他と比較したところ、最初の確認地である静岡県で採取された系統とは明確な違いがあったが、高知県で採取された系統及びタイで採取されたうちの1系統とはほぼ一致していた。

キーワード：メロン黄化えそウイルス、MYSV、キュウリ、LAMP法

## Detection of Melon Yellow Spot Virus by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification

TAKEUCHI Yoshihiko, FUKUTA Shiro and OYA Toshio

Abstract: A simple process for detection of Melon Yellow Spot Virus(MYSV) in infected plant leaves was developed. A novel DNA amplication technique, Loop-Mediated Isothermal Amplification was applied to this process. MYSV could be detected by such a simple process as incubating of RT-LAMP reaction mixture containing LAMP primers, designed in this study for one hour at 63℃, after supplemented with solution extracted from sample leaf by homogenizing with Tris-HCl buffer. Moreover, picking the leaf with toothpick and dipping it in the reaction mixture, could substitute for the extracting process. In this study, we determined a partial sequence of nucleotid of MYSV which occurred in Aichi Prefecture, and we designed LAMP primers based on the sequence. In comparison with other reports, the sequence was apparently different from that of the line collected in Shizuoka Prefecture, the district of the first identification. But it almost coincided with that of the line collected in Kouchi Prefecture and one of those collected in Thailand.

Key Words: Melon Yellow Spot Virus, MYSV, Cucumber, Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP

## 緒言

メロン黄化えそウイルス (melon yellow spot virus (MYSV)) は1992年、静岡県のみんぼろ栽培において初めて発生が確認され、栽培農家に大きな被害を与えた<sup>1)</sup>。1995年には高知県のキュウリ栽培において同じウイルスが原因とされるキュウリ黄化えそ病が発生した<sup>2)</sup>。MYSVによる病害は国内では14県で発生が確認されており (2006年5月時点)、愛知県においては2005年2月に施設栽培キュウリで発生が確認された。

MYSVはミナミキイロアザミウマによって媒介されることが知られている。自然条件ではキュウリ、メロン、スイカに感染し、葉にモザイク、えそ斑点、退緑斑、黄化などの症状を引き起こし、症状が進むと生育抑制、枯死につながる。果実の症状はまれであるが、モザイク斑が出る場合もある。

防除対策としてはミナミキイロアザミウマの防除が中心となるが、完全な防除は困難である。感染が疑われる場合、あるいは感染株が発生した場合に被害の拡大を防ぐためには、早期に感染の有無を判別し、感染株をすべて抜き取ることが重要である。

症状から明確な判別ができない場合、確実なウイルス病検出手法としては、主としてELISA法やRIPA法といった血清学的手法が用いられている。これを応用して簡易に検出できるキットも既に開発されているが、高価格という問題がある。この他にも、遺伝子増幅技術であるRT-PCR法を利用した遺伝子レベルの検出手法が開発されている。しかし、この方法はサーマルサイクラーといった高価な装置が必要であり、結果が得られるまでに多くの手順を必要とする。

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP法) は2000年に栄研化学(株)の納富らによって報告された新しい仕組みの遺伝子増幅技術である<sup>3)</sup>。その名称は、一定温度で反応が進み、合成されたDNA末端がループ状になり、次の合成の起点になるという独特のDNA増幅手法に由来する。LAMP法はPCR法に比較して、塩基配列のわずかな違いを識別でき、短時間 (15~60分) できわめて多く ( $10^9 \sim 10^{10}$ 倍) のDNAを増幅できる。検出結果が出るまでの手順が少なく、65前後の一定温度が保てる恒温器があれば実施可能である。さらに、DNA増幅時には反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムにより反応液が白濁するので、増幅の有無を目視によって確認できるというメリットもある<sup>4)</sup>。このようにLAMP法は遺伝子レベルでの判別にきわめて利用価値が高い。

LAMP法を応用した遺伝子検出技術の開発で中心となるのは、目的とする遺伝子の特異的に増幅できるLAMPプライマーの設計である。LAMP法では増幅対象領域に含まれる6か所の短い塩基配列を基にしてプ

