

Titel

Der Einfluss von *Parachlorella beyerinckii* CK-5 auf die Aufnahme und Ausscheidung von Methylquecksilber (MeHg) bei Mäusen

Takuya Uchikawa¹, Akira Yasutake², Yoshimitsu Kumamoto¹, Isao Maruyama¹, Shoichiro Kumamoto¹ und Yotaro Ando¹

¹ Department of Research & Development, Chlorella Industry Co., Ltd., 1343 Hisatomi, Chikugo, Fukuoka 833-0056, Japan

¹ Biochemistry Section, National Institute for Minamata Disease, 4058-18 Hama, Minamata, Kumamoto 867-0008, Japan

(Eingelangt am 17. September 2009; Angenommen am 13. November 2009)

ZUSAMMENFASSUNG – *Chlorella* (*Parachlorella beyerinckii* CK-5), früher bezeichnet als *Chlorella vulgaris* CK-5, ist eine einzellige grüne Alge, die seit vielen Jahren als Nahrungsergänzungsmittel verwendet wird. Um die Wirkung einer Entgiftung von Methylquecksilber (MeHg) durch *Chlorella* zu erforschen, untersuchten wir die Aufnahme und Ausscheidung von MeHg bei Mäusen. Weibliche C57BL/6N Mäuse wurden willkürlich in drei Gruppen zu je 5 aufgeteilt und in Stoffwechsellkäfigen untergebracht. Die Mäuse bekamen oral MeHg verabreicht, bei Dosen von 5 mg (4 mg Hg)/kg Körpergewicht mit oder ohne 100 mg/Maus an *P. beyerinckii* Pulver (BP) und wurden dementsprechend entweder einer MeHg Gruppe oder einer MeHg + BP Gruppe zugeteilt. Vierundzwanzig h nach der oralen Verabreichung wurden Kot und Urin gesammelt, und Blut-, Leber- und Nierenproben entnommen. Der Gesamtinhalt an Quecksilber in den entnommenen Proben wurde mithilfe einer atomaren Absorptionmethode bestimmt. Die Mengen an Quecksilber, die im Kot und Urin der MeHg + BP Gruppe ausgeschieden wurden, waren fast um ein 1.9- und 2.2-faches höher verglichen mit denen der MeHg Gruppe. Auf der anderen Seite war der Quecksilberanteil im Blut und den Organen nicht bedeutend unterschiedlich in den beiden Gruppen. Diese Resultate legen nahe, dass die Einnahme von BP die Ausscheidung von Hg sowohl im Kot als auch im Urin einleiten könnte, obwohl sie keinen Einfluss auf die Aufnahme von MeHg durch den Verdauungstrakt hat. Die Wirkung von BP auf die Akkumulation von Quecksilber im Gewebe könnte in einem langfristigen Experiment ersichtlich werden.

Schlüsselworte: *Parachlorella beyerinckii*, MeHg, *Chlorella*, Entgiftung, Ausscheidung

EINLEITUNG

Methylquecksilber (MeHg) ist eine neurotoxische Metallverbindung, die viel zu industriellen Zwecken eingesetzt wurde. In letzter Zeit hat der individuelle Verzehr von Meeresfrüchten weltweit zugenommen. Obwohl schwangere Frauen an vielen Orten, darunter auch die Vereinigten Staaten und Europa (Mahaffey, 1999; FDA, 2001; Europäische Kommission, 2004), immer häufiger davor gewarnt werden, Meeresfrüchte zu konsumieren. Diese Warnungen beruhen auf Ängsten bezüglich des schädlichen Einflusses von MeHg in Meeresfrüchten auf den sich entwickelnden Embryo.

