

岡山医学会雑誌

第95巻 7, 8 合併号 (第1064, 1065号)

昭和58年 8 月31日発行

マウス癌漿膜浸潤に対する BCG Levamisole の効果および形態学的検討

岡山大学医学部第一外科教室 (指導: 折田薫三教授)

西 原 幸 一

(昭和58年 2 月18日受稿)

Key words: 漿膜浸潤, 走査電顕,
BCG, Levamisole

緒 言

癌の漿膜浸潤は腹腔内臓器癌, 特に消化器癌症例に数多く認められる癌の進展形式の一つである。漿膜浸潤は手術後に転移・再発を来たす頻度も高く, 特に腹膜播種・癌性腹膜炎を来たし, 予後を不良にしている極めて重要な因子といえる。そのため, 漿膜浸潤の成立機序を知ることは癌進展の機序の一端を知り得るのみならず, 癌の腹膜播種防止の手がかりを得るためにも有益であると考えられる。漿膜浸潤・腹膜播種についてはいろいろな研究がなされ, その成立機序は癌細胞の漿膜への浸潤と癌細胞の漿膜面よりの剥離・遊離, 腹膜への着床と増殖という段階が考えられている¹⁾。腹膜への着床と増殖についての形態学的研究は Birbeck²⁾ に始まり, 本邦でも岡林³⁾, 工藤⁴⁾, 郡家⁵⁾等の研究があるが, 漿膜浸潤と漿膜面からの癌細胞の剥離・遊離についての形態学的検索, その予防法についての検索はあまりなされていない様である。また,

治療についてはすでに腹膜播種を来している場合に腫瘍細胞への直接的効果をねらい, Mitomycin C をはじめとする制癌剤の腹膜内投与や大動脈内注入などが試みられている。最近では腹腔内の免疫担当細胞の癌細胞への関与も考えられるため, OK-432 の腹腔内投与なども行なわれているが未だ十分な効果を得るには至っていない。著者は癌の漿膜浸潤の成立機序を形態学的に検索するため, マウス腹壁を腸管壁とみなす実験モデルを作成した。すなわち, マウス腹壁皮下に腫瘍を移植し, 漿膜とみなした腹膜に腫瘍が浸潤する形態を経的に観察した。更に, 腹膜浸潤の予防と治療を目的とし, 宿主の免疫系を刺激し腫瘍に対して抵抗性を賦与させる biological response modifier (BRM) のうち非特異的免疫刺激剤 (non-specific immunostimulant, NSI) である BCG と, 免疫薬理学的に免疫抑制作用と免疫増強作用を合わせもつ免疫調節剤 (immunomodulator) の Levamisole (以下 LMS と記す) を腹腔内に投与し,

それらが腫瘍の増殖と腹膜播種に対し、いかなる効果をもたらすかを腹膜の形態学的変化と延命率でもって検索した。その結果、若干の知見が得られたので報告する。

実験材料および方法

実験材料

実験動物：静岡実験動物 K.K. より購入した 6～8 週令の体重 20g 前後の雄 DDS マウスを使用し、水と MF 固型飼料で飼育した。

腫瘍細胞：岡山大学第一病理学教室にて移植維持されてきた Ehrlich 腹水癌細胞をゆずりうけ、DDS マウスの腹腔内にて数代継代した。実験には移植 7 日目の腹水を採取し、生理食塩水で洗滌・稀釈し、腫瘍細胞浮遊液を作製使用した。これらの操作は全て無菌的に行ない、腫瘍細胞数は crystal violet 染色により Burkner-Türk 型血球算定板で計数した。

BCG：日本 BCG 研究所製を使用した。BCG 菌は一般に溶解後、4℃の冷蔵庫に保存すれば 14 日間程度その力価は落ちないといわれているが、著者らは原則として使用前に溶解作製したものを使用した。

LMS：協和発酵より提供されたものを使用した。

実験方法

I. 腹膜面浸潤の形態学的検索

1. 正常腹膜：無処置マウスをエーテル麻酔下に屠殺し、腹膜面を傷つけないよう広く採取し、一部を光学顕微鏡（以下光顕とする）試料に、一部を走査電子顕微鏡（以下走査電顕とする）試料に供した。

2. 腫瘍細胞の移植：マウス腹壁皮下に 6×10^4 個の Ehrlich 癌細胞を 27 ゲージ鈍針を用い、腹膜損傷や腹腔内注入をしないように充分注意して移植した。移植後、経日的に腫瘍径を計測した。同時にマウスをエーテル麻酔下に屠殺し、腹膜面を傷つけないように広く採取し、肉眼的に観察を行なったのち、一部を光顕用に、一部を走査電顕用に供した。

3. 光学顕微鏡標本作製法：採取した腹膜を紙ボードに伸展固定し、10%ホルマリン水溶液にて固定後、パラフィン包埋を施し、4μに薄切、

Hematoxyline-Eosin 染色を行ない検鏡した。

4. 走査電顕試料作製法：採取した腹膜を生理食塩水、Millonig's phosphate buffer で軽く洗滌した後、紙ボードに虫ピンでしわを生じない程度に伸展固定し、Millonig's phosphate buffer 加 2.5% glutaraldehyde で 90 分間固定し、同上燐酸緩衝液で 80 分間洗滌した。その後 1% osmic acid 水溶液にて 60 分間固定した。固定された材料を 50～100% アルコール系列にて脱水し、isoamylactate でアルコール置換を行ない、臨界点乾燥の後に白金パラジウム蒸着を施し、日立 SSM II 型走査電子顕微鏡で観察した。

II. BRM の投与による抗腫瘍性の検討

1. BCG 接種（表－1）

表－1 方 法

実験モデル：雄 DDS マウスの腹部皮下に Ehrlich 腹水癌細胞 6×10^6 個を移植

実験：BCG 投与（4mg/匹 腹腔内接種）

A：感作（－）＋腫瘍移植後無処置（Control）

B：〃（－）＋〃〃 3日目より 接種

C：〃（－）＋〃〃 14日目より 〃

D：〃（＋）＋〃〃 無処置

E：〃（＋）＋〃〃 3日目より 接種

F：〃（＋）＋〃〃 14日目より 〃

（感作：腫瘍移植 14 日前 4mg/匹 腹腔内接種）

BCG 接種は全例腹腔内接種とし、4mg/0.1 ml/匹を接種した。マウスを感作群と非感作群に分け、非感作群は A、腫瘍移植後無処置、B、腫瘍移植後 3 日目より週 2 回の接種、C、腫瘍移植後 14 日目より週 2 回の接種、の 3 群に分けた。感作群は腫瘍移植 14 日前に BCG 4mg/0.1 ml/匹を接種し、D、感作＋腫瘍移植後無処置、E、感作＋腫瘍移植後 3 日目より週 2 回の接種、F、感作＋腫瘍移植後 14 日目より週 2 回の接種、の 3 群に分け、計 6 群で検索した。なお一群のマウス数は 20 匹とし、腫瘍移植後 3、7、10、14、17、21、24、28 日目の腫瘍径、生存率および形態学的変化を観察した。また、BCG 接種回数による機械的刺激の変化を同じくするため、無処置時のマウスには全て BCG 接種量と同量の生理食塩水を腹腔内に注入した。

2. LMS 投与（表－2）

LMS の投与は全例腹腔内投与とした。マウスを 5 群に分け、I、腫瘍移植後無処置、III、

表—2 実験2 Levamisole(LMS)投与

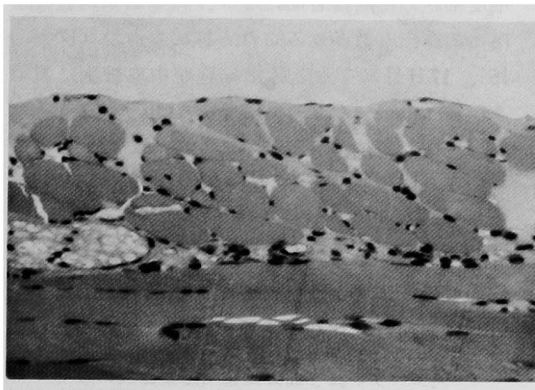
I. Control			
II. BCG 4mg/匹	腫瘍移植 14 日前	腹腔内	接種
III. LMS 10mg/kg	" " 3 日前	"	投与
IV. LMS 1.15mg/Kg	" " 3 日後より	"	"
V. LMS 2.0mg/kg	" " 14 日後より	"	"

LMS 10mg/kg/0.1ml を腫瘍移植 3 日前に投与, IV. LMS 1.15mg/kg/0.1ml を腫瘍移植後 3 日目より週 2 回の投与, V. LMS 20mg/kg/0.1ml を腫瘍移植後 14 日目より週 2 回の投与とし, BCG 感作群と比較するため, II. BCG 4mg/0.1ml/匹を腫瘍移植 14 日前に接種した群を加えた. なお, 一群のマウスは 20 匹とし, 腫瘍径, 生存率, 平均生存日数および形態学的変化を観察した. 無処置時マウスには BCG 接種実験と同様に, BCG 接種, LMS 投与と同量の生理食塩水を腹腔内に注入した.

