

制癌に関する実験的研究

第9報 異処的投与法による Bis (2-hydroxy-3, 5-dibromophenylazo)-n-propylphloroglucinol [Azo-106] の抗腫瘍性の検討*

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本 肇教授)

金沢大学結核研究所化学部(主任 越村三郎教授)

宮 地 民 子

(昭和34年8月18日受付)

* 本研究費の一部は文部省科学研究費癌総合研究の補助金によつた。

2, 2'-Dihydroxyazobenzene 系諸誘導体を指向した癌化学療法の実験的研究において、さきに平田¹⁾によつて Bis(2-hydroxy-3,5-dibromophenylazo)-n-propylphloroglucinol [Azo-106] がエールリッヒ腹水癌移植マウスに対し顕著な抗腫瘍性効果を呈する物質であることが見出され、次いで間もなく本物質は又吉田肉腫, サルコーマ 180²⁾ 及び白血病 SN 36³⁾ に対しても効果的であるという実証**がもたらされた。

ところで今、これら研究における実験方法について見ると、そのいずれにあつても腫瘍細胞を腹腔内移植した動物に対し被検物質の腹腔内投与を行なうという方式が適用されているのであるが、このことと、現在悪性腫瘍に対する実験化学療法研究の分野では決定的なスクリーニング法なるものがなく、効果判定の手段として各人により各様の方式が提案、採用されている状態で⁴⁻⁹⁾ あることに鑑みると、Azo-106 にあつても亦その制癌物質としての性格に関する諸他の実験方式による検討が要請されていることは申すまでもないところである。

即ち私は前記平田等の研究に続行し、ここに腫瘍細胞(エールリッヒ癌並びにサルコーマ 180)の移植箇所に対し Azo-106 の投与部位を異にせしめるという方式による吟味実験(即ち換言すれば Azo-106 には流血を介しての効果性があるか否かの考査)に着手し

たわけである。

以下その成績を報告する。

I. 腹水腫瘍における実験

吉田肉腫, エールリッヒ癌及びサルコーマ 180 等の腹水腫瘍細胞を腹腔内移植した動物に対し、移植24時間後から Azo-106 を直接腹腔内に投与するという方式の実験で、宿主動物における生命の著しき延長或いは完全治癒の成績が得られたことについては既に報告されたところである。

しからばかかる腫瘍移植動物に対し、Azo-106 を直接腹腔内に投与せずに、腫瘍細胞移植の場所とは無関係な遠隔の部位に投与したらばどうであろうか?

本問題に対する吟味検討の第一着手として、エールリッヒ癌及びサルコーマ 180 を対象とし、まずマウスに対しそれぞれの腫瘍細胞の腹腔内移植を行ない、次いで Azo-106 を皮下投与或いは経口投与して治療する実験を行なつた。

A. 腫瘍細胞の腹腔内移植マウスに対する Azo-106 皮下投与の治療実験

実験方法

1. 使用動物：体重 17~21g の純系マウス (ddN, ♂) を使用し、1 群10匹宛とし、10群を用意する。
2. Azo-106 溶液の調製：Azo-106 の 12.0 mg

** エールリッヒ腹水癌移植動物を対象とする Azo-106, Thio-TEPA, BCM, 6-Mercaptopurine, Carzinophyllin, Mitomycin C, 及び Actinomycin J 等の制癌実験の成績については文献 2) を参照のこと。

Experimental Anticancer Studies. Part 9 Test for Tumor-inhibitory Action of Bis (2-hydroxy-3, 5-dibromophenylazo)-n-propylphloroglucinol (Azo-106) Administered in a Part of Body Remote from the Site of Tumor Implantation in Mice. Tamiko Miyaji Department of Pharmacology (Director : Prof. H. Okamoto), School of Medicine, Kanazawa University; Department of Chemistry (Director : Prof. S. Koshimura), Research Institute of Tuberculosis, Kanazawa University

を秤取し、これを N NaOH 2~3 滴の添加のもとに滅菌生理的食塩水 15cc に溶解せしめた (0.2mg/0.25 cc)。

3. 腫瘍細胞懸濁液の調製 :

i) エールリッヒ癌細胞懸濁液 : 約 1,500 万個のエールリッヒ癌細胞を腹腔内移植した純系マウスから、移植10日目に腹腔穿刺により滯溜腹水を採取し、これを約 2 倍量の滅菌食塩水(少量のペニシリン添加)中に混和す。この混液についてまず cell count を行ない、次いでその腫瘍細胞数に応じて 4,000万/cc となるように滅菌食塩水を追加した。即ち本懸濁液 0.2cc は癌細胞 800 万個を含有す。

ii) サルコーマ 180 細胞懸濁液 : サルコーマ 180 細胞の約 2,000 万個を純系マウスの腹腔内に移植してから14日目に腹水を採集し、これをエールリッヒ癌細胞懸濁液調製の場合と同様に処理して 5,000万/cc 懸濁液とした。即ち本懸濁液 0.2cc はサルコーマ 180 の細胞 1,000 万個を含有す。

