

几种鱼类细胞对草鱼呼肠孤病毒 敏感性的研究

邓初夏 杨兴棋 陈宏溪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

比较研究了鲫鱼异倍体细胞系(CAB-80)、团头鲂尾鳍细胞系(BCC)、大鱗副泥鰌雌核发育单倍体胚胎细胞系(PHG)、草鱼胚胎细胞系(GCE)、草鱼尾鳍细胞系(GCRF-2)、草鱼肾细胞系(GCK-84)及其四个克隆对草鱼呼肠孤病毒(GCRV)的敏感性。证实了这些细胞(PHG除外)在不同程度上对GCRV敏感,其中以GCK-84的敏感性最强。这表明,在体外培养条件下,GCRV并无严格的种族特异性。用经GCK-84传代的病毒感染草鱼种,能复制出典型的出血症状。用GCK-84检测了病毒在GCK-84、GCRF-2、CAB-80、BCC和PHG中的滴度(TCID_{50/ml}),其值分别为8.24, 7.36, 2.90, 2.15和1.33。4个克隆与肾细胞系对病毒的敏感程度亦不尽相同,其滴度在6.3到9.32之间变化。上述结果对细胞工程抗病育种预示有较大的潜在意义。

在电镜下可见GCRV对被感染的细胞造成了严重的破坏。病毒为平均直径58nm的球形颗粒,具有一个高度电子密度的核心,平均直径约为38nm。病毒在细胞中的分布方式有三种:即散布于细胞质中的、呈晶格状包于一膜状结构中的和整齐或不整齐地聚集在一起但无膜包裹的。

草鱼出血病是草鱼稚、幼鱼阶段危害最大的一种传染性疾病,发病季节长,死亡率高,对养鱼事业造成严重威胁。现已证实草鱼呼肠孤病毒(Reovirus of grass carp, GCRV)是草鱼出血病的病原,对其分离、提纯和鉴定,已有较详细的研究^[4,5,9]。目前已知GCRV能感染草鱼肌肉、卵巢和尾鳍单层细胞^[1]。草鱼肾脏组织细胞系(CIK)草鱼吻端组织细胞系^[9](ZC-7901)和鲫鱼异倍体细胞系(CAB-80)对该病毒的敏感性,亦有一些初步报道^[7,10]。但是迄今未见有关GCRV能通过细胞繁殖传代而增强毒力及其在细胞内增殖过程的详细资料。就多种鱼类细胞对GCRV敏感性的深入研究,不仅能为病毒分离和疫苗制备奠定物质和技术基础,而且对于抗病育种亦具有实用意义。

我们从1983年开始,对GCRV在草鱼肾脏组织培养细胞内的增殖过程及其宿主细胞

1) 杨广智等, 1983。浙江水产所草鱼出血病鉴定会材料。

1985年1月21日收到。

的种族特异性进行了初步研究,以期在细胞水平上获得有细胞工程育种价值的材料。

材 料 和 方 法

1. 细胞和培养液

细胞 草鱼尾鳍细胞系 (GCTF-2), 团头鲂尾鳍细胞系 (BCC)、大鳞副泥鳅胚胎细胞系 (PHG) 和鲫鱼异倍体细胞系 (CAB-80) 均由本研究室提供¹⁾。草鱼胚胎细胞系 (GCE) 和草鱼肾细胞系 (GCK-84) 及其克隆²⁾由作者培养和分离。

培养液 上述几种细胞均用 TC-199 培养液 (Difco Laboratories, USA) 培养。培养液含 10% 小牛血清和 100I. U./ml 青霉素, 100ug/ml 链霉素, 50I. U./ml 卡那霉素。培养温度为 27°C。

2. 病毒悬液

以典型出血病症状的草鱼病灶组织制备的病毒悬液, 由本所鱼病研究室病毒组提供。

3. 病毒对细胞传代感染

病毒对细胞感染 用维持液(含 2—5% 小牛血清的 TC-199 培养液) 将病毒悬液稀释成 10^{-3} , 作为毒液, 从传代 3 天左右的单层细胞培养瓶中吸出培养液, 加入毒液, 吸附 60 分钟后, 除去毒液, 加入维持液。置 27°C 培养。同时设立不加毒液的细胞培养瓶作为对照。

