

# Wertigkeit serologischer Untersuchungen von hCG und AFP bei Keimzelltumoren des Hodens\*

K. Mann

Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern (Ludwig-Maximilians-Universität München)

## Zusammenfassung:

*Bestimmungsmethoden der Wahl für hCG und AFP als Tumormarker bei malignen Hodentumoren sind sensitive RIA's, EIA's oder IRMA's, wobei polyclonale oder monoclonale Antiseren Verwendung finden. Kommerziell verfügbare, polyclonale Antiseren gegen die  $\beta$ -Untereinheit von hCG erfassen bis auf eine Ausnahme (hCG- $\beta$  Kit IRE) immer das gesamte Hormon und die freie  $\beta$ -Kette. Die Kreuzreaktion dieser Antiseren mit LH und anderen Glykoproteinhormonen liegt meist unter 1%. Nur wenige Anti-hCG Antiseren erkennen nur hCG ohne die freie  $\beta$ -Kette des Hormons und ohne LH. Im Gegensatz hierzu wird mit den derzeit verfügbaren monoclonalen IRMA's meist hCG und nicht zusätzlich die freie  $\beta$ -Kette bestimmt. Auch für die  $\beta$ -Untereinheit weitgehend spezifische Antiseren stehen zur Verfügung. Nur für die freie  $\beta$ -Kette spezifische RIA's haben für die Diagnostik bisher keine gesicherte Bedeutung. Bei der Bestimmung von AFP gibt es keine Spezifitätsprobleme. Eigene Erfahrungen an inzwischen 858 Patienten mit Hodenkarzinom und die anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß hCG und AFP eine wertvolle diagnostische Hilfe für die Primärdiagnose, Stadieneinteilung, die Differentialdiagnose zwischen Seminom und nicht-seminomatösen Keimzelltumoren, vor allem aber für die Verlaufskontrolle und Therapieüberwachung sind. Beide Marker sind heute unabdingbare Bestandteile der Diagnostik. Die Inzidenz der Marker ist stadienabhängig und liegt für hCG und AFP zusammen zwischen 45 und 85%. Trophoblastisch differenzierte Teratome sind immer hCG-positiv, Dottersacktumoren immer AFP-positiv. Erhöhte AFP-Spiegel schließen dagegen ein reines Seminom aus. Bei 8 bis 15% der Patienten mit Seminom finden sich erhöhte, wenn auch niedrige hCG-Serumspiegel. Sie stammen von einzelnen synzytialen hCG-bildenden Riesenzellen, die häufig nur immunhistologisch nachweisbar sind. Die Unabhängigkeit beider Parameter drückt sich durch ein nicht selten (21%) diskordantes Verhalten von hCG und AFP unter der Therapie aus. Die Normalisierung der Marker unter Chemotherapie darf keinesfalls als verlässliches Zeichen einer Vollremission gewertet werden, da dies durch eine selektive Zerstörung markerbildender Tumorzellen bedingt sein kann. Kurzfristige Anstiege von hCG (bis zu 10 Tagen) und AFP (bis zu 30 Tagen) sind andererseits kein Zeichen einer Tumorprogression, sondern als Ausschüttungseffekt nekrotisierender Tumorzellen zu werten. Sie sind deshalb keine Indikation zur Änderung des Therapieplans.*

## Schlüsselwörter:

Keimzelltumoren des Hodens - hCG - AFP - Tumormarker - polyclonale Antikörper - monoclonale Antikörper - Immunhistologie - Chemotherapie - Prognose

## Summary:

*Methods of choice for the determination of hCG and AFP as tumour marker in patients with testicular cancer are RIA's, EIA's or IRMA's using poly- or monoclonal antibodies. Commercially available antisera directed against the  $\beta$ -subunit of hCG detect the dimeric hormone simultaneously with the free  $\beta$ -subunit. Cross reactivity with LH is mostly below 1%. In contrast presently available monoclonal IRMA's detect mostly hCG without the free  $\beta$ -subunit. Specific antisera for the free  $\beta$ -subunit exist, but have no proven clinical significance. Specificity is not critical in the determination of AFP. Our own experience in patients with testicular cancer (N = 858) and that of others have convincingly shown, that hCG and AFP are valuable parameters for diagnosis, staging, differential diagnosis between seminoma and non-seminoma and especially for control of therapy and follow up. Both markers are an inevitable adjunct for interdisciplinary handling. The incidence of both parameters, hCG and AFP, depends on tumour stage (45-85%). Trophoblastic differentiated teratomas are always hCG-positiv, yolk sac tumours without exception AFP-positiv. "Pure" seminomas cannot produce AFP. Therefore elevated levels of AFP are a strong evidence against seminoma. In contrast, about 15% of patients with seminoma show indeed slightly elevated hCG-levels, which derive from single syncytiotrophoblastic giant cells. The independency of both parameters was documented by the discordant behaviour of hCG and AFP in 28/134 (21%) patients under therapy. If markers*

\* Nach einem Vortrag auf dem Symposium für Laboratoriumsmedizin, Wiesbaden, 12. Mai 1984.

Mit Unterstützung des Tumorzentrums München

*fall under therapy into the normal range nevertheless complete remission cannot be assumed, because marker producing structures may be selectively destroyed by chemotherapy. This can change the histological structure of metastases. On the other hand, if marker levels increase during chemotherapy (hCG up to 10 days, AFP 30 days) it is not a proven sign of tumour resistance to therapy, but probably due to release of markers by dying cells. Therefore it should not be taken as indicator for changing therapy regimens.*

#### Keywords:

*testicular germ cell tumours - hCG - AFP - tumour marker - polyclonal antibodies - monoclonal antibodies - immunohistochemistry - chemotherapy - prognosis*

#### Einleitung

Die interdisziplinäre Therapie maligner Hodentumoren hat zu beispielhaften und unter den soliden Tumoren unerreichten Erfolgen geführt. So können heute nahezu alle Patienten im frühen Stadium und 50 bis 70% derer mit fortgeschrittener Erkrankung eine langfristige Remission erwarten. Hauptanteil hieran haben die Fortschritte der modernen Chemotherapie und radikale urologische und chirurgische Eingriffe bei Patienten mit nicht-seminomatosen Tumoren. Marker als Parameter der Tumoraktivität werden dabei für die Therapieentscheidung mit herangezogen. Wegen dieser weitreichenden Konsequenzen soll im Rahmen der vorliegenden Übersicht auch auf mögliche Fehlinterpretationen der als Tumormarker allgemein anerkannten Parameter, Alpha-Fetoprotein (AFP) und humanes Choriongonadotropin (hCG) besonders eingegangen werden. Anhand eigener Erfahrungen an inzwischen 856 Patienten mit malignen Hodentumoren und denen aus der Literatur soll ferner der Stand der Diagnostik und die klinische Wertigkeit dieser beiden Parameter dargestellt werden.

