

## Untersuchung zur Immunogenität und Allergenität eines experimentellen Kuhmilchprotein-Hydrolysates

V. Stephan\*), J. Kühr\*\*\*), G. Sawatzki\*\*) und R. Urbanek\*\*\*)

\*) National Institute of Health, Bethesda, USA

\*\*) Milupa AG, Forschungsabteilung, Friedrichsdorf, FRG

\*\*\*) Universitäts-Kinderklinik, Freiburg, FRG

**Zusammenfassung:** Säuglingsmilchnahrung, deren Proteinbasis auf hydrolysiertem Kuhmilchprotein beruht, werden derzeit als sogenannte hypoallergene Nahrungen entwickelt und sind zum Teil auch erhältlich. Dabei soll die meist enzymatisch durchgeführte Eiweißhydrolyse zur Abnahme der Immunogenität und Allergenität führen. Seren von 31 Kontrollen, 36 Atopikern und 20 Kuhmilchallergikern wurden auf IgG- und IgE-Antikörper-Bindung untersucht. Zusätzlich wurde bestimmt: Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten nach Inkubation mit den Kuhmilchproteinen  $\beta$ -Lactoglobulin und Casein sowie mit einem Kuhmilchprotein-Hydrolysat (Molkenproteine und Caseine) bei 5 Kontrollpersonen, 10 Atopikern und 5 Kuhmilchallergikern. Eine IgG-Bindung mit Kuhmilchproteinen und dem Hydrolysat war in der Mehrzahl der Seren feststellbar. Eine IgE-Bindung ließ sich nur bei 5 der 10 Kuhmilchallergiker belegen, obwohl in allen Seren spezifische IgE-Antikörper gegen Kuhmilchproteine nachzuweisen waren. Histaminfreisetzung durch das Kuhmilchprotein-Hydrolysat wurde bei 5 Atopikern und 2 Kuhmilchallergikern hervorgerufen. Verglichen mit dem Ausgangsprodukt Kuhmilch zeigt das Hydrolysat eine herabgesetzte, aber teilweise erhaltene antigen/allergene Potenz.

**Summary:** Recently hydrolyzed cow milk proteins have been introduced for the production of infant formulas and are available as hypoallergenic infant formulas. To achieve a decrease in antigenicity and allergenicity a protein hydrolysis (mostly enzymatic) is performed. Seres of different groups were tested for IgG and IgE antibody-binding: 31 controls, 36 atopic children, and 20 children with cow milk protein allergy. Histamine release from basophil leucocytes after incubation with the cow milk proteins  $\beta$ -lactoglobuline and casein, as with the cow milk protein hydrolysate, was determined additionally for five control, 10 atopic, and five cow milk allergic children. IgG binding to cow milk protein and to the hydrolysate was found in the majority of the sera tested. IgE binding was detectable in sera of only five of the 10 cow milk allergic children, despite detection of specific IgE-antibodies against cow milk proteins in all sera. Histamine release by the cow milk hydrolysate was observed for five atopic and two cow milk allergic children. The cow milk hydrolysate demonstrated a decreased but partially conserved antigenic/allergenic potency compared with cow milk proteins.

**Schlüsselwörter:** Kuhmilchprotein, Hydrolysat, Immunoglobulinbindung, Histaminfreisetzung, hypoallergene Nahrung

**Key words:** cow milk protein, hydrolysate, immunoglobulin binding, histamine release, hypoallergenic nutrition

## Einleitung

Die phänotypische Expression IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen wird durch Vererbungs- und Umweltfaktoren bestimmt (11, 19). Unter letzteren haben Nahrungsmittel- und Inhalations-Allergenexpositionen, Virusinfektionen und andere Faktoren, wie z.B. inhaled unspezifische Luftsabststoffe, eine große Bedeutung (1, 2, 20). Da es nicht möglich ist, den genotypischen Faktor zu modifizieren, konzentrierten sich Versuche zur Senkung der Atopiefrequenz auf die Vermeidung von Umweltallergenen (6, 17). Die ersten Lebenswochen haben für die Expression allergischer Erkrankungen eine besondere Bedeutung, da sowohl die Schleimhaut als auch das Immunsystem des Neugeborenen bzw. des jungen Säuglings für Umweltfaktoren eine besondere Empfindlichkeit aufweisen (3, 10, 14). Präventive Maßnahmen sollen deshalb zu einem möglichst frühen Zeitpunkt einsetzen und erscheinen besonders bei Säuglingen mit atopischer Disposition gerechtfertigt.