病毒在细胞内传代 从病毒感染细胞的培养瓶中, 收集产生明显细胞病变效应 (CPE) 的培养液, 用维持液将其稀释 10 倍, 加入待感染细胞。当细胞出现 CPE 时, 再收集其培养液, 重复传代感染。

4. 病毒对草鱼感染

用作感染试验的材料鱼, 取自本所试验场。材料鱼的规格为 10 厘米左右。试验前, 先在室内水泥池中暂养两周, 证实确系健康鱼后, 按常规方法^[1]进行注射感染。

5. 半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 测定

用维持液将传代扩增后的病毒悬液, 稀释成 10^{-1} — 10^{-2} 的连续梯度, 加入 2—3 天前接种于 96 孔板中的细胞上, 每个梯度作 6—8 孔。同时设立对照组。吸附 60 分钟后, 除去毒液, 加入 0.1 毫升维持液。置 27°C 培养。约经 8 天后, 对照组细胞开始老化, 即停止实验。在倒置显微镜下计算出现 CPE 的孔数, 测定 TCID₅₀ 值^[6], 即为病毒滴度。以此滴度高低作为判断细胞敏感性强弱的依据。

6. 电镜观察³⁾

取经病毒感染后具明显 CPE 的细胞, 用戊二醛和四氧化锇双固定, 酒精系列脱水, 苯二甲酸二丙稀酯包埋, 制备超薄切片, 在电镜下观察和拍片。

1) 魏彦章同志提供 GCTF-2 细胞系, 阎康同志提供 BCC 细胞系, 刘汉勤同志提供 PHG 细胞系, 陈敏容同志提供 CAB-80 细胞系, 特此致谢。

2) 草鱼肾细胞系 (GCK-84) 的建立及其克隆分离方法, 将另文报告。

3) 由本所电镜室制片和观察, 武汉大学测试中心协助拍照, 特此致谢。

试验与结果

1. 病毒在细胞内的传代感染

GCRV 感染草鱼肾细胞系 (GCK-84) 之后, 感染率随感染代数的增加而增加(表 1)。

表 1 GCRV 对 GCK-84 的传代感染

Tab. 1 Transferring of GCRV in GCK-84 cells

感染代数 ¹⁾	感染细胞瓶数 (a) ²⁾	出现 CPE 瓶数 (b) ³⁾	感染率 (b/a, %) ⁴⁾	对照感染率 ⁵⁾
1	46	23	50	0/8
2	26	17	65	0/5
3	10	8	80	0/1
4	7	7	100	—
5	9	9	100	—
6	10	10	100	0/1
7	8	8	100	0/3
8	10	10	100	0/7
9	3	3	100	0/1

1) Passages of GCRV in GCK-84 cells; 2) No. total infected flasks; 3) No. flasks with detectable CPE; 4) Infection rate; 5) Infection rate of control

当作第一代感染时, 8 次重复实验中, 有 4 次完全未出现 CPE, 其余 4 次出现 CPE 的程度亦有差异, 症状也不十分明显。在此后的传代感染中, 症状逐渐明显和稳定, 感染率愈益增高。从第 4 代起, 感染率为 100%。当传至 20 余代之后, 感染率仍为 100%。以此证实 GCRV 能在 GCK-84 细胞中增殖和传代, 表明 GCK-84 细胞系对 GCRV 具有明显的敏感性。

2. 细胞病变效应 (CPE)

为要详细了解 CPE 的发生过程, 我们取 39 代的 GCK-84 细胞, 用在细胞内传至 4 代的病毒, 稀释成 10^{-1} 进行感染, 在倒置显微镜下作连续观察。感染后 24 小时内, 细胞无明显变化。36 小时左右, 可见细胞内颗粒明显增多, 色泽变暗, 出现细胞间隙和小空洞, 有些细胞变圆、膨大、中空呈破环形或弯月形(图版 I:1)。56 小时左右, 细胞大量离壁, 形成明显空斑; 72 小时左右, 空斑进一步扩大, 占培养面积 1/2 左右(图版 I:2)。100 小时左右, 贴附在瓶壁的细胞呈稀网状, 经固定和姬姆萨染色后, 能见细胞内含有一些染色较深的颗粒, 可能是包涵体(图版 I:3)。对照组的细胞则完好无损(图版 I:4)。