ライマーを設計する。そのため、2か所の配列から設計するPCR法よりも特異性が高いことが明らかとなっている<sup>3)</sup>。

設計したLAMPプライマーによる診断を行うためには、DNAあるいはRNAの抽出・精製方法や反応液の組成・反応温度といった条件を整えることが必要である。これに関しては、これまでの報告<sup>5-7)</sup>により、植物病原ウイルスについては基本的な方法が確立されている。

本研究では、LAMP法を利用して植物体からMYSVを検出する方法を開発した。これは、確実性、迅速性、簡便性を備えながら、コストも比較的安く抑えることができる方法である。

## 材料及び方法

### 1 LAMPプライマー設計のための塩基配列決定

LAMPプライマーを設計するにあたり、罹病植物からMYSVのRNAを抽出し、この塩基配列の一部を決定した。

塩基配列の決定のために、静岡県農業試験場で塩基配列決定用に設計されたプライマーSC2: 5'-GTAAACACCATGTCTACCGT-3'及びSS4: 5'-GCAGACTAGCAAGCAAGAC-3'<sup>1,8)</sup>を用いた。この2つのプライマーは、L RNA (8918bp)、M RNA (4815bp)、S RNA (3232bp) の3分節から構成されるMYSVのゲノムRNAのうち、S RNA上にある、外皮タンパク質をコードするN遺伝子の一部分を増幅する。

#### (1) DNAサンプル調製

愛知県で採取し、MYSVの感染が明らかなキュウリの葉からRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社) を用いて全RNAを抽出した。このRNAを逆転写酵素Rever Tra Dash (東洋紡(株)) とプライマーSC2を用いて、逆転写反応によりMYSV由来のDNAを得た。さらに、約450bpのDNA増幅断片が得られることが分かっているプライマーSC2及びSS4を用いてPCR法により増幅した。増幅DNA断片は電気泳動して選別し、MYSV由来の増幅DNA断片2サンプルを得た。

これをベクターpGEM-T Easy (promega社) 及び大腸菌DH5 $\alpha$  を用いてクローニングした後、再度PCRにより増幅し、DNA3サンプルを得た。

#### (2) 塩基配列の決定

塩基配列の決定にはジェネティックアナライザーCEQ8000 (BECKMAN COULTER社) を使用し、一連の操作手順はCEQ8000 DNA Analysis System (同) のプロトコルに従った。

以上により、3つのDNAサンプルをそれぞれ両側から解析し、6つの塩基配列データを得た。これらを比較、修正して最終的な配列を決定した。

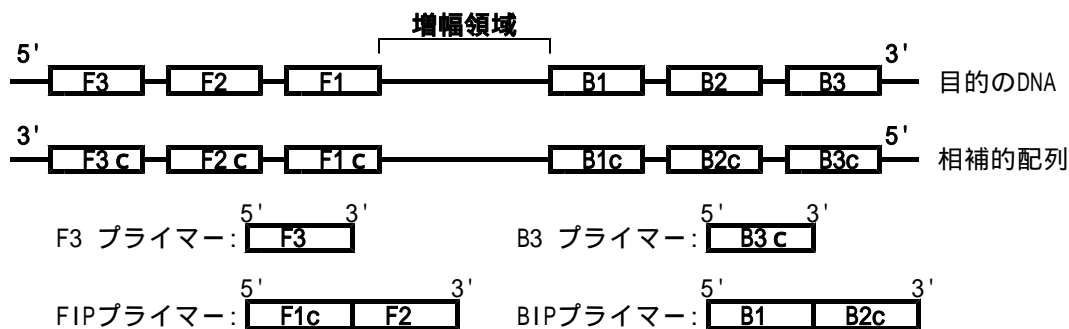


図1 LAMPプライマーの塩基配列とその設計部位の塩基配列との対応関係  
 F3プライマーはF3部位と同じ配列、FIPプライマーはF1部位の相補的配列 (F1c) の後に  
 F2部位をつなげた配列、BIPプライマーはB1部位の後にB2部位の相補的配列 (B2c) をつ  
 ながれた配列、B3プライマーはB3部位の相補的配列である。  
 (Fはforward、Bはbackward、IPはinner primerを表す)

