

nected with the sensitivity of these stages to the mutagenic action of formaldehyde itself. After injection of formaldehyde in highly mutagenic concentrations, using daily brood changes, peak sensitivity was observed in sperm sampled on the second and third day after treatment (unpublished work). Another possibility is that formaldehyde speeds up sperm utilization by killing, or otherwise inactivating spermatozoa.

The author wants to express his thankfulness to Dr. CHARLOTTE AUERBACH for reading the manuscript and to Dr. SHEILA COUNCE for correcting the English. He feels much indebted to Prof. Dr. J. J. Zoon who made the X-ray apparatus of his department available for this study. The technical assistance of Miss V. VAN DEN HUL is gratefully acknowledged. The investigation was supported in part by the Radiobiological Group of the Health Research Council T.N.O.

F. H. SOBELS

Institute of Genetics of the State University, Utrecht, Netherlands, May 17, 1956.

Zusammenfassung

Vor einer Röntgenbestrahlung, deren Dosis von 1700 bis 2200 r variierte, wurde *Drosophila*-Männchen Formalinlösung in schwacher, „submutagener“ Konzentration injiziert. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu den Kontrollen, welche nur bestrahlt wurden, die Mutationsrate nach Formalin-Vorbehandlung signifikant gesteigert war. Dabei wurden spätere Entwicklungsstadien der Spermatogenese erfasst als nach einer Vorbehandlung mit Zyanid, Azid und einem organischen Peroxid; bei reifen Spermatozoen liess sich jedoch keine Zunahme der Mutationsrate feststellen. Die Befunde weisen darauf hin, dass ein erhöhter Gehalt an organischen Peroxiden in den vorbehandelten Zellen die Chromosomen empfindlicher macht für die mutagene Wirkung der Röntgenbestrahlung.

La culture de cellules tumorales sur des explants d'organes *in vitro*

Des cellules tumorales peuvent-elles envahir des organes ou fragments d'organes embryonnaires explantés *in vitro*, comme elles colonisent les tissus de l'organisme entier? J'ai abordé ce problème au moyen de la technique de culture organotypique de WOLFF et HAFEN¹. Des fragments du sarcome de Souris S 180 ont été associés à des organes ou fragments d'organes embryonnaires de Poulet de 6 à 9 jours d'incubation. Les deux fragments se soudent intimement, comme le font des organes embryonnaires de Poulet et de Souris associés (WOLFF²).

Au contact d'explants de différents organes, les cellules tumorales prolifèrent activement. Elles peuvent entourer l'organe d'une sorte de cortex dont les cellules extérieures s'exfolient. Elles pénètrent en même temps à l'intérieur par des voies d'invasion qui empruntent généralement le stroma conjonctif. Elles se divisent activement dans les tissus de l'hôte et forment soit des nodules compacts, soit des traînées orientées qui propagent la tumeur à grande distance de son point d'entrée.

¹ ET. WOLFF et K. HAFEN, J. exp. Zool. 119, 381 (1952); Texas Rep. Biol. Med. 10, 463 (1952).

² ET. WOLFF, Bull. Soc. zool. Fr. 79, 357 (1954). – ET. WOLFF et J. P. WENIGER, J. Embr. exp. Morph. 2, 161 (1954).

Les organes qui se sont révélés les plus aptes à la prolifération tumorale (Fig. 1) sont le mesonephros, les gonades, le metanephros, le derme, le poumon, le périoste, les mésentères et les tuniques de l'intestin, la capsule et les cloisons du foie. Le mesonephros est particulièrement favo-

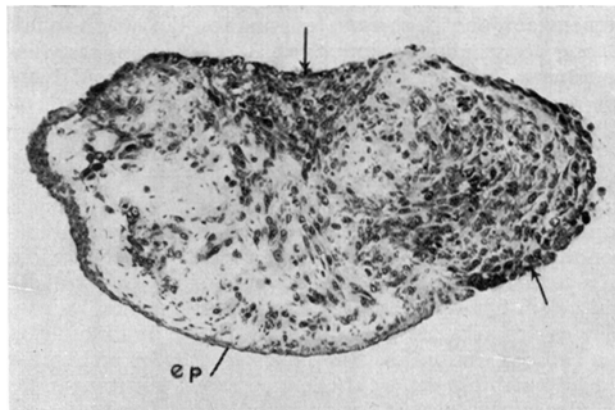


Fig. 1. Invasion de la paroi tégumentaire ventrale d'un embryon de Poulet, cultivée *in vitro*, par le sarcome S180 de Souris. Les cellules du sarcome peuvent être facilement distinguées grâce à leur taille et à leur coloration sombre. Elles envahissent pratiquement tout l'explant dont il ne subsiste localement que l'épiderme (ep.) et des cellules conjonctives éparses. (Les régions les plus riches en cellules tumorales sont indiquées par des flèches.) Grossissement $\times 122$.