4. 実験術式 :

i) 移植 : 5 群の動物に対し一斉にエールリッヒ癌の細胞懸濁液 0.2cc (移植細胞数は 800 万個) 宛の腹腔内移植を行ない、他の 5 群の動物に対しては一斉にサルコーマ 180 の細胞懸濁液 0.2cc (移植細胞数は 1,000 万個) 宛の腹腔内移植を行なう。

ii) Azo-106 の投与 :

a) エールリッヒ癌細胞移植動物群のうち 1 群(V) を対照とし、この群の各動物には移植 1 時間後に滅菌食塩水 0.25cc 宛の第 1 回背部皮下注射を行ない、翌日より 1 日 1 回宛 6 日間に亘つて同様の注射を行なう。而して他の 4 群 I, II, III 及び IV) は治療実験用とし、腫瘍細胞を移植してから I 群では 1 時間後に、II 群では 24 時間後に、III 群では 48 時間後に、又 IV 群では 72 時間後にそれぞれの動物に対し Azo-106 0.2mg/0.25cc (即ち $MTD \approx 0.8mg/20g$ mouse, Sb. の $\frac{1}{4}$ 量) をもつてする第 1 回の皮下注射を行ない、以後 1 日 1 回宛 6 日間連続して同様の処置を行なう。

なお注射は背部皮下の左右に対し隔日交互せしめて行なつた。

b) サルコーマ 180 細胞の移植動物群における治療実験も亦前記 a) の方式に準じて行なつた。

5. 判定 : 全実験動物は最後 (第 7 回目) の注射を行なつてから以後何らの処置をも施さずに正常の飼育管理下に置き、その生存状況を——途中斃死したマウスは剖検によつて腫瘍死 (腹水滯溜並びに腫瘍浸潤の有無及びその程度) か否かを確かめながら——逐日観察した。而して最後に各群についてその動物の平均生

存日数 (及び 50% 生存日数) を求めた。

実験成績

Fig. 1a はエールリッヒ癌の腹腔内移植マウスに対する Azo-106 (0.2mg/day/mouse) の皮下投与における実験の成績を生存曲線をもつて示したものである。

即ち本図では

1) 対照群 (V) マウスは癌細胞移植後 18 日以内に全部腫瘍死しており、その平均生存日数は 14.9 日 (50% 生存日数は 15 日) であるに対し、

2) 移植 1 時間後及び 24 時間後から Azo-106 を皮下投与した実験群 I 及び II にあつては動物の平均生存日数はそれぞれ 19.7 日及び 22.2 日 (50% 生存日数はそれぞれ 18 日及び 22 日) であつて、軽度ながら平均生存期間の延長が現われている。

3) しかし移植 48 時間後及び 72 時間後から治療を開始した実験群 III 及び IV では、そのいずれにあつても生存日数の関係においては対照群のそれに対比して全く差異するところがないという所見である。

而して Fig. 1b はサルコーマ 180 の腹腔内移植マウスに対する Azo-106 の皮下投与における実験成績を示したものであつて、この場合は前記エールリッヒ癌細胞における程ではないが、サルコーマ 180 移植 1 時間後並びに 24 時間後に Azo-106 による治療を開始した実験群 I 及び II において平均生存期間が僅かに延長しているを見る。

B. 腫瘍細胞の腹腔内移植マウスに対する Azo-106 の経口投与の治療実験

実験方法

1. 使用動物 : ddN マウス (17~20g, ♂) を使用、1 群 10 匹宛とし治療並びに対照の 2 群を用意する。

2. Azo-106 内服液の調製 : Azo-106 はトラガント漿をもつて乳剤となして経口的に投与す。即ちまず Azo-106 の 45mg を乳鉢にとり 2~3 滴の 95% アルコールをもつて研磨細粉化する。次いで、これに 0.5% トラガント漿の少量宛を加えつつ研磨の操作を続け、最後にトラガント漿をもつて全量 15cc とす。本乳剤 0.5cc は Azo-106 1.5mg を含有す。

