イネ萎縮病ウイルスに関する研究 (続報) — II

木 村 郁 夫*

Ikuo KIMURA: Further studies on the rice dwarf virus. — II

実験材料および方法は前報のとおりである。

発育鶏卵培養法の御指導を賜わった北海道大学医学部附属病院眼科の越智通成医学博士、超遠心分離の操作を御指導下さった同学部第1生理学教室斎藤大雄氏につつしんで感謝の意を表する。

ウイルスの精製

最近までイネ萎縮病ウイルスの形態や大きさについては全く不明であつた。これを研究するために罹病植物および保毒虫の搾汁液からウイルス粒子を分離することを企てた。

低速遠沈試験

高速遠沈と低速遠沈とを組み合わせた分画遠心分離において、ウイルス粒子の損失が最も少なく、しかもウイルス粒子以外の粒子をできるだけ多く除去する適当な低速遠心力を定めることがまず必要である。

実験 1. 罹病イネの茎葉を磨碎して、第1図のごとく遠心分離を行なつた。

第1図 低速遠心分離

く遠心分離を行なつた。

ここで得た試料 P₁~P₃ および S をそれぞれ無毒虫に注射した。その結果は第1表のとおりである。

第1表 接種試験結果

供試試料	注射虫数	20日以上生存虫数	感染虫数
P ₁	50	25	0
P ₂	50	22	0
P ₃	50	22	1
S	50	23	4

この結果より P₃ および S は感染力を有しウイルスが含まれていることが認められた。

実験 2. 保毒虫を磨碎して、第2図のごとく遠心分離を行なつた。

第2図 低速遠心分離

上述の S₁~S₃ の1部をとり無毒虫に注射した。その結果は第2表に示すとおりである。

この結果によると S₁~S₃ の感染力は同程度であつて、この一連の遠心分離操作ではウイルスが最後まで上清に含まれていることがわかつた。

以上低速遠沈試験では 5,000 rpm 30 分遠心分離を行なつてもウイルスは沈殿せず、10,000 rpm 30 分ではわずかに沈殿するが大部分のウイルスは上清に含ま

* 北海道大学農学部

第2表 接種試験結果

供試試料	注射虫数	20日以上 生存虫数	感染虫数
S ₁	25	13	2
S ₂	25	17	3
S ₃	25	18	3

れることがわかった。したがってウイルスの損失の少ない低速遠沈の限界は 5,000 rpm 30 分であるが、10,000 rpm 30 分を用いてもウイルスの損失はわずかであると考えられる。

高速遠沈試験

磨碎汁液中のウイルス粒子を沈殿させるに必要な遠心力を知るために以下の実験を行なった。

実験 1. 罹病イネの磨碎液を第3図のごとく遠心分離を行なった。

第3図 高速遠心分離

この一連の操作で得られた試料 S₁~S₂ および P₁~P₃ をそれぞれ無毒虫に注射した。その結果は第3表に示すとおりである。

この結果より S₁ に含まれるウイルス粒子の多くは P₁ に存し、P₂, P₃ および S₂ には少量が含まれていることがわかった。

実験 2. 前実験同様の遠心分離を保毒虫の磨碎液を用いて行なった。その結果は第4表に示すとおりである。

第3表 接種試験結果

供試試料	注射虫数	20日以上 生存虫数	感染虫数
S ₁	60	46	12
P ₁	60	45	6
P ₂	60	42	2
P ₃	60	38	1
S ₂	60	31	1

第4表 接種試験結果

供試試料	注射虫数	20日以上 生存虫数	感染虫数
S ₁	30	22	4
P ₁	30	21	2
P ₂	30	19	0
P ₃	30	17	1
S ₂	30	15	0

第4表の結果によれば、前実験の結果と同じく、S₁ に含まれるウイルスの多くは P₁ に存し、P₂, P₃ および S₂ にはほとんど存しないことがわかった。

実験 3. 保毒虫を用いて、第4図のごとく遠心分離を行なった。

第4図 高速遠心分離

ここで得られた試料 P₁~P₃ および S₁~S₂ をそれぞれ無毒虫に注射した。その結果は第5表に示すとおりである。

第5表 接種試験結果

供試試料	注射虫数	20日以上 生存虫数	感染虫数
S ₁	30	16	3
P ₁	30	16	2
P ₂	30	16	2
P ₃	30	15	0
S ₂	30	12	0