3. 感染试验

用经细胞传代的病毒感染试验鱼, 能复制出典型的草鱼出血病症状。三次感染试验的平均死亡率为 71.4%。对照组未死(表 2)。说明能使细胞产生 CPE 的 GCRV, 就是导致草鱼产生出血病的病原。

4. GCRV 对细胞克隆的感染

用 GCRV 感染细胞克隆, 筛选出对病毒较敏感或较不敏感的克隆, 以寻求在细胞工程上有价值的标准系列工具。取 30 代的 GCK-84 细胞进行克隆培养。将获得的 44 个克

表2 GCRV对草鱼感染试验

Tab. 2. Injection experiments of GCRV to grass carp fingerlings

实验组别 ¹⁾	病毒代数 ²⁾	病毒浓度 ³⁾	注射量 ⁴⁾ (ml/尾)	感染死活比例 ⁵⁾	对照死活比例 ⁶⁾
I	3	10 [°]	0.5	4/4	/
II	5	10 [°]	0.5	3/7	0/7
III	9	10 [°]	0.5	5/7	0/7

1) Groups of experiments; 2) Generations of GCRV; 3) Concentrations of GCRV; 4) Injection dose;
5) Death rate of injected fishes; 6) Death rate of control

隆复制品,在96孔板上进行感染。观测到各克隆显现CPE的时间有明显的差异,最快的为2天左右,慢的需3—4天,最慢的则为7天左右。从复制板上对应孔中选择性地传出几个克隆,与GCK-84一起测定TCID₅₀值。分离出的4个克隆均不如肾细胞系敏感。现按TCID₅₀值大小排列如下: GCK-84: 9.32, GCK84-E: 8.7, GCK84-D: 7.3, GCK84-F: 6.4, GCK84-C: 6.3。

5. 病毒-宿主细胞的种族特异性

取在细胞内传至9代的GCRV稀释至10⁻²,感染GCE, GCK-84, GCTF-2, CAB-80, BCC和PHG等6种细胞。前三种细胞(草鱼细胞)均有明显的CPE,而后三种细胞(鲫鱼、团头鲂和泥鳅细胞)均不产生CPE。于是对后三种细胞进行盲传,当传至2代时,CAB-80和BCC细胞出现了轻微CPE。传至第三代时,CAB-80细胞出现明显空斑,BCC细胞则见有膨胀、弯曲和裂解现象。从出现CPE的时间来看,草鱼细胞一般为2—3天,鲫鱼和团头鲂细胞则要5—7天,而泥鳅细胞一直未观察到CPE。据此说明,在体外培养条件下,GCRV对宿主并无严格的种族特异性。

为了进一步验证这几种细胞对GCRV敏感性的差异,在作盲传观察CPE试验的同时,又对其作了病毒滴度的比较测定。取传至9代的GCRV分别感染GCK-84, GCRF-2, CAB-80, BCC, PHG5种细胞,1小时后,除去毒液,用PBS(一)洗2次,分别于感染后和培养4天后,置-70℃冻存。用GCK-84来检测病毒在这5种细胞内的增殖情况。当预先接种于96孔板的GCK-84细胞长成致密单层时,将在-70℃冻存的病毒细胞培养物取出,冻融2次,稀释成连续梯度,加入96孔板的细胞内,测定病毒滴度(TCID₅₀)。培养4天的病毒在GCK-84中滴度最高,为8.24,在PHG中的滴度基本未增加,在CAB-80和BCC中的滴度均比草鱼细胞中的低,分别为2.90和2.15。从而定量地表明了这几种不同鱼类细胞系对GCRV敏感性的差异,且其结果与这几种细胞产生CPE的情况是相吻合的(表3)。

6. 电镜观察

为了确证GCK-84细胞被GCRV感染后,产生病变及病毒在细胞内的增殖过程,用经10⁻¹GCRV感染约72小时后的GCK-84细胞作超薄切片,在电镜下观察,可见大多数细胞均产生了程度不同的病变,细胞膜和内质网变形,胞质出现空洞,线粒体膨大,核膜内层加厚,核周腔变宽等(图版I:5;图版II:7—12)。

