

Aus der II. Chirurgischen Universitätsklinik Osaka
(Direktor: Prof. Dr. M. KURU)

Über die Phosphoamidaseaktivität der Magenschleimhaut bei verschiedenen Magenkrankheiten

Von

T. SUGIMOTO

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. November 1961)

Beim histochemischen Nachweis der Phosphoamidase zeichnen sich Carcinomzellen in der Regel durch eine starke Aktivität dieses Enzyms aus (GOMORI). Allerdings konnten mit der von GOMORI (1948) angegebenen Nachweismethode häufig keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden; teilweise widersprachen die Resultate einander.

Wir haben im Rahmen morphologischer und histochemischer Untersuchungen an präcancerösen Veränderungen verschiedener Organe (MAGOSHI 1957; YASUI 1959; SUGITA 1959; OUE 1959; WATANABE 1959; IMANISHI 1959; KURU und HIROSE 1961) auch das histochemische Verhalten der Phosphoamidase in der normalen und pathologisch veränderten Magenschleimhaut geprüft. Dabei erwies es sich als notwendig, die von GOMORI angegebene Nachweismethode zu überprüfen. Über das Ergebnis unserer methodischen Untersuchungen sowie über die Lokalisation der Phosphoamidase in der normalen und pathologisch veränderten Magenschleimhaut soll im folgenden berichtet werden.

Material und Methodik

Als Untersuchungsmaterial dienten 124 operativ entfernte Magen. Sofort nach der Operation wurden jeweils mehrere Gewebstückchen von normaler und pathologisch veränderter Magenschleimhaut entnommen. Das Material wurde 24 Std in Aceton bzw. absolutem Alkohol bei -4 bis -6°C fixiert und anschließend in Paraffin (Schmelzpunkt 50 — 52°C) eingebettet. Es hat sich weiterhin bewährt, jeweils mehrere Gewebsschnitte von unterschiedlicher Schnittdicke (4 , 6 und $8\ \mu$) zusammen auf einem Objektträger aufzuziehen. Dadurch konnte in den einzelnen Präparaten ein ähnliches Resultat erzielt werden wie bei verschieden langer Inkubationsdauer bei ein und derselben Schnittdicke.

Die Enzymreaktion wurde meist in Anlehnung an die Originalmethode von GOMORI durchgeführt. In ausgedehnten Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß der *Reinheitsgrad* der p-Chloroanilidophosphorsäure für die Durchführung der Enzymreaktion von ausschlaggebender Bedeutung ist. Zur Herstellung bzw. Reinigung des zweimal umkristallisierten Substrates hat sich folgendes Verfahren bewährt:

Rohe und noch nicht getrocknete p-Chloroanilidophosphorsäure (nach dem Verfahren von OTTO hergestellt) wurde unter Erhitzen in 95%igem Alkohol gelöst und anschließend sofort in Eiswasser abgekühlt. Die sich über Nacht bildenden weißen, seidenglänzenden Kristalle wurden in einer Kühlzentrifuge gesammelt und anschließend mehrmals in 75%igem Alkohol gewaschen und über Calciumchlorid getrocknet. Anschließend wieder Umkristallisation aus 75%igem Alkohol. Der Reinheitsgrad der Kristalle ließ sich durch quantitative Analyse der organischen und anorganischen Phosphorsäure (nach TAKAHASHI in der Modifikation von MARTIN-DOTY) auf mindestens 99,8% bestimmen.

Wenn die gereinigte p-Chloroanilidophosphorsäure dem Bleinitrat-Puffergemisch zugegeben wird, entstehen — im Gegensatz zu dem von GOMORI verwandten Substrat — auch nach 3 Std bei 52° C bzw. nach 6 Std bei 37° C keine Niederschläge.

Die Inkubationszeit betrug 10—12 Std bei 37° C und pH 5,6. Nach der Behandlung mit einer verdünnten Ammoniumsulfidlösung wurden die Schnitte zur Entfernung unspezifischer Bleiniederschläge für einige Stunden in absolutem Alkohol eingestellt. Kernfärbung mit Mayers-Hämalaun.

Als Kontrollreaktionen dienten: Inkubation ohne Substratzusatz, Hitzeinaktivierung sowie Hemmung der Fermentreaktion durch Lugolsche Lösung.

An Serienschnitten kamen weiterhin die histochemischen Nachweisreaktionen für saure Phosphatase nach GOMORI sowie nach GROGG und PEARSE zur Anwendung. Dabei wurde die Bleiphosphatmethode (GOMORI) nur für eine methodische Untersuchung der Phosphoamidase berücksichtigt.