#### Methodenübersicht

AFP wurde seit 1976 mit einem von Lamerz entwickelten Doppelantikörper-Radioimmunoassay (1), hCG seit 1978 mit einem eigenen RIA bestimmt (2). Als Antiserum verwendeten wir ein polyclonales Anti-hCG- $\beta$ -Antiserum der Firma Serono/Freiburg. Die Kreuzreaktion dieses heterologen Assays ( $^{125}\text{I}$ -hCG, Anti-hCG- $\beta$ ) mit LH beträgt 0,3%. Die Standardisierung erfolgte zunächst am 2nd IRP-hCG (Holly Hill, London), seit 1984 an der reineren Präparation 1st IRP-hCG (75/537). Die Affinität dieses Antisera zu hCG (CR 119 NIAMDD) und der freien  $\beta$ -Untereinheit (hCG- $\beta$  CR 119- $\beta$ ) ist annähernd gleich, so daß deren Standardverdrängungskurven parallel verlaufen und beide Analyte gleichzeitig erfaßt werden (hCG/hCG- $\beta$ -Assay). Die Interassay-Präzision des AFP- und hCG-RIA lag im steilen Bereich der Standardkurve unter 10%. Die Bestimmung der hCG-Untereinheiten und die immunhistologischen Untersuchungen erfolgten wie früher beschrieben (3, 4).

Alle Patienten (n = 858) wurden in der Projektgruppe Hodentumoren des Tumorzentrums München nach einem standardisierten Manual interdisziplinär betreut, in einem Tumorregister dokumentiert und anhand eines Nachsorgekalenders überwacht.

#### Bestimmungsmethoden und Herkunft von AFP

Alpha-Fetoprotein ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 70000 und einer elektrophoretischen Alpha-1-Beweglichkeit. Bestimmungsmethoden der Wahl sind heute sensitive Radio- oder Enzymimmuno-Assays,

die sich polyclonaler oder monoclonaler Antikörper bedienen. Nur mit diesen Techniken ist eine sichere Erfassung normaler und niedrig pathologischer Spiegel im Serum und anderen Körperflüssigkeiten möglich. Von mehr orientierender und eher qualitativer Art sind die anderen in Tab. 1 aufgeführten Techniken. Sie sind einfach durchführbar und weisen eine hohe Spezifität, aber eine geringe Sensitivität auf. Der heute allgemein verbindliche Standard ist der der WHO. Als Obergrenzen im Serum werden allgemein 15  $\mu\text{g/l}$  angegeben. Wesentliche Störfaktoren oder Kreuzreaktionen sind nicht bekannt.

Physiologischerweise stammt AFP aus dem fetalen Gastrointestinaltrakt, der Leber und dem Dottersack. Es ist diaplazentar durchgängig und dies erklärt, warum Kinder bis zum ersten Lebensjahr und Schwangere physiologischerweise erhöhte AFP-Spiegel aufweisen. In der regenerierenden Leber, bei Hepatitiden und der Leberzirrhose können leicht erhöhte Spiegel nachgewiesen werden. Hierdurch ist die Spezifität von AFP als Tumormarker eingeschränkt. Die höchsten Serumspiegel finden sich bei Keimzelltumoren und beim hepatozellulärem Carcinom. Diese beiden Tumoren stellen die Hauptdomäne der Indikationen zur AFP-Bestimmung dar (Tab. 2).

Tab. 1: Bestimmungsmethoden für Alpha-Fetoprotein

Test	Empfindlichkeit ( $\mu\text{g/l}$ )
Radioimmunoassay	< 1
Enzymimmunoassay	1–3
a) polyclonal	
b) monoclonal	
Überwanderungselektrophorese	100– 300
Elektroimmunodiffusion	300– 500
Radiale Immunodiffusion	1000–5000
Standard: WHO-AFP 72/225 1 IU = 1.21 ng	
Referenzbereich: Obergrenze 15 $\mu\text{g/l}$	

Tab. 2: AFP-Spiegelerhöhungen im Serum

Herkunft	Fetaler GI-Trakt und Leber, Dottersack
Physiologische Erhöhungen	Kinder unter 1 Jahr Schwangere ab 10. SSW
Benigne Erkrankungen	Akute Virushepatitis, alkohol., chron. aktive Hepatitis, Zirrhose
Maligne Erkrankungen	Gastrointestinale Tumoren 20% Hepatozelluläres Karzinom 95% Keimzelltumoren 50–70% Hoden, Ovar, extragonadal

## Bestimmungsmethoden von hCG (+ hCG-β)

Die Glycoprotein hormone hCG, TSH, LH und FSH bestehen aus zwei nicht kovalent verbundenen Untereinheiten. Die α-Kette ist strukturell annähernd identisch, während die β-Kette im wesentlichen die immunologische und biologische Spezifität determiniert. Bei LH und hCG ist die β-Kette im Bereich der ersten 115 aminoterminalen Aminosäuren zu 80% strukturhomolog. Das erklärt zumindest zum Teil die ähnlichen, immunologischen Eigenschaften gerade dieser beiden Hormone. Die β-Kette von hCG hat allerdings an ihrem C-terminalen Ende des Moleküls zusätzlich 32 Aminosäuren (Abb. 1).

Immunisiert man mit dieser freien β-Untereinheit, so erhält man in der Regel Antiseren mit wesentlich geringerer Kreuzreaktion zu den anderen Glycoproteinhormonen, insbesondere LH. Die meisten Kits verwenden solche polyclonale Anti-hCG-β-Antiseren, wobei die Affinität zu der freien β-Kette meist höher als zum Gesamtmolekül ist. Hieraus folgt, daß mit diesen Kits hCG und die freie β-Kette gleichzeitig erfaßt wird. Aufgrund der Schwierigkeit die freie β-Untereinheit, die als Immunogen verwendet wird, rein und ohne Verunreinigungen mit dem Gesamthormon hCG darzustellen, kann die Spezifität solcher Anti-hCG-β-Antiseren sehr unterschiedlich sein. So weist beispielsweise das Antiserum SB 6 der NIAMDD noch eine Kreuzreaktion mit LH von 5,5% auf (2). Deshalb sollten die Kreuzreaktionen mit LH und FSH in jedem