本乳剤はこれを 1cc の注射筒に吸引し、その 0.5cc 宛を特製の有頭細管を介して直接試獣の胃中に注入せしめた。対照群動物には 0.5% トラガント漿 0.5cc 宛を投与す。

3. 腫瘍細胞懸濁液の調製 : 前項 A) におけると同様にしてエールリッヒ癌細胞 2,500 万/cc 及びサルコーマ 180 細胞 4,000 万/cc の懸濁液を調製す。

4. 実験術式 :

i) まず2群の全動物に対し一斉にエールリッヒ癌細胞懸濁液 0.2cc 宛の腹腔内移植を行なう。移植6時間後に治療群にあつては Azo-106 懸濁液 0.5cc (1.5mg Azo-106/0.5cc/mouse) をもつてする第1回の経口投与を行ない、以後同様の処置を1日1回宛2日間連続せしめ、4日目に1日の休止日を置き、第5日目から3日間に亘り1日1回 Azo-106 懸濁液 0.5cc 宛の投与を行なう。

対照群に対しては同様の方式で 0.5%トラガント漿 0.5cc 宛の経口投与を行なう。

ii) サルコーマ 180 細胞移植動物群における治療実験も亦上記 i) の方式に準じて行なつた。

5. 判定： 前述の I-A 項実験と同様。

実験成績

Fig. IIa 及び IIb に示したように、エールリッヒ癌における実験では治療動物群の平均生存日数は対照動物群のそれに対比して2日間延長しており、又サルコーマ 180 における実験では治療群の平均生存日数は対照群のそれに対比して4日間延長しているを見る。

而してこの実験では Azo-106 それ自体を直接トラガント漿中に 1.5mg/0.5cc に懸濁せしめたものを内服せしめたのであるが、他方、Azo-106 を一旦 Na-塩の濃厚水溶液とし、次いでこれを 0.5%トラガント漿に 1.2mg Azo-106/0.3cc (即ち MTD \approx 4mg/20g mouse, per os, の $\frac{1}{2}$ 量) の濃度としたものを内服せしめた実験でも Fig. IIa 及び IIb に類似した成績が得られた。

II. 結節型腫瘍における実験

前項 I の Azo-106 による治療実験は、それが皮下投与法によつたものたると経口の投与法によつたものとを問わず、いずれも腹腔内に腫瘍移植を行なつた動物を対象として行なわれたのであるが、しからば皮下結節腫瘍の動物を対象とした場合は如何。即ちこのことに対する検討として、腫瘍細胞の鼠蹊部皮下移植によつて起る腫瘍形成に及ぼす Azo-106 の影響をその腹腔内投与と背部皮下投与の両場合について考査した。

A. 腫瘍細胞の皮下移植 マウスに対する Azo-106 腹腔内投与の治療実験

実験方法

1. 実験材料： 体重 18~21g の純系マウス (ddN) を使用する。而して注射用 Azo-106 溶液 (0.2mg/0.25cc), 及び腫瘍細胞懸濁液 (エールリッヒ癌細胞では 4,800万/cc, サルコーマ 180 細胞では 5,400万/cc)

は前項 I-A におけると同様にして調製す。

2. 実験術式：

i) エールリッヒ癌における実験： まず5群 (1群 10匹宛) の動物に対し一斉にその左鼠蹊部皮下に 960万細胞/0.2cc/mouse の移植を行なう。次いで I 群では1時間後に、II 群では24時間後に、III 群では48時間後に、IV 群では72時間後に、Azo-106 の 0.2mg/0.25cc/mouse (LD₅₀=0.8mg/20g mouse, i. p. の $\frac{1}{2}$ 量) をもつてする第1回目の腹腔内投与を行ない、以後各群に対しそれぞれ1日1回宛 Azo-106 の 0.2mg/0.25cc/mouse の腹腔内投与を6日間に亘つて連続せしめた。

なお腹腔内注射は毎常右側腹部より行なつた。

ii) サルコーマ 180 における実験： I 群が12匹宛であり、サルコーマ 180 の移植細胞数が 810万/0.15cc/mouse である点が異なつてはいるだけで、その他の方式は前記 i) と同様。

3. 判定： エールリッヒ癌における実験では12日目に、又サルコーマ 180 における実験では移植後14日目にそれぞれにおける全群の動物をクロロフォルムで殺して、腫瘍の摘出を行なう。而して各摘出腫瘍については、まずその重量を測定し、各群における平均重量を求め、最後に各腫瘍の大きさの相対的關係を示すべく摘出腫瘍を各群毎に整列せしめて撮影す (Fig. IIIa 及び IIIb に示した腫瘍の大きさはこの写真像に基づいたもの)。