Ergebnisse (vergl. Tabelle)

In der *normalen Magenschleimhaut* findet sich beim histochemischen Nachweis der Phosphoamidase in den Becherteilen der Foveola-Zellen ein mäßig starker Reaktionsausfall, der besonders zum Halsteil hin ausgeprägt ist. Die Oberflächen-

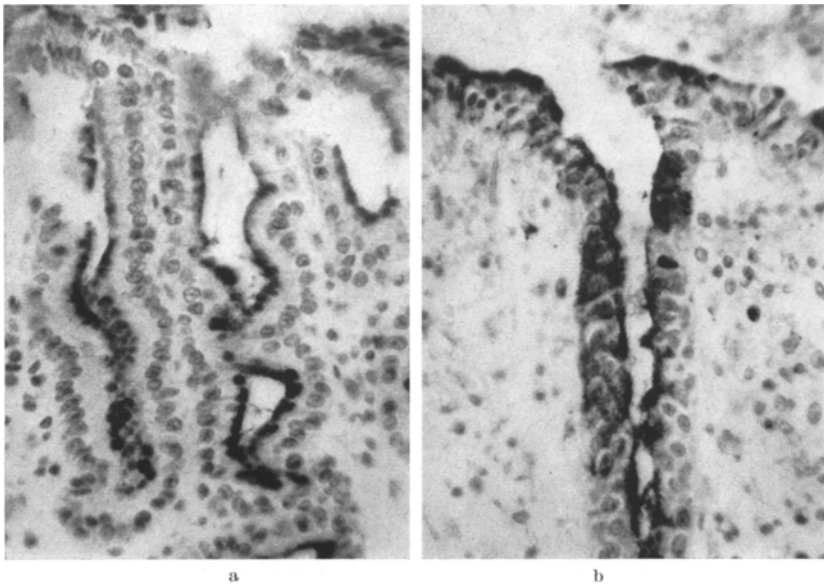


Abb. 1a u. b. a Phosphoamidaseaktivität in der normalen Magenschleimhaut im Bereich der Becherteile der Foveola-Zellen und Oberflächenepithelien. 290mal. b Im ganzen Cytoplasma verteilte Enzymaktivität im anaplastischen Regenerat eines Geschwürsrandes. 290mal

epithelien besitzen nur eine schwache Aktivität im Bereich ihrer Becherteile (Abb. 1a). Haupt- und Nebenzellen der Fundusdrüsen sowie die Pylorusdrüsen enthalten fast keine histochemisch nachweisbare Phosphoamidase; nur Belegzellen sind mitunter fermentpositiv.

Dünne, einschichtige *Schleimhautregenerate* am Rand von Geschwüren zeigen im Cytoplasma nur eine sehr geringe Fermentreaktion. Im Gegensatz dazu weisen die mit chromatinreichen Kernen versehenen Zellen in anaplastischen Regeneraten eine über das ganze Cytoplasma verteilte deutliche Phosphoamidaseaktivität auf (Abb. 1b).

Auch bei der *Dünndarmmetaplasie* findet sich in den Epithelien eine deutliche Fermentreaktion, welche im apikalen Teil der Zellen lokalisiert ist. Die Vacuolen der Becherzellen fallen stets negativ aus (Abb. 3a). Bei der hyperplastischen und anaplastischen Dünndarmmetaplasie nimmt die Fermentaktivität deutlich zu; sie ist bei letzterer über das gesamte Cytoplasma der Epithelien verteilt (Abb. 3b).

Carcinome zeichnen sich regelmäßig durch eine außerordentlich starke, das ganze Cytoplasma einnehmende Phosphoamidaseaktivität aus, welche mit fortschreitender Entdifferenzierung des Krebsgewebes zunimmt. So weisen scirrhöse und medulläre Magencarcinome die stärkste Enzymaktivität auf (Abb. 4a). In Gallertkrebsen zeigen sowohl die einzeln im Schleim liegenden Krebszellen als auch die zusammenhängenden Epithelien eine starke Fermentreaktion, wobei die Aktivität in den letzteren stärker ausgeprägt ist. Die Schleimschubstanzen sowie die Vacuolen der Siegelringzellen fallen negativ aus (Abb. 4b).

