

## 虚血腎機能障害に対するエリスロポエチンの 腎保護作用についての検討

森山 学, 田中 達朗, 鈴木 孝治  
金沢医科大学泌尿器科学教室

### RENAL PROTECTIVE EFFECTS OF ERYTHROPOIETIN ON ISCHEMIC REPERFUSION INJURY

Manabu MORIYAMA, Tatsuro TANAKA and Koji SUZUKI  
*The Department of Urology, Kanazawa Medical University*

We reexamined the conditions of tissue disorders resulting from temporary ischemia of the organs as well as changes in tissue function and the effects on the preservation of renal function over time by using rat models in order to clinically utilize erythropoietin, which has inhibitory effects on ischemia-reperfusion disorders.

In 8- to 9-week-old Wister male rats, after the right kidney had been resected under general anesthesia, the left renal artery was clamped to inhibit the blood flow for 45 minutes. At 30 minutes before inhibiting the blood flow and after releasing the inhibited blood flow, 100 U/kg of recombinant human erythropoietin (rhEPO) was administered via the inferior vena cava and the abdominal cavity, and then the tissues and blood samples were extracted at 6 hours and 24 hours after the release. The renal tissue specimens were evaluated for apoptosis and renal function using hematoxylin eosin staining and TUNEL staining. Changes in the emergence of active oxygen were investigated by using blood samples. The degree of renal dysfunction was evaluated by measuring neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in the spot urine samples. The changes in the serum creatinine level, showed that the renal function was preserved with a significant difference in the rhEPO administration group. The liver deviation enzymes clearly decreased in the rhEPO administration group. Active oxygen did not change before and after the ischemia-reperfusion nor was it changed by rhEPO administration. Apoptosis was inhibited by rhEPO administration. No direct effects of rhEPO administration on the emergence of active oxygen were observed. The administration of rhEPO, was suggested to help preserve the renal function in marginal donors with a longer agonal stage by effectively.

(Hinyokika Kyo 56 : 473-479, 2010)

**Key words :** Erythropoietin, Marginal donor, Ischemia, Reperfusion injury (IRI), Kidney transplantation

## 緒 言

赤血球造血充進作用を持つ体液成分が1948年に Bonsdorff ら<sup>1)</sup>により erythropoietin と命名され, Jacobson により erythropoietin は腎で産生されていることが明らかにされた<sup>7)</sup>. Erythropoietin は後期赤芽球系前駆細胞 (colony forming unit-erythroid) にもっとも作用しその成熟を促すとともにアポトーシスを抑制し赤血球の産生量を調節しており<sup>18)</sup>, さらに腎性貧血の状況で有力と考えられるもう1つの erythropoietin の効果は産生された幼弱な赤血球が崩壊する neocytosis を抑制することでも知られている<sup>24)</sup>. ところが1988年 Garcia らの報告によると6分の5腎摘モデルに対して erythropoietin を投与すると貧血は改善するものの高血圧を伴い腎機能を悪化させることが確認された<sup>3)</sup>. その後の研究<sup>10,25)</sup>や prospective randomized control study (RTC)<sup>11)</sup>で高血圧を十分コント

ロールすれば, 貧血が改善され逆に腎機能を保護するとともに腎不全の進行阻止をもたらすことが確認され<sup>4)</sup>, 以来腎不全患者の腎性貧血に対しては erythropoietin が非常に貢献する医薬品の地位を獲得した. 長い間 erythropoietin は赤血球造血機能のみ注目されており, それ以外の作用は考えられていなかった. ところが Sakanaka らにより脳内で産生された erythropoietin が神経細胞を保護する機能を持つことを証明し<sup>19)</sup>, また Parsa らは心筋梗塞のサイズに対する erythropoietin の効果を報告している<sup>17)</sup>. さらには生殖器官や消化管での局所生理作用を持つことも示唆されている<sup>20)</sup>. これらの作用は erythropoietin がそのレセプターと結合することにより複数の細胞保護シグナルが活性化されることがわかっており中でも PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) が重要である. 活性化された PI3K はサイトカインの細胞内シグナル伝達の中で細胞死を抑制する中心的な役割を担っている Akt キ

ナーゼ (Protein Kinase B; Akt) をさらに活性化し組織が虚血や再灌流障害などから惹起されるアポトーシスやオンコースへの誘導を阻害する。

臓器移植の領域でも虚血再灌流障害から生じる重篤な臓器障害は移植後の移植臓器機能獲得に重要な要因であり、erythropoietin の投与によりそれらの障害からの回避が期待されている。