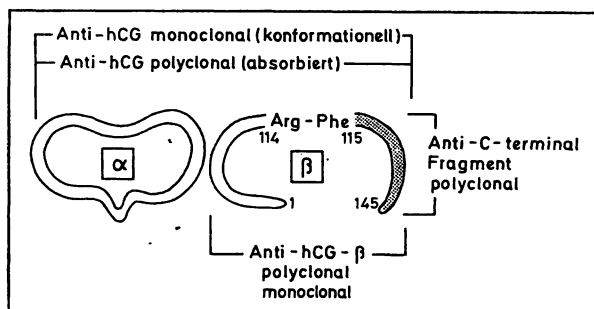


Abb. 1: Spezifität von Antiseren gegen hCG, hCG-β und hCG-β Teilssequenzen

Tab. 3: HCG (β) - Bestimmungsmethoden

Kit	<sup>125</sup> I-Tracer	Antiserum	Standard	Ref.-Präp.	Spezifität
IRE-hCG	hCG	Anti-hCG	hCG	IRE-Präp. ng/ml = 6800 ± 700 IU/mg 2nd IRP	hCG/(LH)
IRE-hCG-β	hCG-β	Anti-hCG-β	hCG-β	hCG-β ng/ml	hCG-β/(hCG)
Serono-hCG-β	hCG	Anti-hCG-β	hCG	2nd IRP mIU/ml	hCG-β/hCG
NML Chorioquant β-hCG	hCG	Anti-hCG-β	hCG	2nd IRP	hCG-β/hCG
Bect. Dick. β-hCG	hCG	Anti-hCG-β	hCG	1st oder 2nd IRP	hCG-β/hCG
Byk RIA-mat β-hCG	hCG	Anti-hCG-β	hCG	2nd IRP	hCG-β/hCG
Amersham Clin. Ass.	hCG	Anti-hCG-β	hCG	1st oder 2nd IRP	hCG-β/hCG
Gamma DAB β-hCG	hCG	Anti-hCG-β	hCG	1st IRP	
CNRC hCG-β	hCG-β	Anti-hCG-β	hCG	2nd IRP mIU/ml	hCG-β/hCG
Hybritech Tandem-R, -E	Anti-hCG	Anti-hCG	hCG	1st IRP oder 2nd IRP mIU/ml	hCG
Behring/Hoechst RIA-gnost® hCG	Anti-hCG-α	Anti-hCG-β	hCG	1st IRP mIU/ml	hCG
Serono HCG MAIAclone®	Anti-hCG und Anti-hCG-β		hCG	1st IRP mIU/ml oder 2nd IRP mIU/ml	hCG-β/hCG

Labor vor Einführung eines hCG-Kits zumindest mit Postmenopausenseren überprüft werden, die hohe Konzentrationen dieser Hormone enthalten. Antiseren noch höherer Spezifität wurden gegen das C-terminale Fragment der β-Kette oder die chemisch modifizierte β-Kette hergestellt. Diese Antiseren sind jedoch nicht allgemein verfügbar. Die Firma IRE (Belgien) bietet einen hCG-RIA an, der weitgehend spezifisch das dimere Hormon ohne Kreuzreaktion mit der freien β-Kette bestimmt. Nach eigenen Untersuchungen beträgt die Kreuzreaktion mit LH jedoch noch ca. 2% und muß klinisch berücksichtigt werden. Ein weiterer Kit dieser Firma bestimmt in einem homologen hCG-β-RIA weitgehend spezifisch die freie β-Untereinheit, die Kreuzreaktion mit LH beträgt 0,01%, mit hCG 2,2% (2). Neuerdings stehen aber auch hochspezifische monoklonale Anti-hCG-Antiseren zur Verfügung, die teilweise gegen konformationelle Determinanten des Hormons gerichtet sind. So verwendet der radio- oder enzymimmunometrische Assay von Hybritech einen Festphasen-gebundenen Antikörper gegen ein auf dem Gesamtmolekül zugängliches Epitop der α-Kette und als Tracer einen zweiten, monoklonalen Antikörper, der gegen eine andere Antigen determinante auf der β-Kette des Gesamtmoleküls liegt. Mit drei monoklonalen Antikörpern arbeitet in homogener Lösung der immunoradiometrische Assay von Serono (Tab. 3). Im IRMA der Behringwerke ist ein monoklonaler Antikörper gegen die β-Kette an die Festphase gebunden, ein jodierter, monoklonaler Antikörper gegen die α-Kette dient als Tracer. Wie Abb. 2 zeigt, weisen jedoch auch in einem solchen hochspezifischen Testsystem Postmenopausenseren deutlich höhere hCG-Spiegel als männliche Kontrollpersonen auf.

So ergab sich für den monoklonalen IRMA RIA-gnost®hCG (Hoechst) für Männer ein Normbereich bis 5, für Frauen in der Postmenopause bis 10 IU/l. Hierbei handelt es sich nicht um eine Kreuzreaktion mit LH, sondern um ein wahrscheinlich vorwiegend aus der Hypophyse stammendes Antigen, das mit derzeitigen immunologischen und biochemischen Methoden von hCG nicht unterscheidbar ist. Es ist bei Frauen in der Menopause, nicht dagegen zur Zeit des LH-Gipfels im normalen Zyklus in erhöhten Konzentrationen im Serum nachweisbar. Zwei der bisher auf dem Markt befindlichen monoklonalen

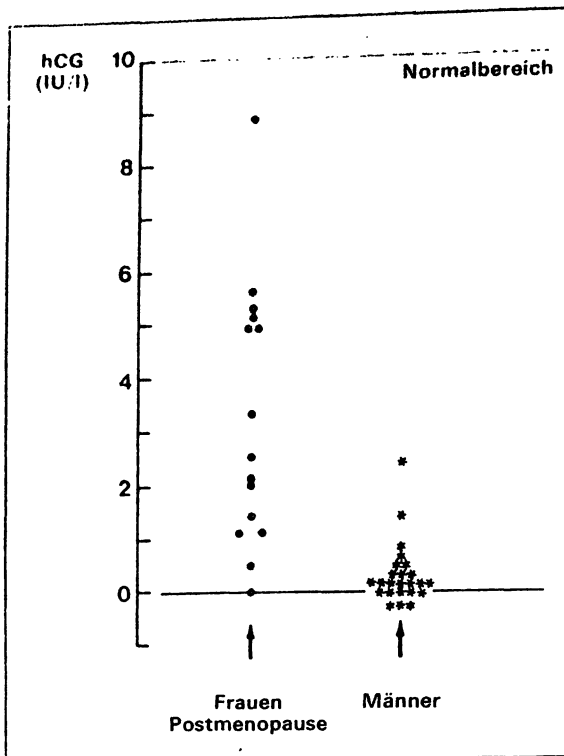


Abb. 2: hCG-Serumspiegel in einem monoclonalen Immuno-Radiometrischen Assay ( $^{125}\text{I}$ -Anti-hCG- $\alpha$ , Anti-hCG- $\beta$ , 1st IRP-hCG)

hCG-Bestimmungsmethoden erfassen nur das Gesamtmolekül, eine zusätzlich die freie  $\beta$ -Kette, wie dies bei polyclonalen RIA's die Regel ist. Eigene Untersuchungen haben zwar gezeigt, daß bei Patienten mit nichtseminomatosen Tumoren niemals die freie  $\beta$ -Kette allein freigesetzt wird, für Patienten mit Seminomen gibt es hierzu noch keine eindeutigen Befunde. Bei anderen trophoblastischen, aber auch nicht-trophoblastischen Tumoren wurde auch die isolierte Freisetzung der  $\beta$ -Untereinheit nachgewiesen (5, 6, 7). Für die diagnostisch wichtige Gruppe von Tumoren wie Keimzelltumoren des Hodens, Blasenmole und Choriokarzinom der Frau ist aber noch nicht entschieden, ob die zusätzliche Bestimmung der freien  $\beta$ -Untereinheit die Sensitivität des Markernachweises verbessert. Hier sind weitere Untersuchungen mit hochspezifischen, monoclonalen Assays für die  $\beta$ -Kette erforderlich. Bei der immer noch verwirrenden Nomenklatur wäre aus analytischer Sicht eine Methode zu bevorzugen, die nur einen Analyten, nämlich das intakte Gesamtmolekül hCG oder aber die freie  $\beta$ -Kette erfäßt.