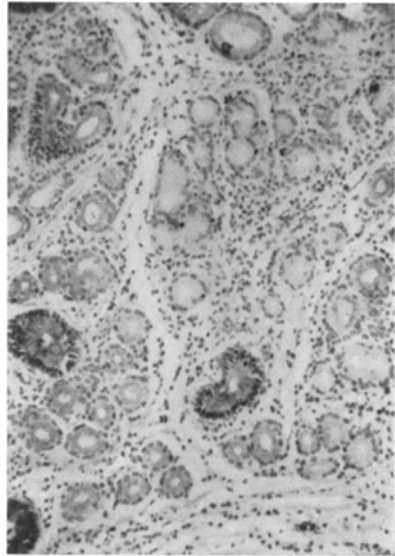


Abb. 2. Deutliche Phosphoamidaseaktivität in Zellgruppen mit chromatinreichen Kernen im Bereich von Pylorusdrüsen. 80mal

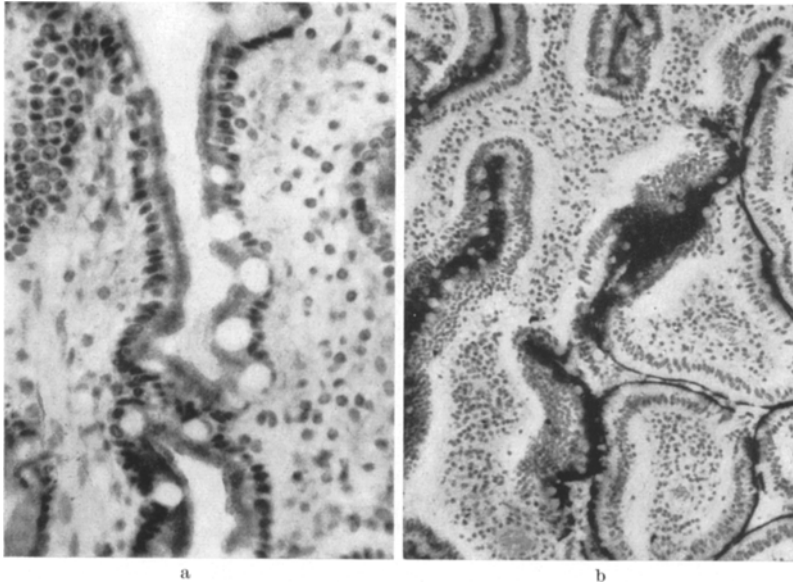


Abb. 3. a Dünndarmmetaplasie: deutliche Phosphoamidaseaktivität im apikalen Teil der Schleimhaut-epithelien; die Vacuolen der Becherzellen sind fermentnegativ. 290mal. b Hyperplastische Dünndarmmetaplasie mit intensiver Fermentaktivität. 80mal

In Adenocarcinomen des Magens ist die Fermentreaktion etwas schwächer ausgeprägt als in scirrhösen oder medullären Krebsen (Abb. 5a und b).

In der *Nachbarschaft von infiltrierend wachsenden Carcinomzellen* konnte an normalen Epithelien der Magenschleimhaut eine sehr intensive Phosphoamidase-

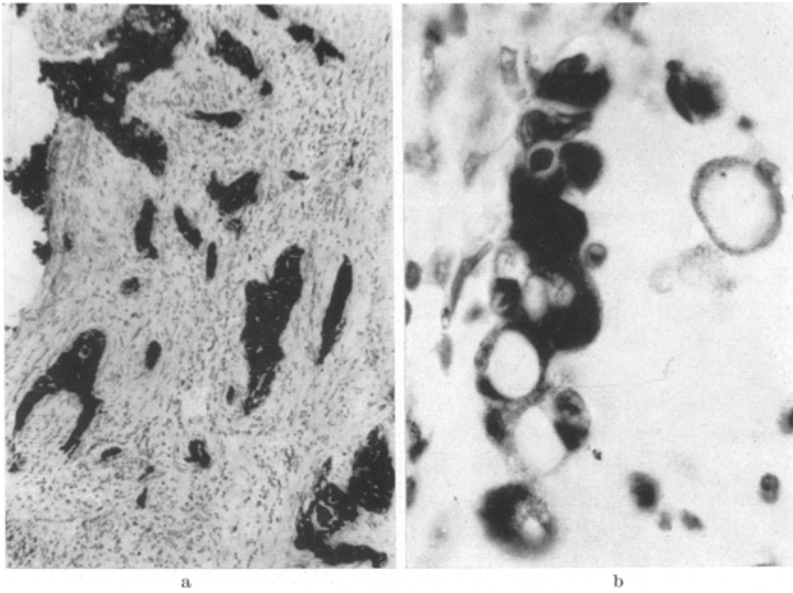


Abb. 4. a Scirrhes Magencarcinom: sehr starke Phosphoamidaseaktivität in den Krebszellen. 80mal.
b Starke Enzymaktivität in Siegelringzellen; die Vacuolen bleiben frei. 710mal