Neben Maßnahmen wie Verlängerung der Stillzeit, verspäteter Gabe von Beikost könnte unter anderem die Einführung hypoallergener Kost in die Säuglingernährung eine Möglichkeit zur Reduzierung der Allergenexposition und somit eventuell zur Atopieprophylaxe darstellen. Vor Einsatz der durch enzymatische Spaltung und thermische Behandlung modifizierten Kuhmilchproteine (8, 9) in der Säuglingernährung sollte jedoch eine Überprüfung der reduzierten immunologischen und allergologischen Eigenschaften erfolgen.

Ziel dieser Untersuchung ist die Beurteilung der Immunogenität und Allergenität eines neu entwickelten Kuhmilchprotein-Hydrolysates im Vergleich zu bekannten Kuhmilchallergenen wie Casein und  $\beta$ -Lactoglobulin. Durch Bestimmung spezifischer IgG- und IgE-Antikörper und Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten sollen ggf. verbleibende antigene Eigenschaften des Kuhmilchprotein-Hydrolysates sowie die Kreuzreaktivität von Hydrolysat und Kuhmilchallergenen festgestellt werden. Getestet wurden Seren bzw. Vollblut von Normalprobanden, Atopikern und Kuhmilchallergikern.

## Patienten und Methoden

### Patienten

Es wurden Seren von insgesamt 31 gesunden Probanden (11 Erwachsene im Alter von 18–46 Jahren, 10 Kinder von 7–15 Jahren und 10 Kinder zwischen 3 und 6 Jahren) untersucht. Die Atopieanamnese dieser Probanden war unauffällig und der Gesamt-IgE-Gehalt des Serums normal.

Die Gruppe der Atopiker umfasste 36 Patienten (10 Erwachsene im Alter von 20–36 Jahren, 10 Kinder von 7–15 Jahren, 9 Kinder zwischen 3 und 6 Jahren und 7 Kinder von 12 Monaten bis 2 Jahren). Alle Probanden waren durch einen Gesamt-IgE-Gehalt im Serum von über 1000 kU/l und den Nachweis spezifischer IgE-Antikörper auf diverse Allergene sowie Sensibilisierungen im Hauttest charakterisiert.

Darüber hinaus wurden 10 Kuhmilchallergiker (1 Erwachsener, 2 Kleinkinder und 7 Säuglinge) untersucht, die neben einer eindeutigen Anamnese eine positive kutane Testung, den Nachweis spezifischer, gegen eines oder mehrere Kuhmilchproteine gerichteter IgE-Antikörper sowie eindeutige mukokutane und teilweise

gastrointestinale Sofortreaktionen im klinischen Allergen-Expositionstest aufwiesen.

Alle Probanden waren entweder Patienten der Universitäts-Kinderklinik Freiburg oder freiwillige Teilnehmer.

#### *Materialien*

Das benutzte experimentelle Kuhmilchprotein-Hydrolysat bestand aus einem Molkenprotein-Casein-Hydrolysat-Gemisch, und die enzymatisch gewonnenen Peptide hatten Molekulargewichtsgrößen von < 10 000, die durch eine beschriebene FPLC-Methode (18) bestimmt wurden. Es wurde eine speziell hergestellte adaptierte Säuglingsmilchnahrung (Herstellung: Milupa AG, Friedrichsdorf) benutzt, die dieses Hydrolysat enthielt. Die Kuhmilchproteine Casein und  $\beta$ -Lactoglobulin für die Allergie-Hautteste und die Bestimmung spezifischer IgG-Antikörper wurden bei Sigma (München) erworben. Weitere Erwerbsquellen sind im Methodenteil angegeben.

#### *Bestimmung spezifischer IgG-Antikörper*

Zur Messung der spezifischen IgG-Antikörper wurde ein Enzym-Immunttest (ELISA) angewendet.