りである。

この結果より S₁ に含まれるウイルスは P₁ と P₂ に同程度に含まれていることがわかった。

以上高速遠沈試験の結果を合わせ考えると、20,000 rpm 120 分遠心分離を行なうと大部分のウイルス粒子が沈殿することと、また 10,000 rpm 120 分では沈殿、上清ともほぼ同量のウイルスを含むことがわかった。

沈降速度

前実験において、20,000 rpm 120 分遠心分離によつて得た沈殿にウイルス活性が高く、この試料中にはウイルス粒子が最も多く含まれていると考えられた。この試料について分析用超遠心機を用いて、沈降図を撮影し、試料の純度を見る実験を行なつた。沈降定数 (St) は次式により算出した¹²⁾。

$$St = \frac{2(x_2 - x_1)}{(x_2 + x_1) \omega^2 (t_2 - t_1)}$$

健全イネ

罹病イネ

第6図 沈降図形

この結果によれば peak B および C は罹病イネ試料にのみ存し、健全イネ試料には存在しなかつた。しかし peak A は健病両試料に存し、イネ組織内の正常細胞構成成分と考えられる。罹病イネ試料の peak B および C の沈降定数 (St) は次のとおりである。

$$\text{peak C } St = 468 \times 10^{-13} \text{ (平均)}$$

$$\text{peak B } St = 318 \times 10^{-13} \text{ (平均)}$$

実験 2. 前実験で得た試料にはウイルス以外の成分と考えられるものが相当混在していたので、ここでは第7図のごとく遠心分離を行なつた。

x : 回転中心より peak までの距離 cm

t : 秒

$\omega : N\pi/30$ ($N = \text{rpm}$)

実験 1. 罹病イネ茎葉を磨碎して第5図のごとく精製を行なつた。

第5図 分画遠心分離

ここで最後に得た上清を Spinco E 型超遠心機の分析用セルに入れ、20,410 rpm (Max. 30,400 g) で遠心分離を行なつて、4 分おきに沈降図を撮影した。これらの沈降図の1部は第6図に示すとおりである。

ここで最後に得た上清を分析用セルに入れ、20,410 rpm で遠心分離を行なつて、2 分おきに沈降図を撮影した。その1部は第8図に示すとおりである。

この結果によると罹病イネ試料には peak が1つ現われたが、健全イネ試料には peak が1つも現われなかつた。この罹病イネ試料の peak の沈降定数 (St) の平均は次のようであつた。

$$St = 405 \times 10^{-13}$$

この実験に現われた peak は前実験の peak C に相当するものと考えられる。

第7図 分画遠心分離

第8図 沈降図形

沈降時間

沈降に要する時間は溶媒に対する溶質の沈降定数がわかればつぎの式から算出することができる。

$$t = \frac{1,521}{SP_i} \text{ (分)}$$

$$\text{ただし } P_i = \frac{(\text{rpm})^2}{\log_e R_2 - \log_e R_1}$$

S : 沈降定数/秒

R_1 : 回転中心から tube までの最短距離 cm

R_2 : 〃 最長距離 cm

それで $St = 468 \times 10^{-13}$ として日立 40 P 型超遠心機の RP-40 の rotor を用いて回転数を 20,000 rpm とすると上式より、この粒子が沈降に要する時間は62分となる。

反覆精製

分画遠心分離を反覆した場合に試料のウイルス活性が変化するかどうかを知るため以下の実験を行なった。

実験 1. 罹病イネ茎葉を磨碎して、第9図のごとく反覆して遠心分離を行なった。

この一連の操作で得られた対照、1回および2回精製の試料をそれぞれ無毒虫に注射した。その結果は第

第9図 反覆遠心分離

6表に示すとおりである。

この結果より、精製1回で濃縮したウイルス液は感

第6表 反覆精製液の接種試験結果

反覆回数	稀釈倍数	注射虫数	20日以上生存虫数	感染虫数
対 照	5	55	41	4
1	1/5	55	35	6
2	1/10	55	25	2

染率が高いが2回精製したものは濃縮しても感染率が低下することがわかった。

実験 2. 前実験同様反覆精製を行なった。

第10図 反覆遠心分離

ここで得た試料Sおよび P₁~P₃ をそれぞれ無毒虫に注射した。その結果は第7表に示すとおりである。

この結果よりウイルス液は精製1回で濃縮すると感染率が少し高まり、2回以上精製すれば濃縮しても感染率が低下することがわかった。

ウイルス液からの核酸抽出

Kirby は哺乳動物組織からリボ核酸を取り出すため

第7表 反覆精製液の接種試験結果

供試試料	稀釈倍数	注射虫数	20日以上生存虫数	感染虫数
S	5	30	16	2
P ₁	5	30	18	2
P ₁	1/10	30	17	3
P ₂	1/10	30	16	0
P ₃	1/10	30	12	1