病毒粒子在细胞内的分布方式主要有:①散布于胞质内(图版II:7);②成团聚集于膜状结构内,膜的层次多少不等,少的1—2层(图版II:9, 12),有的5—6层(图版II:10)、

表3 GCRV 在5种鱼类细胞系中的滴度
Tab. 3 Titres of GCRV in five fish cell lines

细胞系 ¹⁾	培养时间(天) ²⁾	TCID _{50/ml}
GCK-84	0	2.16
	4	8.24
GCTF-2	0	2.36
	4	7.36
CAB-80	0	0.67
	4	2.90
BCC	0	1.15
	4	2.15
PHG	0	1.09
	4	1.33

1) Cell line; 2) Days of incubation

多的8—9层(图版II:8)。③成团聚集于胞质中,但无膜状结构包裹(图版II:11)。图版II:11显示了一团无膜包裹的病毒发生基质,其内大部分病毒的核心部分直径为 $367 \pm 20 \text{ \AA}$ 。

图版II:12也显示了一团病毒发生基质,但发育时期较图版II:11中所示病毒晚些。图中大部分病毒已包装好蛋白质外壳。图版II:10示大部分病毒已完成包装,但仍有一些空壳和无外壳的核心,能见到大小不等的几种病毒粒子。一种粒子直径为 $575 \pm 18 \text{ \AA}$,外包衣壳,衣壳上规则排列着若干子粒,此乃完整的病毒结构。另一种粒子较小,核心直径仅为 $414 \pm 13 \text{ \AA}$ 。还有一些大小不等的空壳,小的可能是由于机械切片造成的,当一刀从球形样品边缘切割时,就会出现比球直径小的环。病毒在尚未完全形成晶格状排列时,出现一些大小稍不相等的小空壳是不足为奇的;大的空壳也许是未包装病毒核酸的蛋白质外壳。在图II:9中,可见病毒呈晶格状排列,大小基本一致,形态整齐,直径为 $572 \pm 15 \text{ \AA}$,核心直径为 $381 \pm 19 \text{ \AA}$ 。图版I:6则示刚从细胞中释放出来的病毒粒子。

讨 论

当用病鱼组织提取液对细胞作第一代感染时,感染率只有50%,病变现象也不明显,传至4代时,病变趋于稳定,感染率达100%,且在传至20余代之后,其病变效应仍稳定不衰。这种现象可能是由于在体外培养条件下,病毒与宿主之间,在开始时尚未建立起某种适应关系,故病毒毒力弱。经传代后,病毒-宿主关系逐渐加强,病变也就愈益明显。对此观点可从GCK-84中传至9代的病毒感染CAB-80和BCC的试验得到证实。用这种病毒对两种细胞作第一代感染时,亦未出现CPE,而经过盲传2代,CPE渐趋明显。有人曾报道,一种引起流行性腹泻的病毒,在经过盲传5代后才出现不典型细胞病变^[8]。这就进一步证实了作者的上述看法。病毒通过在细胞内传代而增强毒力的事实,不仅说明病毒能在肾细胞系内增殖,而且对研究鱼类病毒学及鱼类病毒病的防病免疫,提供了有力的

技术手段。至于病毒与宿主细胞适应性增强的机理，尚待进一步研究。

从 Wolf 等 (1980)^[13] 关于鱼类细胞系与病毒的综述中可看出，一种鱼类细胞系对几种病毒具有敏感性，或反过来，一种病毒能感染几种细胞系的现象较为普遍。 Winton 等 (1981)^[12] 从大麻哈鱼 (Chum Salmon) 中分离到的一种呼肠孤病毒在几种大麻哈鱼细胞系中滴度最高，而且它也能不同程度地感染其它鱼的培养细胞。本文也对这种现象作了研究。在成体水平上，GCRV 能感染草鱼和青鱼，但不能感染团头鲂^[13]。在细胞水平上，尽管该病毒在草鱼的几种细胞中滴度较高，但仍能在鲫鱼和团头鲂细胞中增殖，并在盲传 2 代后产生 CPE，这充分说明 GCRV 在细胞水平上的宿主特异性不如在成体水平强。至于 GCRV 不能感染 PHG 这一事实，其机理有待进一步研究。在草鱼的几种细胞系中，GCK-84 对 GCRV 的敏感性最强(滴度最高)，这在细胞水平上证实了草鱼肾脏为 GCRV 的靶器官。这可能是由于宿主细胞膜上病毒受体蛋白结构的不同而形成的。同时表明 GCK-84 可用作检测病毒-宿主关系的工具。当然，尚应研究其免疫血清中和反应的变化。