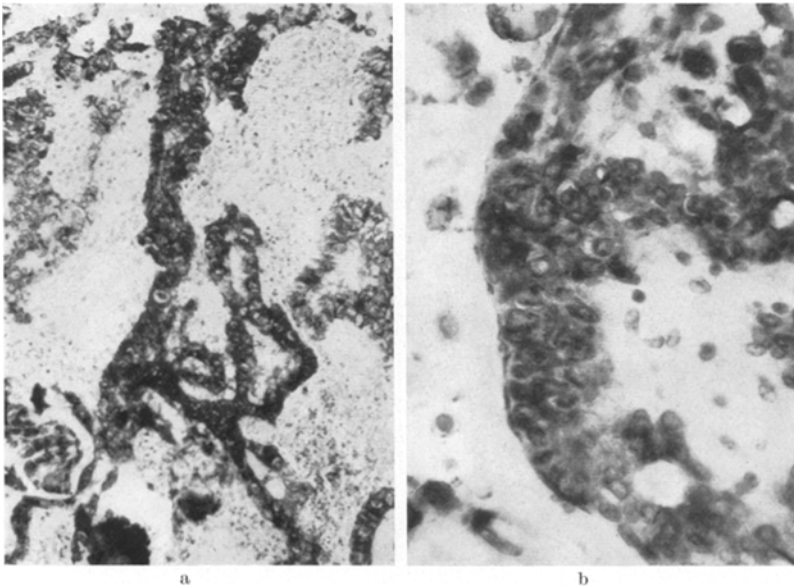


Abb. 5a u. b. Deutliche Phosphoamidaseaktivität in einem Adenocarcinom des Magens. 80mal

aktivität festgestellt werden, während in entsprechenden, weiter entfernt liegenden Schleimhautepithelien nur der normale Reaktionsausfall anzutreffen war. Dieser Befund kann unseres Erachtens nicht auf ein Diffusionsartefakt zurückgeführt

werden, da das zwischen Carcinomgewebe und normalem Schleimhautepithel gelegene Bindegewebe keine Anfärbung zeigt.

Vergleichende Untersuchungen mit der Nachweismethode für *saure Phosphatase* ergeben an der normalen Magenschleimhaut folgendes Verteilungsmuster: Ähnlich wie bei der Phosphoamidase ist sowohl in den Haupt- und Nebenzellen der Fundusdrüsen als auch in den Pylorusdrüsen keine oder nur eine geringe Fermentaktivität nachweisbar. Im Gegensatz zur Phosphoamidase findet sich in den Oberflächenepithelien und Foveolazellen ein mehr diffuser Reaktionsausfall, wobei die Becherteile hier frei bleiben. Bei der Dünndarmmetaplasie findet sich eine ziemlich deutliche Fermentaktivität in den apikalen Anteilen der Epithelien. In entdifferenzierten Adenomen sowie in Adenocarcinomen läßt sich eine intensive Aktivität von saurer Phosphatase nachweisen. Im Gegensatz zur Phosphoamidase zeigt die saure Phosphatase keine so deutliche Abhängigkeit von der Anaplasie des Krebsgewebes. In entdifferenzierten Carcinomen findet sich gewöhnlich nur eine mäßig starke Phosphataseaktivität.



Abb. 6. Phosphoamidaseaktivität in den Tumorzellen eines scirrhösen Carcinoms. Das darüber liegende fermentpositive Epithel weist eine Ähnlichkeit mit der Dickdarmschleimhaut auf. 290mal

Tabelle

	Phosphoamidase		Saure Phosphatase		R. N. S.	
	Aktivität	intra-celluläre Lokalisation	Aktivität	intra-celluläre Lokalisation	Aktivität	intra-celluläre Lokalisation
Fundusdrüse . . .	0 ¹		0 bis +	basal	++ ²	basal
Pylorusdrüse . . .	0		0 bis +	basal	+	basal
Deckepithelien . .	+	Becherteil	+	bis auf Becherteil	+	bis auf Becherteil
Foveola	++	Becherteil	+	bis auf Becherteil	++	bis auf Becherteil
Regenerat	0 bis +	apikal	0 bis +	g. P.	+	g. P.
Anaplastisches Regenerat . . .	++	g. P. ³	++	g. P.	++	g. P.
Darmmetaplasie .	++	apikal	++	apikal	++	apikal
Anaplastische Darmmetaplasie	+++	unbestimmt	+++	unbestimmt	+++	unbestimmt
Adenocarcinom . .	++++	g. P.	++	g. P.	+++	g. P.
Gallertkrebs . . .	++++	bis auf Vacuolen	++	bis auf Vacuolen	+++	bis auf Vacuolen
Scirrhus	+++++	g. P.	++	g. P.	++++	g. P.
Medullarkrebs . .	+++++	g. P.	++	g. P.	++++	g. P.