## 2 LAMPプライマーの設計

決定した塩基配列に基づきLAMPプライマーを設計した。LAMPプライマーの設計にはインターネット上で利用できる「LAMP法プライマー設計支援ソフトウェアPrimer Explorer」(栄研化学(株)・(C)FUJITSU LIMITED)を利用した。LAMPプライマーは増幅対象領域の6か所の短い塩基配列を基にして、4種類のプライマーを一組として設計する。それぞれの対応関係を図1に示す。

## 3 植物体からのサンプル調製

設計したLAMPプライマーの有効性はpositive control及びnegative controlのLAMP反応を調べることにより確認した。positive control用として、愛知県内で採取され、MYSVに感染していることが明らかになったキュウリの葉を使用した。これは明確に病徴が現れている段階のものを用いた。また、negative control用として、非感染のキュウリの葉を用いた。

### (1) 磨砕・懸濁による方法<sup>5)</sup>

キュウリ葉0.1gに400 $\mu$ lの緩衝液(100mM Tris-HCl (pH8.0))を加えて乳鉢でよくすりつぶすことにより、ウイルスを抽出した。この5 $\mu$ lを同じ緩衝液195 $\mu$ lで希釈して最終的に200倍希釈とした懸濁液をサンプルとした。

また、同じく100mM Tris-HCl (pH8.0)でこの200倍希釈サンプルをさらに10倍、100倍、1000倍に希釈した懸濁液も用意した。

### (2) つまようじによる方法<sup>6)</sup>

(1)の方法の代わりに、滅菌したつまようじを用いて、先端に汁液の色がつく程度にキュウリ葉の病斑部位をつつくことでサンプルを採取した。

## 4 RT-LAMP法

通常のLAMP法はDNAを鋳型にして増幅するが、MYSVのゲノムはRNAなので、ここではRNAのDNAへの転写と増幅を一度に行うことができるRT(reverse transcription)-LAMP法<sup>3)</sup>を用いた。なお、この方

法が通常のLAMP法と異なるのは、通常の反応液にDTT、RNase inhibitor、AMV reverse transcriptaseを加える点のみである。

### (1) 反応液の調製

RT-LAMP反応液の組成はFukuta et al<sup>9)</sup>に従い、20mM Tris-HCl (pH8.8)、10mM KCl、10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、8mM MgSO<sub>4</sub>、0.1% Tween20、0.8M betain (Sigma-Aldrich)、1.4mM dNTPs、5mM DTT、16unitのBst DNA polymerase (New England Biolabs)、8unitのRNase inhibitor (Promega)、1.25unitのAMV reverse transcriptase (Invitrogen)、0.2 $\mu$ M F3及びB3プライマー、1.6 $\mu$ M FIP及びBIPプライマーとした。調製には滅菌ミリQ水を用い1.5mlチューブ内に調製した。この反応液を1サンプルにつき24または25 $\mu$ lずつ、200 $\mu$ lチューブに分注した。