Eine in Vorversuchen bestimmte optimale Antigenmenge von 0,02 mg/ml wurde in gelöstem Zustand in die Mikrotiterplatte übertragen. Die Immobilisierung des Antigens an die Mikrotiterplatte erfolgte bei 4 °C während 24 Stunden. Die Patientenserien wurden 1:25 bis 1:1600 verdünnt. Pro Reaktionseinheit der Mikrotiterplatte wurden 50  $\mu$ l Serumverdünnung eingesetzt. Nach 60minütiger Inkubation der Serumverdünnung mit dem auf der Mikrotiterplatte immobilisierten Antigen wurde der Überstand durch drei Waschvorgänge mit Phosphatpuffer pH 7,4 entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von verdünntem Peroxidase-markiertem Anti-Human-IgG-Globulin (Firma Dakopatts, Hamburg), 1:1000 in isotonischem Phosphatpuffer verdünnt, vom Kaninchen. Nach erneutem Waschvorgang wurden die Komplexe aus immobilisiertem Antigen, humanspezifischem IgG-Antikörper und enzymmarkiertem Anti-Human-IgG-Antikörper durch Zugabe von o-Phenylenediamin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sichtbar gemacht. Die im letzten Schritt enzymatisch bewirkte Farbreaktion wurde nach 10 Minuten mit Schwefelsäure gestoppt (16). Die Stärke der Farbreaktion wurde durch Messung der optischen Absorption bei 492 nm photometrisch bestimmt. Zur Prüfung der Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung wurden die Patientenserien jeweils eine Stunde mit den entsprechenden Antigenen vorinkubiert und die resultierende Inhibition der Bindungsreaktion bestimmt.

Zum Nachweis der Spezifität der festgestellten Antigen-Antikörper-Bindung und der Kreuzreaktivität beider Antigene wurden Inhibitionsversuche im ELISA (Bestimmung spezifischer IgG-Antikörper) bzw. RAST-System (Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper) durchgeführt. Alle Untersuchungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Vermeidung falsch positiver/negativer Ergebnisse wurden an jedem Untersuchungstag Kontrollproben mitgeführt.

#### *Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper*

Die Messung der spezifischen IgE-Antikörper erfolgte mit dem RAST-Verfahren (Pharmacia, Uppsala). Die Kopplung des zu untersuchenden Kuhmilchprotein-Hydrolysates an die RAST-Scheibe wurde von Pharmacia, Uppsala, Schweden, durchgeführt.

#### *Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten*

Die Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten wurde im Vollblut untersucht. Hierzu wurden 2 ml Vollblut im Verhältnis 1:1 mit einem isotonischen

Phosphatpuffer (pH 7,4) verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von ebenfalls im Phosphatpuffer gelöstem Kuhmilchprotein-Hydrolysat in 4 verschiedenen Konzentrationen (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml).

Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wurde die Reaktion durch eine Zentrifugation mit 1000 × g über 5 Minuten bei 4 °C abgestoppt.

Zur Bestimmung der Spontanfreisetzung wurde Antigen durch die gleiche Menge Puffer ersetzt. Die Messung des Total-Histamingehaltes wurde durch Ersetzen des Antigens durch Puffer und anschließendes Erhitzen des Gemisches während 10 Minuten auf 100 °C durchgeführt. Die durch das Hydrolysat freigesetzten absoluten und relativen Histaminmengen wurden durch den Anteil der Spontanfreisetzung korrigiert und als % des Gesamt-Histamingehaltes angegeben. Die Histaminbestimmung erfolgte mit dem von Shaff und Beaven (12) beschriebenen und nach Fuhr und Kownatzki (4) modifizierten Einzelisotopen-Radioenzymassay. Hierbei wird eine mit Tritium markierte Methylgruppe von S-Adenosylmethionin durch Histaminmethyltransferase auf Histamin übertragen. Die Menge des Chloroform-extrahierbaren radioaktiven Methylhistamins entspricht der Menge des eingesetzten Histamins. Die Umrechnung erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve.

#### Statistik

Zum Vergleich der Kuhmilchprotein-Hydrolysat-spezifischen IgG-Spiegel bei Kontrollpersonen, Atopikern und Kuhmilchallergikern in verschiedenen Altersstufen wurde der Wilcoxon-Rank-Test angewendet.