GCRV 对细胞克隆的感染试验结果表明，分离出的 4 个克隆的敏感性虽不如肾细胞系，但若用 GCRV 对克隆进行连续传代感染，也许会增强克隆的敏感性。诸克隆对病毒的敏感性存在着差异这一事实预示着用克隆来研究病毒，或用病毒来筛选特殊需要的克隆，对于细胞工程育种学具有较大的潜在意义。

关于呼肠孤病毒在鱼类细胞中的增殖过程，目前尚无较详细的报道。在感染哺乳类的呼肠孤病毒中 Silverstein 和 Dales (1968)^[11] 报道了 3 型呼肠孤病毒 (Reovirus Type 3) 对 L 细胞感染及在其内增殖的过程。他们认为该病毒是被细胞通过一种吞噬过程摄入的，然后吞噬泡与溶酶体融合形成吞噬体。在吞噬体中，病毒在溶酶体水解酶的作用下，脱下外层衣壳，形成亚病毒粒子 (Subviral Particle)。当主要的外壳蛋白 σ_3 被脱去后，病毒就被激活，从而开始 RNA 的转录和翻译，并在核周围的胞质“工厂”中完成病毒粒子的装配。从电镜图片中，也能见到 GCRV 在核附近增殖的情况 (图版 I:1, 5)，但并不都是如此。此外，在图 II:2—4, 6 中，可见到一种膜层结构，将病毒包于其中。我们在未被病毒感染的细胞中也见到了类似的膜层结构，故认为：这种膜层结构不是病毒本身的结构，而可能是溶酶体。并且从图 II:12 中可见，在病毒发生的较早阶段，这种膜就已经存在了，表明该病毒也可能和哺乳类中的呼肠孤病毒一样，是通过一种吞噬过程进入宿主的。如这个膜结构在病毒发生过程中被破坏了，就会产生图 II:7, 11 中所示的情况。

关于引起草鱼出血病的病原是一种病毒还是多种病毒尚在研究之中。有人报道了在病鱼肾组织切片中见到一种大粒子 (直径 600—780 Å) 和一种无外壳的小粒子 (直径为 460—600 Å)^[2]。另有人报道了在草鱼肾培养细胞切片中见到一种大粒子 (直径 600—700 Å) 和一种无外壳的小粒子 (直径 300—400 Å)^[3]。他们推测这些不同的颗粒可能是处于病毒粒子成熟过程的不同阶段。本研究亦见到大小两种粒子，大的直径为 $575 \pm 18 \text{ Å}$ ，小的无外壳，直径为 $414 \pm 13 \text{ Å}$ ，且此两种粒子处于同一膜状结构内，小粒子的大小与大粒子的核心大小基本一致 (图 II:10)，同时在病毒刚开始发育的基质中还见到裸露的病毒粒子核心 (图 II:10)，这足以证实这两种粒子的确属于病毒粒子成熟过程的不同阶段。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院水生所第三室病毒组, 1978。草鱼出血病病原的研究。水生生物学集刊, 6(3): 321—330。
- [2] 中国科学院水生所第三室病毒学组等, 1980。草鱼出血病病原的研究 II. 电镜观察。水生生物学集刊, 7(1): 75—80。
- [3] 中国科学院武汉病毒所、中国水产科学研究院院长江水产所草鱼出血病研究协作组, 1983。草鱼出血病病毒的电子显微镜观察初报。淡水渔业, (3): 39。
- [4] ——, 1984。草鱼出血病病原——鱼呼肠孤病毒(FRV)核酸特性的研究。淡水渔业, (4): 7—9。
- [5] ——, 1984。草鱼出血病病毒精细结构的研究。淡水渔业, (2): 21—22。
- [6] 北京协和医院检验科主编, 1960。病毒实验诊断手册。25—30页。人民出版社。
- [7] 左文功等, 1984。草鱼肾脏组织细胞系CIK的建立(简报)。淡水渔业, (2): 38—39。
- [8] 吴克复, 1982。诊断病毒学的译后增补。引自何申等译, G. D. 华斯莱编《动物组织培养技术》。246页。科学出版社。
- [9] 陈燕新等, 1983。草鱼出血病病毒形态、结构及其理化特性的研究。科学通报, (18): 1138—1140。
- [10] 陈敏容等, 1985。鲫鱼异倍体细胞系的建立及其生物学特性。水产学报, 9(2): 121—130。
- [11] Silverstein, S. C. and S. Dales, 1968. in The Biology of Animal Viruses, Second Edition (F. Fenner et al.) p. 226—273. Academic Press, New York and London (1974).
- [12] Winton, J. R., 1981. Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan. *Fish Pathology*, 15 (4): 155—162.
- [13] Wolf Ken and J. A. Mann, 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In Vitro*. 16(2): 168—179.