nable à la prolifération des cellules tumorales qui s'infiltrant dans les espaces intertubulaires (Fig. 2) et entourent les canalicules urinaires qu'ils finissent par envahir, après dégénérescence de leurs cellules. Les cellules tumorales montrent un aspect de fibroblastes fuselés, lorsqu'elles sont en migration; un aspect ovoïde ou arrondi quand

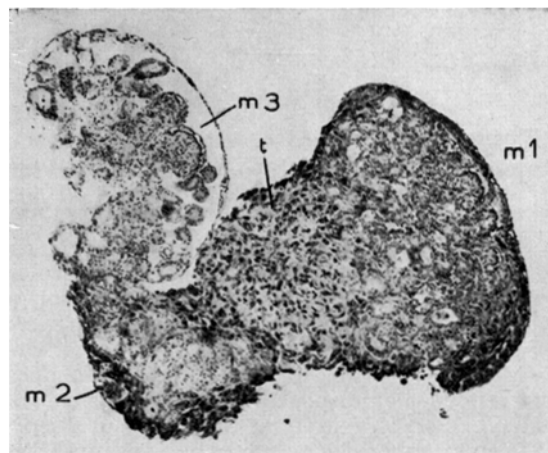


Fig. 2. Association d'un fragment de tumeur S180 de Souris avec plusieurs explants de mesonephros d'embryon de Poulet de 7 jours. L'explant tumoral se développe sur place au contact de deux des explants de mesonephros. L'invasion se fait par la périphérie des organes aussi bien que par leur face interne. Toutes les plages ou taches sombres sont des régions colonisées par des cellules tumorales. m1, m2: explants de mesonephros envahis par la tumeur. m3: explant encore intact. t: nodule tumoral développé aux dépens du fragment initial. Grossissement $\times 75$.

elles sont groupées en amas. Les mitoses sont nombreuses, souvent aberrantes. L'organe peut être complètement envahi en l'espace de 2 à 4 jours. On peut ainsi propager

la souche tumorale par repiquages successifs en culture d'organes.

Dans le cas des autres organes, les cellules tumorales se multiplient au contact de l'explant de Poulet, formant un amas compact; elles s'infiltrèrent dans les tissus suivant la direction des strates conjonctives ou des tuniques musculaires. Dans les organes qui présentent un cloisonnement conjonctif, comme les gonades, l'invasion se fait le long des travées conjonctives. A la faveur de ces voies de pénétration, les cellules tumorales envahissent bientôt tout l'organe, en particulier le cortex ovarien, où elles ont tendance à prendre la place des ovogonies.

Ces résultats montrent qu'on peut cultiver et propager des cellules tumorales sur des organes explantés *in vitro*. Cette méthode donne la possibilité d'étudier les conditions de l'invasion cancéreuse d'un organe, indépendamment de la circulation et de toute connexion. Elle permet d'aborder, dans des conditions de simplicité qui ne sont jamais réalisées dans un organisme, les problèmes des affinités, de la stimulation et de l'inhibition des cellules tumorales. Elle peut orienter les recherches sur la sensibilité différentielle à certaines substances des cellules cancéreuses et des tissus qu'elles parasitent.

E. WOLFF

Laboratoire d'Embryologie expérimentale, Collège de France, Paris, le 25 avril 1956.

Zusammenfassung

Setzt man in Organkulturen *in vitro* kleine Teilstücke eines S180-Maustumors mit embryonalen Organen des Huhnes zusammen, so wandern die tumoralen Zellen in die explantierten Organe über, bevölkern sie und vermehren sich aktiv.

Gewisse Organe wie Vorniere, Mesenterien, Darmwand, Kapsel der Leber, Haut, erweisen sich als besonders geeignet für die Einwanderung und die Vermehrung der tumoralen Zellen.

Tumor Necrosis After the Intra-Tumor Injection of Chemical Agents and Colloidal Radioisotopes

In laboratory and clinical investigations of the use of radioisotopes for the management of tumors, colloidal radioisotopes are injected directly into the tumor¹ with the objective of producing a maximum of tumor necrosis. In view of the increasing number of anti-tumor chemicals which have been successful in producing temporary clinical remission of neoplastic diseases², we have undertaken an exploratory study of the ability of a series of those agents to produce tumor necrosis after intra-tumor injection³.