Chlorella (*Parachlorella beyerinckii* CK-5) ist eine einzellige grüne Alge mit einem Durchmesser von etwa 3 bis 8 μm , und wurde wegen ihrer Fülle an Nährstoffen wie Proteinen, Vitaminen, Mineralien und Ballaststoffen seit vielen Jahren als Nahrungsergänzung konsumiert. Es ist bereits bekannt, dass *Chlorella* die Fähigkeit hat, gewisse Metalle wie Cd, Zn, Cu und Pb aufzunehmen (Sandau *et al.*, 1996). Daher wurde sie in Abwasseraufbereitungssystemen verwendet, um die kontaminierten Schwermetalle zu reduzieren (Almaguer Cantu *et al.*, 2008). Außerdem wurde berichtet, dass *Chlorella* bei der Entgiftung von Cadmium und Dioxinen in Tierversuchen nützlich sei (Nagao *et al.*, 1983; Morita *et al.*, 2001). Dennoch blieben die Wirkungen von *Chlorella* im Hinblick auf MeHg unklar. Um den Einfluss von *Chlorella* auf die Aufnahme und Ausscheidung von MeHg bei Mäusen zu untersuchen, haben wir hier sowohl die Ausscheidung von Hg als auch das Ausmaß der Akkumulation von innerem Hg untersucht wobei wir Mäuse verwendeten, denen MeHg verabreicht wurde.

Korrespondenz: Takuya Uchikawa (E-Mail: takuya_uchikawa@chlorella.co.jp)

MATERIALIEN UND METHODEN

Zubereitung von *Parachlorella beyerinckii* Pulver (BP)

Parachlorella beyerinckii CK-5, eine einzellige grüne Alge mit einem Durchmesser von etwa 3 bis 8 μm , wurde in dieser Studie verwendet. Ursprünglich wurde sie aufgrund ihrer morphologischen Charakteristika entsprechend der Beschreibung von Fott und Nov'akov'a (1969) als *C. vulgaris* bezeichnet, und wurde auf der Grundlage von sowohl den Sequenzen der 18S rRNA Gene als auch ihrer morphologischen Charakteristika entsprechend der Beschreibung von Krienitz *et al.* (2004) als *P. beyerinckii* neu benannt. Die Algenzellen wurden in einem Freiluftbecken gezüchtet und geerntet, und wurden mittels eines Zentrifugalseparators mit Wasser gewaschen. Der entstandene Algenschlamm wurde während 1 min mit einem Plattenwärmetauscher von 118°C erwärmt und mit einem Sprühtrockner bei einer Blasetemperatur von 170°C getrocknet.

Tiere und Chemikalien

Weibliche C57BL/6N Mäuse (im Alter von 10 Wochen) wurden bei Charles River Japan Co., Ltd. (Kanagawa, Japan) gekauft und in dieser Studie verwendet. MeHg Chlorid und alle Chemikalien wurden bei Wako Pure Chemicals Ind. (Osaka, Japan) bezogen. Die Mäuse wurden willentlich in drei Gruppen zu je fünf Tieren aufgeteilt und in Stoffwechsellkäfigen mit einem 12 stündigen Lichtzyklus (6:00 bis 18:00) bei $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ und $55 \pm 5\%$ relativer Luftfeuchtigkeit untergebracht (eine Maus pro Käfig). Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter (geschrotete Nagetiernahrung, CE-2, CREA Japan Inc., Tokyo, Japan) und Wasser.

MeHg wurde in destilliertem Wasser aufgelöst (184 µg/ml) und den Mäusen bei einer Dosis von 5 mg (4 mg Hg)/kg Körpergewicht mit oder ohne 100 mg/Maus an BP verabreicht. Dementsprechend wurden die Mäuse einer MeHg Gruppe oder einer MeHg + BP Gruppe zugeteilt. In der Kontrollgruppe wurden den Mäusen die gleiche Menge an destilliertem Wasser statt MeHg verabreicht. Vierundzwanzig h nach der Verabreichung wurde den Mäusen bei Phenobarbitalanästhesie aus der unteren Hohlvene Blut abgenommen; die Tiere wurden dann mit phosphatgepufferter Salzlösung perfundiert (pH 7.3), und Leber und Nieren wurden entfernt. Die Tiere wurden entsprechend der von NIH veröffentlichten Richtlinien behandelt.