因に結節型腫瘍 (solid tumor) を対象とする薬物の抗腫瘍試験では各研究者によつてそれぞれの実験方式なり或いは効果判定の基準として異なる点で異なつていところがあるが、一般に効果判定には腫瘍の直径を caliper で測定し⁴⁾、実験群平均値/対照群平均値の百分率が求められていた場合が多い。しかしながら最近腫瘍の平均重量比をもつて効果の有無を表示せんとする傾向もあるので、本研究ではこの表示法を採用することにした訳である^{10), 11)}。

実験成績

Fig. IIIa はエールリッヒ癌の結節型腫瘍形成に対する Azo-106 の腹腔内投与による治療実験の成績を展示したものである。

まず本表を一目して腫瘍像 (size) の大きさの關係では大体

V 群 (対照) \geq IV 群 > III 群 > II 群 \geq I 群

の順であることが感知されよう。而して同様の關係が又各群における腫瘍の平均重量の方からも看取される。即ち対照群における平均重量が 0.67g であるに對し、治療開始が移植1時間後に行なわれた I 群にあ

つては、対照群の約 $\frac{1}{4}$ 即ち 0.16g であるに過ぎず、しかも24時間後治療開始のⅡ群においても亦大体これに類する成績が得られている。しかし治療開始が移植48時間後に行なわれたⅢ群では成績が劣り、平均重量は 0.29g (即ち対照群の約 $\frac{1}{2}$) の値を示し、更に72時間後からの治療群(Ⅳ)では、平均重量は 0.61g で対照群における値との間に殆んど差異がないといった所見である。

他方、サルコーマ 180 の結節型腫瘍形成に対する Azo-106 の腹腔内投与における実験成績は Fig. Ⅲb に示した。即ち本図では移植1時間後から治療を開始したⅠ群では対照に較べて明らかに成績良好であり、平均重量では前者が 0.33g で、後者の 0.92g に対して約 $\frac{1}{3}$ に過ぎないこと、及び治療開始が移植24時間後、48時間後、及び72時間後に行なわれたⅡ、Ⅲ及びⅣ群では、それぞれの成績間に大した差異はないが、それでも対照群に比すればよい成績(平均重量比は約 $\frac{1}{3}$)が得られていることに注目すべきであろう。

B. 腫瘍細胞の皮下移植マウスに対する Azo-106 皮下投与の治療実験

実験方法

1. 使用動物：体重 17~19g の純系マウス(ddN)を使用、1群8匹宛とする。

2. Azo-106 溶液の調製：前項 I-A におけると同様にして調製する。

3. 腫瘍細胞懸濁液の調製：前項 I-A に準じて、エールリッヒ癌では 1,200万/0.2cc/mouse, 又サルコーマ 180 では 900万/0.2cc/mouse なる如くした。

4. 実験術式：第 II-A 項の実験方式に準じて行なう。即ち腫瘍細胞懸濁液 0.2cc をマウスの左鼠蹊部皮下に移植。Azo-106 の1回の投与量は 0.2mg/0.25cc とし、注射部位は背部皮下。移植後から第1回の Azo-106 注射までの時間がそれぞれ 1, 24, 48 及び72時間なる4群を置き、いずれも以後1日1回宛6回の Azo-106 注射(背部皮下の左右へ各回交互に)を行なう。

5. 判定：前項 II-A に準ず。但し腫瘍重量の測定はエールリッヒ癌及びサルコーマ 180 のいずれの場合にあつても移植後3週間目に行なつた。

実験成績

Fig. Ⅳa はエールリッヒ癌細胞の皮下移植マウスに対し、Azo-106 を皮下投与した実験の成績である。

即ち対照群(Ⅴ)における腫瘍の平均重量が 2.34g であるに対し、Azo-106 の投与が移植1時間後より行なわれたⅠ群にあつては約 $\frac{1}{3}$ の 0.83g, 又治療開始が24時間後(Ⅱ群)、48時間後(Ⅲ群)、及び72時間後

(Ⅳ群)のものではいずれも $\frac{1}{2}$ 程度(それぞれ 1.06g, 1.01g 及び 1.07g)という成績であることを見る。

しかもこれと大体同様関係の成績が Fig. Ⅳb 提示の如く、サルコーマ 180 における実験でも得られていた(腫瘍の平均重量はⅠ群で 0.63g, Ⅱ群で 0.88g, Ⅲ群で 1.15g, Ⅳ群で 1.10g であるに対し、対照のⅤ群では 1.99g)。