献腎移植では心停止後、ただちに灌流液で灌流し提供臓器を冷却すると共に血液が凝血しないように対処する必要がある。したがって提供臓器は虚血状態や再灌流による組織障害から免れない。未だに臓器不足が解消されない移植医療の現状では死戦期が長引き一般的な臓器提供のクライテリアを逸脱した ECD (Expansive criteria donor) からの提供を余儀なく受ける機会も増えてきている。もう一方では死戦期提供腎の生物学的活性度を明確に確認する手段がなく一般的に行われている血清クレアチニンなどの推移では検査結果と活性度との時間差が生じリアルタイムでの検討が困難である。そこでわれわれは従来から用いられている血清クレアチニン値に加え最近腎の尿中バイオマーカーとして注目されている好中球ゼラチナーゼ関連リポカイン (eutrophil gelatinase-associated lipocain: NGAL) に関して検討した。尿中 NGAL は急性腎障害のバイオマーカーとして有力で腎障害に関する感度は非常に高いと言われている<sup>16)</sup>。

今回われわれは移植後の腎機能獲得に向けて死体腎からの臓器提供前の死戦期における graft viability 維持を目的とした erythropoietin の利用可能性に関して Rat 虚血再灌流モデルを用いて検討し提供腎組織障害に対する biomarker として、スポット尿における NGAL 測定意義を検討した。

## 対象と方法

### 1. Animal model

体重 250~300 g の Wister/ST 雄ラット32匹を日本 SLC (株) (Shizuoka, Japan) より購入し1週間慣らし飼いの後実験に使用した。実験遂行にあたっては Guidelines for Animal Experiments in Kanazawa Medical University を遵守した。ランダムに4つのグループに分けた (すべてのラットに右腎摘除施行)。1. 生理食塩水投与による虚血再灌流なしグループ (片腎コントロール群 n=8), 2. 虚血再灌流処置のみ群 (Ischemic reperfusion injury: IRI 群 n=8) 3. 虚血再灌流前30分 rhEPO 投与群 (EPOpre 30群 n=8), 4. 虚血再灌流時 rhEPO 投与群 (EPOjust 0群 n=8)。コントロール群, EPOpre 30群そして EPOjust 0群には 500  $\mu$ l の生理食塩水, 100 IU/kg recombinant human erythropoietin (Chugai-pharm, Tokyo, Japan) を虚血30分前および虚血と同時に下大静脈より経静脈単回投与を行った。

EPOpre 30群には右腎摘および左腎動静脈駆血30分前, EPOjust 0群には駆血と同時に注射投与した。すべてのラットに対して Diethyl Ether (Wako Pure Chemical Industries, Ltd Osaka, Japan) にて吸入麻酔行った後 Sodium Pentobarbital (Kyoritsu Pharm, Ltd Tokyo, Japan) 30 mg/kg を腹腔内投与にて行った。左腎動静脈に対する駆血は経腹的なアプローチにて動脈クリップを用い確実にクリップした後、肉眼的に腎臓の色調が暗赤色に変化したことを確認した。駆血時間45分間とし、血流再開・再灌流は動脈クリップをはずし腎臓が赤色に変化したことを肉眼でも確認した。組織採取の目的に再灌流後6時間と24時間でラットを犠牲死させた。組織摘出時は腹部大動脈より24ゲージ血管留置針を用いて生理食塩水約 15 ml で灌流し組織内血液の洗い出しを行った。

### 2. 血液生化学的検査および血清活性酸素量の測定

血清生化学的検査項目はクレアチニン (Cr), 血清尿素窒素 (BUN), Asparate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT) とし虚血処置前, 虚血再還流後 (左片腎状態) 6時間および24時間の3点で測定した。

活性酸素量は96マルチウエルプレートの各ウエルに 140  $\mu$ l の 0.1 M NaOAc 緩衝液を加え、次いで血液生化学検査に利用した血清を検体として 5  $\mu$ l, また検量線作成用には過酸化水素水標準液を 5  $\mu$ l 加えた後, 37°C, 5分間インキュベートする。R1\* 溶液と R2\* 溶液の混液 (1:25, 用時調整) 100  $\mu$ l を各ウエルに添加し, 37度に設定したプレートリーダー上で1分間インキュベートした後, 505 nm における吸光度を15秒間隔で180秒まで測定する。測定開始60秒後から180秒までの各測定値上昇の傾きから試料中の total ROS (Reactive oxygen species) 値を算出し対数値で表した。