Analyse der Gesamtmenge an Hg

Alle Proben wurden zur Vorbehandlung mit der Methode der Naßveraschung abgebaut (Ministry of Environ, 2004), und danach wurde die Gesamtmenge an Hg in allen Proben mit der Methode der Reduktion durch Verdampfung bestimmt, wobei ein Quecksilber Analyser RA-3320 verwendet wurde (Nippon Instruments Corp., Tokyo, Japan).

Adsorption von MeHg an BP und unverdauliche Pepsinrückstände von BP (dBP)

Die Pepsinverdauung von BP wurde entsprechend der Methode von AOAC (1990) durchgeführt. Nach der enzymatischen Reaktion wurde der unverdauliche Rückstand durch Zentrifugation bei 3,000 Upm während 10 min bei Raumtemperatur gesammelt und dann gefriergetrocknet. Der Ertrag der Gefrieretrockenzubereitung wurde als dBP verwendet. Beim Experiment der Aufnahme von MeHg *in vitro* wurden 100 mg von BP und dBP in 10 ml einer 180 µg/ml MeHg Chloridlösung (144 µg Hg/ml) bei 37° C für 16 h geschüttelt. Danach wurden BP und dBP durch Zentrifugation bei 3,000 Upm während 15 min bei Raumtemperatur aus der Lösung entfernt. Die Konzentrationen in den Überständen wurden gemessen, und dann wurden die Adsorptionsraten von MeHg an BP und dBP berechnet. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt.

Statistische Analyse

Die Bedeutung von Abweichungen wurde entsprechend dem Student T-Test unter Verwendung von Microsoft Office Excel 2007 für Windows (Microsoft Co., Ltd., Tokyo, Japan) berechnet. Jeder Wert von $p < 0.05^*$ oder $p < 0.01^{**}$ wurde als statistisch bedeutsam angesehen.

RESULTATE UND ERÖRTERUNG

Um den Einfluss von *Chlorella* unter der Verwendung von Mäusen auf die Ausscheidung und Aufnahme von MeHg zu untersuchen, teilten wir die Tiere in drei Gruppen, die MeHg Gruppe, die MeHg + BP Gruppe und die Kontrollgruppe. Jeder der Mäuse wurde MeHg (5 mg/kg an MeHg Chlorid), MeHg + BP (100 mg/Maus) oder destilliertes Wasser verabreicht. Das anfängliche Durchschnittskörpergewicht der drei Gruppen betrug 18,4 g, und 24 h nach der Verabreichung wurde kein Unterschied zwischen den drei Gruppen beobachtet. Außerdem wurden keine bedeutsamen Unterschiede bei der Futter- und Wasseraufnahme während 24 h zwischen den Gruppen gefunden (Daten nicht angeführt), was darauf hinweist, dass das Körpergewicht vermutlich nicht durch die Verabreichung von MeHg und BP beeinflusst werden würde.

Die Ausscheidungen von Hg in Kot und Urin in den 24 h nach der Verabreichung von MeHg werden in Fig. 1 dargestellt. Die Mengen an Hg, die bei den Gruppen MeHg und MeHg + BP im Kot ausgeschieden wurden waren 3.12 ± 0.42 µg/Maus (Mittelwert \pm Standardabweichung)