総括並びに考按

Table I は以上各項に亘つて述べてきた成績について、それらの相互関係の理解に便ならしめるために総括したものである。

今本表を一瞥すると、今回行なわれた異処的投与方法による Azo-106 のエールリッヒ癌並びにサルコーマ 180 に対する抗腫瘍性の検討では

1) 腫瘍細胞の腹腔内移植マウスに対する Azo-106 の皮下投与による治療実験(I-A)

2) 腫瘍細胞の皮下移植マウスに対する Azo-106 の腹腔内投与による治療実験(II-A), 並びに

3) 腫瘍細胞の皮下移植マウスに対する Azo-106 の皮下投与による治療実験(II-B)

のいずれにおいても Azo-106 (投与量は 0.2mg/day/mouse, 7回)による治療開始の時間が早期であるもの程治療成績が良好であるという点で一致しているのであるが、これはまさに Azo-106 の抗腫瘍性の顕現であること、換言すれば異処的に投与された Azo-106 が流血を介して腫瘍細胞の増殖に対し抑制の効を示したためであることの証左といえよう。

他方、実験 I-B の Azo-106 の経口の投与による治療実験にあつては、

1) 治療開始が腫瘍細胞の腹腔内移植後6時間目である場合についての考査のみであること、及び

2) 治療動物群の対照動物群に対する平均延命日数が2~3日(Table I では±)であること

に想到するならば、もしこの実験のみが単独に行なわれたような時は、或いはこの成績は実験誤差の範囲内にあるともいえよう。しかし、I-A, II-A 及び II-B の各抗腫瘍実験の成績から推して、この経口投与の実験成績も亦 Azo-106 の抗腫瘍性の現われであると解しても支障がないところであろう。

ところで、ここに注記すべきことは、さきに平田及び岡本等はエールリッヒ癌細胞を腹腔内に移植した後24時間を経たから Azo-106 の腹腔内投与による治療を行なつた制癌実験で生存率において 60~90%にも及ぶという顕著な抗腫瘍成績を得ているに対し、今回の Azo-106 の異処的投与による制癌実験ではその抗

腫瘍成績が甚だしく劣っていることであろう。しかし今、

1) 前者のような腹腔内移植に対する腹腔内投与の実験方式では、たとえ24時間内に腫瘍細胞の一部が既に組織内へ侵入したものがあろうとはいえ、大部分の腫瘍細胞は高濃度の Azo-106 の直接的影響を蒙るであろうこと、しかるに

2) 後者のような Azo-106 の異処的投与による制癌実験では、Azo-106 が一旦投与箇所から血流に吸収され、しかる後遠隔部位にある腫瘍細胞に作用するのであるから、Azo-106 の作用濃度は甚だしく稀薄であろうこと、

に思いを致すならば、両者間で抗腫瘍物質の効果が懸絶して現われることはむしろ当然のことと理解し得るところであろう。

結 語

本研究では Bis(2-hydroxy-3,5-dibromophenyl-azo)-n-propylphloroglucinol [Azo-106] について、これを腫瘍細胞 (エールリッヒ 癌並びにサルコーマ 180) の移植部位から遠隔した体部に適用する時、果して抗腫瘍効果を期待し得るであろうかについて次のような諸方式での考査が行なわれた :

- I. 腹水腫瘍を対象とし、延命効果で判断する実験
 - A. 腫瘍細胞の腹腔内移植マウスに対する Azo-106 の皮下投与の影響
 - B. 腫瘍細胞の腹腔内移植マウスに対する Azo-106 の経口投与の影響
- II. 結節型腫瘍を対象とし、腫瘍増大に対する抑制効果で判断する実験
 - A. 腫瘍細胞の鼠蹊部皮下移植マウスに対する Azo-106 の腹腔内投与の影響
 - B. 腫瘍細胞の鼠蹊部皮下移植マウスに対する

Azo-106 の背部皮下投与の影響

そして、以上の各検討実験を通じて、Azo-106 による治療開始が早期である場合に生存日数の延長、或いは腫瘍増大の軽少が招来されるという点で一致している成績が得られ、ここにこれらの成績に対する多角的判断の結果として Azo-106 には流血を介してもエールリッヒ癌並びにサルコーマ 180 に対し抗腫瘍効果を呈する性能があると論結されるに至つた訳である。