+ schwach positiv, ++ mäßig positiv, +++ stark positiv, ++++ sehr stark positiv, +++++ außerordentlich stark positiv. ¹ Belegzellen fallen mitunter positiv aus, ² Belegzellen sind gewöhnlich farblos. ³ g. P. im ganzen Protoplasma.

Vergleicht man die Verteilung der *Ribonucleinsäure* mit der Lokalisation der Phosphoamidase, so läßt sich bei den Carcinomen sowie bei der Dünndarmmetaplasie (Abb. 7a) eine weitgehende Übereinstimmung feststellen. Dagegen bestehen in den Epithelien der normalen Schleimhaut deutliche Unterschiede: Die Becherteile der Oberflächenepithelien und Foveolazellen weisen keine cytochemisch feststellbare Ribonucleinsäure auf (Abb. 7b), während Haupt- und Nebenzellen der Fundusdrüsen reich an Ribonucleinsäure sind (s. Tabelle).

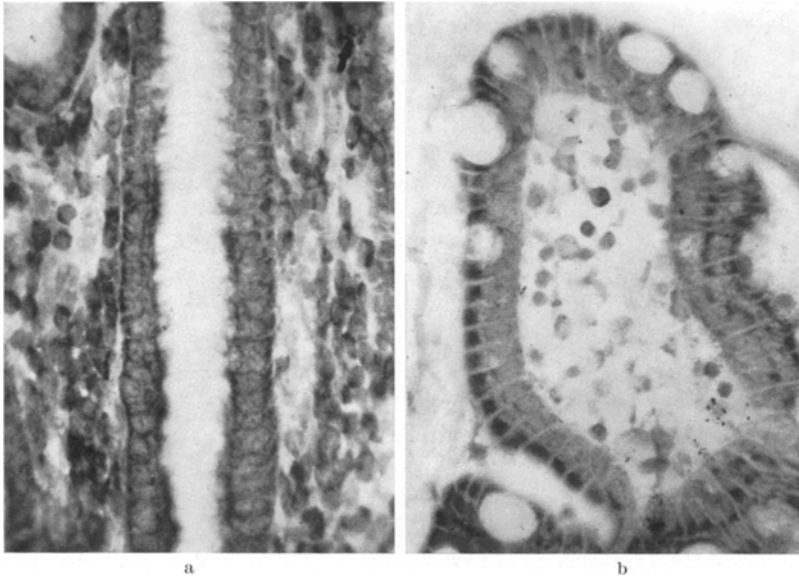


Abb. 7. a Methylgrün-Pyronin-Färbung: keine nachweisbare Ribonucleinsäure im Bereich der Becherteile von normalen Foveola-Zellen. 290mal. b Dünndarmmetaplasie: auffallende Ähnlichkeit in der Lokalisation der Ribonucleinsäure bei der Methylgrün-Pyronin-Färbung mit dem Verteilungsmuster der Phosphoamidase (vgl. Abb. 3a.) 290mal

Diskussion

Mit der von GOMORI (1948) angegebenen histochemischen Nachweismethode für die Phosphoamidase konnten häufig keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden (vgl. PEARSE). Auch GOMORI selbst hatte Bedenken an der Zuverlässigkeit dieser Methode. Die Frage, ob es sich bei der Phosphoamidase um ein eigenes Enzym handele, welches Phosphoamidbindungen spezifisch zu spalten vermag, ließ sich bisher nicht eindeutig klären. Eingehendere methodische Untersuchungen zum histochemischen Nachweis dieses Enzyms wurden von MEYER und WEINMANN (1953, 1955) durchgeführt, die außerdem die Verteilung der Phosphoamidaseaktivität in normalen und pathologisch veränderten Geweben der Mundhöhle bestimmten.

Unsere Überprüfung der Methode von GOMORI hat gezeigt, daß der *Reinheitsgrad des Substrates* von ausschlaggebender Bedeutung für den Reaktionsausfall ist. Durch die Untersuchungen von RORIG ist bekannt, daß GOMORI bei seinen Untersuchungen nicht das Monoamid, sondern das Diamid als Substrat verwandte.