und $5.98 \pm 0.52 \mu\text{g}/\text{Maus}$. Die Fäkalausscheidung von Hg bei der MeHg +BP Gruppe war 1,9-mal höher als bei der MeHg Gruppe. In der Kontrollgruppe wurde kein Hg im Kot festgestellt. Außerdem gab es zwischen den drei Gruppen keinen bedeutenden Unterschied bei den Kotmengen in den 24 h nach der Verabreichung (Daten nicht angegeben). MeHg ist eine leicht aufnehmbare toxische Substanz, und es ist bekannt, dass 95 % oder mehr des aufgenommenen Hg bei Menschen vom Magendarmtrakt absorbiert wird (Canuel *et al.*, 2006). Da *Chlorella* dafür bekannt ist, dass es die Fähigkeit hat, mehrere Schwermetalle zu adsorbieren (Sandau *et al.*, 1996), könnten die Ernährungskomponenten von BP einen Teil des MeHg im Magendarmtrakt adsorbieren. Tatsächlich wurde 80 % des Bleis in einer 200 ppm Bleilösung an dBP adsorbiert (Uchikawa *et al.*, 2009). Die adsorbierte Menge an MeHg kann im Kot ohne Darmabsorption aufscheinen. MeHg wurde mit dBP *in vitro* inkubiert, um seine Adsorption an dBP zu untersuchen. Es wurde herausgefunden, dass die Adsorptionsrate von MeHg an dBP sogar nach einer 16 h - Inkubation nur 6.6 % betrug (Tabelle 1). Da die Zeit der Interaktion zwischen MeHg und dBP im Magendarmtrakt viel kürzer als 16 h wäre, sollte die tatsächliche Adsorptionsrate dort viel niedriger als 6,6 % sein. Dementsprechend wäre die Aufnahme von MeHg im Magendarmtrakt meist zu gleichen Raten in der MeHg- und der MeHg + BP Gruppe aufgetreten.

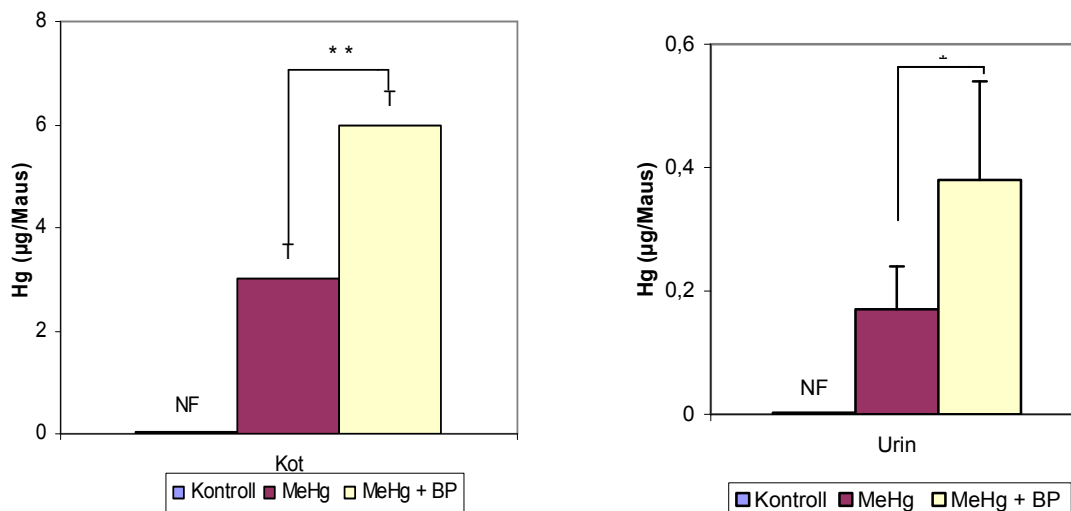


Fig. 1 Ausscheidung von MeHg in Kot und Urin 24 h nach der Verabreichung von MeHg und BP. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung. $n = 5$. NF: Nicht festgestellt. Bedeutende Unterschiede wurden durch * ($p < 0.05$) und ** ($p < 0.01$) gezeigt.