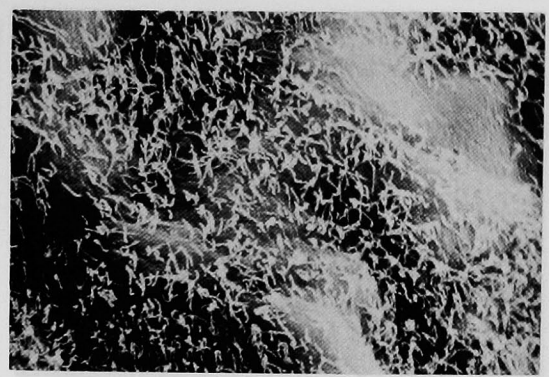
実験成績

I. 腫瘍の腹膜浸潤の形態学的変化

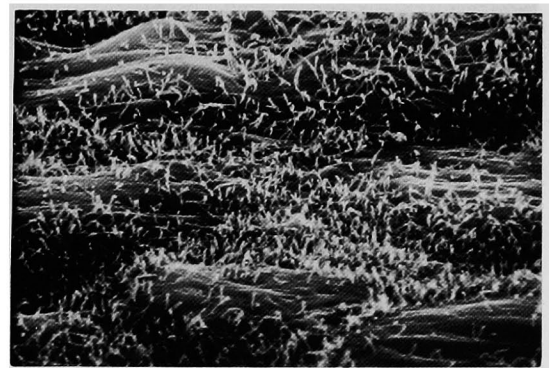
1. 正常マウス: 光顕では散在性に扁平な細胞の一層の被覆がみられ, 漿膜下組織は薄く, 炎症細胞浸潤はあまり認められなかった (図—1). 走査電顕では表面は軽く波うった様に見える, 中皮細胞は辺縁が平坦で中央部がやや膨隆した楕円形を呈するものが多かった. その細胞境界は一般に明瞭でなかった. 細胞表面には直径 $0.6 \sim 1.0 \mu$ の microvilli が散在性に, 一定の方向をとることなく存在していた (図—2).



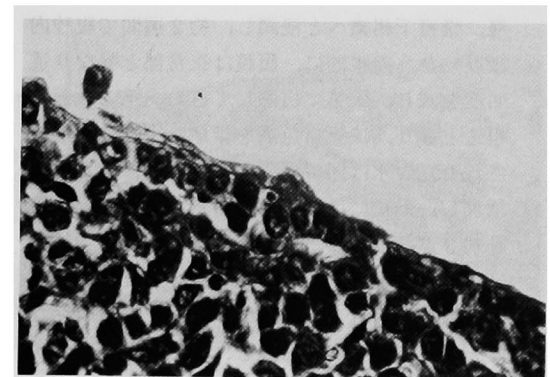
図—1 正常腹膜 ($\times 100$)
腹膜表面には扁平な細胞が散在性にみられる。



図—2 正常腹膜 ($\times 15,000$)
腹膜表面は軽く波うち, $0.6 \sim 1.0 \mu$ の microvilli が散在性にみられた。



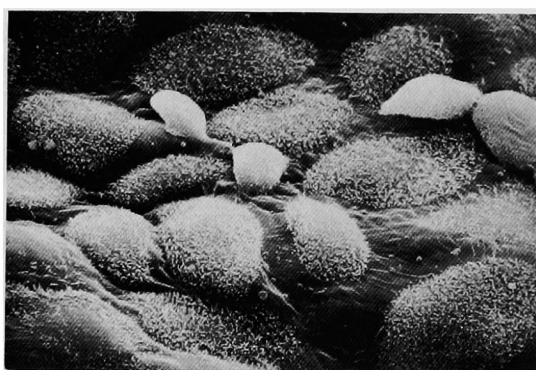
図—3 対照群 (腫瘍移植後 3 日目, $\times 15,000$)
microvilli が散在性にみられた。



図—4 対照群 (10 日目, $\times 400$)
腹膜直下にまで腫瘍細胞は浸潤し, 一部で腹腔内への露出がみられた。



図一5 対照群 (10日目, $\times 6,000$)
細胞間隙より腫瘍細胞が露出。



図一6 対照群 (10日目, $\times 6,000$)

2. 対照群マウス：マウス腹壁皮下に移植された Ehrlich 癌細胞は経日的に増殖し、固有筋層、漿膜下組織へと浸潤し、約2週間で腹腔内に達した。肉眼的に、腹膜は正常部と異なり透明度を減じ、次第に白濁してきた。その表面は粗造となり、淡灰白色調を帯びた小結節が形成された。腹水は同時期より認められ、経日的に増加し、最後には血性となった。腹水証明時より約3週間以内に全例腫瘍死した。組織学的には腫瘍移植後3日目では正常腹膜に比しあまり変化は認められなかった(図一3)。7日目になると中皮細胞は軽く膨隆し、その細胞境界は次第に明らかになってきた。microvilli は密な部と疎な部が混在するようになった。10日目の光顕では腫瘍細胞は腹膜直下にまで浸潤し、一部で腹腔内への露出がみられた(図一4)。走査電

顕でみると中皮細胞境界は哆開し、それぞれの結合は欠如し、basement membrane が露出、その間隙から腫瘍細胞が出現して来た(図一5, 6)。一部では腹腔内に露出した腫瘍細胞が分裂をおこなっているものもみられた(図一7)。中皮細胞は膨隆が一層強くなり、その表面の microvilli は密生している様にみえた。14日目には光顕では腫瘍細胞の腹腔内への露出、すなわち漿膜浸潤が著明となった(図一8)。走査電顕では腹膜表面に浸潤した腫瘍細胞が中皮細胞上で広く増殖していた(図一9)。

3. BCG 接種マウス

感作群では腫瘍移植後3日目では、光顕では対照群とあまり差を認めなかった。電顕では腹膜表面は軽く波うって、中皮細胞の膨隆はあまりみられないが、その表面の microvilli は対照群に比し密生し、長くのび、互いにまわりつき、網目状を呈していた(図一10)。7日目では microvilli はその密度を増し、互いにまわりつき網目状構造が強くなり、中皮細胞表面を被っていた(図一11)。10日目では光顕では腫瘍細胞が散在性にみられるが、腹腔内への露出はあまりみられなかった(図一12)。走査電顕では散在性に細胞境界が哆開しているのがみられ、その間隙より腫瘍細胞が腹膜面に露出しているのがみられた(図一13)。中皮細胞は全体に膨隆気味で、その microvilli は短くなり、一部で網状構造を残してはいるが、7日目に比しやや疎になっている様であった。14日目には腫瘍細胞は腹腔内に露出しており(図一14)。走査電顕では中皮細胞の膨隆は著明になり、腫瘍細胞の腹腔内への露出も数多くみられる様になった(図一15)。17日目になると腫瘍細胞が中皮細胞に置きかわった様になり、走査電顕でも、中皮細胞が層をなして増殖しているのがみられた。一部で中皮細胞は脱落し、その直下の結合組織が露出していた(図一16)。

非感作群では、腫瘍移植後3日目では中皮細胞の軽度の膨隆がみられるが、表面の microvilli は対照群と比してあまり変化は認められなかった(図一17)。7日目になると中皮細胞の膨隆は強くなり、その表面の microvilli は毛ば立ち、網目状構造を呈しているが、細胞境界は哆