### Resultate

#### 1 Immunologische Kreuzreaktivität von $\beta$ -Lactoglobulin und Kuhmilchprotein-Hydrolysat

In Referenzseren mit bekanntem Gehalt an  $\beta$ -Lactoglobulin-spezifischen IgG-Antikörpern wurde deren Bindung durch Vorinkubation mit dem identischen Antigen um 85 % inhibiert. Durch Vorinkubation der Seren mit dem Kuhmilchprotein-Hydrolysat in einem entsprechenden Reaktionsansatz wurde keine Inhibition beobachtet (Abb. 1A). Die Spezifität der Bindung der IgE-Antikörper an das an der RAST-Scheibe gekoppelte Kuhmilchprotein-Hydrolysat wurde durch Inhibition mit Hydrolysat bzw. mit  $\beta$ -Lactoglobulin als Fremdantigen getestet. Die Antigen-Antikörper-Bindung war zu 83 % durch Hydrolysat und 24 % durch  $\beta$ -Lactoglobulin inhibierbar (Abb. 1B). Eine die Bindungsfähigkeit der IgE-Antikörper betreffende schwach ausgebildete Kreuzreaktivität von  $\beta$ -Lactoglobulin und dem untersuchten Kuhmilchprotein-Hydrolysat erscheint somit wahrscheinlich. Hingegen zeigen  $\beta$ -Lactoglobulin-spezifische IgG-Antikörper für  $\beta$ -Lactoglobulin eine Erkennung spezifischer Epitope, die im Hydrolysat nicht mehr nachweisbar sind.

#### 2 Bestimmung der spezifischen IgG-Antikörper

Die Bestimmung der spezifischen IgG-Antikörper gegen Hydrolysat wurde bei insgesamt 77 Probanden vorgenommen. Die genaue Verteilung der Titerstufen in den verschiedenen Probandengruppen geht aus Abbildung 2 hervor. Unter Berücksichtigung aller Titerstufen waren in der Gruppe der Normalprobanden bei 17 von 31 Probanden (54 %) IgG-Antikörper gegen Hydrolysat (Abb. 2A) feststellbar. Die geringsten Konzentra-

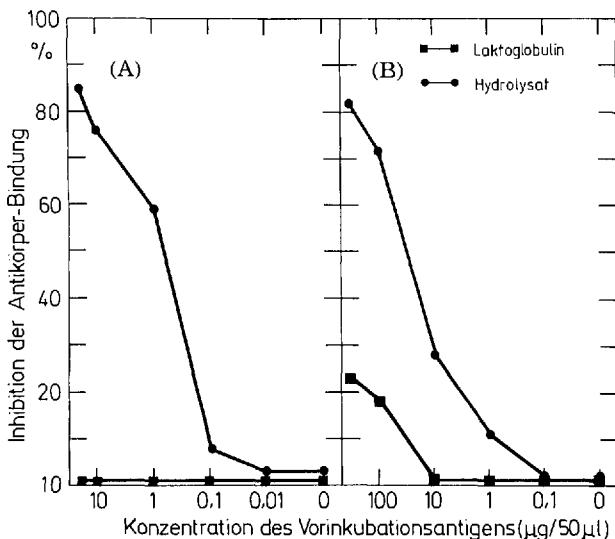


Abb. 1. Inhibition der IgG-(A) bzw. IgE-(B)Antikörperbindung. Mit dem immobilisierten Kuhmilchprotein-Hydrolysat werden Seren zusammengebracht, die mit unterschiedlichen Mengen (x-Achse) von Hydrolysat oder  $\beta$ -Lactoglobulin vorinkubiert wurden. Die dadurch erzeugte Bindungsreduktion wird in Prozent der nicht inhibierten Bindung angegeben.

tionen spezifischer IgG-Antikörper gegen das Hydrolysat fanden sich in dieser Gruppe; die höchste erreichte Titerstufe war 100. Bei 21 von 36 Atopikern (58 %) fanden sich Hydrolysat-spezifische IgG-Antikörper mit maximalen Titerstufen von 200 bzw. 400 (Abb. 2B). Der höchste Anteil an

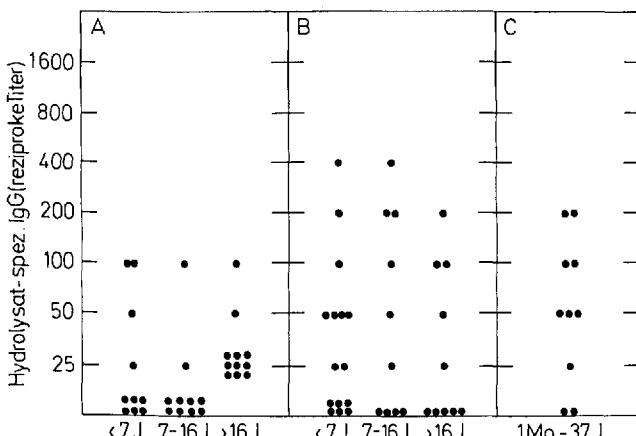


Abb. 2. Bestimmung Kuhmilch-Hydrolysat-spezifischer IgG-Antikörper bei Normalprobanden (A, n = 31), Atopikern (B, n = 36) und Kuhmilchallergikern (C, n = 10) verschiedener Altersstufen.