Tabelle 1 Die Adsorption von MeHg an BP und dBP *in vitro*

	BP	dBP
Anfangsquecksilberkonzentration im Glaskolben ($\mu\text{g Hg}/\text{ml}$)	144	144
Quecksilberkonzentration im Überstand ($\mu\text{g Hg}/\text{ml}$)	124.0 ± 6.7	134.5 ± 5.1
Adsorptionsraten von Hg an BP und dBP (%)	13.9 ± 4.7	6.6 ± 3.5

Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung. $n = 3$

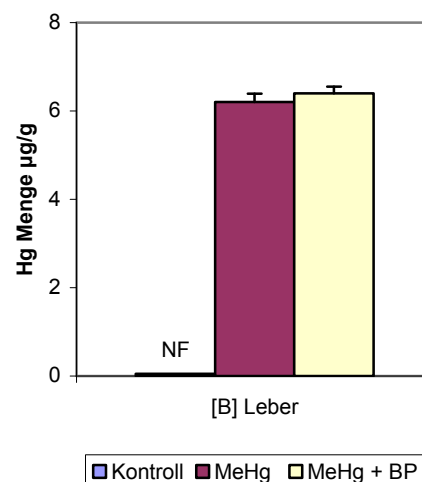
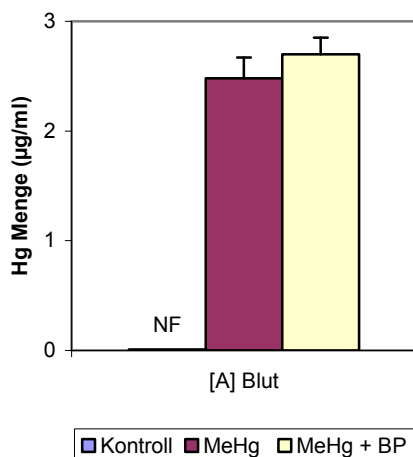
Als alternativen Faktor für die Zunahme der fäkalen Ausscheidung von Hg stellten wir die Hypothese auf, dass die Einnahme von BP die Ausscheidung von MeHg durch die Galle beschleunigen könnte. Sano (1982) berichtete, dass Komponenten von BP wie Lipidverbindungen und Ballaststoffe die Reabsorption von Gallensäure im Verdauungstrakt

hemmen, und so die Sekretion von Galle in den enterohepatischen Kreislauf beschleunigen. Das meiste MeHg wurde mit Glutathion verbunden in der Leber und im Blut gefunden, wobei das MeHg-Glutathion dann von der Leber mit der Galle abgesondert wurde (Ballatori und Clarkson, 1983; Hirayama *et al.*, 1987), und danach wurde eine kleine Menge davon mit dem Kot ausgeschieden. So könnten die kombinierten Wirkungen der dBP-Adsorption und der beschleunigten Gallenausscheidung dazu beitragen, dass es in der MeHg + BP Gruppe zu einer erhöhten Hg Ausscheidung durch den Kot kam, wie in der vorliegenden Studie beobachtet wurde.

Was die Ausscheidung von Hg durch den Urin betrifft, so betragen die Mengen an ausgeschiedenem Hg in der MeHg- und der MeHg + BP Gruppe $0.17 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{Maus}$ beziehungsweise $0.38 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{Maus}$. Die Mengen an durch Urin ausgeschiedenem Hg in der MeHg + BP Gruppe waren 2.2-mal so hoch wie jene in der MeHg Gruppe, ähnlich wie die Zunahme des fäkal ausgeschiedenen Hg in der MeHg + BP Gruppe. In der Kontrollgruppe wurde keine Ausscheidung von Hg durch Urin festgestellt. Obwohl berichtet wurde, dass die Ausscheidung von Hg durch Urin als seine Zysteinverbindung auftrat (Yasutake *et al.*, 1989), zogen wir in Erwägung, dass der von BP kommende Metallbindungsfaktor einen Beitrag zur Ausscheidung von MeHg durch Urin leisten könnte.