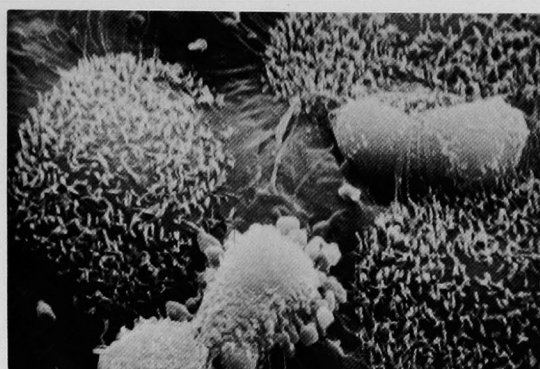


図-7 対照群 (10日目, $\times 15,000$)
腫瘍細胞が細胞分裂をおこなっていた。

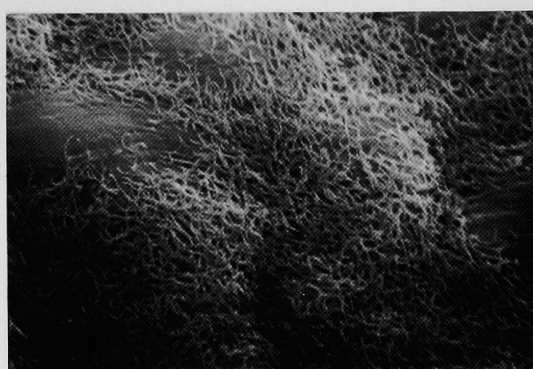


図-10 BCG 感作群 (3日目, $\times 15,000$)
microvilli が密生し, 網状構造を呈した。

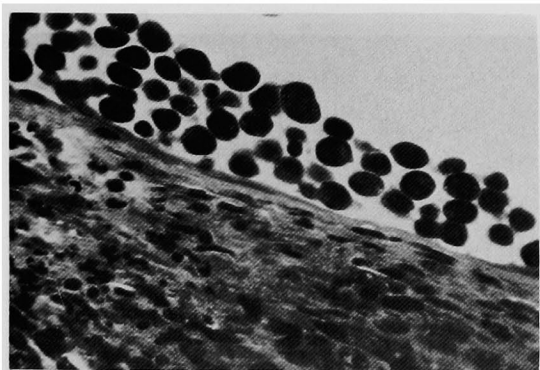


図-8 対照群 (14日目, $\times 400$)
腫瘍細胞が層状をなし, 腹膜面を被っていた。

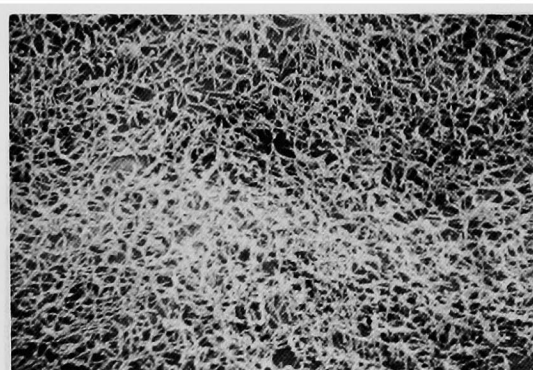


図-11 BCG 感作群 (7日目, $\times 15,000$)
microvilli の網目状構造が著明となった。



図-9 対照群 (14日目, $\times 6,000$)
多数の腫瘍細胞が腹膜表面を被っていた。

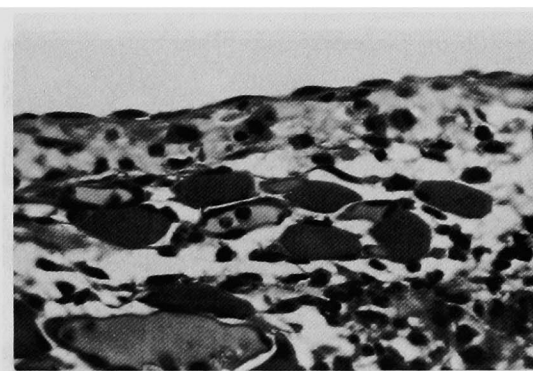


図-12 BCG 感作群 (10日目, $\times 400$)
腹膜下に散在性に腫瘍細胞がみられる。



図-13 BCG 感作群 (10日目, $\times 6,000$)
腫瘍細胞が散在性にみられた。
microvilli は短くなっていた。



図-16 BCG 感作群 (17日目, $\times 6,000$)
腫瘍細胞が腹膜表面を被っていた。

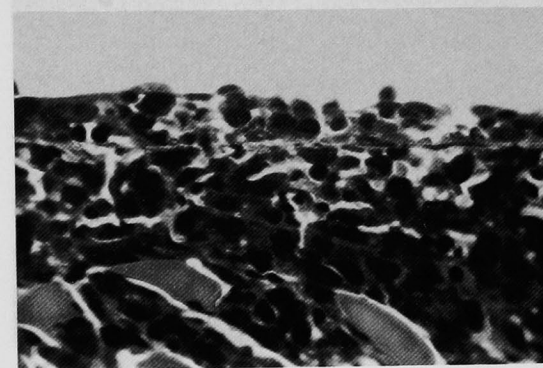


図-14 BCG 感作群 (14日目, $\times 400$)
腫瘍細胞は著明に浸潤し、腹腔内に露出して
いた。

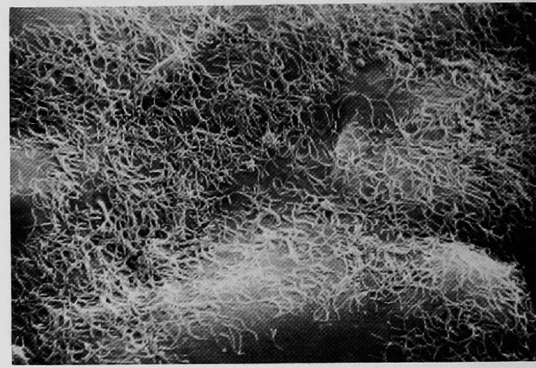


図-17 BCG 非感作群 (3日目, $\times 15,000$)
microvilli は表面に付着した様に見えた。

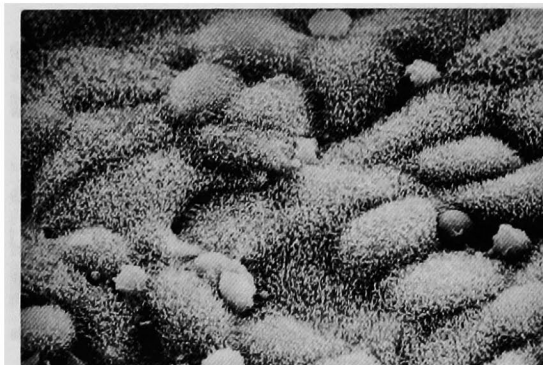


図-15 BCG 感作群 (14日目, $\times 6,000$)
中皮細胞の膨隆は著明となり、腫瘍細胞の露
出が多くみられた。

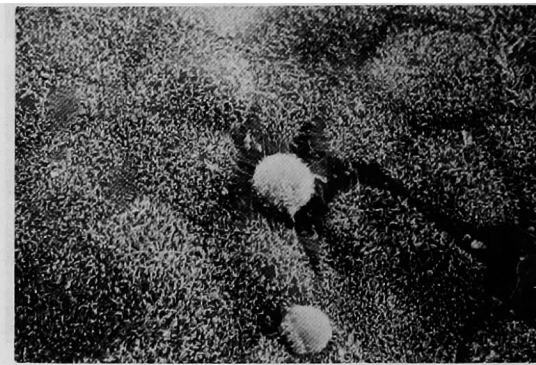
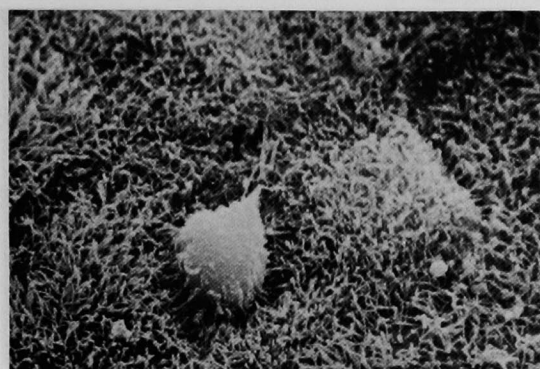
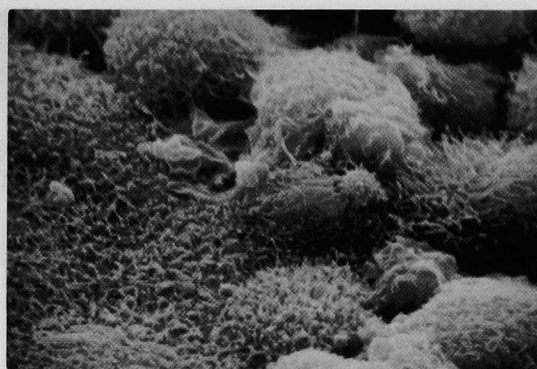


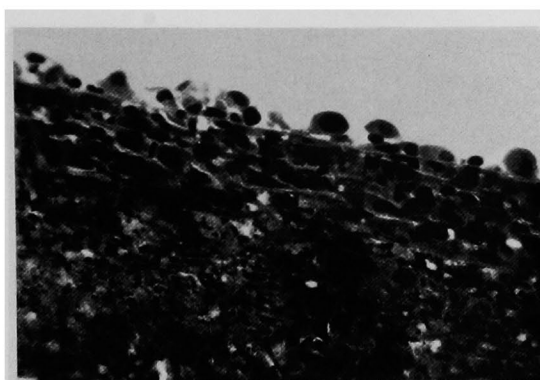
図-18 BCG 非感作群 (7日目, $\times 6,000$)
microvilli は毛ば立ち、細胞間隙より腫瘍細
胞が露出。



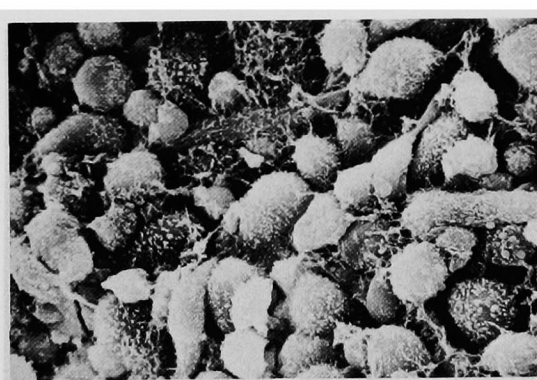
図一19 BCG 非感作群 (7日目, $\times 15,000$)
microvilli の毛ば立ちが著明にみられる。



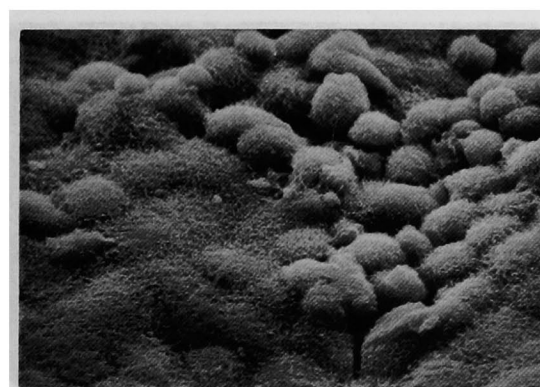
図一22 BCG 非感作群 (10日目, $\times 15,000$)
腫瘍細胞の露出がみられた。



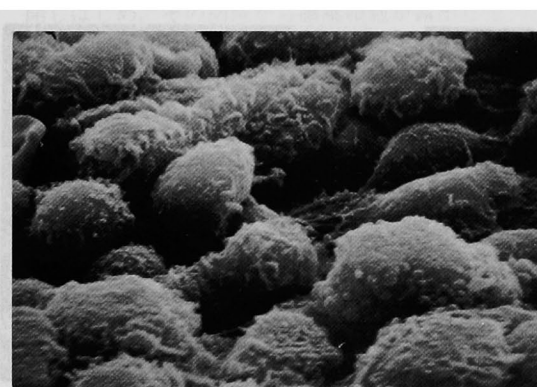
図一20 BCG 非感作群 (10日目, $\times 400$)
腫瘍細胞が腹腔内に露出。