SUSCEPTIBILITY TO GRASS CARP REOVIRUS (GCRV) OF SEVERAL FISH CELL LINES

Deng Chuxia Yang Xingqi and Chen Hongxi

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

The susceptibility to grass carp reovirus (GCRV) of CAB-80, BCC, PHG, GCE GCTF-2 and GCK-84 (these cell lines were derived from crucian carp blastula embryos, herbivorous bream caudal fins, loach haploid gastrula embryos, grass carp gastrula embryos, grass carp caudal fins and grass carp kidney, respectively), as well as four clones isolated from GCK-84, were analyzed comparatively. Sensitivity of various degrees was confirmed in the infected cell lines (except PHG) among which GCK-84 was the most sensitive. It is demonstrated that GCRV, *in vitro*, has no strict species specificity. Typical symptom of muscular hemorrhage could be replicated when fingerlings of grass carp were infected with the virus which had been propagated in GCK-84. The virus produced by GCK-84, GCRF-2, CAB-80, BCC and PHG was titrated in GCK-84 cells. The titers (TCID₅₀/ml) were 8.24, 7.36, 2.90, 2.15 and 1.33 respectively. Some difference was also observed in the four clones and GCK-84, with the titers ranging from 6.3 to 9.32. The results presented above predict the relative potential significance in the disease-resistant breeding of fish cell engineering.

Serious damages in GCRV-infected GCK-84 cells could be seen with electron microscopy. The observed virus was in the shape of spherical particles having a size of 58 nm in diameter and a core with high electronic density approximately 38 nm in diameter on the average. The distribution of virions in cells could be divided into three patterns: existing individually in cytoplasm, congregating in large crystalline aggregates bound by membranous structures, gathering together in an orderly or disorderly arrangement without a surrounding membrane.