Das zum Teil von deutschen Autoren (EBNER und STRECKER 1951; STOLL u. Mitarb. 1951; NEUMANN u. Mitarb. 1954; OELERT u. Mitarb. 1954; SEPP 1954)

benutzte Substrat der Firma Bayer hat offenbar einen höheren Reinheitsgrad als die von anderen Untersuchern angewandte p-Chloroanilidophosphorsäure. Bei Verwendung des nach unserer Vorschrift gereinigten Substrates läßt sich bei der histologischen Nachweisreaktion eine gute Lokalisation der Phosphoamidase erzielen. Es sind nur wenige Artefakte nachweisbar.

Bei der histochemischen Nachweisreaktion wird in der Literatur meist ein pH -Wert von 5,4—5,6 angegeben. Außerdem wurde aber auch bei pH 5,2 (MEYER und WEINMANN 1955) und pH 4,6 (STOLL u. Mitarb. 1951; SANDRITTER und SCHREIBER 1958) gearbeitet. Die vorliegenden Untersuchungen haben ergeben, daß bei einem pH -Wert über 6,0 die Reaktion deutlich abgeschwächt wird, während unterhalb pH 5,2 Kunstprodukte durch unspezifische Bleisulfidniederschläge auftreten; das Bild ähnelt dann mehr dem Verteilungsmuster der sauren Phosphatase bei Anwendung der Gomori-Methode.

Eine Anfärbung der Kerne bei der Phosphoamidasereaktion, wobei es sich offensichtlich nicht um eine Fermentreaktion, sondern um ein Kunstprodukt handelt, dürfte — ähnlich wie bei der Nachweismethode für die saure Phosphatase — im wesentlichen auf drei Faktoren zurückzuführen sein:

1. Länger als 18 Std dauernde Inkubationszeiten führen oft zu einem intensiven Reaktionsausfall in den Kernen.
2. Je stärker die Acidität der Inkubationslösung ist, um so häufiger kommt es zu einer Anfärbung der Kerne.
3. Es besteht eine deutliche Abhängigkeit zwischen Fixierungsbedingungen und Kernreaktionen: Nach Fixierung in eiskaltem Aceton oder Alkohol bleibt eine Anfärbung der Kerne aus. Auch EBNER und STRECKER berichten, daß nach dieser Art der Fixierung bei 12—15stündiger Inkubationsdauer nur eine geringe Kernreaktion nachweisbar ist. Unsere Ergebnisse stimmen mit diesen Beobachtungen überein. Im Gegensatz dazu zeigen die Kerne nach Fixierung in eiskaltem Formalin eine Anfärbung, die um so stärker ausfällt, je länger fixiert wurde. Die Fermentreaktion im Cytoplasma schwächt sich bei längerer Fixierdauer im Formalin ab. Nach NEUMANN u. Mitarb. findet sich auch an gefriergetrocknetem Material eine Kernreaktion.

Systematische Untersuchungen über die histochemisch nachweisbare Phosphoamidaseaktivität in der Magenschleimhaut bei verschiedenen pathologischen Zuständen sind bislang nicht durchgeführt worden. Nach den vorliegenden Befunden steht die Aktivität und Verteilung der Phosphoamidase in engem Zusammenhang mit der Zellproliferation. Das geht auch daraus hervor, daß in der normalen Magenschleimhaut die stärkste Enzymaktivität stets am Halsteil einer Foveola anzutreffen ist. Gerade in diesem Bereich findet sich bekanntlich die Proliferationszone der Magenschleimhaut. Auch eine Anaplasie der Zellen ist hier am häufigsten anzutreffen. Mit fortschreitender *Proliferationstendenz* und *Anaplasie* des Gewebes kommt es zu einer zunehmenden *Aktivitätssteigerung der Phosphoamidase* (vgl. Tabelle). Außerdem findet sich dann im ganzen Cytoplasma ein positiver Reaktionsausfall. Carcinomzellen weisen eine sehr starke Phosphoamidaseaktivität auf, die um so intensiver ausgeprägt ist, je entdifferenzierter das Krebsgewebe ist. Offenbar üben die Carcinomzellen auch einen Einfluß auf die Enzymaktivität in angrenzenden normalen Schleimhautepithelien aus, in denen sich gegenüber entsprechenden, weiter entfernt liegenden Zellen eine

deutlich stärkere Phosphoamidaseaktivität nachweisen läßt. Ein ähnlicher Befund wurde auch von MEYER und WEINMANN bei Carcinomen der Mundhöhle mitgeteilt.