図一23 BCG 非感作群 (14日目, $\times 6,000$)
腫瘍の増殖が著明になった。



図一21 BCG 非感作群 (10日目, $\times 6,000$)
microvilli は毛ば立ち, 表面にへばりついた様になっていた。



図一24 BCG 非感作群 (14日目, $\times 15,000$)
腫瘍細胞表面の偽足様突起は疎になり, その先端は球形を呈していた。

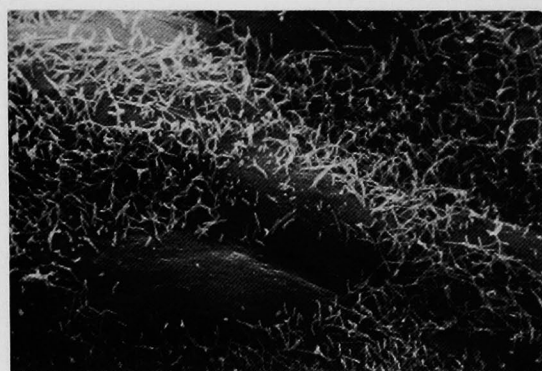


図-25 LMS 前投与群（3日目、 $\times 15,000$ ）
対照群と比して著変を認めなかった。



図-28 LMS 前投与群（14日目、 $\times 6,000$ ）
腫瘍細胞が表面を被っていた。

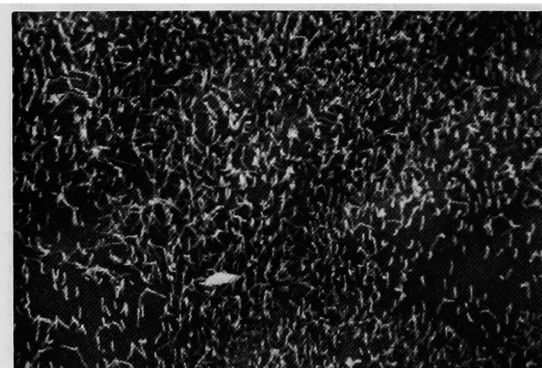


図-26 LMS 前投与群（7日目、 $\times 15,000$ ）

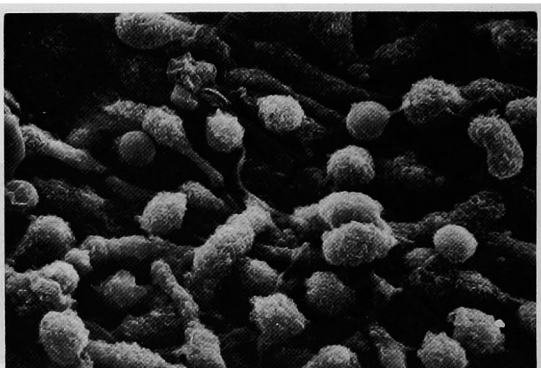


図-29 LMS 前投与群（17日目、6,000）

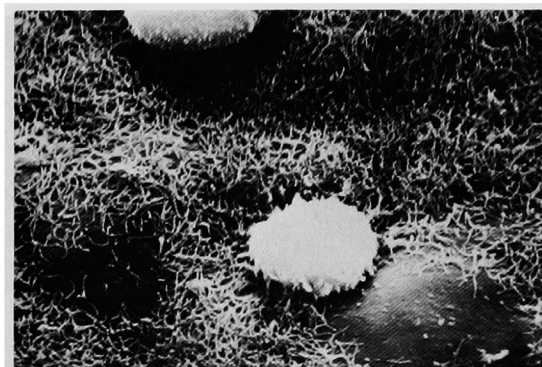


図-27 LMS 前投与群（10日目、 $\times 15,000$ ）
細胞間隙より腫瘍細胞が露出。

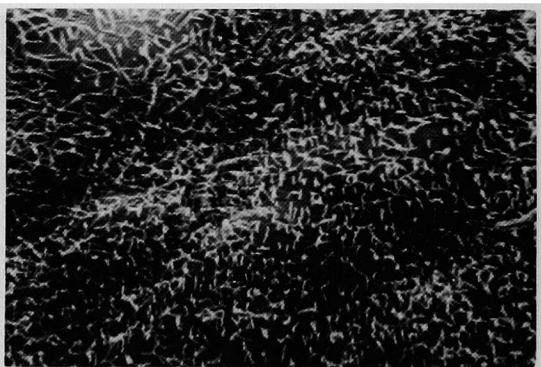


図-30 LMS 前投与群（3日目、 $\times 15,000$ ）
microvilli は短かく、腹膜表面全体にみられた。



図-31 LMS 後投与群 (7日目, $\times 15,000$)
microvilli は軽度の網目状を呈していた。

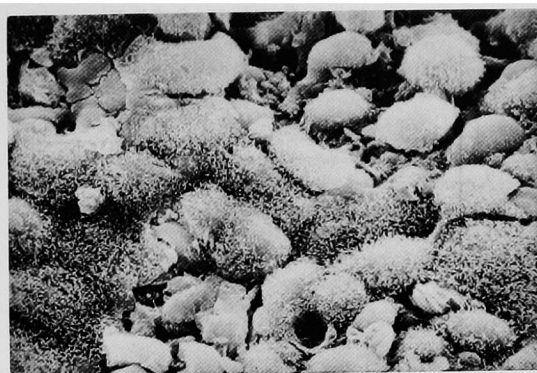


図-34 LMS 後投与群 (14日目, $\times 6,000$)

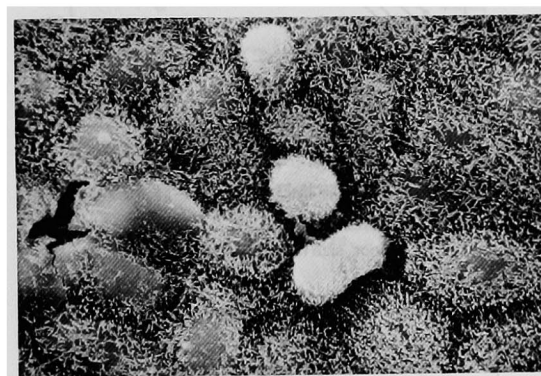


図-32 LMS 後投与群 (10日目, $\times 6,000$)
腫瘍細胞が露出。

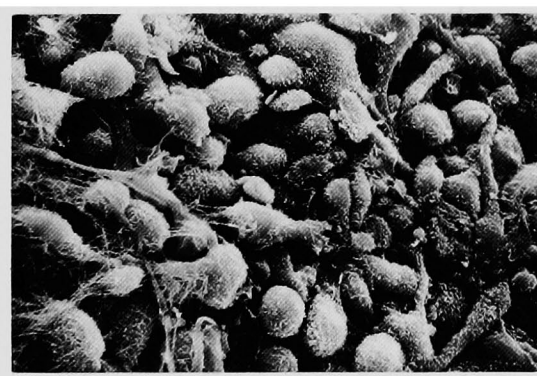


図-35 LMS 後投与群 (14日目, $\times 6,000$)

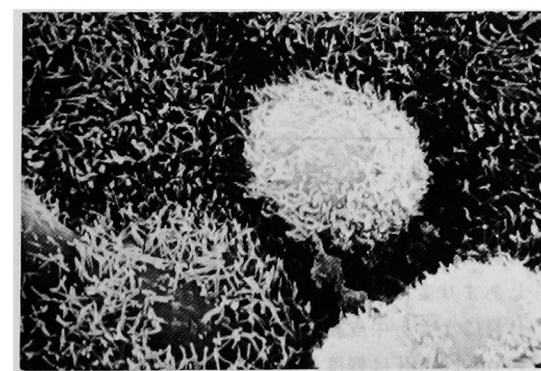


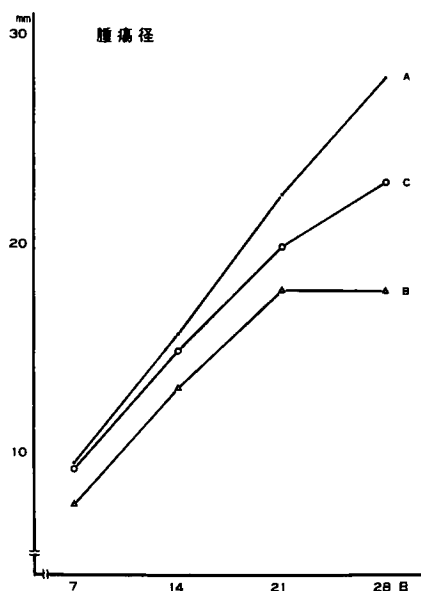
図-33 LMS 後投与群 (10日目, $\times 15,000$)
細胞間隙より露出した腫瘍細胞。

開しはじめ、その間隙から腫瘍細胞が露出して
いた(図-18, 19)。10日目では腫瘍細胞は多数
腹膜面に露出し(図-20)、中皮細胞はその膨隆
を増し、microvilli は短かく、表面にへばりつ
いたようになっていた(図-21, 22)。14日目には
残存せる中皮細胞は少なく、その形は紡錘形を
呈し、膨隆は著明となり、その表面の micro-
villi は疎になっていた(図-23)。腹膜表面は大
部分腫瘍細胞に置きかわっていた。