Eine alternative Möglichkeit könnte die Ausscheidung von anorganischem Hg sein. Es wurde bereits berichtet, dass ein MT-ähnliches, Metall bindendes Protein, das aus *Chlorella* abgeleitet wurde, eine hohe Fähigkeit der Adsorption von Metallen wie Cd, Zn und Cu hatte (Yoshida *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008). Nagao *et al.* (1983) berichteten, dass die gemeinsame Verabreichung des von *Chlorella* abgeleiteten, Metall bindenden Proteins an Ratten eine gesteigerte Ausscheidung von Cd im Urin bewirkte. MeHg ist gut bekannt dafür, sich in Tiergewebe zu anorganischem Hg zu verändern. Es könnte möglich sein, dass sich so entstandenes anorganisches Hg mit dem von *Chlorella* abgeleiteten, Metall bindenden Protein gegenseitig beeinflussen. Weitere Studien unter Verwendung von Chromatographie und/oder selektiver Quantifizierung von Urin-Hg werden einen Schlüssel liefern, um einen Mechanismus für die BP-induzierte Ausscheidung von Hg im Urin zu erläutern.

Zusätzlich zur Untersuchung der Hg-Absorption wurden 24 h nach der Verabreichung auch die Hg Mengen in Blut, Leber und Nieren analysiert. Wie in Figur 2A gezeigt wird, waren die Hg Mengen im Blut bei der MeHg + BP Gruppe ($2.70 \pm 0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$) etwas, aber nicht bedeutend geringer als bei der MeHg Gruppe ($2.48 \pm 0.19 \mu\text{g}/\text{ml}$) (unlogische Angabe im Original: Anmerkung der Übersetzerin). Die Ansammlung von Hg in Leber und Nieren wird in den Figuren 2B und C gezeigt. Es wurden bei der Leber und bei den Nieren keine bedeutenden Unterschiede bei den Hg Mengen zwischen den Gruppen MeHg und MeHg +BP festgestellt, was nahe legt, dass in beiden Gruppen gleich viel MeHg absorbiert worden sein könnte. Das bedeutet, dass BP wenig Einfluss auf die Absorption von MeHg durch den Magendarmtrakt hätte. In der Kontrollgruppe wurde kein angesammeltes Hg in Leber und Nieren entdeckt.



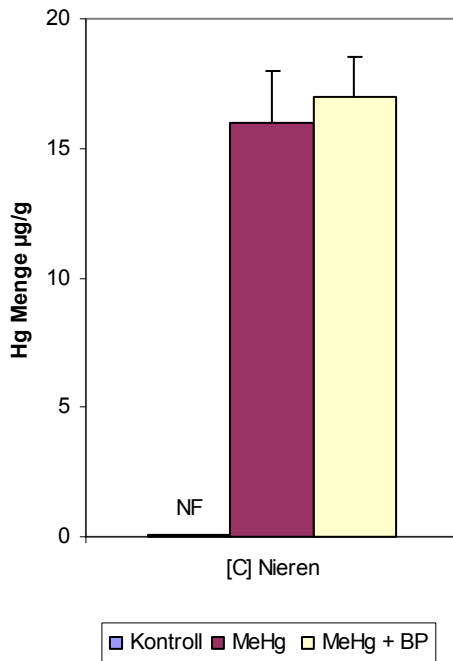


Fig. 2 Die Quecksilbermengen in Blut [A], Leber [B] und Nieren [C] 24 h nach der Verabreichung von MeHg. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung. $n = 5$. NF: Nicht festgestellt.

In der vorliegenden Studie wurde festgestellt, dass BP die Hg Ausscheidung bei mit MeHg behandelten Mäusen steigert. Die Prozentsätze der Gesamtausscheidung bei der verabreichten Dosis ($73,5\mu\text{g Hg/Maus}$) waren 4.5% und 8.7% in den Gruppen MeHg beziehungsweise MeHg + BP. Es wurde aber kein Unterschied bei der Ansammlung von Hg im Gewebe beobachtet.