Seren mit positivem Nachweis Hydrolysat-spezifischer Antikörper wurde bei Kuhmilchallergikern (8 von 10 Patienten, 80 %) gemessen. Die Verteilung der Titerstufen der spezifischen IgG-Antikörper zeigt keine statistisch signifikant höhere Konzentration im Vergleich zu den Gruppen der Normalprobanden und Atopiker (Abb. 2C), wobei zu bemerken ist, daß in der Gruppe 2C nur 10 Kinder mit Kuhmilchallergie untersucht wurden. Damit ist letztere Gruppe relativ klein, und somit könnte diese Fallzahl, im Vergleich mit den anderen Gruppen, Ursache für die fehlende Signifikanz der Unterschiede sein. In keiner der getesteten Gruppen fand sich eine Abhängigkeit des Nachweises Hydrolysat-spezifischer Antikörper von der Altersklasse der Probanden.

### 3 Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper

Untersucht wurden alle oben aufgeführten Seren, bei denen die Bestimmung der spezifischen IgG-Antikörper durchgeführt wurde. Gegen das Hydrolysat gerichtete IgE-Antikörper konnten bei keinem der getesteten Normalpersonen bzw. Atopikern gefunden werden. In allen Seren der untersuchten Kuhmilchallergiker (Abb. 3) fanden sich  $\beta$ -Lactoglobulin-spezifische IgE-Antikörper der RAST-Klasse 1–4 als Ausdruck der vorhandenen Sensibilisierung. Demgegenüber waren Hydrolysat-spezifische IgE-Antikörper in dieser Gruppe nur bei 5 Patienten nachweisbar, die Konzentration der Hydrolysat-spezifischen IgE-Antikörper lag jeweils 1 bis 2 RAST-Klassen unter der der  $\beta$ -Lactoglobulin-spezifischen IgE-Antikörper.

### 4 Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten

Die Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten wurde bei 5 Normalprobanden, 10 Atopikern und 5 Kuhmilchallergikern durchgeführt, die jeweils aus den oben beschriebenen Probandengruppen rekrutiert

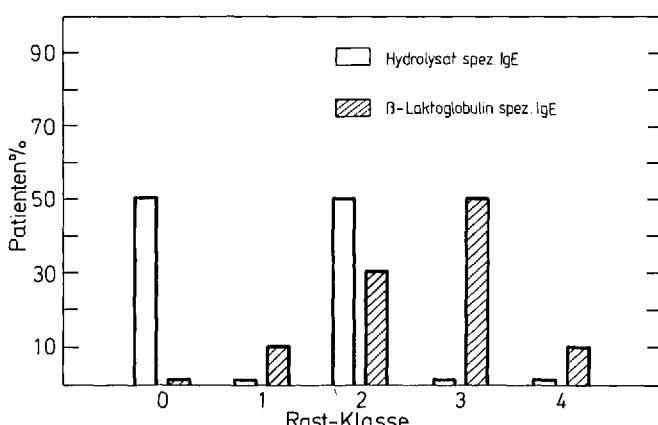


Abb. 3. Vergleich des Häufigkeitsnachweises von  $\beta$ -Lactoglobulin- und Hydrolysat-spezifischen IgE-Antikörpern bei 10 Kuhmilchallergikern.

Tab. 1. Hydrolysat- (HYD.), Kasein- (KAS.) und  $\beta$ -Lactoglobulin- (LAK) induzierte maximale Histaminfreisetzung aus dem Vollblut bei Normalen, Atopikern und Kuhmilchallergikern (Angabe in % der Gesamtmenge an Histamin).

|                    | Antigen       | Histaminfreisetzung (%) |      |      |
|--------------------|---------------|-------------------------|------|------|
|                    |               | 0-5                     | 6-10 | > 10 |
| Normale            | n = 5 (Hyd.)  | 5                       |      |      |
| Atopiker           | n = 10 (Hyd.) | 5                       | 5    |      |
| Kuhmilchallergiker | n = 5 (Hyd.)  | 3                       | 1    | 1    |
| Kuhmilchallergiker | n = 5 (Kas.)  | 2                       | 0    | 3    |
| Kuhmilchallergiker | n = 5 (Lak.)  | 2                       | 1    | 2    |

wurden. Unter 20 mit dem Histaminfreisetzungstest untersuchten Probanden fand sich in 6 Fällen (5 Atopiker, 1 Kuhmilchallergiker) eine schwache (6-10 % des Total-Histamingehaltes) und in einem Fall eine starke (34 %) Hydrolysat-induzierte Histaminausschüttung (Tab. 1).