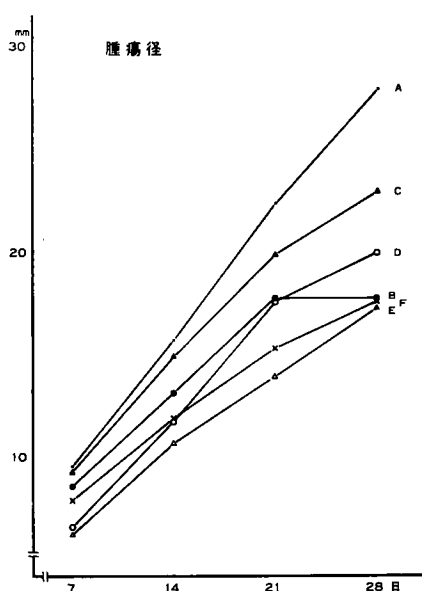
腫瘍細胞の形態は光顕では BCG 接種後もあ
まり差を認めなかったが、走査電顕では対照群
に見られたものに比し、変形が強く、その表面
にみられた偽足様突起は疎になり、その先端は
球形を呈しているものもみられた(図-24)。

4. LMS 投与マウス

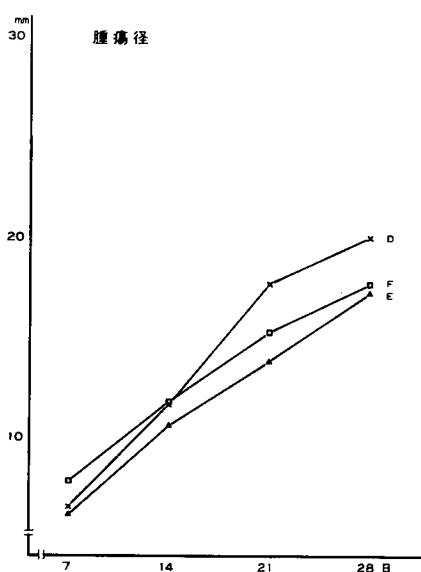
表一 3 腫瘍径 BCG 接種(非感作群)



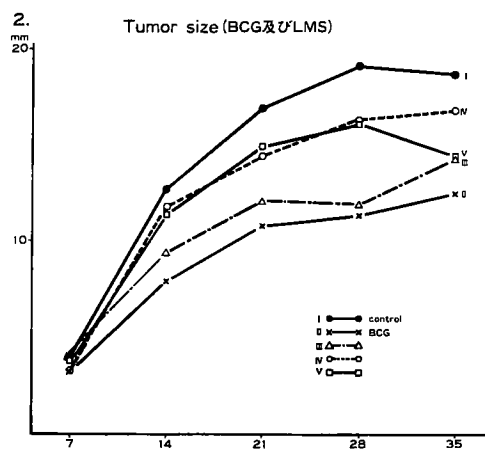
表一 5 腫瘍径 BCG 接種群



表一 4 腫瘍径 BCG 接種(感作群)



表一 6 腫瘍径 LMS 投与群



腫瘍移植前投与では、3～7日目まで中皮細胞の著明な変化は認められず(図一25、26)10日目になり一度に中皮細胞は膨隆し、細胞境界は明瞭になった。その間隙に腫瘍細胞が露出してきた(図一27)。14日目以降は中皮細胞は全く脱落し、結合組織は露出、その表面を腫瘍細胞が

被っていた(図一28、29)。

腫瘍移植後投与では、3日目では対照群と比しあまり変化は認められなかった(図一30)。7日目になると中皮細胞は軽度膨隆し、その表面の microvilli は軽度の網目状構造を呈していた(図一31)。10日目には細胞境界は明瞭に認められ、その間隙より腫瘍細胞の露出がみられた(図一32、33)。14日目には大部分の中皮細胞は脱落し、一部残存した中皮細胞では microvilli

表-7 生存率および平均生存日数・BCG 接種群

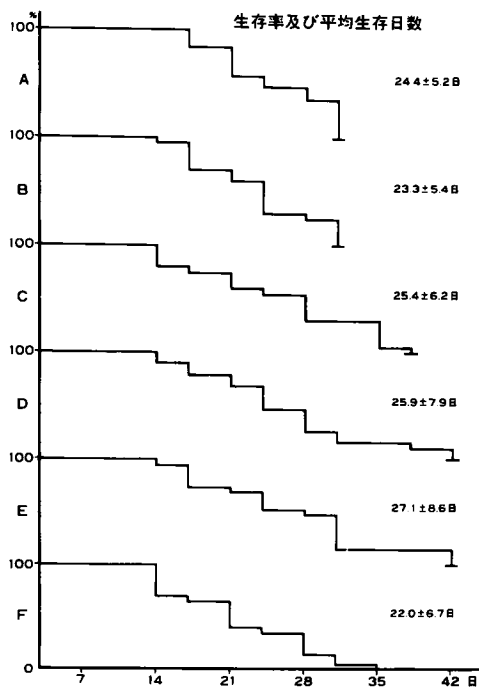


表-8 生存率および平均生存日数・LMS 投与群

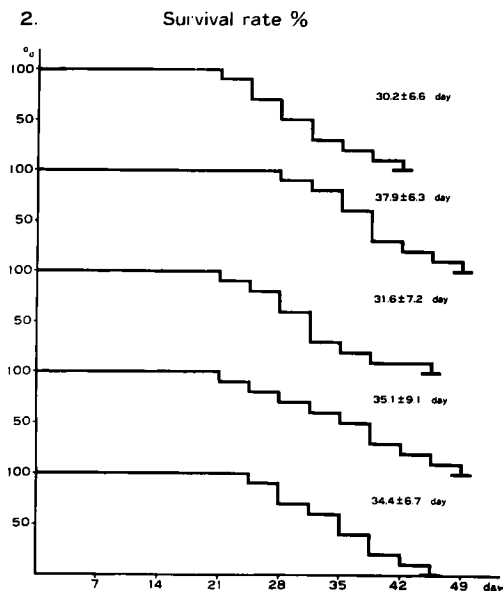


表-9

Effect of levamisole on the function of isolated phagocytes and lymphocytes from compromised hosts

Phagocytes	Lymphocytes
Random migration ↑	E-roset formation ↑
Chemotaxis ↑	Nucleic acid and protein synthesis ↑
Migration inhibition ↑	Lymphokine production ↑
Phagocytosis ↑	Suppressor activity ↑
Intracellular killing ↑	Lysosomal activity ↑
Cytotoxicity ↑	Plaque cell formation ↑
	Killer activity ↑

↑, increased

By J. Symoens, 1978.

は短かく萎縮した様にみえた。腫瘍細胞は全面を被うように増殖し、fibrin 様物質が付着していた(図-34, 35)。17日目には14日目より一層腫瘍細胞の増殖が著明に認められた。

II. BRM 投与による抗腫瘍性の検討

1. 腫瘍径

腫瘍径は長径+短径/2 をとり比較した。

a. BCG 接種マウス

非感作群(表-3)では、A群(腫瘍移植後無処置)は1週目 9.5 ± 1.4 mm, 2週目 15.2 ± 2.7 mm, 3週目 22.4 ± 3.3 mm, 4週目 27.8 ± 4.9 mmと経日的に腫瘍は増殖した。B群(移植後3日目より接種)は 8.3 ± 1.4 mm, 13.1 ± 2.4 mm, 17.8 ± 3.3 mm, 19.0 ± 4.2 mmと増殖傾向を示すが、A群に比し腫瘍増殖傾向はゆるやかで、1週目にははやくも差がみられ、3週目よりはA群との間に有意差を認めた($P < 0.05$)。C群(移植後14日目より接種)は 9.5 ± 1.1 mm, 16.1 ± 1.6 mm, 22.3 ± 3.3 mm, 24.3 ± 1.6 mmで、A・B群の中間の経過を示した。2週目まではA群と同様な増殖傾向を示したが、3週目ではA群との間にやや差が生じ、4週目にはその差は開いた($p < 0.1$)。B群と比較すると、1週目にははやくも差が認められ、4週目になると有意の差が生じた($p < 0.05$)。

感作群(表-4)では、D群(感作+腫瘍移植後無処置)は1週目 6.3 ± 1.4 mm, 2週目 10.8 ± 1.0 mm, 3週目 17.9 ± 1.6 mm, 4週目 20.9 ± 1.2 mm, E群(感作+移植後3日目より接種)は 6.6 ± 1.3 mm, 10.6 ± 2.1 mm, 14.7 ± 2.3 mm, 17.9 ± 2.8 mm, F群(感作+移植後14日目より接種)は 8.1 ± 1.6 mm, 11.7 ± 2.5 mm, $16.2 \pm$

2.2mm, 18.4 ± 1.9 mm であった。感作群は非感作群に比し全てに腫瘍の増殖抑制効果が認められた(表-5)。また、D群はA・C群に対しては1週目より有意差を認め($p < 0.05$)、B群に対しては3週目まであまり差を認めないが、4週目になると腫瘍径はB群に比し増大した。E群との間には2週目まで差を認めないが、3週目以降になると有意差を生じ($p < 0.05$)、腫瘍は増大した。F群との間には3週目まで差を認めないが、4週目になると有意差を生じた($p < 0.05$)。E群はA・C群に対し1週目より全経過を通じ有意差を認めた。B群との間には3週目まで有意差を認めたが、4週目になると差は認めなかった。F群とは全経過を通じあまり差は生じなかった。

b. LMS 投与マウス (表-6)