Die bisher verwendete Referenzpräparation war der 2. Internationale hCG-Standard (2nd IRP-hCG), der jedoch erhebliche Verunreinigungen an Untereinheiten enthält. In Zukunft sollte nur noch der wesentlich reinere 1. Internationale Standard (75/537) verwendet werden. Der Umrechnungsfaktor vom 2. in den 1. Internationalen Standard beträgt ca. 2. Bei einigen bisher verwendeten Kits sind Standardverdrängungskurven von hCG, hCG- $\beta$  und dem 2. Internationalen Standard nicht deckungsgleich oder nicht einmal parallel. Bei den derzeit auf dem Markt befindlichen monoclonalen IRMA's, die nur hCG erfassen, ist es dagegen unerheblich, ob der 1. oder 2. Standard verwendet wird, da diese Verdrängungskurven völlig deckungsgleich ausfallen. Grund dafür, daß bisher

alle Ringversuche von 1982 bis 1984 eine wenig befriedigende analytische Präzision und eine fehlerhafte Zuordnung zu den verschiedenen Assay-Typen erbrachten, liegt auch daran, daß die Kalibrierungsstandards der Kits nicht eindeutig genug bezeichnet sind. So war beim letzten Ringversuch 1984 bei einem Viertel der Teilnehmer eine Zuordnung der Ergebnisse nicht möglich. Zur Harmonisierung und Verbesserung der analytischen Voraussetzungen für die Bestimmung von hCG wurde deshalb die Beachtung folgender Punkte empfohlen, die in den Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, Heft 5/1983 und in den Endokrinologie-Informationen 3/1984 niedergelegt sind. Für die Analyse sollen folgende Bezeichnungen gewählt werden: „hCG-Bestimmung“, wenn bei der Analyse das hCG-Gesamtmolekül erfaßt wird und wenn im beschriebenen Testansatz die Kreuzreaktivität verwandter Proteine, insbesondere die der freien hCG- $\beta$ -Untereinheit und die des Luteotropins (LH) vernachlässigbar gering ist. „hCG (+ hCG- $\beta$ )-Bestimmung“, wenn bei der Analyse sowohl das hCG-Gesamtmolekül als auch die freie hCG- $\beta$ -Untereinheit erfaßt wird und wenn im beschriebenen Testansatz die Kreuzreaktivität verwandter Proteine, insbesondere die des LH vernachlässigbar gering ist. „hCG + LH-Bestimmung“, wenn bei der Analyse neben hCG das LH – ganz oder teilweise – erfaßt wird und „hCG- $\beta$ -Untereinheit-Bestimmung“, wenn bei der Analyse die freie hCG- $\beta$ -Untereinheit erfaßt wird und wenn im beschriebenen Testansatz die Kreuzreaktivität verwandter Proteine, insbesondere die des hCG-Gesamtmoleküls, vernachlässigbar gering ist.

#### Höhe der hCG-Spiegel bei malignen Tumoren

Tab. 4 zeigt, welche Serumkonzentrationen von hCG (+ hCG- $\beta$ ) bei Patienten mit Hodentumoren vorkommen. Nur leicht erhöhte Serumspiegel zwischen 4 und 20  $\mu\text{I}$  kommen bei 21,8% der Patienten vor und dies macht deutlich, daß auf höchste Sensitivität der Assays Wert gelegt werden muß. Bei radioimmunometrischen Assays kann der sog. Hook-Effekt, d.h. das Auftreten falsch niedriger Werte bei Serumproben mit sehr hohem hCG-Gehalt zum Problem werden.

Setzt man die Sensitivität der hCG-Bestimmung mit der Tumorzellmasse in Verbindung, so darf davon ausgegangen werden, daß noch etwa  $10^6$  Zellen, das entspricht Stecknadelkopfgroße, erfaßt werden können. Bei Anwendung spezifischer Bestimmungsmethoden sprechen beim Mann erhöhte hCG-Spiegel mit großer Sicherheit für das Vorliegen eines malignen Tumors. Erhöhte hCG-Spiegel sind jedoch nicht für bestimmte Tumoren spezifisch. So sind auch nicht-trophoblastische Tumoren wie das Pankreascarcinom, Magencarcinom und andere (Tab. 5) zur hCG-Bildung befähigt. hCG-Bestimmungen haben sich jedoch hier für die Diagnostik und Verlaufskontrolle wegen der geringen Sensitivität des Markers nicht durchgesetzt.

Tab. 4: Serumspiegel von hCG(+ hCG- $\beta$ ) in IU/l des 2nd IRP-hCG bei Patienten mit malignen Hodentumoren (N = 1457)

Serumspiegel (IU/l)	N	Prozent
1,6–4	234	16,1
4–20	318	21,8
20–200	396	27,2
200–1000	188	12,9
1000–100000	262	18,0
100000–1 Mio.	38	2,6
> 1 Mio.	21	1,4

Anwendungsgebiete für AFP und hCG bei Hodentumoren

Allgemeine Screening-Untersuchungen mit Tumormarkern sind wegen des geringen prädiktiven Wertes nicht sinnvoll. Patienten mit Maldescensus testis, gesunde ein-eilige Zwillinge von Patienten mit Hodentumoren sowie Patienten in der Vollremission sollten jedoch regelmäßig überwacht werden. Bei symptomatischen Patienten können hCG und AFP-Bestimmungen für die Primärdiagnose, die Stadieneinteilung, die Tumorlokalisation, besonders aber für die Verlaufskontrollen, die Therapieüberwachung und für eine frühzeitige Rezidiverkennung verwendet werden. Ferner haben die Markerbestimmungen einen bestimmten prognostischen Wert. Auf diese Punkte wird nun im folgenden eingegangen.

Ordnet man den Markernachweis den Klassifikationen maligner Hodentumoren (8, 9) zu, so läßt sich ablesen, daß trophoblastisch differenzierte Teratome immer hCG-positiv sind, die seltenen Dottersacktumoren immer AFP-positiv und die differenzierten Teratome immer Marker-negativ sind (Tab. 6). Die übrigen Teratome vom Intermediärtyp, undifferenzierte Teratome und sog. Kombinationstumoren, bestehend aus Teratomen und Seminomen, sind dagegen je nach histologischer Zusammensetzung Marker-positiv, und zwar mit einer Inzidenz von zusammen ca. 70%.

Die Korrelation zwischen serologischen und immunhistologischen Befunden ist sehr eng. So fanden wir bei 35 ausgewählten Patienten hCG nur einmal ausschließlich im Gewebe, ansonsten waren die Befunde immer konkordant (Abb. 3). Darüber hinaus ergab sich eine semiquan-

titative Beziehung zwischen der Höhe der präoperativen Markerspiegel (Abb. 4 als Beispiel für das AFP) und der Anzahl markertragender Tumorzellen (10).

Eine Abhängigkeit der Inzidenz von hCG und AFP vom Tumorstadium ist vor und nach chirurgischer Therapie mehrfach belegt. So fand Nørgaard Petersen (11) einen von beiden Markern im Stadium I bei 54%, im Stadium II bei 65% und im Stadium III bei 78% der Patienten.

Nach der Orchiektomie persistierende Marker sprechen gegen eine auf den Hoden beschränkte Erkrankung, also ein Stadium I, so daß Markerbestimmungen die Sicherheit der Stadieneinteilung erhöhen. Da jedoch alle zur Stadieneinteilung herangezogenen Methoden einschließlich der Marker in 15 bis 30% falsch-negative Befunde liefern, bleibt die retroperitoneale Lymphadenektomie bis heute die einzig sichere Methode zur Stadieneinteilung.