### 3. 尿中 NGAL 測定 (Sandwich ELISA analysis of NGAL expression in urine)

尿検体は血液検体採取と時期をあわせて虚血処置前および虚血再還流後 (左片腎状態) 6時間および24時間の3点で採取した。検体は採取後ただちに遠心し上澄を -70°C で使用時まで保存した。NGAL は Streptoavidin を用いた Sandwich ELISA analysis の Rat NGAL ELISA Kit (BioPorto Diagnosis A/S, Denmark) を用い添付の操作説明に準じて測定した。凍結保存していた検体を室温で融解し500倍に希釈した後測定に供した。すべての検体の対して triplicate にて平均値を求めた。標準曲線および検体の吸光度はマイクロプレートリーダー (model 680 microplate reader, Bio-

\* R1 : 0.1 M NaOAc 緩衝液, pH 4.8 に N, N-diethyl-para-phenylene-diamine, DEPPD) を 100 mg/ml に溶解調整。  
R2 : 塩化鉄 (Sigma Aldrich Co, MO, USA) を 0.1 M NaOAc 緩衝液に 4.37 mM に溶解調整。

Rad Laboratories, Inc CA, USA) を用いて 450 nm の波長で測定し Microplate Manager Software (ver. 5.2PC, Japan Bio-Rad Laboratories, Inc Tokyo, Japan) にて解析を行った。

#### 4. Terminal Deoxynucleotidyltransferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL) Staining

摘出した腎臓を長軸方向に 2 分し 10%ホルマリン液に浸漬しパラフィン包埋, マイクロトームにて 6 マイクロに薄切しスライドガラスに貼付した。キシレンにて脱パラフィンした後, エタノールにて多段階の濃度で親水処理し染色の前準備を整えた。TUNEL 染色は Apoptosis in situ Detection Kit Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd Osaka, Japan) を用い添付の操作説明に準じて行った。再びエタノールにて多段階の濃度で脱水処理した後キシレンで透徹処理を行い水溶性封入剤 (Biomed Corporation, CA, USA) にて封入した。顕微鏡観察には Olympus BX50 (OLYMPUS Corporation, Tokyo, Japan) にて行い, 顕微鏡用デジタルカメラ DP71SET-A (OLYMPUS Corporation, Tokyo, Japan) で撮影した。画像解析には解析ソフト DP2-BSW (OLYMPUS Corporation, Tokyo, Japan) を用いた。

#### 5. 統計

2 群間の有意差検定には unpaired student-t 検定を用い 0.05 以下を有意とした。

### 結 果

血液生化学所見: 血液生化学的検査の結果, 虚血操作 30 分前に rhEPO 投与した群は rhEPO 投与しない群, 虚血処置直後に投与した群, おおのにおける虚血再灌流 6 時間後および 24 時間後それぞれの時点で比較し有意に血清クレアチニン値増加が抑制されていた。また BUN に関しても同様に虚血処置直後に投与した群で有意に上昇が抑制された (Table 1, Fig. 1)。

肝逸脱酵素 (AST/ALT) に関しては, 有意差は得られなかったものの血清クレアチニン BUN 値と同様に虚血操作直後・投与なし群と比較し 30 分前投与群は虚血操作前からの値の上昇が少ないことが確認された (Table 1)。

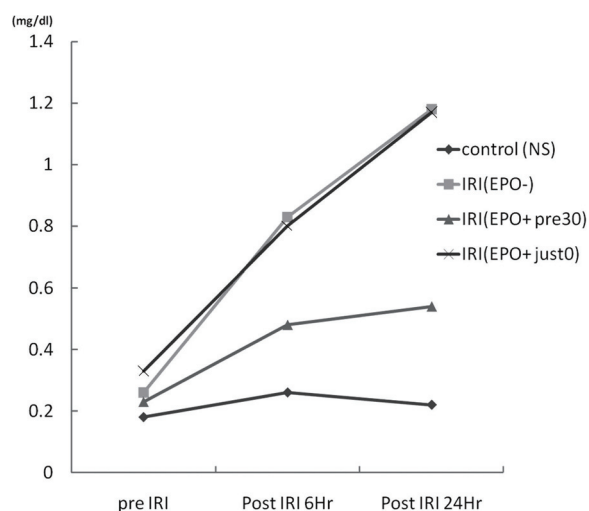


Fig. 1. Changes in the serum creatinine levels at 6 hours and 24 hours after ischemia-reperfusion in each group.