I群(腫瘍移植後無処置)は1週目 3.9 ± 0.9 mm, 2週目 12.7 ± 2.8 mm, 3週目 16.9 ± 3.4 mm, 4週目 19.1 ± 3.7 mm, 5週目 18.7 ± 3.2 mmで、腫瘍は経日的に増大した。II群(BCG接種)は 3.3 ± 0.9 mm, 7.9 ± 2.0 mm, 10.8 ± 2.6 mm, 11.4 ± 4.2 mm, 12.5 ± 5.8 mm, III群(移植3日前10 mg/kg/0.0ml投与)は 4.0 ± 0.7 mm, 9.4 ± 1.9 mm, 12.1 ± 2.4 mm, 11.9 ± 3.4 mm, 14.2 ± 0.6 mm, IV群(移植後3日目より1.15mg/kg/0.1ml投与)は 3.3 ± 1.0 mm, 11.8 ± 1.9 mm, 14.4 ± 1.5 mm, 16.3 ± 2.8 mm, 16.8 ± 4.1 mm, V群(移植後14日目より2.0mg/kg/0.1ml投与)は 3.8 ± 1.0 mm, 11.4 ± 2.3 mm, 14.9 ± 4.4 mm, 16.4 ± 6.9 mm, 14.2 ± 9.5 mm であった。II群はI群に対し2週目より全経過中有意差を認めた($p < 0.05$)。また、IV・V群に対しても2週目より有意差を認めたが($p < 0.05$)、III群に対しては差を認めなかった。III群はI・IV・V群に対し2週目より有意差を認めた($p < 0.05$)。IV・V群は同じ様な腫瘍増大傾向を示し、I群との間にも有意差を認めなかった。しかし、BCG群が全例腫瘍死したのに対し、LMS群では腫瘍の縮小を示すものがみられ、ついには腫瘍の消失をみたものがあった。

2. 平均生存日数および最長生存日数

a. BCG 接種マウス (表-7)

A群は最長生存日数31日(平均 24.4 ± 5.2)

であった。B群は31日(23.3 ± 5.4)、C群は38日(25.4 ± 6.2)であり差は認めなかった。D群は42日(25.9 ± 7.9)、E群は42日(27.1 ± 8.6)、F群は35日(22.0 ± 6.7)で、D・E群はA群に比し生存日数の延長を認めた。

b. LMS 投与マウス (表-8)

I群は最長生存日数42日(平均 30.2 ± 6.6)であった。II群は49日(37.9 ± 6.3)、III群は45日(31.6 ± 7.2)、IV群は49日(35.1 ± 9.1)、V群は45日(34.4 ± 6.7)であった。対照群に比しBCG群、LMS群共に最長生存日数、平均生存日数、生存率全てに高値を示したが、そのうちでもBCG接種が良く、LMS投与群では腫瘍移植後3日目よりの投与群が一番生存日数が長かった。

考 案

I. 漿膜浸潤について

腹膜播種の成立機序として、癌細胞が漿膜面へ露出し、腹腔内への脱落をおこした後、転移膜面での着床・増殖を来す過程が考えられる¹⁾。この漿膜面における癌細胞の露出の有無は明らかに予後を左右する重要な因子であるが、その確認には光学的観察がなされているのみである。走査電顕を使用し、癌細胞の露出、脱落過程を観察した研究はあまりみられない。腹膜播種についての形態学的観察は光顕ではWheatly⁶⁾、村上⁷⁾が、透過電子顕微鏡ではBirbeck²⁾、岡林³⁾、Jones⁸⁾が、走査電顕ではBuck⁹⁾、金島¹⁰⁾、喜安¹¹⁾、工藤⁴⁾、郡家⁵⁾らが行なっている。しかし、走査電顕を使用しての癌細胞の漿膜面への浸潤・露出を観察した研究は、金島¹²⁾らの研究のみである。金島らは人の胃癌手術標本を材料とし、1)癌細胞による物理的圧迫によって漿膜細胞を押し上げ、2)漿膜細胞間の離開や漿膜細胞の脱落、3)細胞間隙および欠損部からの癌細胞の露出の3つの過程を考えている。しかし、これは経過の一断面をみているのみであり、経日的な観察はなされていない。著者は経日的な漿膜浸潤を観察するため以下のモデルを考案した。小動物腸管粘膜下に腫瘍を移植することが困難なため、腹壁を腸管に、腹膜を漿膜にみたて、皮下に腫瘍細胞を移植することにより、経日的変化を観察することに成功した。その結果、

腫瘍細胞が漿膜面へ露出する過程はまず漿膜細胞の膨隆が起こり、次いで漿膜細胞間の哆開がみられ、癌細胞がその哆開部より腹腔内へ露出してきた。その後、腹膜面での増殖および腹腔内への癌細胞の遊離を来し、腹水の出現と共に他の部の腹膜への着床（腹膜播種）がみられた。しかし、金島らのいう漿膜細胞の脱落は癌細胞が腹膜露出した早期には認められず、腹膜面で癌細胞が増殖した時期には観察された。

腹膜細胞表面の microvilli の観察は透過型電顕による Odor¹³⁾、Fukata¹⁴⁾、の報告があり、一方走査電顕による詳細な研究は Andrews¹⁵⁾、工藤¹⁶⁾の報告がある。これらによれば microvilli は腹腔内の部位により差があり、Andrews は 3 群に分け、グループ I は後腹膜、壁側腹膜、膀胱が属し、 $10\mu^2$ 中 250 本以内、グループ II は肝臓表面、腸漿膜が属し、250~380 本、グループ III は横隔膜、脾臓表面が属し、600 本以内であったと報告し、工藤も同様の結果であったと述べている。著者が観察した正常腹膜は壁側腹膜であり、Andrews らのグループ I に属し、同様の所見であった。腹膜播種の観察による microvilli の変化はあまり言及されておらず、またその役割も不明である。著者の実験では、BCG 接種により microvilli は毛ば立ち、密度の増加、網目状構造などの変化がみられた。これは BCG 非接種対照群ではみられないもので、BCG による作用か、接種回数による機械的刺激に対する反応であるのか決定はされないが、対照群には生理食塩水を BCG 接種回数と同じに投与しているため、機械的刺激による変化とは考えにくく、BCG による直接作用と考えている。LMS 投与によっても、microvilli の変化は認められるが、BCG 接種による変化程強くはなかった。この microvilli の変化が漿膜細胞の結合を幾分強め、癌細胞が浸潤するのを防いでいる様に考えられた。

II. BCG 接種群

BCG は周知のように弱毒のウシ型結核菌である。BCG を腫瘍の予防や治療に役立てようという試みはすでに 1950 年代から活発に行われてきた。その発端は BCG 接種に伴って生体の網内系機能が亢進し、非特異的に微生物の感染に対し抵抗が高まるという現象と¹⁷⁾、移植腫

瘍の増殖中にやはり網内系機能の亢進がみられるという現象とが相ついで発見され²⁹⁾、両者の関連が注目された。近年になり、BCG の抗腫瘍性は直接腫瘍細胞に対して増殖阻止的ないし細胞破壊的に働くものではなく、すべて宿主の反応を媒介として働くことが知られてきた¹⁸⁻³⁰⁾。癌の免疫療法のうち、BCG は宿主の免疫系を刺激し、腫瘍に対して抵抗性を賦与させる、いわゆる非特異的免疫療法として最も多く使用されている。BCG が強く Macrophage を活性化し、cytostatic あるいは cytotoxic macrophages を動員しうることや、ある抗原による感作において、T 細胞を活性化し、細胞性免疫を誘導する adjuvant 活性をもつことなどが明らかにされ^{22,23)}、非特異的にかつ特異的にも抗腫瘍免疫導入に作用することが明らかにされている^{20,21)}、しかし、その抗腫瘍性賦与の機構においても、BCG 療法の有効な対象となる腫瘍の種類、BCG 投与の時期、量など多くの報告にもかかわらず意外にわかっていないことが多い。また、癌の非特異的免疫療法において、BCG は主として経皮的に皮内注射、乱刺法によって用いられており、腹腔・胸腔内などへの注入法による報告は少ない。Rapp²⁴⁾ らの実験によれば、BCG のような非特異的免疫刺激剤は腫瘍内あるいは腫瘍近傍に接種する方が腫瘍縮小効果が強くみられている。徳永・高橋²¹⁾らは BCG 使用による腫瘍の増殖を経日的に病理学的に検索した実験で、腫瘍内やその周辺の BCG が多数認められる部位には速かに好中球と大単核細胞の著明な浸潤集積が観察され、それに伴って腫瘍組織が漸次壊死変性に陥ってゆく過程を観察し、これを「巻き込み効果」と表現している。著者は癌の漿膜浸潤に対する BCG の効果を検索するために、あまり一般的に用いられていない BCG の腹腔内接種により検索した。その結果、光頭では明瞭な「巻き込み効果」はみられなかったが、腫瘍周囲にはリンパ球・好中球を主とした細胞浸潤がみられ、日がたつにつれ、腫瘍中心部は壊死に陥っているのが観察された。これは徳永・高橋らの実験と同じ結果と考えられ、BCG の腹腔内接種によっても腫瘍内接種と同様の効果があるものとする。BCG の感作