この操作はコンタミネーションを防ぐため、クリーンベンチ内において行った。

### (2) 反応液とサンプルの混合

磨砕・懸濁による方法の場合は、24 $\mu$ lずつ分注した反応液にサンプル1 $\mu$ lを加えた。

つまようじによる方法の場合は、同じ反応液25 $\mu$ l中にサンプルを採取したつまようじの先端部を1~2秒浸した。

サンプルの混合はコンタミネーションを防ぐため、反応液の調製とは別のクリーンベンチ内で行った。

### (3) 反応条件及び測定

反応液にサンプルを混合した後は、ただちにリアルタイム濁度測定装置LA-200 (テラメックス(株))に移した。この装置は恒温そうと分光光度計を兼ねたもので、DNAの増幅による反応液の濁度の上昇を分光光度計により測定するものである。反応温度は63一定に設定し、90分間測定を行った。

```

1 aaaggctctc caatgcatag cattaatctc aaagctgtca tgtcaaaactt tgcaggcaca
aaaggctctc caatgcatag cattaatctc aaagctgtca tgtcaaaactt tgcaggcaca
aaaggctctc caatgcatag cattaatctc aaagctgtca tgtcaaaactt tgcaggcaca

61 gttaaacat atgcagcaac caatggaagc tgcattgctt tctcatacat tttctgcttt
gttaaaccat atgcagcaac caatggaagc tgcattgctt tctcatacat tttctgcttt
gttaaaccat atgcagcaac caatggaagc tgcattgctt tctcatacat tttctgcttt

121 tcttcctcat tctctgtctt tcttgcaatg ctgatcatca aagtctctgat gacagcctca
tcttcctcat tctctgtctt tcttgcaatg ctgatcatca aagtctctgat gacagcctca
tcttcctcat tctctgtctt tcttgcaatg ctgatcatca aagtctctgat gacagcctca

181 gttcttttaa atgtccaatc atcagggtcca acattatccc cagatgcaac tatctttttc
gttcttttaa atgtccaatc atcagggtcca acattatccc cagatgcaac tatctttttc
gttcttttaa atgtccaatc atcagggtcca acattatccc cagatgcaac tatctttttc

241 cgcgcaaaact tgtagttgcc agatttgcaa gctgcataaa ctgcttctct gctttttaga
cgcgcaaaact tgtagttgcc agatttgcaa gctgcataaa ctgcttctct gctttttaga
cgcgcaaaact tgtagttgcc agatttgcaa gctgcataaa ctgcttctct gctttttaga

301 atagttatac cattattata atttaatttc acctcatctc tcacatccc aaagaatgag
atagttatac cattattata atttaatttc acctcatctc tcacatccc aaagaatgag
atagttatac cattattata atttaatttc acctcatctc tcacatccc aaagaatgag

361 tggaagttaa atccttcagt cgattcctct gtctctattt caacttctga ctggccacca
tggaagttaa atccttcagt cgattcctct gtctctattt caacttctga ctggccacca
tggaagttaa atccttcagt cgattcctct gtctctattt caacttctga ctggccacca

421 ctaagaagtt cctggatctt ctcccttctc aacttagca
ctaagaagtt cctggatctt ctcccttctc aacttagca
ctaagaagtt cctggatctt ctcccttctc aacttagca
    
```

図 2 今回決定した塩基配列と既報との比較（囲み文字は相異部分）及びプライマー 1 の設計部位（下線部）

上段：愛知県（キュウリ）の系統（今回決定した塩基配列）

中段：高知県（キュウリ）の系統（ACCESSION:AB076250 371-829）・タイ国（ヘチマ）の系統（ACCESSION:AM087020 12-470）

下段：静岡県（メロン）の系統（ACCESSION:AB038343 2696-3154）

表 1 決定した塩基配列に基づき設計したLAMPプライマー

プライマー	塩基配列	位置 <sup>注)</sup>
プライマー-1		
F3	5'- GTCCAACATTATCCCCAGA -3'	206-224
B3	5'- GGTGGCAAGTCAGAAGTT -3'	402-419
FIP	5'- GCAGGAAGCAAGTTTATGCAGCGCAACTATCTTTTTCCCGC -3'	226-244, 271-292
BIP	5'- TTCACCTCATCTCTCACATCCCGAGACAGAGGAATCGACTGA -3'	328-349, 376-395
-----		
プライマー-2		
F3	5'- GTCCAACATTATCCCCAGA -3'	206-224
B3	5'- GGTGGCAAGTCAGAAGTT -3'	402-419
FIP	5'- GCAGGAAGCAAGTTTATGCAGCGCAACTATCTTTTTCCCGC -3'	226-244, 271-292
BIP	5'- TCACCTCATCTCTCACATCCCGAGGAATCGACTGAAGGAT -3'	329-349, 371-389

注) 図 2 の塩基配列中における位置

### 試験結果

#### 1 塩基配列

塩基配列の決定により、MYSVのS RNA上のN遺伝子

の一部である459塩基分の配列が明らかとなった（図 2）。N遺伝子については、調査時点において、国内で採取された 2 系統及びタイ国で採取された 9 系統のものがDNA Data Bank of Japan(DDBJ)に登録され