Zum Ausschluß falsch negativer Reaktionen wurden alle Zellen von Kuhmilchallergikern ebenfalls durch Anti-IgE-Antikörper stimuliert, da in ca. 15 % oder unselektierten Probanden keine IgE-induzierte Histaminfreisetzung zu erzielen ist (13). Die Freisetzungswerte waren in unserem Probandengut 18-71 % des Totalhistamins. Bei allen getesteten Kuhmilchallergikern fand sich eine eindeutige Casein- bzw.  $\beta$ -Lactoglobulin-induzierte Histaminfreisetzung mit mindestens einem der beiden Antigene im Konzentrationsbereich von 10 ng/ml bis 10  $\mu$ g/ml (Abb. 4, Darstellung der Mittelwerte). Der Bereich der Histaminfreisetzung betrug 1-59 % mit Casein bzw. 3-69 % mit  $\beta$ -Lactoglobulin. Der Vergleich der Casein- und  $\beta$ -Lactoglobulin- mit der Hydrolysat-induzierten Histaminfreisetzung

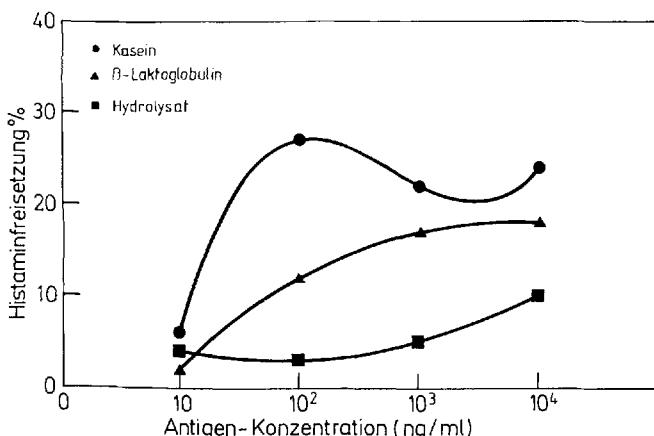


Abb. 4. Vergleich von Casein-,  $\beta$ -Lactoglobulin- und Hydrolysat-induzierter Histaminfreisetzung bei 5 Kuhmilchallergikern. Angegeben wurde jeweils der Mittelwert aus 5 Bestimmungen.

zeigt bei allen Patienten geringere Freisetzungswerte mit dem Kuhmilchprotein-Hydrolysat (Bereich 0–34 %) bei allen getesteten Antigenkonzentrationen.

## Diskussion

Als Reaktion auf den Kontakt mit immunogenen Substanzen bildet das Immunsystem des Menschen insbesondere spezifische Immunglobuline vom IgG-Typ. Spezifische IgG-Antikörper können daher als Marker für die immunologische Auseinandersetzung mit Antigenen betrachtet werden. In dem von uns untersuchten Probandengut ließ sich in 46 von 77 Fällen der Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen das getestete Kuhmilchprotein-Hydrolysat führen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen bzw. eine Abhängigkeit der Titerhöhe der spezifischen IgG-Antikörper vom Alter der Probanden fanden sich nicht. Aus den dargestellten Ergebnissen muß auf eine Restimmunogenität des Kuhmilchprotein-Hydrolysates geschlossen werden, da in 60 % der untersuchten Seren spezifische IgG-Antikörper gefunden wurden. Darüber hinaus deutet die fehlende Inhibierbarkeit der IgG-Antikörper-Hydrolysat-Bindung selbst durch hohe  $\beta$ -Lactoglobulin-Konzentrationen auf eventuell neu aufgetretene antigenen Eigenschaften des Kuhmilchprotein-Hydrolysates hin. Walker (21) berichtet, daß im Serum von Tieren, die mit unterschiedlichen Proteinen gefüttert wurden, ein Spektrum von nieder-, intermediär- und höhermolekularen Proteinfragmenten gefunden wurde, jedoch nur sehr kleine Mengen des nativen Proteins. Eine Modifizierung der antigenen Eigenschaften durch die hydrolytische Prozessierung des Ausgangsproduktes, ähnlich wie bei der natürlichen Verdauung, ist daher vorstellbar (7, 15). Deswegen kann angenommen werden, daß die Antikörperbildung bei den Hydrolysaten ähnlich ablaufen kann wie bei den intakten Proteinen. Inwieweit neue Spezifitäten der Antigene (neue Epitope) auftreten können, gegen die andere Antikörper gebildet werden, muß in weiteren Untersuchungen, möglicherweise tierexperimentell, geklärt werden.