Key words Susceptibility ,GCRV (grass carp reovirus), titre, clone

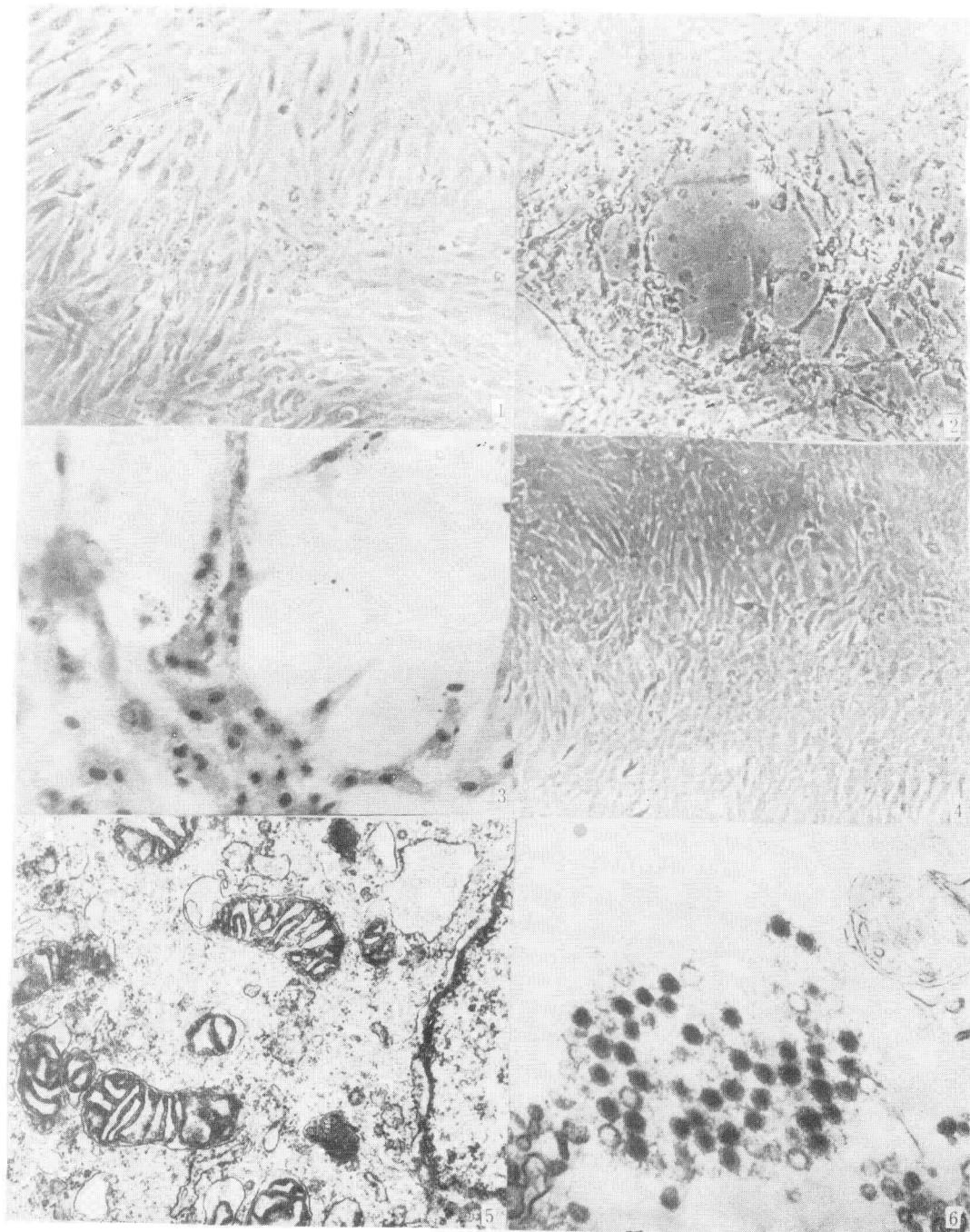


图 1—4 被 GCRV 感染后的 GCK-84 细胞。1.36 小时；2.72 小时；3.100 小时，姬姆萨染色，示包涵体；4.对照。图 5 被 GCRV 感染的 GCK-84 细胞的电镜切片，示细胞病变， $\times 26,480$ 。图 6 示刚释放出细胞的一团病毒。

Figs. 1—4 GCK-84 cells infected by GCRV 1. 36 hours; 2. 72 hours; 3. 100 hours, Giemsa stained showing inclusion bodies in cytoplasm; 4. Control Fig. 5 Electron microscopy of thin section of infected GCK-84 cells showing CPE, $\times 26,480$ Fig. 6 A flock of virions just having been released from infected cell