文 献

- 1) Hirata, R. : Japan. J. Exp. Med., 27, 99 (1957).
- 2) Okamoto, H., Koshimura, S., Hirata, R., Murasawa, K., Bando, Y., and Shimizu, R. : Z. Krebsforsch., 62, 408 (1958).
- 3) 未発表.
- 4) Stock, C. C., Philips, F. S., Moore, A. E., Buckley, S. M., Clarke, D. A., Barclay, R. K., & Sugiura, K. : Cancer Research, Suppl. 1, 91 (1953).
- 5) Sugiura, K., Stocke, C. C., Dobriner, K., & Rhoads, C. P. : Cancer Research, 10, 244 (1950).
- 6) Homburger, F. : The Biologic Basis of Cancer Management. Paul B. Hoeber, Inc., New York, 1957.
- 7) Greenstein, J. P., : Biochemistry of Cancer. Academic Press Inc., New York, 1954.
- 8) Greenstein, J. P. & Haddow, A. : Advances in Cancer Research, Vol. II, Academic Press Inc., New York, 1954.
- 9) 武田勝男 : 癌の化学療法, 医歯薬出版株式会社, 1957.
- 10) Tarnowski, G. S. : Cancer Research, Suppl. 2, 333 (1955).
- 11) Greenberg, D. M., & Gal, E. M. : Cancer Research, Suppl. 1, 53 (1953).

Abstract

Using Ehrlich ascites carcinoma, and Sarcoma 180, as the implantation material to mice, followig series of anticancer experiments were designed :

1. Experiments on animals implanted with tumor cells intraperitoneally.
 - a) Effect of subcutaneous administration of Azo-106 on the life-span of the animals.
 - b) Effect of oral administration of Azo-106 on the life-span of the animals.
2. Experiments on animals implanted with tumor cells subcutaneously in the left groin.
 - a) Effect of intraperitoneal administration of Azo-106 on the growth of tumor.
 - b) Effect of subcutaneous administration of Azo-106 on the growth of tumor.

Summing up the results obtained in all these experiments (cf. Table I), it was concluded that Azo-106, even when it is administered at a place distant from the tumor, exerts an inhibitory activity against the tumors.

Table I. Summary of Results

Exp. No.	Kind of tumor implanted	Experimental conditions		Results of anticancer experiments						Remarks
		Site of tumor cells implantation	Place of administration of Azo-106	The time of beginning of treatment with Azo-106 after tumor-cells implantation					Control	
				1 hr	6 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs		
I	A	Intraperitoneally	Subcutaneously	+	•	+	-	-	-	Average survival day of treated animals was compared with those of untreated animals, and the relative inhibitory results were graded as follows: +, ± and -.
				±	•	±	-	-	-	
	B		Orally	•	±	•	•	•	-	
				•	±	•	•	•	-	
II	A	Subcutaneously	intraperitoneally	±	•	+	+	-	-	Average weight of treated tumors was compared with those of untreated tumors, and the relative inhibitory results were graded as follows: ++, +, ± and -.
				+	•	±	±	±	-	
	B		Subcutaneously	+	•	+	+	+	-	
				+	•	+	±	±	-	

Fig. Ia Effect of Subcutaneous Administration of Azo-106 on Ascitic Tumor of Ehrlich Carcinoma in Mice

Inoculation: Eight million tumor cells were implanted to each mouse intraperitoneally.
 Treatment: Each animal of the treated groups received a daily subcutaneous dose of 0.2 mg Azo-106 (in 0.25 cc) for 7 successive days. Each control animal received a daily subcutaneous injection of 0.25 cc of saline for 7 successive days.

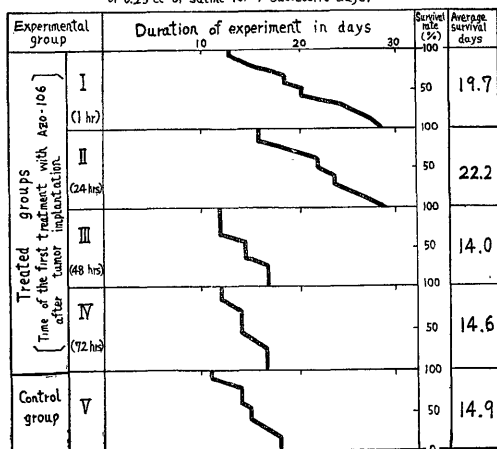


Fig. Ib Effect of Subcutaneous Administration of Azo-106 on Ascitic Tumor of Sarcoma 180 in Mice

Inoculation: Ten million tumor cells were implanted to each mouse intraperitoneally.
 Treatment: Each animal of the treated groups received a daily subcutaneous dose of 0.2 mg Azo-106 (in 0.25 cc) for 7 successive days. Each control animal received a daily subcutaneous injection of 0.25 cc of saline for 7 successive days.