Die Untersuchung der IgE-Antikörper-Bindungsfähigkeit des Kuhmilchprotein-Hydrolysats ist auf Grund der Bedeutung des Immunglobulins E als Mittler der allergischen Sofortreaktion von besonderem Interesse. Weder bei Normalprobanden noch in dieser Gruppe der Atopiker wurden IgE-Antikörper gegen Hydrolysat nachgewiesen. Bei 10 Kuhmilchallergikern fanden sich in 5 Fällen Hydrolysat-spezifische Antikörper, jedoch bei allen Patienten der Nachweis von  $\beta$ -Lactoglobulin-spezifischen IgE-Antikörpern. Dieser Nachweis einer verminderten IgE-Antikörper-Bindungsfähigkeit des Hydrolysates steht im Gegensatz zur Untersuchung von Haddad (5), der über häufigeres Auftreten von IgE-Antikörpern gegen prozessierte Kuhmilchprotein-Allergene im Vergleich zu den nativen Proteinen bei Kuhmilchallergikern mit Sofortreaktionen berichtet.

Durch die Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten wird nicht nur die Präsenz Antigen-spezifischer IgE-Antikörper auf der Zellmembran nachgewiesen, sondern es werden in diesem Verfahren auch zelluläre Pathomechanismen der allergischen Reaktion berücksichtigt. In Ana-

logie zu den Ergebnissen der Untersuchung der Bindungsfähigkeit von IgE-Antikörpern zeigte sich bei den Normalprobanden und bei der Hälfte der Atopiker keine Histaminfreisetzung durch das Kuhmilchprotein-Hydrolysat. Da bei diesen Probanden keine Hydrolysat-spezifischen IgE-Antikörper nachweisbar waren, war ebenfalls nicht mit einer IgE-induzierten Histaminfreisetzung zu rechnen. Die bei fünf Atopikern aufgetretene Histaminfreisetzung von 6–10 % kann auf nicht immunologisch bedingter Zellaktivierung sowie auf einer durch die IgE-Antikörper-Bestimmung nicht erfaßten allergenen Potenz des Hydrolysates beruhen. Der ansteigende Verlauf der Hydrolysat-Histamin-Freisetzung im oberen Konzentrationsbereich könnte auch als beginnende zytotoxische, osmotisch verursachte, nicht IgE-vermittelte Mediatorfreisetzung gedeutet werden. Demgegenüber wiesen alle der Kuhmilchallergiker eine eindeutige Histaminfreisetzung mit mindestens einem der beiden Kuhmilch-,  $\beta$ -Lactoglobulin- und Casein-Allergene auf. Insgesamt zeigt aber der Vergleich mit dem Kuhmilchprotein-Hydrolysat sowohl in der Anzahl der positiven Teste als auch im Ausmaß der Histaminfreisetzung Unterschiede im Sinne einer Reduktion der allergenen Potenz des Hydrolysates.

Nach den vorliegenden Ergebnissen weist das untersuchte Kuhmilchprotein-Hydrolysat eine spezifische Bindungsfähigkeit mit humanen Serum-IgG-Antikörpern und damit wahrscheinlich auch eine immunoogene Potenz auf. Ein Vergleich des Kuhmilchprotein-Hydrolysates mit den beiden bekannten Kuhmilchallergenen Casein und  $\beta$ -Lactoglobulin in der Gruppe der Kuhmilchallergiker deutet sowohl betreffend der IgE-Antikörper-Bindungsfähigkeit als auch der antigeninduzierten Histaminfreisetzung auf eine reduzierte, jedoch weiterhin nachweisbare allergene Potenz hin. Zur Herstellung von Säuglingsnahrungen ohne sensibilisierende Eigenschaften sollte versucht werden, die antigenen Eigenschaften des Ausgangsproduktes weitgehend aufzuheben.