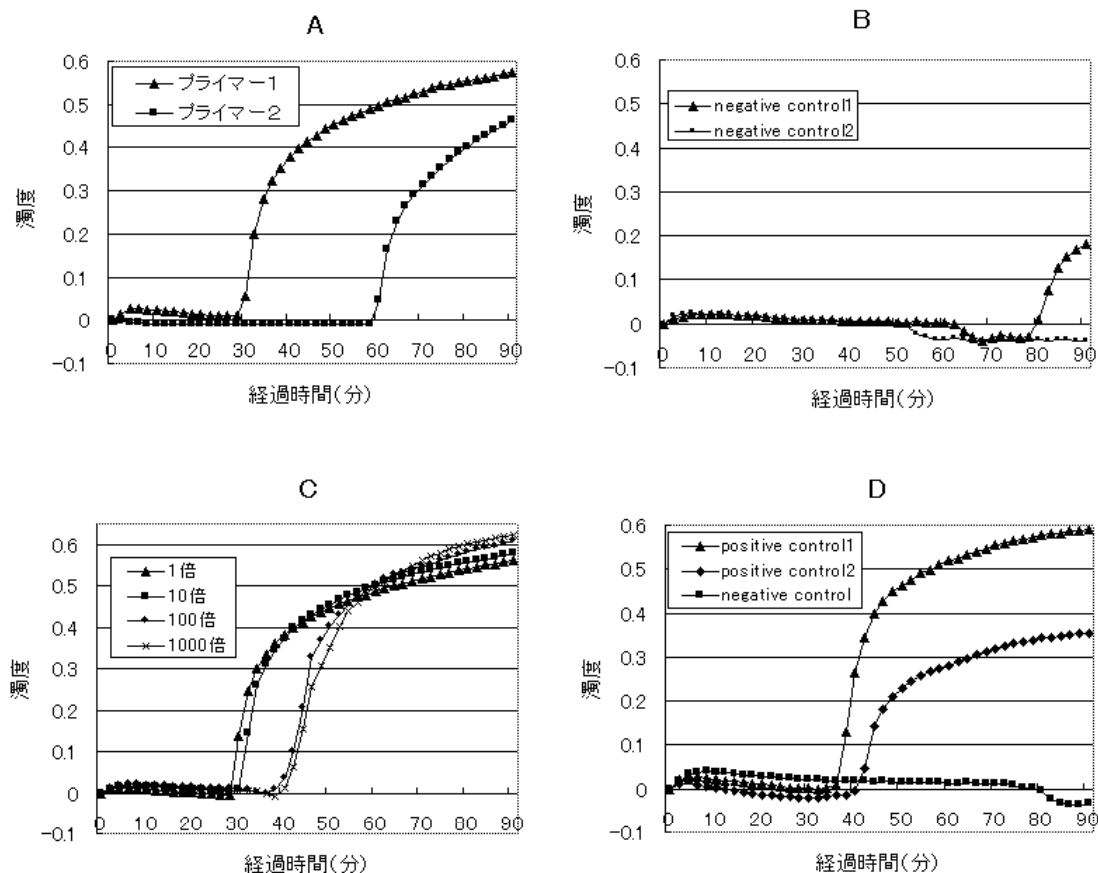


図3 リアルタイム濁度測定装置によるRT-LAMP反応の測定結果

- A: プライマー1・2、サンプル;positive、サンプル調製方法;磨砕+懸濁  
 B: プライマー1、サンプル;negative、サンプル調製方法;磨砕+懸濁  
 C: プライマー1、サンプル;positive(希釈)、サンプル調製方法;磨砕+懸濁  
 D: プライマー1、サンプル;positive・negative、サンプル調製方法;つまようじ

ていた。今回決定した、愛知県のキュウリから採取されたMYSVの459塩基の配列に相当する部分でこれら11系統との比較をしたところ、静岡県のメロンで採取された系統 (ACCESSION:AB038343) とは459塩基中、17か所の塩基が異なっていた (相同性96.3%)。高知県のキュウリで採取された系統 (ACCESSION:AB076250) 及びタイのヘチマで採取された系統 (ACCESSION:AM087020) とは1塩基のみの違いであった (相同性99.8%)。ところが、タイ国で同じキュウリから採取された系統 (ACCESSION:AY673635) とは95.4%の相同性であった。この他の7系統とは95.4~96.1%の相同性であった。