Sarcoma 180 tumors were injected on the 8th day after transplantation⁴ to the axillary region of Swiss

¹ R. H. FLOCKS, H. D. KERR, H. B. ELKINS, and D. A. CULP, *J. Urol.* 71, 628 (1954).

² C. C. STOCK, in: *Advances in Cancer Research*, Vol. 2 (Greenstein and Haddow, Academic Press, Inc., New York 1954), p. 426.

³ Presented at the National Meeting of the American Association for the Advancement of Science, Berkeley, California, December 1954.

⁴ The original transplant material was donated by Dr. JOHN B. FIELD, Cancer Chemotherapy Laboratory, University of Southern California.

Sarcoma 180 Necrosis after Intra-Tumor Injection of Agents

Agent	mg per ml	Days	% Necrosis
methyl nitrogen mustard . . .	0.07	1	48 ± 3
methyl nitrogen mustard . . .	0.67	1	65 ± 4
methyl nitrogen mustard . . .	0.57	3	81 ± 9
β-naphthyl nitrogen mustard ⁵ .	50	3	90 ± 4
phenyl nitrogen mustard ⁶ . . .	50	3	62 ± 4
p-chlorophenyl nitrogen mustard	50	3	69 ± 5
triethylene melamine	0.40	1	68 ± 2
triethylene melamine	6.7	1	80 ± 4
triethylene melamine	0.67	3	79 ± 7
triethylene phosphoramidate . .	10	1	51 ± 2
triethylene phosphoramidate . .	10	3	85 ± 6
yttrium 90 fluoride	25 ^a	3	51 ± 7
chromic radiophosphate	5 ^a	3	5 ± 3
cortisone acetate	50	2	14 ± 3
hydrocortone	20	2	42 ± 6
testosterone propionate	25	2	31 ± 4
methyl testosterone	10	3	42 ± 7
diethylstilbestrol	10	3	55 ± 6
estiny estradiol	15	3	54 ± 5
aminopterin	3.3	2	20 ± 5
furadroxyl	67	2	38 ± 6
isoniazid	50	3	53 ± 6
p-aminosalicylate	67	2	4 ± 2
6-mercaptopurine	67	1	68 ± 2
6-mercaptopurine	83	3	84 ± 6
zinc peroxide	333	2	48 ± 5
p-menthane hydroperoxide . . .	b	1	64 ± 2
p-menthane hydroperoxide . . .	b	3	87 ± 4
colchicine	2.5	2	28 ± 4
urethane	67	1	69 ± 4
urethane	250	3	83 ± 5
myleran	0.8	1	20 ± 4
controls	saline	1	3 ± 2
controls	saline	3	3 ± 2

^a Radioisotope concentrations are in millicuries per ml of injectate.
^b 0.03 ml of liquid p-menthane hydroperoxide.

mice. The injectate was a freshly prepared solution or suspension of the agent in saline; each milliliter contained 50 mg of carbon black⁷ to mark the intratumor site of deposition. For each agent, 0.03 ml was injected aseptically into each of 5 tumors. After the agent had remained in the tumor for the number of days shown in the Table, the animals were sacrificed and the tumors excised. The tumors were fixed in dilute formalin, sliced to find the region of maximum deposition of carbon black, and hematoxylin and eosin slides of sections from this region were prepared.

The extent of gross tumor necrosis was then determined by microscopic examination, with the absence of stained cell nuclei as the criterion for gross necrosis. This criterion was selected because of the objectivity and relative ease of determining the per cent of the tissue area in which the nuclei did not stain. Inasmuch as there was some variation in size of the injected tumors (within the range from 1.0 to 1.5 cm), the per cent necrosis was calculated on the basis of the necrosis in the 1.0 cm circle centering on the site of maximum car-

⁵ Donated by: Dr. W. C. J. Ross, The Chester Beatty Research Institute, The Royal Cancer Hospital, London, S.W.3.

⁶ M. E. MORTON, *Nucleonics* 10, 92 (1952). – S. W. MAYER and M. E. MORTON, *Proceedings of the O.R.I.N.S. Conference on Rare Earths in Medicine* (1955) (in press).

⁷ Sterling MT grade, Godfrey L. Cabot, Inc., Boston 16, Massachusetts.