Versuche, Tumormetastasen durch Antikörper-Szintigraphie zu lokalisieren, sind in England, der Schweiz und in den USA angelaufen. Hierbei wird die immunabsorbierte IgG-Fraktion oder das Fab-Fragment des spezifischen Antikörpers, sei es polyclonal oder monoclonal, radioaktiv markiert, dem Patienten injiziert und eine Immunszintigraphie der Antigen(hCG, AFP, CEA)-tragenden Metastasen durchgeführt. Erste vorläufige Ergebnisse lassen eine hohe Sensitivität dieser Methode erwarten. Der Indikationsbereich wird jedoch auf Einzelfälle beschränkt bleiben (12, 13).

AFP und hCG beim Seminom

Bei Patienten mit Seminomen haben erhöhte Serumspiegel von AFP und hCG eine besondere Bedeutung, denn

Tab. 5: Häufigkeit erhöhter hCG (+ hCG-β)-Serumspiegel bei malignen Tumoren

Nichtseminomatöse Keimzelltumoren des Hodens	48–86%	Dünndarmtumoren	13%
Seminom	8–15%	Colonkarzinom	0–20%
testikuläres/plazentares Chorionkarzinom	100%	Hepatom	17–21%
Blasenmole	97%	Bronchialkarzinom	0–12%
Pankreskarzinom, Adeno-Ca	11–50%	Ovarialkarzinom	
Inselzell-Ca	22–50%	epithelial	18–41%
Magenkarzinom	0–23%	Mammakarzinom	7–50%
		Nierenkarzinom	10%

Tab. 6: Klassifizierung der Keimzelltumoren des Hodens einschließlich der Tumormarker HCG und AFP

GB Pugh 1976	Marker	WHO Mostofi/Sobin 1977
<b>Teratom</b> (Dermoidzyste)		Dermoidzyste
Teratom differenziert reif/unreif (TD)	hCG – AFP –	Teratom reif/unreif
Malignes Teratom Intermediärtyp (MTI)	hCG + AFP +	Embryonales CA mit Teratom (Terato-CA)
Malignes Teratom undifferenziert (MTU)	hCG + AFP +	Embryonales CA Polyembryom
Malignes Tetratom trophoblastischer Typ (MTT)	hCG + AFP +	Chorion CA ± Teratom o. andere Typen (ohne Seminom)
Kombinationstumor: Mal. Teratom (MTI, MTU, MTT) + Seminom	hCG + AFP +	Seminom + andere Keimzell-TU (embryonales CA, Chorion CA, Teratom)
Sog. Yolk-Sac-Tumor o. Endodermaler Sinustumor	hCG – AFP +	Yolk-sac-Tumor (endodermaler Sinus-TU)
<b>Seminom</b> „Klassisch“ („typisch“) spermatocytär	hCG ± AFP –	Seminom spermatocytär

der Nachweis von AFP beim Seminom gilt heute als zuverlässiger Beweis für das Vorliegen eines Kombinationstumors und eben nicht eines reinen Seminoms. Klinisch wichtig ist allerdings, daß bei einer Metastasierung eines reinen Seminoms in die Leber auch AFP gebildet werden kann.

Tumorzellen Serum	HCG	HCG	Σ
	—	+	
HCG —	19	1	20
HCG +	—	15	15
Σ	19	16	35

Abb. 3: Korrelation von Serum- und Gewebefunden bei Patienten mit nicht-seminomatösen Hodentumoren (N = 35)

Serumspiegel	AFP Tumorzellen			
	Ø	+	++	+++
normal 0-15 ug/l	* 19			
gering erhöht 15-50 ug/l	1	5	1	
mittelgradig erhöht 50-500 ug/l		2	2	
stark erhöht > 500 ug/l		1	2	2

Abb. 4: Korrelation der Serum- und Gewebefunde von AFP bei Patienten mit nicht-seminomatösen Hodentumoren (N = 35); \* übereinstimmend negativ alle differenzierten malignen Teratome (MTD) N = 5; markernegativ 4 MTI, 10 MTU, kein MTT. Nach (10)

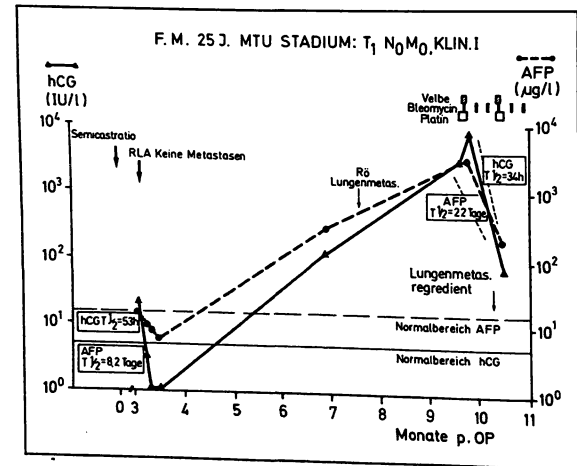


Abb. 5: Verlaufsbeobachtung von hCG und AFP bei Pat. F. M. 25 J mit undifferenziertem malignem Teratom (MTU), Stadium T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> und Berechnung der Abklingzeiten von hCG und AFP

Serologisch und immunhistologisch ist dagegen eine hCG-Bildung auch bei sog. reinen Seminomen nachgewiesen. So fanden wir vor der Orchiektomie bei sieben von 44 Patienten, postoperativ bei vier von 78 Patienten erhöhte hCG-Spiegel. Bei all diesen Patienten lag jedoch nur bei einem der Serumspiegel über 200 IU/l, so daß stark erhöhte hCG-Spiegel weniger für ein reines Seminom sprechen. Praktische Konsequenzen leiten sich aus diesen Befunden insofern ab, als bereits mäßig erhöhte hCG-Spiegel den Verdacht auf das Vorliegen eines Kombinationstumors lenken müssen und eine immunhistologische Abklärung unbedingt herbeigeführt werden muß. Ferner sollten hCG-positive Seminome auch im Verlauf durch hCG-Bestimmungen überwacht werden, wobei persistierende oder ansteigende Hormonspiegel Hinweis einer Therapieresistenz sind und die Indikation abgeben, die Therapie zu ändern.

### Frequenz von AFP- und hCG-Bestimmungen im Verlauf

Aus Sicherheitsgründen sollten die Marker zweimal vor der Orchiektomie, dann zwei- bis dreimal pro Woche in der ersten Woche nach Orchiektomie oder retroperitonealer Lymphadenektomie und dann wöchentlich unter Chemotherapie oder Strahlentherapie bis zur Normalisierung durchgeführt werden. Später erfolgen die Bestimmungen bei jeder Wiedervorstellung im Rahmen des Tumornachsorgeprogramms (Tab. 8).

### Verhalten der Marker unter Therapie

Bei operativer Tumorverkleinerung bzw. Entfernung repräsentiert der Abfall der Serumspiegel die Menge des entfernten Tumors. Im Falle einer vollständigen Tumorentfernung wird deshalb – nach einem oft kurzfristigen postoperativen Anstieg aufgrund der Manipulation am Tumor – die hCG- bzw. AFP-Konzentration entsprechend der physiologischen Abklingquote in den Referenzbereich absinken. Diese physiologische Halbwertszeit beträgt für hCG ca. 24 Stunden, für AFP fünf Tage.