## 2 設計したLAMPプライマー

決定した塩基配列に基づき、表1に示す二組のLAMPプライマー (プライマー1、プライマー2) を設計した。なお、この二組はF3、B3、FIPの3つが共通するものとなった。

## 3 RT-LAMP反応の測定結果

### (1) 反応の速さ

プライマー1及びプライマー2を使用し、positive controlをサンプルとしてRT-LAMP法による反応を調べた結果、プライマー1では29分後、プライマー2では58分後から濁度の上昇が見られ、明らかにDNAが増幅されていることが確認された (図3A)。特に、プライマー1は、ほぼ30分前後から安定的に反応が始まり、40分後には明らかな白濁が認められたので、以下の反応にはプライマー1を用いた。

### (2) 非特異的反応

プライマー1を使用して、negative controlをサンプルとしてRT-LAMP法による反応を調べたところ、図3Bに示すように、80分前後から濁度が上昇してくる場合があった。この非特異的な反応は同じサンプルを用いた場合でも現れる場合と現れない場合があり、今回の実験においては3回に1回程度の割合でこのような反応が見られた。

### (3) 検出感度

プライマー1を使用して、positive controlをさらに10倍、100倍、1000倍に希釈した場合のRT-LAMP

反応を調べた結果、10倍に希釈したサンプルでは30分前後から濁度の上昇が見られた。また、100倍、1000倍に希釈したサンプルではこれより10分程度遅かったが、いずれの希釈サンプルでも明らかなDNA増幅が確認された(図3C)。

#### (4) つまようじによるサンプル調製における反応

プライマー1を使用して、つまようじで採ったサンプルについてRT-LAMP法による反応を調べた結果を図3Dに示した。positive controlにおいて明確なDNA増幅が確認できたが、濁度が上昇し始めるのは磨砕・懸濁による方法よりも6~10分遅かった。また、同じ葉を用いてもサンプル部位により反応時間にばらつきが見られた。negative controlでは磨砕・懸濁した場合の結果と同様に、数回に1回程度、90分近くから非特異的の反応が見られる場合があった(データ省略)。

## 考 察

### 1 簡易診断法としての実用性

今回決定した塩基配列に基づいて設計した二組のLAMPプライマーを使用したRT-LAMP法による反応結果により、罹病葉からMYSVを検出できることが明らかになった。特にプライマー1は、反応の速さから判断して十分な実用性があるといえる。通常、LAMP法ではループプライマーを加えることで反応が促進されることが知られている<sup>10)</sup>。しかし、プライマー1を用いた場合、約30分で安定的に反応が始まったので、ループプライマーは必要ないと判断し、設計は行わなかった。ただし、ループプライマーを加えることでさらに反応を促進することは可能と思われる。

また、今回は、病徴の明確な罹病葉の抽出液を200倍希釈したものをpositive controlとした。これをさらに1000倍希釈して20万倍希釈としたものをサンプルとしても、反応までの時間が数分遅れる程度で明確な反応が見られた。実際のウイルス濃度については未調査であるが、この結果から、より初期の罹病段階においても検出は十分可能であることが推測される。

negative controlを用いた反応において、80分前後から非特異的の反応とみられる反応が表れたのは、葉からの抽出物に含まれるきょう(夾)雑物が何らかの影響を及ぼしたためと考えられる。しかし、positive controlは30分で反応し、これを1000倍に希釈したサンプルでも40分で反応したように、negative controlを用いた場合の非特異的の反応とは反応時間に明確な差があり、両者を誤って判定する可能性は低いと考えられる。したがって、抽出物を精製する手間や装置を考慮すると、今回のサンプル調製方法で実用上は問題がないと考えられる。ただし、80分経過後から非特異的の反応が確認されたことから、60分以内に反応液の白濁を確認して判断する

ことが適当であると考えられる。

また、つまようじで罹病葉をつつくだけのサンプル調製でもMYSVを検出できることが明らかになった。この場合、サンプルにより反応時間にばらつきが表れたのは、つまようじでつづいた部位によって葉中のウイルス濃度が異なっていたためではないかと考えられる。したがって、この方法による場合は複数の部位をつまようじでつづくことで検出の確実性がより高まると思われる。また、90分近くから見られた非特異的の反応は上記と同様の理由で実用上の問題はないと考えられる。つまようじによる方法は大量のサンプルを検定したいときには特に有効であると思われる。