にフェノールを加えて振とうし、遠心分離によつて除タンパクを行ない、水層をとり、エタノールで RNA を沈殿させた¹⁰⁾。Gierer und Schramm は同様にフェノール法を用いてタバコモザイク病ウイルスから核酸(RNA)をタンパクを含まない標品としてとり出し、これを *Nicotiana glutinosa* に接種して感染せしめることに成功した⁹⁾。また Fraenkel-Conrat ちもタバコモザイク病ウイルスを sodium dodecyl sulfate で処理して核酸を分離し、この核酸が感染力を有することを報告した⁹⁾。その後これらの方法によつて、多くの植物ウイルス粒子および罹病組織から核酸が取り出されている。

ここでは Gierer und Schramm が用いたものに類似の方法を用いて、ある程度に精製したウイルス液から核酸を抽出せんとして実験を行なった。

実験 1. 罹病イネ茎葉を磨碎し、5,000 rpm 30分と 20,000 rpm 60分の分画遠心分離によつて部分的精製を行なった試料から核酸の抽出を行なった。すな

第11図 核酸の抽出

わち、精製ウイルス液と等量の水飽和フェノールを加えて 10 分間強く振とうし、遠心分離（5,000 rpm 10 分）して水層をとり、少量のフェノールを加えて 10 分間振とうし、遠心分離（5,000 rpm 10 分）して水層をとり等量以上のエーテルを加えてフェノールを除く（3 回反覆）。最後に遠心分離後水層に終末 1M NaCl を加えて 1 時間冷蔵庫内（0～4℃）に静置し、遠心分離して沈殿を集め、リン酸緩衝液で溶解し、さらに軽く遠心分離して上清を得る。

ここで得た抽出液（上清）と部分的精製ウイルス液とを無毒ヨコバイに注射した。その結果は第 8 表に示すとおりである。

第 8 表 抽出液の接種試験結果

供試試料	稀釈倍数	注射虫数	20 日以上生存虫数	感染虫数
抽出液	1/20	70	31	2
ウイルス液	5	60	26	4

抽出液を 70 頭のヨコバイに注射したうち 2 頭、ウイルス液の方は 60 頭注射したうち 4 頭がそれぞれ感染を起こした。

同一試料について血清反応を試みた結果は第 9 表に示すとおりである。

第 9 表 沈降反応

抗血清終末稀釈倍数	16	32	64	128	256	512	1024	2048	対照
抽出液	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ウイルス液	+	+	+	+	+	+	+	—	—

抽出液：×1/5，ウイルス液：×5

この結果の示すごとく、ウイルス液は 1/1024 まで沈殿反応十であるのに、抽出液は全く反応を示さなかつた。

また同一試料の紫外外部吸収度を測定したところ第 12 図に示すとおりで、これによると、270 rpm に peak が認められた。

実験 2. 前実験同様部分的精製ウイルス液から第 13 図のごとき手順で核酸の抽出を行なつた。

そして最後に得られた抽出液およびウイルス液を無毒虫に注射した。その結果は第 10 表に示すとおりである。

この結果、抽出液を 120 頭に注射したが 1 頭も感染しなかつた。

同一試料について血清反応を見たが、沈降反応が認められなかつた。またこの試料の紫外外部吸収度を測定

第 12 図 紫外外部吸収曲線

(部分的精製ウイルス液) + (水飽和フェノール) (1:1)

第 13 図 核酸の抽出

第 10 表 抽出液の接種試験結果

供試試料	稀釈倍数	注射虫数	20日以上 生存虫数	感染虫数
抽出液	1/20	120	37	0
ウイルス液	5	90	26	6

した結果は第 14 図に示すとおりで、258 m μ に peak が現われ、核酸の吸収曲線なることを示した。

第 14 図 紫外外部吸収曲線

血清学的研究

Black and Brakke は wound tumor virus を分画遠心分離とショ糖溶液による density gradient column 中で電気泳動を行なつて純化することに成功し