Bei nicht-seminomatösen Tumoren haben wir wiederholt im Verlauf Markeranstiege schon Monate vor den klinischen Symptomen eines Rezidivs beobachtet. Das Bei-

Tab. 7: Radioimmundetection markerbildender Metastasen maligner Hodentumoren

		Gesicherte Metastasen	
		N	Detection (%)
Begent et al.	1980 hCG-Bildung	21	72
Goldenberg et al.	1981 hCG-Bildung	18	100
Goldenberg et al.	1980 AFP-Bildung	13	85
Halsall et al.	1981 AFP-Bildung	15	80

Tab. 8: Abnahmefrequenz der Serumproben für hCG/AFP bei Patienten mit malignen Hodentumoren

Vor Orchiektomie	2x..
1. Woche nach Orchiektomie	2-3x
1. Woche nach RLA	
Unter Chemo-/Strahlentherapie	
bis zur Normalisierung	1x/Wo
Bei allen Nachsorgeterminen	1x

spiel Abb. 5 zeigt, wie es etwa vier Monate nach Normalisierung von hCG und AFP wieder zum Anstieg beider Marker kam und erst dann die Metastasierung radiologisch nachgewiesen wurde. Unter Chemotherapie kam es dann erneut zum Abfall beider Marker. Ob hCG oder AFP nachweisbar werden, hängt von der geweblichen Zusammensetzung der Metastasen ab. Dies erklärt, warum wir bei 28 von 134 Patienten (21%) im Verlauf ein diskordantes Verhalten beider Marker nachweisen konnten und belegt gleichzeitig die Unabhängigkeit beider Parameter. Abb. 6 zeigt wie AFP nach der Operation und Chemotherapie innerhalb von zwei Monaten in den Normbereich abfällt, während hCG trotz Chemotherapie nach dem Einhornschema ansteigt und erst nach Gabe der Kombination von Endoxan, Bleomycin, Platin und VP 16 dann in den Normbereich absinkt. Zwei Wochen nach Normalisierung kam es dann wieder zum Anstieg von hCG, so daß nach Entnahme autologen Knochenmarks aufgrund der hCG-Befunde die Indikation zu einer erneuten aggressiven Chemotherapie gestellt wurde.

Werden andererseits die Marker im Verlauf negativ, so ist damit eine weiterbestehende oder sogar progrediente Erkrankung keinesfalls ausgeschlossen. Es kommt nämlich nicht selten durch die Chemotherapie zu einer selektiven Zerstörung des Marker-bildenden Tumorgewebes, während Marker-negatives Gewebe bestehen bleibt. Dies führt dann zu einem histologischen Typenwandel. Der Verlauf kann dann serologisch nicht mehr kontrolliert werden (Abb. 7). In dieser Situation ist nicht selten die LDH von Nutzen. Wir müssen dann regelmäßig bildgebende Verfahren als Verlaufsparemeter einsetzen. Deutet man also die Normalisierung der Tumormarker als Zeichen einer Remission, so bedeutet dies bei einer Reihe von Fällen eine Fehleinschätzung der Erkrankung.

Auf eine andere, mögliche Fehlinterpretation weist das folgende Beispiel hin (Abb. 8): Unter der Chemotherapie

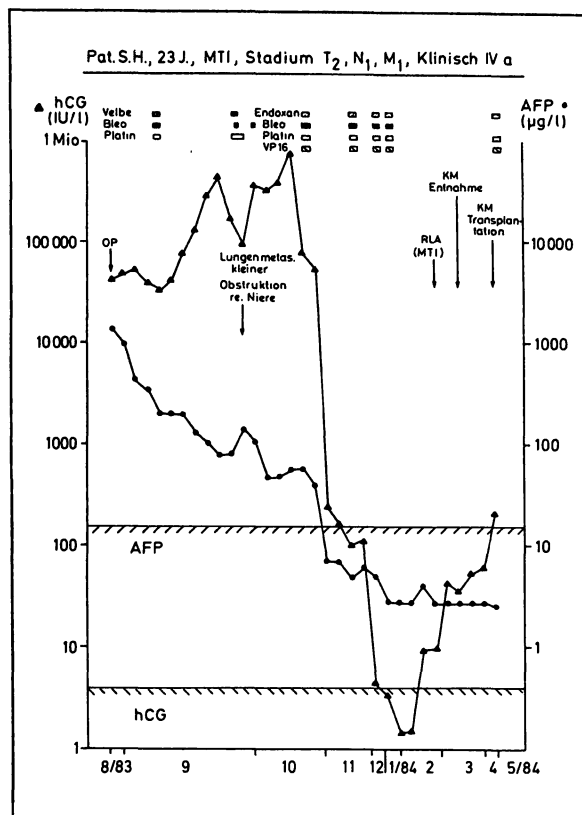


Abb. 6: Verlaufsbeobachtung von hCG und AFP bei Pat. S. H. 23 J mit malignem Teratom vom Intermediärtyp (MTI), Stadium  $T_2N_1M_1$ . Diskordantes Verhalten beider Marker unter Chemotherapie und Rezidiv-Früherkennung durch hCG

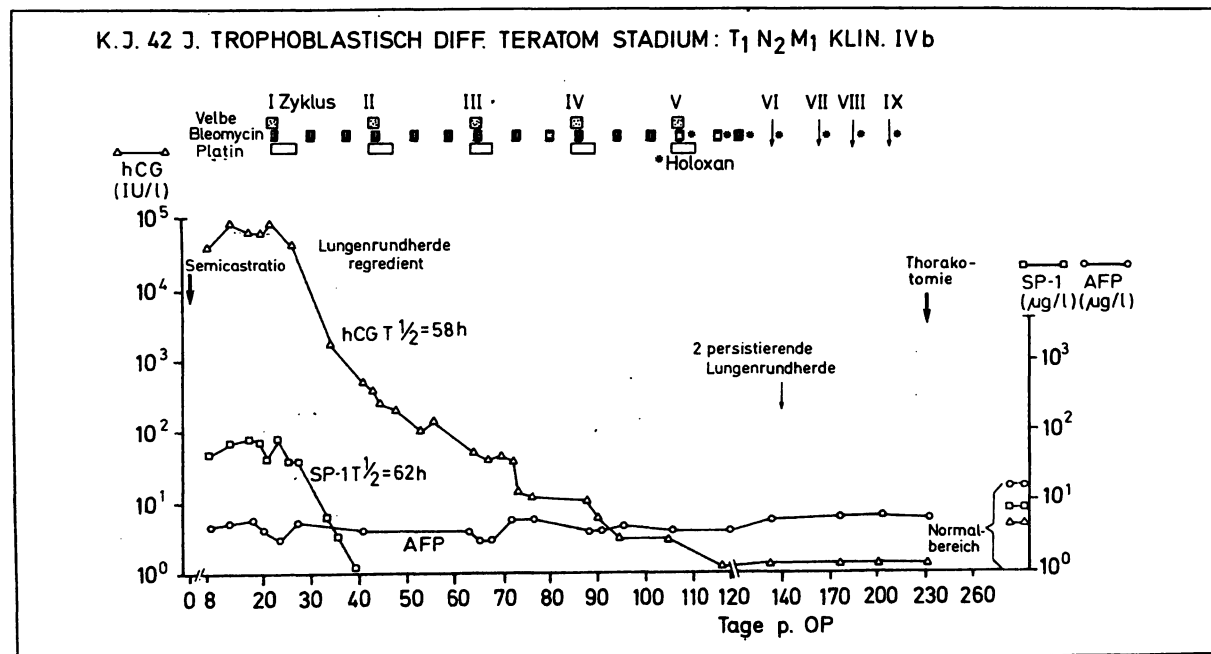


Abb. 7: Verlaufsbeobachtung von hCG, AFP und SP-1 nach Orchidektomie und Chemotherapie bei Pat. K. J. 42 J, Stadium  $T_1N_2M_1$ . Histologischer Typenwandel von trophoblastisch differenziertem Teratom (MTT) mit Primärtumor zum differenzierten Teratom (MTD) in den resezierten Lymphknoten nach Chemotherapie mit Vinblastin, Bleomycin, Cisplatin und Ifosfamid