Es muß jedoch betont werden, daß es sich beim Nachweis der starken Phosphoamidaseaktivität in Krebszellen nicht um einen spezifischen histochemischen „Krebsnachweis“ handelt. Entsprechende Versuche, insbesondere alle Bemühungen, die Phosphoamidasereaktion für die cytologische Krebsdiagnostik anzuwenden, sind bisher fehlgeschlagen (NEUMANN u. Mitarb. 1954; GROSS und DANZINGER 1957, SANDRITTER und SCHREIBER 1958). Offensichtlich spielt die Phosphoamidase bei Proliferationsvorgängen und bei der Entdifferenzierung der Zelle eine wichtige Rolle. Sie ist aber sicher nicht auf das Tumorgewebe allein beschränkt. Aus Untersuchungen über die Fermentaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe geht weiterhin hervor, daß es allein durch die vermehrte funktionelle Beanspruchung der mesenchymalen Zellelemente bei der Phagocytose unter anderem auch zu einer Aktivitätszunahme der Phosphoamidase kommt (GEDIGK und BONTKE 1957). Es ist weiterhin anzunehmen, daß die Phosphoamidase in Organen wie Gehirn (GOMORI 1948), Milz (MAXINE u. Mitarb. 1957), Sperma (TAKAHASHI 1955) noch andere, eventuell unterschiedliche Funktionen auszuüben hat. Außerdem ist es denkbar, daß unter dem Namen Phosphoamidase verschiedene Enzyme erfaßt werden, die jeweils ein spezifisches Substrat zu spalten vermögen. Auch über die Spezifität der histochemischen Phosphoamidase-reaktion konnte bislang noch keine Einigkeit erzielt werden. Sowohl PEARSE als auch GROSS und DANZINGER fanden keine grundsätzlichen Unterschiede in der Lokalisation von Phosphoamidase und saurer Phosphatase. Bei den vorliegenden Untersuchungen an der Magenschleimhaut läßt sich jedoch ein unterschiedliches Verteilungsmuster feststellen, das unseres Erachtens nicht durch eine einfache Veränderung des Substrates erklärt werden kann.

In vergleichenden Untersuchungen konnte schließlich gezeigt werden, daß zwischen der Verteilung der Ribonucleinsäure einerseits und dem histochemischen Verhalten der Phosphoamidase andererseits eine weitgehende Übereinstimmung besteht (vgl. Tabelle). Sowohl die Ribonucleinsäure als auch die Aktivität der Phosphoamidase nehmen mit fortschreitender Proliferation und Anaplasie des Gewebes zu und erfassen dabei das ganze Cytoplasma der Zellen. Auf Grund unserer Untersuchungen möchten wir annehmen, daß der größte Teil der Phosphoamidase in den Mikrosomen lokalisiert ist.

Zusammenfassung

In der normalen Magenschleimhaut findet sich im wesentlichen nur im Bereich der Becherteile der Foveola-Zellen und Oberflächenepithelien eine mäßig starke bzw. schwache Enzymaktivität der Phosphoamidase, die mit fortschreitender Proliferationstendenz und Anaplasie zunimmt. Carcinome des Magens zeichnen sich durch eine sehr starke, das ganze Cytoplasma einnehmende Phosphoamidaseaktivität aus, die ebenfalls mit fortschreitender Entdifferenzierung zunimmt. Infiltrierend wachsende Krebszellen üben einen Einfluß auf die Enzymaktivität der angrenzenden normalen Schleimhauteptithelien aus.

Der Reinheitsgrad des Substrates (p-Chloroanilidophosphorsäure) ist für den Ausfall der Phosphoamidasereaktion (nach GOMORI) von ausschlaggebender Bedeutung.

Es wurden weiterhin das histochemische Verhalten der sauren Phosphatase und die cytochemische Lokalisation der Ribonucleinsäure mit dem Verteilungsmuster der Phosphoamidaseaktivität im Magen verglichen.

Summary

In the normal gastric mucosa, primarily in the region of the goblet part of the foveolar cells and in the surface epithelium there is a moderately intense to weak phospho-amidase activity. With epithelial proliferation and anaplasia the activity increases. The cells of gastric carcinoma are characterized by a very intense phospho-amidase activity which occurs throughout their cytoplasm. The activity increases with progressive dedifferentiation. Infiltrating cancer cells affect the enzyme activity of the normal epithelial cells of the adjacent mucosa.

The degree of purity of the substrate (p-chloroanilido-phosphoric acid) is of decided importance in the occurrence of the phospho-amidase reaction (GOMORI's method).