た。そしてこの精製ウイルスを Adjuvant と混合して家兎に注射して抗血清を得たことを報告している⁸⁾。

著者は部分的精製イネ萎縮病ウイルスと Adjuvant とを混合して家兎に注射し、抗血清を得んとしてこの研究を行なつた。

実験 1. 罹病イネ葉を用いて、第 15 図のごとく精製を行なつた。

第 15 図 分画遠心分離

この最後に得られた上清に同量の Adjuvant を混合して、家兎の後肢の筋肉内に注射した。注射後 3 週および 5 週目に 1 部採血を行なつて、力価検定を行なつた。その結果は第 11 表および第 12 表に示すとおりである。

この結果によると、注射後 3 週目の血清は 1/512 まで、5 週目の血清は 1/1024 まで沈降反応を示した。

実験 2. 前実験同様にして得た部分的精製ウイルス液と Bact Adjuvant を混合して前実験に用いた家

第 11 表 沈降反応 (3 週目採血)

抗血清終末 稀釈倍数	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	対照
罹病イネ汁液	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
健全イネ汁液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

抗原稀釈倍数：5 倍

第 12 表 沈降反応 (5 週目採血)

抗血清終末 稀釈倍数	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	対照
罹病イネ汁液	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—
健全イネ汁液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

抗原稀釈倍数：5 倍

第 13 表 沈 降 反 応

抗血清終末 稀釈倍数	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	対照
罹病イネ汁液	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
健全イネ汁液	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—

抗原稀釈倍数：5 倍

兎に注射した。この注射後、3 週目に 1 部採血を行なつて力価検定を試みた。その結果は第 13 表に示すとおりである。

この結果によれば、罹病イネ汁液に対しては 1/4096 まで反応を示したが、健全イネ汁液には反応がなかった。これによつて、かなり力価の高い抗血清を得られることがわかつた。

鶏卵培養試験

Murphy and Ross は鶏卵胚に腫瘍組織を培養する方法を案出した¹¹⁾。すなわち鶏に生ずる肉腫組織を発育鶏卵の漿尿膜に移植して培養することを企て、初めてこれに成功したのである。

その後 Woodruff and Goodpasture は fowl pox のウイルスを発育鶏卵の漿尿膜に培養した¹⁰⁾。これがウイルスの鶏卵培養の最初の報告である。それ以後この方法は種々改良されて、種々の病原体の培養に用いられ、多くの動物ウイルスはこの方法で培養できることがわかつた。

また Burnet らは漿尿膜以外の部分に培養する方法を発見した⁴⁾。

植物ウイルスにおいては、Takahashi がこの方法を用いてタバコモザイク病ウイルスを漿尿膜に接種して培養を試みたが不成功に終つた¹³⁾。また鮎沢らはカイコ膿病ウイルスを発育鶏卵で培養を試みたが成功しなかつた¹²⁾。

著者はイネ萎縮病ウイルスをこの方法で培養しようと試みた。

実験材料および方法：鶏卵培養には白色レグホンの受精卵を使用した。孵卵器は菌類培養用恒温器を用い、孵化温度は 37～38℃ で湿度の調節のために径 12 cm のシャーレのふたに水を入れて恒温器の最下段に置いた。卵は 1 般に行なわれているように気室部を斜め上にした位置に保ち、1 日に 2～3 回転卵を行なつた。孵化後、4 日および 8 日目に検卵して無精卵および発育停止卵を除去し、孵化後 11 日目に漿尿膜に接種を行なつた。接種法は一般に行なわれている方法によつた。

接種源は保毒虫を磨砕し、軽く遠心分離を行なつた上清を用いた。接種源には 1 ml につき水溶性ペニシリン 1,000 単位を加えて微生物の繁殖を防ぎ、0.1 ml づつ接種した。

接種後 7 日目に開卵して漿尿膜を取り出し、生理食塩水で 2～3 回洗い、変化があるか否かを観察した後、この膜を磨砕して、生理食塩水で稀釈し、遠心分離を行なつて、上清をとり、無毒虫に注射して、この液が感染力を有するか否かを調べた。