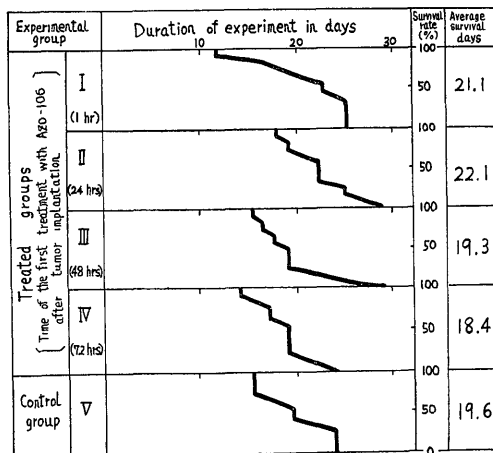


Fig. IIa Effect of Oral Administration of Azo-106 on Ascitic Tumor of Ehrlich Carcinoma in Mice

Inoculation: Five million tumor cells were implanted to each mouse intraperitoneally.
 Treatment: Six hours after implantation, each animal (of the treated group) received orally a daily dose of 1.5 mg Azo-106 (suspended in 0.5 cc of 0.5% tragacanth fluid) for 6 days. Each control animal received a daily oral administration of 0.5 cc of 0.5% tragacanth fluid for six days.

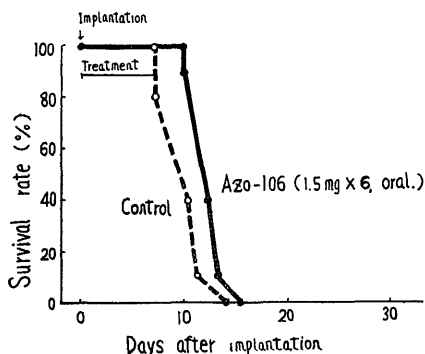


Fig. IIb Effect of Oral Administration of Azo-106 on Ascitic Tumor Sarcoma 180 in Mice

Inoculation: Sarcoma 180 cells 8 million, intraperitoneally.
 Treatment: Azo-106 1.5 mg x 6, orally.

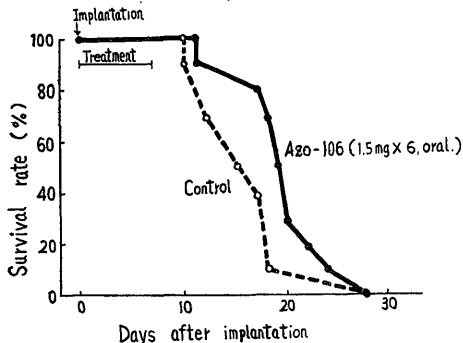


Fig III a Effect of Intraperitoneal Administration of Azo-106 on Solid Tumor of Ehrlich Carcinoma in Mice

Inoculum: Ehrlich carcinoma cells ($9.6 \times 10^6 / 0.2 \text{ cc}$) were implanted subcutaneously into the groin region of each animal
 Treatment: Each animal of the treated groups received a daily intraperitoneal dose of 0.2 mg Azo-106 (in 0.25 cc) for 7 successive days.
 Measurement of tumor: Twelve days after implantation, all animals were sacrificed and the tumors resected, were weighed, and then at a time photographed to represent their relative size.

Exp group Finding	Treated groups (Time of the first treatment with Azo-106 after tumor implantation)				Control group (untreated)	
	I (1 hr)	II (24 hrs)	III (48 hrs)	IV (72 hrs)		
Weight (g) and size (relative) of tumor	● 0.10	● 0.03	● 0.16	● 0.54	● 0.47	
	● 0.29	● 0.10	● 0.17	● 0.80	● 0.64	
	● 0.09	● 0.59	● 0.11	● 0.95	● 1.32	
	● 0.04	● 0.11	● 0.43	● 0.34	● 0.60	
	● 0.09	● 0.23	● 0.44	● 0.19	● 0.60	
	● 0.23	● 0.39	● 0.11	● 0.59	● 0.59	
	● 0.29	● 0.09	● 0.20	● 0.93	● 0.40	
	X	● 0.07	● 0.38	● 0.44	● 0.45	
	X	● 0.15	● 0.40	● 0.38	● 0.46	
	X	● 0.09	● 0.45	● 0.98	● 1.12	
	Average tumor weight (g)	0.16 (x omitted)	0.19	0.29	0.61	0.67

Note: X = The animals died of unknown cause before the 12 th day with survival period of 2, 6 and 9 days, respectively.