#### Literatur

1. Berciano FA, Crespo M, Bao CG, Alvarez FV (1987) Serum levels of total IgE in non-allergic children. *Allergy* 42:276–283
2. Björksten F, Suoniemi I (1981) Time and intensity of first pollen contacts and risk of subsequent pollen allergies. *Acta med scand* 209:299–303
3. Eastham EJ, Lichauco T, Grady MI, Walker AW (1978) Antigenicity of infant formulas: Role of immature intestine on protein permeability. *J Pediatr* 93:561–564
4. Fuhr N, Kownatzki E (1986) Inhibition of rat kidney histamine-N-methyltransferase by biogenic amines. *Pharmacology* 32:114
5. Haddad ZH, Kalra V, Verma S (1979) IgE-antibodies to peptic and peptic-tryptic digests of  $\beta$ -lactoglobulin: significance in food hypersensitivity. *Ann Allergy* 42:368–371
6. Hattevig G, Kjellman B, Sigurs N, Björksten B, Kjellman NIM (1989) Effect of maternal avoidance of eggs, cow's milk and fish during lactation upon allergic manifestations in infants. *Clinical and Experimental Allergy* 19:27–32
7. Heppel LM, Sissons JW, Pedersen HE (1987) A comparison of the antigenicity of soya-bean-based infant formulas. *Br J Nutr* 50:393–403

8. Jost R, Monti JC, Pahud JJ (1987) Whey protein allergenicity and its reduction by technological means. *Food Technology* 41:118–121
9. Pahud JJ, Monti JC, Jost R (1985) Allergenicity of whey proteins: Its modification by tryptic in-vitro hydrolysis of the protein. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 4:408
10. Savilahti E, Salmenperä L, Tainio VM, Halme H, Perheentupa J, Siimes A (1987) Prolonged exclusive breast-feeding results in low serum concentrations of immunoglobulin G, A and M. *Acta paediat scand* 76:1–6
11. Sears MR, Chow CM, Morseth DJ (1980) Serum total IgE in normal subjects and the influence of a familiar history of allergy. *Clin Allergy* 10:423–431
12. Shaff RE, Beaven MA (1974) Increased sensitivity of the enzymatic isotopic assay of histamine: Measurement of histamine in plasma and serum. *Analyt Biochem* 94:425–430
13. Sobotka AK, Dembo M, Goldstein B, Lichtenstein LM (1979) Antigen-specific desensitization of human basophils. *J Immunol* 122:511–517
14. Strobel S (1988) Developmental aspects of food allergy. In: Reinhardt D, Schmidt E (eds) *Food Allergy*. Raven Press, Nestle Nutrition 17:99–115
15. Udall JN (1989) Serum antibodies to exogenous proteins: The significance? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 8:145–147
16. Urbanek R, Kemeny MD (1988) IgG and IgG subclasses response to dietary antigens in patients with immediate and nonimmediate food allergy. In: Reinhardt D, Schmidt E (eds) *Food Allergy*. Raven Press, Nestle Nutrition 17:71–79
17. Zeiger RS, Heller S, Mellon M, O'Conner R, Hamburger RN (1986) Effectiveness of dietary manipulation in the prevention of food allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol* 78:224–228
18. Georgi G, Sawatzki G (1989) Molecular weight determination of protein hydrolysates (FPLC). In: Barth CA, Schlimme E (eds) *Milk Proteins*. Steinkopff Verlag Darmstadt, S 238–241
19. Rowntree S, Cogswell JJ, Platts-Mills TAE, Mitchel EB (1985) Development of IgE and IgE-antibodies to food and inhalant allergens in children at risks of allergic disease. *Arch Dis Child* 60:727–735
20. Mitchell EA (1983) Increasing prevalence of asthma in children. *N Z med J* 96:463
21. Walker WA (1988) Transmucosal Passage of Antigens. In: Reinhardt D, Schmidt E (eds) *Food Allergy*. Raven Press, Nestle Nutrition 17:15–34

Eingegangen 18. September 1989

Für die Verfasser:

Prof. Dr. R. Urbanek, Universitäts-Kinderklinik, Mathildenstraße 1, D-7800 Freiburg i. Br.