実験 保毒虫を磨砕し、1:50 に稀釈し、10,000 rpm 30 分、遠心分離を行ないその上清を 0.1 ml づつ発育鶏卵に接種した。そして接種後 6～7 日目に開卵し、漿尿膜を取り出し、磨砕して 1:10 に生理食塩水で稀釈して、軽く遠心分離を行ない、その上清を無毒虫に注射した。その結果は第 14 表に示すとおりである。

第 14 表 鶏卵培養試験

実験 番号	孵化鶏 卵 数	開卵時生 育 卵 数	注射虫数	20 日 以上 生存虫数	感染虫数
I	10	8	68	39	0
II	20	4	53	17	0
III	20	9	30	2	0
IV	20	4	50	26	0

以上のごとく、25 個の発育鶏卵から漿尿膜をとり出して、その抽出液を 201 頭のヨコバイに注射したが 1 頭も感染しなかつた。

考 察

ヨコバイやウンカによつて媒介される植物ウイルスのうちで、精製され、形態が観察されたウイルスは少ない。著者は超遠心機を用いて、分画遠心分離によつてイネ萎縮病ウイルスの精製を試みたがある程度の純化に成功した。この部分的精製液を電子顕微鏡で観察した結果、60～80 mμ の球形あるいは高角形粒子が見られた⁷⁾。またこれと同じ粒子が保毒虫および罹病イネの組織の超薄切片の中に観察された。しかし分画遠沈を反覆しても試料が十分純化されず、活性が低下するのでさらに純度を高めるために、硫酸クロロホル

ムなどを用い前処理を行なうことが必要である。

吉井らは萎縮イネの組織から Kirby 法によつて核酸を抽出し、これを用いて無毒虫を感染させ、この抽出液が感染力を有することを報告した¹⁴⁾¹⁵⁾。著者は Schramm らと類似の方法を用いて、部分的精製ウイルス液から核酸の抽出を試み、1 M食塩で沈殿させて得た試料には感染力が有つたが、アルコール沈殿で得た試料には感染力がなかつた。紫外部吸収曲線を見るに、アルコール沈殿によつて得た試料は食塩沈殿のものより不純物がよく除かれているようである。

江崎らは罹病磨碎汁液をろ過器を用いて精製した試料を抗原として家兎に注射して抗血清を得ている⁹⁾。この血清は健全イネ汁液とは反応しなかつたそうであるが、力価が低いものであつた。著者は分画遠心による部分的精製液を Adjuvant と混合して家兎に注射した結果、高力価の抗血清を得た。これによつて汁液内のウイルスを容易に検出することができるので、このウイルスの研究を進める上において今後重要な役割を演ずるものと考えられる。

摘 要

1. イネ萎縮病ウイルスは 10,000 rpm 30 分での遠心力では少し沈殿するが、5,000 rpm 30 分では沈殿しなかつた。保毒虫および罹病イネ磨碎汁液中のウイルス粒子は 20,000 rpm 120 分で沈殿した。このウイルス粒子の M/30 リン酸緩衝液中の沈降定数は 405×10^{-13} sec であつた。

2. 部分的精製ウイルス液からフェノール法で、核酸の抽出を試みた。抽出液を食塩で沈殿させた試料は感染力を有し、その紫外部吸収曲線は 270 m μ に peak を示した。抽出液をアルコールで沈殿させたものは感染力がなく、その紫外部吸収曲線は 258 m μ に peak があつた。

3. 部分的精製ウイルス液に Bact-Adjuvant を混じて家兎に注射したところ、終末稀釈倍数 1/4096 の力価を有する抗血清が得られた。

4. このウイルスは発育鶏卵の漿尿膜上に培養出来

なかつた。

(1962. 3. 3 受理)