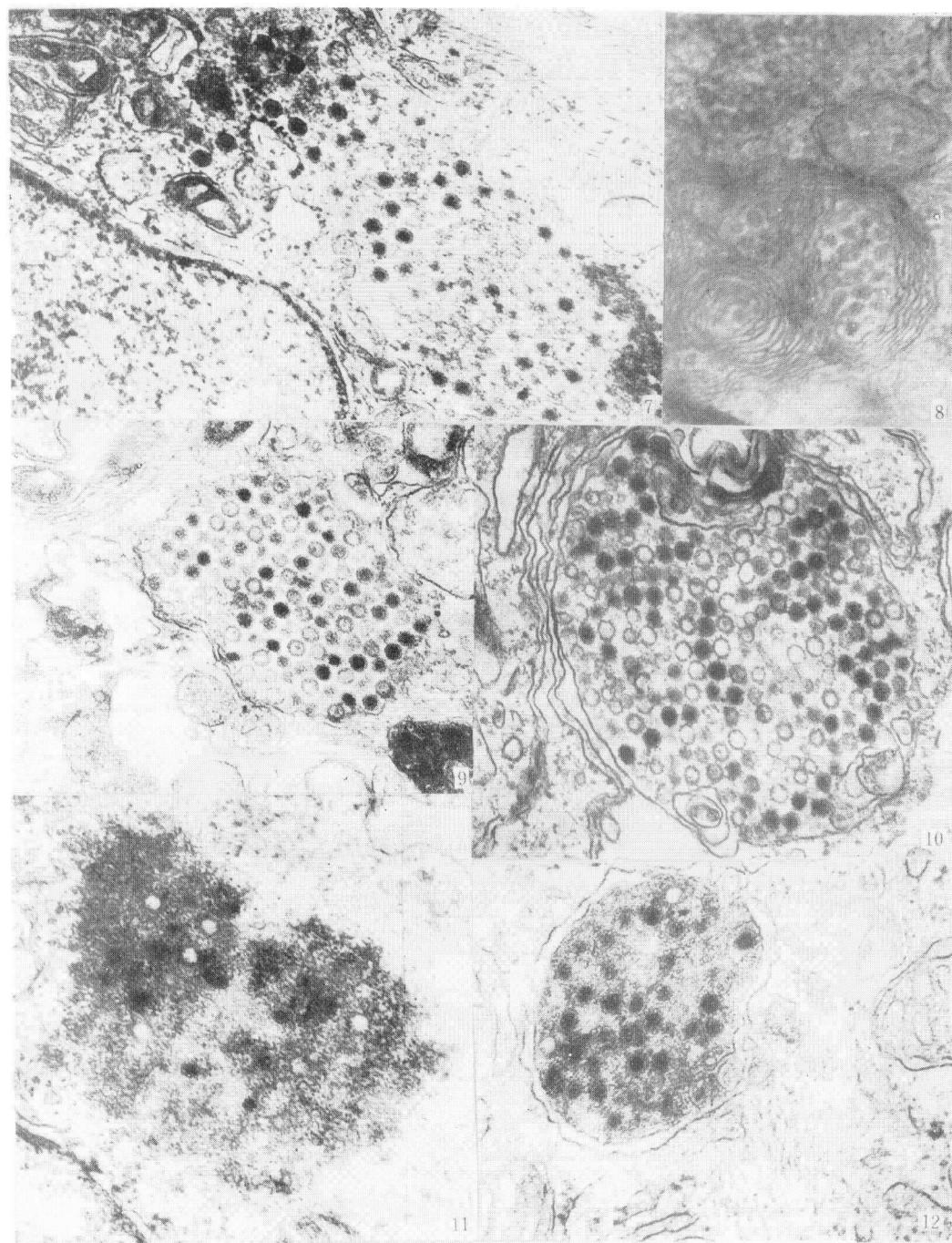


图 7—12 被 GCRV 感染后的 GCK-84 细胞的电镜切片。图 7 分散在细胞质内的病毒, $\times 50,000$ 。图 8 被 8—9 层膜包裹的病毒粒子, $\times 48,000$ 。图 9 晶状排列的病毒粒子, 外包 1—2 层膜, $\times 50,000$ 。图 10 聚集的病毒粒子, 外包 5—6 层膜状结构, $\times 54,000$ 。图 11 病毒发生基质, 其外无膜状结构包裹, $\times 70,000$ 。图 12 病毒发生基质, 其外包有 1—2 层膜状结构, $\times 70,000$ 。

Figs. 7—12 Electron microscopy of thin sections of infected GCK-84 cells. Fig. 7 Virions distributing individually in cytoplasm, $\times 50,000$. Fig. 8 Virions aggregate bound by a 8 or 9-layer membranous structure, $\times 48,000$. Fig. 9 Virions in crystalline aggregate bound by a 1 or 2-layer membranous structure, $\times 50,000$. Fig. 10 Virions gathering together bound by a 5 or 6-layer membranous structure, $\times 54,000$. Fig. 11 Virogenic stroma in early stage of assembly without surrounding membrane, $\times 70,000$. Fig. 12 Virogenic stroma surrounded by a 1 or 2-layer membranous structure, $\times 70,000$.