LAMP法の注意点としては、検出感度が非常に高いため、コンタミネーションによる誤判定が起きやすいことが挙げられる。サンプル抽出や反応液の調製、混合の際には、positiveサンプルに由来する飛沫等がそれ以外のサンプルや反応液にごく微量でも混入することのないように細心の注意が必要である。

### 2 塩基配列に関する分析

今回決定した、愛知県のキュウリで発生したMYSV系統の塩基配列と既報の塩基配列を比較した結果から、愛知県の系統と高知県のキュウリで採取された系統は同一系統である可能性が高い。これはキュウリ苗の流通により、苗とともにMYSVあるいは保毒したミナミキイロアザミウマが運ばれて分布を広げることが主な原因ではないかと推測される。

これに対し、最初の確認事例である静岡県のメロンで発生した系統は塩基配列の違いから別系統と考えられる。また、LAMPプライマーの設計部位の塩基配列で比較した場合、8か所の違いがある(図2)ため、この系統には今回設計したLAMPプライマーが有効でない可能性がある。このことは、本研究の予備段階で行った実験において、この系統のMRNAの塩基配列(ACCESSION:AB061773)に基づいて設計したLAMPプライマーでは、今回使用したサンプルにまったく反応が認められなかったことから推察される。

この他、タイ国で採取された系統と比較した結果も含めて判断すると、この塩基配列の違いは発生地や宿主作物の違いに必ずしも対応していない。今回設計したLAMPプライマーが発生地や宿主作物が違う場合にどの程度有効であるかについては今後の調査が必要である。

## 引用文献

1. トスポウイルスおよびジェミニウイルスによる数種新病害の病原の性状とその防除に関する研究. 静岡県農業試験場 特別報告. 24(2002)
2. 竹内繁治, 奥田充, 花田 薫, 川田洋一, 亀谷満朗. メロン黄化えそウイルス(Melon yellow spot virus)によるキュウリ(Cucumis sativus)の黄化えそ病.

- 日本植物病理学会報.67,46-51(2001)
3. Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N.Amino and T. Hase. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*.vol. 28,No.12 e63.(2000)
  4. Y.mori,K.Nagamine,N.Tomita,T.Notomi.Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity drived from magnesium pyrophosphate formation.*Biochem.Biophys.Res.Commun.*289, 150-154 (2001)
  5. 福田至朗,新美善久,大石一史,吉村幸江,穴井尚子,堀田真紀子,深谷雅博,加藤俊博,大矢俊夫,神戸三智雄. 2種のウイルスとキクスタントウイロイドを検出するreverse transcription loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP)法の開発. *関西病虫研報*47,31-36 (2005)
  6. 福田至朗,穴井尚子,加藤政司,吉村幸江,深谷雅博,矢部和則,大矢俊夫,神戸美三雄.簡易な鋳型調製によるloop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を用いたトマト黄化 葉巻ウイルスの検出. *関西病虫研報*47,37-41(2005)
  7. 福田至朗,加藤晋朗,吉田桂子,水上優子,石田朗,上田淳一,神戸三智雄,石本佳之.Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification(RT-LAMP)法によるシンビジウムモザイクウイルス(CyMV)の検出. *日本植物病理学会報*.69,411-414 (2003)
  8. 平成15年度試験研究成績書(農業環境). *神奈川県農業技術センター*.p.5-6(2003)
  9. Shiro Fukuta, Kazushi Ohishi, Keiko Yoshida, Yuko Mizukami, Akira Ishida and Michio Kanbe. Development of immunocapture reverse transcriptio loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum. *Journal of Virological Method.* 121, 49-55(2004)
  10. K.Nagamine,T.Hase,T.Notomi. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes.* 16, 223-229 (2002)
  11. 加藤公彦,花田 薫.メロン黄化えそウイルスのS RNAの特性. *日本植物病理学会報*.66, 252-254 (2000)