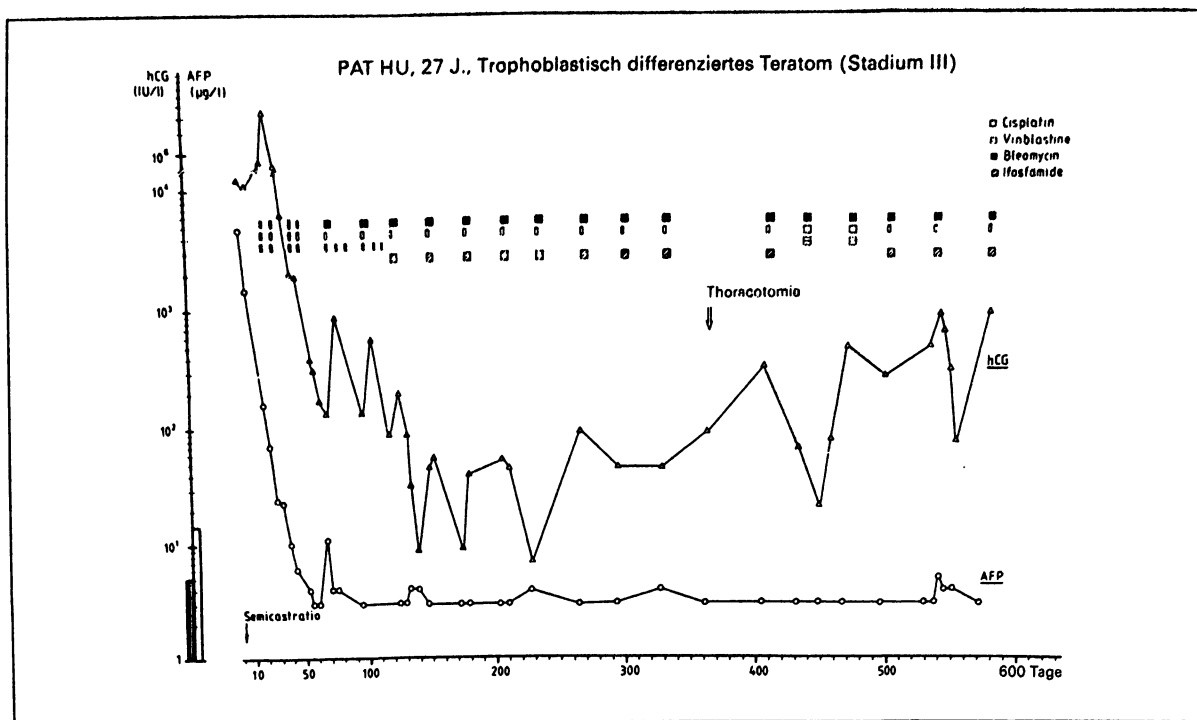


Abb. 8: Verlaufsbeobachtung von hCG und AFP bei Pat. H. U. 27 J mit trophoblastisch differenziertem Teratom (MTT), Stadium T<sub>1</sub>N<sub>2</sub>M<sub>1</sub>. Freisetzung der Marker unter Chemotherapie mit Vinblastin, Bleomycin, Cisplatin und Ifosfamid

kam es zu kurzfristigen Anstiegen von hCG, aber auch von AFP. Dies ist kein Hinweis für eine rasche Tumorprogression, sondern ein Ausschüttungseffekt, der wahrscheinlich durch Tumorzellnekrosen bedingt ist.

#### Prognostische Bedeutung von AFP und hCG

Die Prognose der Patienten mit malignen Hodentumoren hängt nach einer Analyse aus dem Tumorzentrum München und anderer Arbeitsgruppen von der Tumormasse, der Lokalisation der Metastasen und von der Histologie bei Zweiteingriffen nach erfolgter Chemotherapie ab. In dieser Situation stellen die beiden Marker hCG und AFP serologische Parameter dieser den Krankheitsverlauf determinierenden Faktoren dar (14). Darüber hinaus ergab jedoch die Analyse der Hodentumorverbundstudie Bonn anhand von 262 Patienten Hinweise dafür, daß Patienten mit erhöhten hCG-Spiegeln im Stadium I und II signifikant schlechtere Überlebensraten zeigen wie Patienten ohne erhöhte hCG-Spiegel (15) (Tab. 9). Eine Arbeitsgruppe der Stanford-University (16) konnte ferner zeigen, daß der Abfallkinetik der hCG-Serumspiegel unter Chemotherapie beim ersten Therapiezyklus eine prognostisch entscheidende Bedeutung zukommt. In der untersuchten Gruppe von 40 Patienten erreichten nämlich alle

bis auf einen Patienten eine Vollremission über ein Jahr, wenn die hCG-Spiegel auf  $\frac{1}{200}$  des Ausgangswertes absanken oder sich innerhalb der ersten 22 Tage der Chemotherapie normalisierten. Ferner haben Patienten mit hCG-Spiegel über 1000 IU/l eine signifikant schlechtere Überlebensrate.

Ob hCG-positive Seminome eine schlechtere Prognose aufweisen, wird noch immer sehr widersprüchlich diskutiert. Kürzlich konnte Schmoll (17) jedoch zeigen, daß bei Patienten ohne hCG-Nachweis mit Seminom in fortgeschrittenen Tumorstadien IIc bis IIId unter Polychemotherapie und Bestrahlung ein hundertprozentiges rezidivfreies Überleben möglich ist, unter gleicher Therapie jedoch bei Patienten mit hCG-positiven Seminomen nur in 43%. Trotz gleicher Therapie waren die Überlebensraten von Patienten mit hCG-positiven Seminomen sogar schlechter als die von Patienten mit nicht-seminomatösen Tumoren. Hieraus leitet sich das Postulat ab, hCG-positive Seminome aggressiver zu therapieren als bisher.