Fig. III b Effect of Intraperitoneal Administration of Azo-106 on Solid Tumor of Sarcoma 180 in Mice

Inoculum: Sarcoma 180 cells ($8.1 \times 10^6 / 0.15 \text{ cc}$), subcutaneously
 Treatment: Azo-106 0.2 mg x 7, intraperitoneally.
 Measurement of tumor: Fourteen days after implantation.

Exp. group Finding	Treated groups (Time of the first treatment with Azo-106 after tumor implantation)				Control group (untreated)	
	I (1 hr)	II (24 hrs)	III (48 hrs)	IV (72 hrs)		
Weight (g) and size (relative) of tumor	● 0.30	● 0.49	● 0.39	● 0.39	● 0.70	
	● 0.15	● 0.59	● 0.20	● 0.35	● 0.94	
	● 0.37	● 0.28	● 0.84	● 0.56	● 0.95	
	● 0.45	● 0.73	● 0.43	● 0.64	● 1.37	
	● 0.30	● 0.84	● 0.64	● 0.66	● 0.42	
	● 0.49	● 0.84	● 0.59	● 0.24	● 1.05	
	● 0.36	● 1.01	● 0.63	● 0.45	● 0.98	
	● 0.45	● 0.70	● 0.57	● 0.66	● 0.91	
	● 0.36	● 0.20	● 0.64	● 0.63	● 1.09	
	● 0.17	● 0.63	● 0.32	● 0.84	● 0.91	
	● 0.25	● 1.05	● 0.80	● 0.49	● 0.70	
	● 0.32	● 0.24	● 0.67	● 0.46	● 1.05	
	Average tumor weight (g)	0.33	0.63	0.56	0.53	0.92

Fig. IVa Effect of Subcutaneous Administration of Azo-106 on Solid Tumor of Ehrlich Carcinoma in Mice

Inoculum : Ehrlich carcinoma cells (12 mill./0.2 cc) were implanted subcutaneously into the groin region of each animal.
 Treatment : Each animal of the treated groups received a daily subcutaneous dose of 0.2 mg Azo-106 (in 0.25 cc) for 7 successive days.
 Measurement of tumor : Twenty-one days after implantation, all the tumors resected were weighed, and then at a time photographed to represent their relative size.

Exp group Finding	Treated groups (Time of the first treatment with Azo-106 after tumor implantation)				Control group (Untreated)	
	I (1 hr)	II (24 hrs)	III (48 hrs)	IV (72 hrs)		
Weight (g) and size (relative) of tumor	0.61	2.43	0.59	2.75	2.88	
	0.82	1.16	0.74	1.05	1.03	
	0.35	0.56	1.16	0.75	2.16	
	0.61	1.15	1.19	0.93	1.93	
	0.56	0.68	0.58	1.04	3.38	
	1.62	0.40	1.28	0.64	1.65	
	1.57	X	2.06	0.61	2.20	
	0.51	X	0.48	0.74	3.53	
	Average tumor weight (g)	0.83	1.06 (X omitted)	1.01	1.07	2.34

Note : X = The animals died of unknown cause before the 21th day with survival period of 7 and 9 days respectively.

Fig. IVb Effect of Subcutaneous Administration of Azo-106 on Solid Tumor of Sarcoma 180 in Mice

Inoculum : Sarcoma 180 cells (9 mill./0.2 cc), subcutaneously.
 Treatment : Azo-106 0.2 mg x 7, subcutaneously.
 Measurement of tumor : Twenty-one days after implantation.

Exp. group Finding	Treated groups (Time of the first treatment with Azo-106 after tumor implantation)				Control group (Untreated)	
	I (1 hr)	II (24 hrs)	III (48 hrs)	IV (72 hrs)		
Weight (g) and size (relative) of tumor	0.80	2.17	1.12	0.66	3.47	
	0.12	0.62	1.01	0.93	0.88	
	0.93	0.41	0.84	1.39	2.60	
	0.28	0.36	1.12	0.69	2.49	
	1.09	0.35	1.13	0.85	2.49	
	0.76	1.70	1.48	1.94	2.05	
	0.81	0.85	1.38	1.67	1.07	
	0.31	0.62	1.12	0.69	0.88	
	Average tumor weight (g)	0.63	0.88	1.15	1.10	1.99