Die durch BP eingeleitete gesteigerte Ausscheidungsrate, 4.2% der injizierten Menge, könnte nicht ausreichend sein, um eine bedeutende Reduktion bei der Ansammlung von Hg im Gewebe zu beobachten. Möglicherweise wäre eine Langzeitstudie notwendig um die Verringerung von Hg im Blut und in den Organen zu beobachten. Die vorliegenden Resultate legen jedoch nahe, dass *Chlorella* ein Nahrungsmaterial sein könnte, das erfolgreich für die Entgiftung von MeHg eingesetzt werden kann.

BIBLIOGRAPHIE

- Almaguer Cantu, V., Garza-González, M. T., de la Rosa, J. R. and Loredó-Medrano, J. A. (2008); Biosorption of Pb^{2+} and Cd^{2+} in a fixed bed column with immobilised *Chlorella* sp. Biomass. Water Sci. Technol., **58**, 1061-1069.
- AOAC (1990): Official methods of analysis. Pepsin digestibility of animal protein feeds. 15th edition, **1**, 78-79.
- Ballatori, N. and Clarkson, T. W. (1983): Biliary transport of glutathione and methylmercury. Am. J. Physiol., **244**, G435-441.
- Canuel, R., de Grosbois, S. B., Lucotte, M., Atikessé, L., Larose, C. and Rheault, I. (2006): New evidence on the effects of tea on mercury metabolism in humans. Arch. Environ. Occup. Health, **61**, 232-238.
- European Commission (2004): Information Note. Methyl mercury in fish and fishery products. 12 May 2004.
- FDA (2001): Fish and fisheries products hazards and controls Guidance. Third Edition. June 2001.
- Fott, B. and Nov'akov'a, M. (1969): A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species. In: Fott B. (cd.) pp. 10-74. Studies in phycology. Academia. Plaque.
- Hirayama, K., Yasutake, A. and Inoue, M. (1987): Role of interorgan metabolism and transport of glutathione in the fate of methylmercury, Sulfur. Amino. Acids., **10**, 229-234.
- Huang, Z., Li, L., Huang, G., Yan, Q., Shi, B. and Xu, X. (2008): Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. Aquat. Toxicol., **91**, 54-61.
- Krienitz, L., Hegewald, E. H., Hepperle, D., Huss, V.A.R., Rohr, T. and Wolf, M. (2004): Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Phycologia., **43**, 529-542

Einfluss der *Parachlorella* auf die Absorption und Ausscheidung von MeHg
T. Uchikawa et al.

- Mahaffey, K.R. (1999): Methylmercury: A new look at the risks. Public Health Rep., **114**, 396-413.
- Ministry of Environment of Japanese Government (2004): The manual of mercury analysis. 10-27.
- Morita, K., Ogata, M. and Hasegawa, T. (2001): Chlorophyll derived from *Chlorella* inhibits dioxin absorption from the gastrointestinal tract and accelerates dioxin excretion in rats. Environ. Health. Perspect., **109**, 289-294.
- Nagao, T., Suketa, Y. and Okada, S. (1983): Comparative absorption and excretion of *Chlorella ellisoidea* cadmium-binding protein and inorganic cadmium in rats. Jpn. J. Hyg. **10**, 741-747.
- Sandau, E., Sandau, P. and Pulz, O. (1996): Heavy metal sorption by microalgae. Acta. Biotechnologica, **16**, 227-235.
- Sano, T. (1982): The effect of *Chlorella* on alimentary hyperlipemia in rats. Kurume Med. J., **45**, 1130-1152.
- Uchikawa, T., Ueno, T., Hasegawa, T., Maruyama, I., Kumamoto, S. and Ando, Y. (2009): *Parachlorella beyerinckii* accelerates lead excretion in mice. Toxicol. Ind. Health., **25**, 551-556.
- Yasutake, A., Hirayama, K. and Inoue, M. (1989): Mechanism of urinary excretion of methylmercury in mice. Arch. Toxicol., **63**, 479-483.
- Yoshida, N., Ishii, K., Okuno, T. and Tanaka, K. (2006): Purification and characterization of cadmium-binding protein from unicellular alga *Chlorella sorokinian*. Curr. Microbiol., **52**, 460-463.