については、徳永²⁰⁾らは同種腫瘍 S 180 を用い、正常マウス皮下に 10^6 個の腫瘍細胞を移植すると 50 日で全例死亡し、腫瘍の大きさも増大するが、マウスを BCG で感作しておくで腫瘍の増大は若干抑制される。しかし腫瘍は全例生着し、腫瘍死する。一方、感作マウスに腫瘍と BCG を混ぜたものを移植すると腫瘍の生着は阻止されとの結果を報告している。著者の実験でも腫瘍は移植後経日的に増大し、全例腫瘍死した。BCG 感作群では腫瘍の生着は阻止できなかったが増殖抑制はみられ、特に感作+移植後 3 日目よりの BCG 再接種群に増殖抑制が最も強くみられ、感作のみ、感作+移植後 14 日目よりの再接種群の順であった。これは徳永らの実験と異なり腹腔内接種であるため、腫瘍細胞と BCG の混合移植によるもの程強くリンパ球・大単核球の集合がみられず、腫瘍細胞に対する影響が小さかったものと考ええる。非感作群ではやはり腫瘍移植後 3 日目よりの接種群が最も強く腫瘍増殖抑制を示した。これらの実験より BCG の抗腫瘍効果発現までには、感作群・非感作群共に約 2 週間程度の日数が必要と考えられ、田中²⁶⁾らの感作時期を検索する実験と同様の結果を得た。

III LMS 投与群

Levamisole は元来、線虫の駆虫剤として開発された薬剤である。Renoux ら³¹⁾により初めて抗腫瘍効果をもたらす薬剤であることが見出された。LMS は L-2,3,5,6, tetrahydro-6-phenylimidazo [2,1-6] thiazole hydrochloride の構造式をもち、分子量が 240.75 の安定な白色結晶状粉末で水溶性、酸性で安定なものである。Symoens³²⁾らによれば LMS は phagocytes や Lymphocytes に対し表 9 の如き作用があるといわれ、特に細胞性免疫能が低下している状態で LMS を投与すると、T 細胞・外核白血球・大食細胞の cyclic GMP の濃度が上昇し、それらの細胞の増殖や活性が亢進し、細胞性免疫能が賦活、正常化される。この効果はリンパ球の mitogen に対する幼若化反応の増強、E-rosett forming cell の増加⁴³⁾、PPD や DNCB 反応³¹⁾の増強等で示されている。また、LMS の細胞性免疫能へ及ぼす影響は宿主の細胞性免疫の状態に左右されるとされ、手術後や癌宿主など

細胞性免疫能が低下した状態へ LMS を投与すると、E-rosett forming cell が増加したり、PPD 皮膚試験が陽性になったりして細胞性免疫能は賦活されとの報告は多い³⁴⁻³⁶⁾。一方、正常免疫状態に LMS を投与しても細胞性免疫能には影響しないとされている。また、担癌動物において、腫瘍移植直後から LMS を投与したのでは以後の腫瘍増殖に何ら影響を与えず、むしろ腫瘍の増殖を促す傾向があるが、腫瘍移植後数日たって腫瘍が生着増殖しはじめる時期から LMS を投与するなら単独で使用しても抗腫瘍性に働くという報告がある^{37,42,44,45)}。折田ら³⁷⁾は自然発生乳癌マウスと MH 134 肝細胞癌移植マウスを使った実験で、自然発生乳癌担癌マウスに LMS を投与すると腫瘍の完全退縮 1 例を含め 12 例中 8 例に腫瘍の増殖抑制がみられ、また MH 134 肝細胞癌担癌マウスにおいては、腫瘍移植後 10 日目より LMS の投与によって腫瘍の完全退縮を含め 10 例中 5 例に腫瘍の増殖抑制がみられたことを報告している。また Fidler & Spitler³⁸⁾ はマウスへ同系腫瘍を静注する 1 日前に LMS 12mg/kg を腹腔内投与しておくで、有意に肺転移の頻度が低下したが、腫瘍移植の 3 または 5 日前に LMS を投与しておくでかえって肺転移は増加したことを報告している。小野ら³⁹⁾は担癌マウスの免疫応答におよぼす LMS の影響を観察し、LMS の投与により ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity)、MICC (mitogen-induced cellular cytotoxicity) 活性の上昇がさらに増強されることを観察し、また腫瘍を切除すれば LMS を投与しても ADCC、MICC 等に何ら影響がみられなかったことを報告している。最近では LMS 投与により、インターフェロン誘起能作用⁴⁰⁾やヒト血清補体価上昇作用⁴¹⁾がみられたことが報告されている。著者の実験では免疫学的検索は行っていないが、腫瘍増殖に対し腫瘍移植前投与および腫瘍移植後 3 日目よりの投与ではあまり効果は認められないが、腫瘍移植後 14 日目よりの投与(腫瘍増殖時)では 4 週目頃より腫瘍退縮がみられ、完全退縮も 3 例にみられた。

BCG 接種に比して腫瘍増殖抑制効果は強く認められないが、LMS 単独投与によってもあ

る程度の増殖抑制効果がみられ、腫瘍移植3日前に10mg/kgの多量の投与によりBCG接種群に近い増殖抑制効果がみられたが、全例腫瘍死し、腫瘍の退縮はみられなかった。

これは正常状態または担癌早期にLMSを投与したのでは以後の腫瘍増殖・延命にあまり効果なく、腫瘍が生着増殖してからLMSを投与すれば抗腫瘍性に働くことを示唆しているものと考ええる。

結 語

Ehrlich 腹水癌細胞を用い、マウスにおける実験的漿膜浸潤モデルを作製し、その腹膜面における癌細胞浸潤過程を経日的に観察した。さらにBCG, LMSをマウス腹腔内に注入し、その抗腫瘍効果を検索した。

1. Ehrlich 癌細胞移植後3日目までは腹膜の変化はあまり認めなかったが、7日目になり腹膜細胞の軽度の膨隆がみられ、その細胞間隙の哆開がみられた。

2. 10日目になり腹膜細胞は著明に膨隆し、その細胞間隙の哆開は高度になった。その哆開部より腫瘍細胞の露出が認められた。

3. 14日目になり腹膜表面は腫瘍細胞で被われ、一部では腹膜細胞が脱落しているのが認められた。

4. BCG 感作を行なうと腫瘍移植後7日目には腹膜細胞表面のmicrovilliはその密度を増し、毛ば立ち・網目状構造を呈し、腹膜細胞間の哆開はみられず、microvilliの変化が腹膜細胞間の結合に関与している様に考えられた。10日目ではmicrovilliの変化は7日目と変わらないが、細胞間隙より腫瘍細胞が露出しているのが認められた。14日目以降では腹膜細胞は残存

しているが、癌細胞の浸潤増殖が高度に認められた。抗腫瘍効果は感作群が非感作群に比して腫瘍径、最長生存日数、平均生存日数、生存率全てに良く、特に感作+腫瘍移植後3日目よりの週2回接種群が一番効果的であった。

5. LMS 投与では腫瘍移植後7日目まではあまり変化は認められないが、10日目になり腫瘍は腹膜面に露出し、14日目以降では腹膜全面を腫瘍細胞が被うようになっていた。

BCG 群に比しmicrovilliの変化はあまり強く認められなかったが、対照群に比してやはりmicrovilliの密度が増加していた。抗腫瘍効果はBCG程強く認められなかったが、腫瘍移植後14日目よりの投与群で腫瘍の退縮がみられ完全退縮も3例にみられた。

以上より、癌細胞の漿膜浸潤はまず漿膜細胞間が癌細胞の物理的圧迫によって哆開を来とし、その間隙より腹腔内に露出して来る過程が観察された。BCG投種により、形態学的には腹膜表面のmicrovilliの毛ば立ち、網目状構造がみられ、細胞間の結合を強くしている様に考えられた。BCGの抗腫瘍効果は腫瘍径、生存率等の検索で腹腔内接種でも有効と考えられた。LMS投与ではBCG程強く抗腫瘍効果はみられないが、腫瘍増殖時よりの投与では腫瘍の退縮がみられた。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました折田薫三教授に感謝致します。さらに御教示、御協力いただきました川崎医科大学附属川崎病院病理部門 伊藤慈秀教授に感謝するとともに、研究室の諸先生、諸嬢および上平正子氏に感謝致します。

(本研究の一部は昭和55年度第39回日本癌学会および昭和56年第9回BCG免疫療法研究会において発表した。)

文 献

1. 西 満正, 大山 満, 中島聡雄, 大橋一郎, 西俣嘉人, 坂元五偉: 癌性腹膜炎(播種)の発生病理. 外科, 35, 385—390, 1974.
2. Birbeck, M.S.C. and Wheatly, D.N.: An Electron Microscopic Study of the Invasion of Ascites tumor cells into the abdominal wall. *Cancer Res.* 25, 490—497, 1965.
3. 岡林弘毅: 癌の腹膜播種の成立機序に関する実験的研究. 岡山医会誌, 90, 1275—1288, 1978.
4. 工藤浩史: 腹水肝癌細胞 AH100B 移植ラットにおける実験的腹膜播種の走査電顕的観察. 日外会誌, 80,