#### Schlußbetrachtungen

Aufgrund der vorliegenden Befunde dürfen hCG- und AFP-Bestimmungen heute als wesentliche und im gesamten Therapieplan unerläßliche diagnostische Hilfsmittel eingestuft werden. Die verwirrende Nomenklatur der hCG-Bestimmungen sollte uns nicht die Einsicht verwehren, daß für klinische Zwecke Bestimmungsmethoden anzustreben sind, die eine möglichst geringe Kreuzreaktion mit LH und anderen Glycoproteinhormonen aufweisen. Durch den gezielten Einsatz monoclonaler Antikörper läßt sich eine definierte Antigen-Spezifität erreichen. Ob für klinische Zwecke Bestimmungsmethoden mit breiterem Antigenspektrum (Gesamt-molekül, freie  $\beta$ -Kette, Fragmente oder spezielle Varianten von hCG und/oder hCG- $\beta$ ) vorteilhafter sind als solche, die nur das

Tab. 9: 2-Jahres-Überlebensraten beim Nicht-Seminom in Abhängigkeit von Tumorstadium und hCG-Nachweis (N = 262)

	Gesamt	Stadium		
		I	II	III
HCG -	89%	95%	94%	55%
HCG +	65%	83%	77%	34%
Signifikanz	p < 0,01	p < 0,07	p < 0,01	NS

Hodentumorverbundstudie Bonn 1982 (15)



intakte Gesamtmolekül erfassen, ist noch offen. Prinzipiell kann aber eine zu hohe Spezifität auch zu falsch-negativen Befunden führen. Dieses Problem stellt sich erst seit der Einführung monoklonaler Assays und muß in Zukunft detailliert untersucht werden (18). Bei der AFP-Bestimmung gibt es keine Spezifitätsprobleme, polyclonale und monoclonale Antikörper können alternativ verwendet werden. Nützlich sind die Markerbestimmungen für die Primärdiagnose, die Stadieneinteilung, die Differentialdiagnose zwischen Seminom und nicht-seminomatösen Tumoren, vor allem aber für die Verlaufskontrolle und Therapieüberwachung. Erhöhte hCG-Spiegel signalisieren wahrscheinlich sowohl bei seminomatösen wie nicht-seminomatösen Tumoren eine insgesamt schlechtere Prognose.

#### Schrifttum:

1. LAMERZ, R., RJOSK, H., SCHMALHORST, U., FATEH-MOGHADAM, A.: Methodik und klinische Erfahrung mit einem neuen Radioimmunoassay. *Z. Anal. Chem.* 279, 120–121 (1976).
2. MANN, K., LAMERZ, R., HELLMANN, Th., KÜMPER, H. J., STAEHLER, G., KARL, H. J.: Use of human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein radioimmunoassays: Specificity and apparent half-life determination after delivery and in patients with germ cell tumors. *Oncodevelop. Biol. Med.* 1, 301–312 (1980).
3. MANN, K., KARL, H. J.: Molecular heterogeneity of human chorionic gonadotropin and its subunits in testicular cancer. *Cancer* 52, 654–660 (1983).
4. LÖHRS, U., STAEHLER, G., MELLIN, H., HARTENSTEIN, R., MANN, K.: Maligne nicht-seminomatöse Keimzelltumoren und ihre Metastasen bei primärer und sekundärer retroperitonealer Lymphadenektomie. *Verh. Dtsch. Ges. Urol.* 34, 178–180 (1982).
5. COLE, L. A., HARTLE, R. J., LAFERLA, J. J., RUDDON, R. W.: Detection of the free beta subunit of human chorionic gonadotropin (HCG) in cultures of normal and malignant trophoblast cells, pregnancy sera, and sera of patients with choriocarcinoma. *Endocrinology* 113, 1176–1178 (1983).
6. GASPARD, U. J., REUTER, A. M., DEVILLE, J. L., VRINDTS-GEVAERT, Y., BAGSHAW, K. D., FRANCHIMONT, P.: Serum concentration of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunits. 2: Trophoblastic tumors. *Clin. Endocrinol.* 13, 319–329 (1980).
7. STORY, M. T., HUSSA, R. O.: Ectopic secretion of complete human chorionic gonadotropin and  $\beta$ -subunit by human cervical carcinoma cell lines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50, 1057–1061 (1980).
8. PUGH, R. C. B., CAMERON, K. M.: Teratoma. In: *Pathology of the testis* (R. C. B. Pugh; ed.) S. 199–244, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne: Blackwell (1976).
9. MOSTOFI, F. K., SOBIN, L. H.: Histological typing of testis tumours. *International histological classification of tumours*, No. 16, Geneva: World Health Organization (1977).

10. MANN, K., LAMERZ, R., LÖHRS, U., NATHRATH, W., RATTENHUBER, U., KARL, H. J.: HCG und AFP bei Keimzelltumoren des Hodens: Vergleich von Serum- und Gewebesbefunden. In: Uhlenbruck, G., Wintzer, G.: CEA und andere Tumormarker. *Tumor Diagnostik Verlag* 379–388 (1981).
11. NØRGAARD-PEDERSEN, B., SCHULTZ, H. P., ARENDS, J., BRINCKER, H., KRAG JACOBSEN, G., LINDELØV, B., RØRTH, M., SVNNNEKJÆR, I. L., and THE DATECA STUDY GROUP: Tumour markers in testicular germ cell tumours (Five-year experience from the DATECA Study 1976–1980). *Acta Radiol. Oncol.* 23, 287–293 (1984).
12. BEGENT, R. H. J., BAGSHAW, K. D.: Radioimmunolocalization of cancer. In: *Oncodevelopmental Markers* (Ed. Fishman). Academic Press, New York-London (1983).
13. BAGSHAW, K. D.: Tumour markers – where do we go from here? *Br. J. Cancer* 48, 167–175 (1983).
14. HARTENSTEIN, R., JAECKEL, R., CLEMM, C., STAEHLER, G., LÖHRS, U., MANN, K., LAMERZ, R., WILMANN, W.: Vinblastine-Isofamide-Platinum combination in connection with Platinum-Vinblastine-Bleomycin treatment in advanced testicular cancer. *Controlled clinical trials in urologic oncology*. (Ed.: Denis, L., Murphy, G. P., Prout, G. R., Schröder, F.) EORTC Monograph Series Vol. 13, Raven Press, New York (1984).
15. WEISSBACH, L., HILDENBRAND, G.: Register und Verbundstudie für Hodentumoren – Bonn. W. Zuckschwerdt Verlag München (1982).
16. PICOZZI, V. J., FREIHA, F. S., HANNIGAN, J. F., TORTI, F. M., ALTO, P.: Prognostic significance of a decline in serum human chorionic gonadotropin levels after initial chemotherapy for advanced germ-cell carcinoma. *Ann. Intern. Med.* 100, 183–186 (1984).
17. ARASCHMID, M., SCHMOLL, H. J., HECKER, H.: Prognosis of  $\beta$ -HCG positive seminoma in stage I–IIIb. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 107, 71 (1984).
18. LIGHT, P. A., FOSTER, J. P., FELTON, T., ECKERT, H., TOVEY, K. C.: Molecular heterogeneity of chorionic gonadotropin in some testicular cancer patients. *The Lancet*, June 4 (1983).

Danksagung: Herrn Dr. C. Clemm, Med. Klinik III, Großhadern, und den Kollegen des Tumorzentrums München sei für die Zusammenarbeit und die Überlassung der Klinischen Daten gedankt.

#### Anschrift des Verfassers:

Priv.-Doz. Dr. med. Klaus Mann  
Medizinische Klinik II  
Klinikum Großhadern  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Marchioninstr. 15  
8000 München 70