The histochemical nature of acid phosphatase and the cytochemical localization of RNA are compared with the pattern of distribution of the phospho-amidase activity.

Literatur

- EBNER, H., u. H. STRECKER: Über die Darstellung von Karzinomzellen im Vaginalsemear durch den histochemischen Phosphoamidasenachweis. *Dtsch. med. Wschr.* **41**, 1268 (1951).
- GEDIGK, P., u. E. BONTKE: Über die Enzymaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 538 (1957).
- GOMORI, G.: Histochemical demonstration of sites of phosphamidase activity. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **69**, 407 (1948).
- Histochemical specificity of phosphatases. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **70**, 7 (1949).
- GROGG, E., and A. G. E. PEARSE: A critical study of the histochemical techniques for acid phosphatase, with a description of an azo-dye method. *J. Path. Bact.* **64**, 627 (1952).
- GROSS, S. J., and S. DANZINGER: Histochemical techniques applied to the study of benign and malignant squamous epithelium of the cervix uteri. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **73**, 94 (1957).
- IMANISHI, Y.: Cytochemical studies on succinic dehydrogenase activity of human gastric mucosa in certain diseases, with special reference to precancerous conditions. *Ôsaka Daigaku Igaku Zasshi* **12**, (4.5), 925 (1959).
- KURU, M., and S. HIROSE: On histochemical differences among normal precancerous and cancerous tissues: A study with mitochondria and ribonucleic acid stains. *Gann* **52**, 337 (1961).
- MAGOSHI, S.: Histochemical study on the thyroid gland. *Ôsaka Daigaku Igaku Zasshi* **11**(9), 877 (1957).
- MAXINE, F., SINGER and JOSEPH, S. FRUTON: Some properties of beef spleen phosphamidase. *J. biol. Chem.* **229**, 111 (1957).
- MEYER, J., and J. P. WEINMANN: Phosphamidase content of normal and pathologic tissues of the oral cavity. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 305 (1953).
- — A modification of GOMORI's method for demonstration of phosphamidase in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 134 (1955).
- NEUMANN, K., G. OEHLERT u. H. HANSMANN: Histochemische Lokalisation des Enzyms Phosphamidase im weiblichen Genitaltrakt und Vaginalsemear. *Z. Geburtsh. Gynäk.* **141**, 109 (1954).
- OEHLERT, G., K. NEUMANN u. H. HANSMANN: Histochemische Untersuchungen über die Lokalisation des Enzyms Phosphamidase im menschlichen Endometrium und über seine Aktivitätsschwankungen während des Cyclus. *Arch. Gynäk.* **184**, 414 (1954).
- OTTO, P.: Über das P-Chloranilin-n-Oxychlorphosphin. *Ber. dtsch. chem. Ges.* **28**, 617 (1895).

- QUE, N.: A morphological study of the Golgi apparatus in the mastopathia cystica chronica and carcinoma of the breast. *Ôsaka Daigaku Igaku Zasshi* **11**(10), 4127 (1959).
- PEARSE, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied. London: Churchill 1953.
- SANDRITTER, W., u. M. SCHREIBER: Histochemie von Sputum-Zellen. Frankfurt. Z. Path. **68**, 693 (1958).
- SEPP, P.: Die Lokalisation der Phosphamidase in den Zellen des Vaginalsemear beim Collumkarzinom vor und nach Strahlenbehandlung. *Strahlentherapie* **99**, 393 (1954).
- STOLL, P., H. EBNER u. H. STRECKER: Vergleichende, histologische und cytologische Untersuchungen am weiblichen Genitaltrakt. *Arch. Gynäk.* **180**, 76 (1951).
- SUGITA, I.: Cytochemical studies on the precancerous changes of gastric mucous epithelium in gastric diseases. *Ôsaka Daigaku Igaku Zasshi* **11**(3), 585 (1959).
- TAKAHASHI, T.: Über die Phosphamidase und Creatine Phospholinasewirkung in dem Schweine-samen. *Seikagaku* **26**(6), 690 (1955).
- WATANABE, S.: Cytochemical studies of squamous epithelium focusing on cancer. *Ôsaka Daigaku Igaku Zasshi* **11**, 4759 (1959).
- YASUI, T.: Histochemical study of the fat in breast tumors. *Ôsaka Daigaku Igaku Zasshi* **10**(11), 3781 (1959).

Dr. T. SUGIMOTO,
Second Surgical Clinic, Osaka University
Medical School, Osaka (Japan)