- 147—163, 1979.
5. 郡家信晴：癌細胞と腹膜，その着床と治療に関する実験的研究。川崎医学会誌，6，137—154，1980.
 6. Wheatly, D.N., Ambrose, E.J. and Easty, G.C.: Infiltration of intra-abdominal organs by ascites tumors. *Nature* 199, 188—189, 1963.
 7. 村上 敏：腫瘍細胞の腹膜播種抑制に関する実験的研究。米子医誌，24，354—377，1973.
 8. Jones, D.S., Wallace, A.C. and Fraser, E.E.: Sequence of event in experimental metastases of Walker 256 tumor, Light, Immunofluorescent, and Electron Microscopic observations. *J. Natl. Cancer Inst.* 46, 493—504, 1971.
 9. Buck, R.C.: Walker 256 tumor implantation in normal and injured peritoneum studied by Electron Microscopy, Scanning Electron Microscopy, and Autoradiography. *Cancer Res.* 33, 3181—3188, 1973.
 10. Kaneshima, S., Kudo, H., Kosaka, H., Iitsuka, Y., Kimachi, H. and Koga, S.: A Scanning Electron Microscopic Study on implantation of Ehrlich ascites tumor cells in the peritoneal layer. *Yonago Acta Med.* 20, 101—107, 1976.
 11. 喜安佳人：胃癌の腹膜転移に関する走査電顕的研究。米子医誌，29，365—379，1978.
 12. 金島新一，喜安佳人，工藤浩史，飯場保夫，谷田 理，竹内 隆，古賀成昌：胃癌細胞の漿膜面露出の走査電顕的観察。癌の臨床，23，1227—1232，1977.
 13. Odor, D.L.: Observations of the rat mesothelium with the electron and phase microscopes. *Am. J. Anat.* 95, 433—465, 1954.
 14. Fukata, H.: Electron Microscopic Study on Normal Rat Peritoneal Mesothelium and its changes in absorption of particulate iron Dextran Complex. *Acta Pathol. Jpn.* 13, 309—325, 1963.
 15. Andrews, P.M. and Porter, K.R.: The Ultrastructural Morphology and Possible Functional Significance of Mesothelial Microvilli. *Anat. Rec.* 177, 409—426, 1973.
 16. 工藤浩史：ラット正常腹膜の走査電顕的観察。細胞，9，132—136，1977.
 17. Old, L.J., Benacerraf, B., Clarke, D.A., Carswell, E.A. and Slockert, E.: The Role of the Reticulo-endothelial System in the Host Reaction to Neoplasia. *Cancer Res.* 21, 1281—1300, 1960.
 18. 徳永 徹：BCG と腫瘍免疫。医学のあゆみ，84，603—611，1973.
 19. 徳永 徹：BCG と癌。臨床科学，9，1129—1132，1973.
 20. 徳永 徹，片岡哲朗，中村玲子，山本三郎，室橋豊穂：BCG による癌の免疫療法。医学のあゆみ，91，483—489，1974.
 21. 徳永 徹，片岡哲朗，中村玲子，山本三郎：BCG による癌の免疫療法—実験腫瘍学からの示唆—。臨床科学，10，291—299，1974.
 22. 徳永 徹：BCG の抗腫瘍作用の生物学的基礎。癌の臨床，21，768—774，1975.
 23. 徳永 徹：癌とマクロファージ—BCG 療法を中心として—。ピシバニール研究会誌，pp. 76—111，1979.
 24. Rapp, H.J., Churchill, W.H., Kronman, B., Rolley, R.T., Hammond, W.G. and Borsos, T.: Antigenicity of a new diethylnitrosamine-induced transplantable guinea pig hepatoma: Pathology and formation of ascites variant. *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 1—11, 1968.
 25. Kataoka, T., Nakamura, R., Yamamoto, S., Tokunaga, T., Murohashi, T. and Tanaka, T.: Effect of BCG on carcinogen-induced tumor development in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 25, 377—382, 1972.
 26. 田中富子：BCG と腫瘍細胞の direct contact による Immunotherapy. 医学のあゆみ，77，599—604，1971.
 27. 小林征二，守安文明，橋本雅明，田中紀章，万波徹也，折田薫三：癌腹膜播種に対する BCG 免疫療法。第37回日本癌学会総会記事，pp. 260，1978.

28. Hanna, M.G., Zbar, Jr.B. and Rapp, H.J.: Histopathology of Tumor Regression After Intralesional Injection of Mycobacterium bovis. 1. Tumor Growth and Metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* **48**, 1441—1455, 1972.
29. Bartlett, G.L., Zbar, B. and Rapp, H.J.: Suppression of Murine Tumor Growth by Immune Reaction to the Bacillus Calmette-Guerin Strain of Mycobacterium bovis. *J. Natl. Cancer Inst.* **48**, 245—257, 1972.
30. Tokunaga, T., Kataoka, T., Nakamura, R., Yamamoto, S. and Tanaka, T.: Tumor immunity induced by BCG-tumor cell mixtures in syngeneic mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **26**, 71—85, 1973.
31. Renoux, G. and Renoux, M.: Levamisole Inhibits and Cures a Solid Malignant Tumour and its Pulmonary Metastases in mice. *Nature New Biol.* **240**, 217—218, 1972.
32. Symoens, J. and Rosenthal, M.: Levamisole in the modulation of the immune response: the current experimental and clinical state. *J. Reticuloendothel. Soc.* **21**, 175—221, 1977.
33. 折田薫三: Levamisole について. 癌と化学療法, **6**, 689—693, 1979.
34. 三輪恕昭, 折田薫三: Levamisole を用いる胃癌免疫化学療法. 癌と化学療法, **6**, 1363—1373, 1979.
35. 清水法男, 平井泰明, 奥 英敏, 浜副隆一, 金山博友, 前田迪郎, 古賀成昌: Levamisole 術前投与による術後早期における細胞性免疫能の低下防止. 医学のあゆみ, **112**, 34—36, 1980.
36. 三輪恕昭, 河合知則, 中原東亜, 黒瀬康平, 小林征二, 湊 宏司, 万波徹也, 小長英二, 折田薫三: 手術侵襲による細胞性免疫能の低下と Levamisole によるその防止. 臨床免疫, **11**, 121—127, 1979.
37. 折田薫三, 大江新野, 日伝晶夫, 中原東亜, 三輪恕昭: Levamisole の自然発生乳癌マウスおよび MH134 肝癌細胞移植マウスに対する抗腫瘍効果. 医学のあゆみ, **101**, 597—598, 1977.
38. Fidler, I.J. and Spitler, L.E.: Effects of Levamisole on In Vivo and In Vitro Murine Host Response to Syngeneic Transplantable Tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 1107—1112, 1975.
39. 小野 稔, 藤原良一, 橋本俊明, 田中紀章, 三輪恕昭, 万波徹也, 小長英二, 折田薫三: 担癌マウスの免疫応答におよぼす Levamisole (LMS) の影響. 癌と化学療法, **7**, 1988—1997, 1980.
40. 松原秀三, 鈴木富士夫, 石田名香雄: 免疫賦活剤 Levamisole のインターフェロン誘起能. 医学のあゆみ, **104**, 92—94, 1978.
41. 近藤元治, 加藤治樹, 横江信義, 竹村周平: 免疫賦活剤 Levamisole のヒト血清補体価上昇作用. 医学のあゆみ, **106**, 190—191, 1978.
42. Rojas, A.F., Mickiewicz, E., Feierstein, J.N., Glait, H. and Olivari, A.J.: Levamisole in Advanced human breast cancer. *Lancet* **1**, 211—215, 1976.
43. Ramot, B., Biniaminov, M., Shoham, C. and Rosenthal, E.: Effect of levamisole on E-rosette-forming cells in vivo and in vitro in Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* **294**, 809—811, 1976.
44. Potter, C.W., Carr, I., Jennings, R., Rees, R.C., McGinty, F. and Richardson, V.M.: Levamisole inactive in treatment of four animal tumours. *Nature* **249**, 567—569, 1974.
45. Johnson, R.K., Hauchens, D.P., Gaston, M.R. and Goldin, A.: Effects of Levamisole (NSC-177023) and Tetramisole (NSC-102063) in Experimental Tumor Systems. *Cancer Chemother. Rep.* **59**, 697—705, 1975.
46. 野上浩実: MLC suppressor cell に対するレバミゾールの効果. 岡山医誌, **92**, 393—405, 1980.

**Effect of BCG and Levamisole on peritoneal invasion
of cancer: experimental study in mice.**

Koichi NISHIHARA

The First Department of Surgery, Okayama University

Medical School, Okayama

(Director: Prof. K. Orita)

An insight into the mechanism of cancer invasion through the serosa of digestive organs has not been obtained since an adequate experimental model has not been found. In this report, the mouse abdominal wall was considered as intestinal wall and the invasive pattern of cancer cells into the peritoneum was examined morphologically by means of scanning electron microscopy (SEM). The effects of BCG and Levamisole (LMS) on the invasion and growth of cancer were also studied. When Ehrlich ascites tumor cells were implanted into the subcutaneous layer of the abdominal wall, the mesothelial cells became round, and the intercellular space expanded 7 days after the implantation. The tumor cells invaded the intercellular space by the 10th day. The mesothelial microvilli became dense and formed a meshwork 7 days after the tumor implantation in combination with an interperitoneal injection of BCG, resulting in firm intercellular binding. The condition was much more obvious on the 10th day. The enhancement of intercellular binding by BCG may play a role in preventing peritoneal invasion. Administering BCG before tumor implantation was better in preventing than administering it after the implantation. The most effective way was to administer BCG before the implantation, followed by two times a week from the 3rd day after the implantation. When LMS was used, the microvilli became quite dense, but not as much as with BCG. With administration of LMS from the 14th day after tumor implantation regression of tumor growth occurred, although the efficacy of LMS was less than that of BCG.