引用文献

- 1) 鮎沢啓夫 (1957). ウイルス 7 : 450.
- 2) ———・長楽勇・阿部文子 (1957). 蚕糸研究 20 : 71~72.
- 3) Black, L. M. and Brakke, M. K. (1954). Phytopath. 44 : 482.
- 4) Burnet, F. M. (1934). Brit. J. Exp. Path. 15 : 52~55.
- 5) 江崎悌三・鮫島徳造 (1938). 農林省委託浮塵子駆除予防試験報告 9 : 23~29.
- 6) Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. and Williams, R. C. (1957). Biochem. Biophys. Acta 25 : 87~96.
- 7) Fukushi, T., Shikata, E., Kimura, I. and Nemoto, M. (1960). Proc. Japan Acad. 36 : 352~357.
- 8) Gierer, A. und Schramm, G. (1956). Z. Naturforsch. 11 b : 138~142.
- 9) Gierer, A. und Schramm, G. (1956). Nature 177 : 702~703.
- 10) Kirby, K. S. (1956). Biochem. J. 64 : 405~408.
- 11) Murphy, J. B. and Ross, P. (1912). J. exper. Med. 15 : 119.
- 12) 渡辺格・川出由己 (1956). 超遠心機とそれによる蛋白質およびウイルスの研究 (佐々木重雄編), 東京, 163~171.
- 13) Takahashi, W. N. (1940). Phytopath. 30 : 184~185.
- 14) 吉井啓・木曾皓・宮内修三 (1959). 日植病報 25 : 52.
- 15) Yoshii, H. and Kiso, A. (1960). Virus 9 : 582~589.
- 16) Woodruff, A. M. and Goodpasture, E. W. (1931). Amer. J. Path. 7 : 209~222.

Summary

1. When extracts from leaves of diseased rice plants or from viruliferous leafhoppers were centrifuged at 10,000 rpm for 30 minutes the virus was slightly precipitated, but it was completely precipitated by centrifugation at 20,000 rpm for 120 minutes. Partially purified preparations of the virus were secured by two cycles of alternate low and high speed centrifugations. The sedimentation constant of the virus particle in M/30 phosphate buffer was determined to be 405×10^{-18} sec.

2. Nucleic acid extracted from partially purified virus preparations with water saturated phenol and sedimented with NaCl was found to be infective, when injected into the abdomen of non-viruliferous leafhoppers, but the preparations sedimented with ethanol were devoid of infectivity.

3. When rabbits were injected intramuscularly with an emulsion of partially purified antigen in Freund's adjuvant, a high titer antiserum was obtained.

4. The virus could not be cultivated on the chorioallantoic membrane of developing chick embryo.

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

新 刊 紹 介

明日山秀文・向 秀夫・鈴木直治 編集：
植物病理実験法，A 5 判，843 頁，日本植
物防疫協会，1,500 円，1962.

植物病理学の最近の進歩は，菌学や植物生理生態学，あるいは植物解剖学などの古典的な技術はもちろん，生理学，生物化学，生物物理化学など，多方面にわたる広い知識と新しい技術とをとくに要求している。かつ実験科学においては，実験方法の適否がその研究の成否を大きく支配するものであるから，この意味においても植物病理学に関する実験方法のよい指導書を求める声は強かつた。

本書はこの要望にこたえる意味で編集されたものと思われ，全編を 19 章に分けて，実験に必要なあらゆる事項を一応とりあげて説明しようと苦心しており，全頁 800 頁に及ぶぼう大なものである。すなわち，まず病理学に必要な実験器具や施設を解説し，ついで顕微鏡の取り扱い方，とくに位相差顕微鏡，偏光顕微鏡，紫外線顕微鏡など新しい顕微鏡について説明を試みている。さらに病原体の培養法，およびその培地，病原菌の分離培養の技術，環境条

件の測定法およびその調節法などを説明し，殺菌剤の効力検定方法，疾病防除の試験方法に及んでいる。そのほか植物の解剖技術，組織化学に関する実験方法，病原菌の代謝生理，寄生の病態生理，細胞の生理化学に関する諸実験方法，病原菌の生産する代謝毒素に関する実験方法などについても説明を試み，血清反応，ウイルス実験法，電子顕微鏡技術などにも言及している。

以上のように，実験に必要な事項をすべて取りあげようとつとめた結果，実験方法というよりは，むしろ現象の説明に終わっているような点も少なくないが，いずれにしても本書 1 冊あれば，植物病理に関する実験法は一応わかるので，きわめて利用価値の高い良書ということができよう。しかし，しいて難をいえば，植物病理学の領域において今後もつとも必要を感じ，また発達するであろう病態生理学や生理化学に関する分野について，新しい実験方法の紹介がやや少ないように思われることである。本書が永く植物病理実験の指導書として利用されるためには，是非この点の補足が望ましい。（赤井重恭）