血清活性酸素量: 生化学的検索を行ったタイミングでの血清中活性酸素量を測定した。

本測定法では通常正常成人血清中では 100 unit から 200 unit 認められるが, われわれの検討でもラット血液中の活性酸素量に関してはその範囲内にあり, いずれの群も量の変化に特徴的な差を生じることはなかった。虚血操作前に比較し 6 時間後の血清中の活性酸素量はいずれの群も若干減少傾向にあった (Fig. 2)。

#### 1. 尿中 NGAL 結果

スポット尿で測定した NGAL 量の変化であるが, 虚血操作を施していないコントロール群でもシャム OP による侵襲によると考えられる尿中 NGAL 量の増加を認めたが, 虚血再灌流群では rhEPO 非投与群で顕著に尿中 NGAL 量増加が確認された。一方虚血操作 30 分前に rhEPO を投与した群では尿中での NGAL 量の増加がコントロール群よりは増加を認めるものの, rhEPO 非投与の虚血再灌流群より減少していた (Fig. 3)。

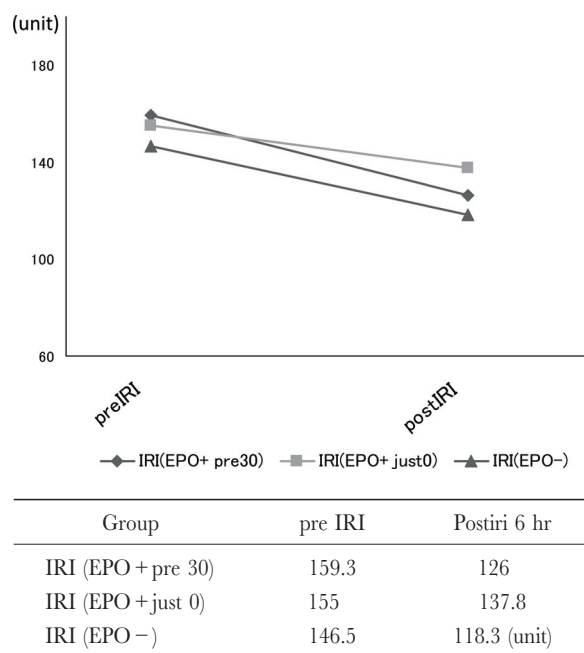
#### 2. TUNEL 染色 + 評価

rhEPO の虚血再灌流障害からの腎保護を組織学的に確認するために TUNEL 染色を行い, 虚血再灌流後 24 時間での TUNEL 染色陽性細胞数を rhEPO 投与

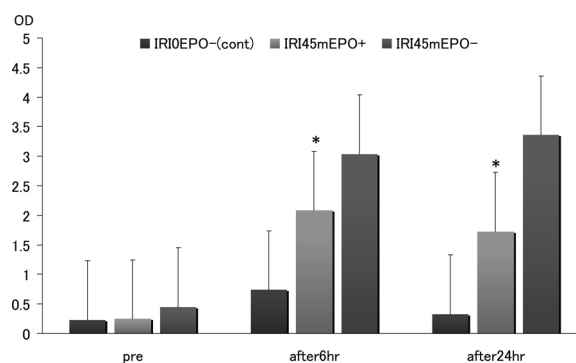
Table 1. The serum creatinine level, urea nitrogen, and liver deviation enzyme level before and after ischemia-reperfusion in each group

| Group            | Pre IRI    |             |           |           | Post IRI 24 hr |             |           |           |
|------------------|------------|-------------|-----------|-----------|----------------|-------------|-----------|-----------|
|                  | Cr (mg/dl) | BUN (mg/dl) | AST (U/L) | ALT (U/L) | Cr (mg/dl)     | BUN (mg/dl) | AST (U/L) | ALT (U/L) |
| Control (NS)     | 0.18       | 10.2        | 130.8     | 53.8      | 0.22           | 18.0        | 146.6     | 114       |
| IRI (EPO-)       | 0.26       | 15.5        | 127.7     | 63.9      | 1.18           | 74.7        | 316.1     | 125.5     |
| IRI (EPO+pre 30) | 0.23       | 15.3        | 201.7     | 84.6      | 0.54           | 32.9        | 257       | 104.8     |
| IRI (EPO+just 0) | 0.33       | 17.7        | 123.5     | 92.5      | 1.02           | 36.9        | 392       | 143.8     |

IRI: Ischemic reperfusion injury, EPO: erythropoietin.

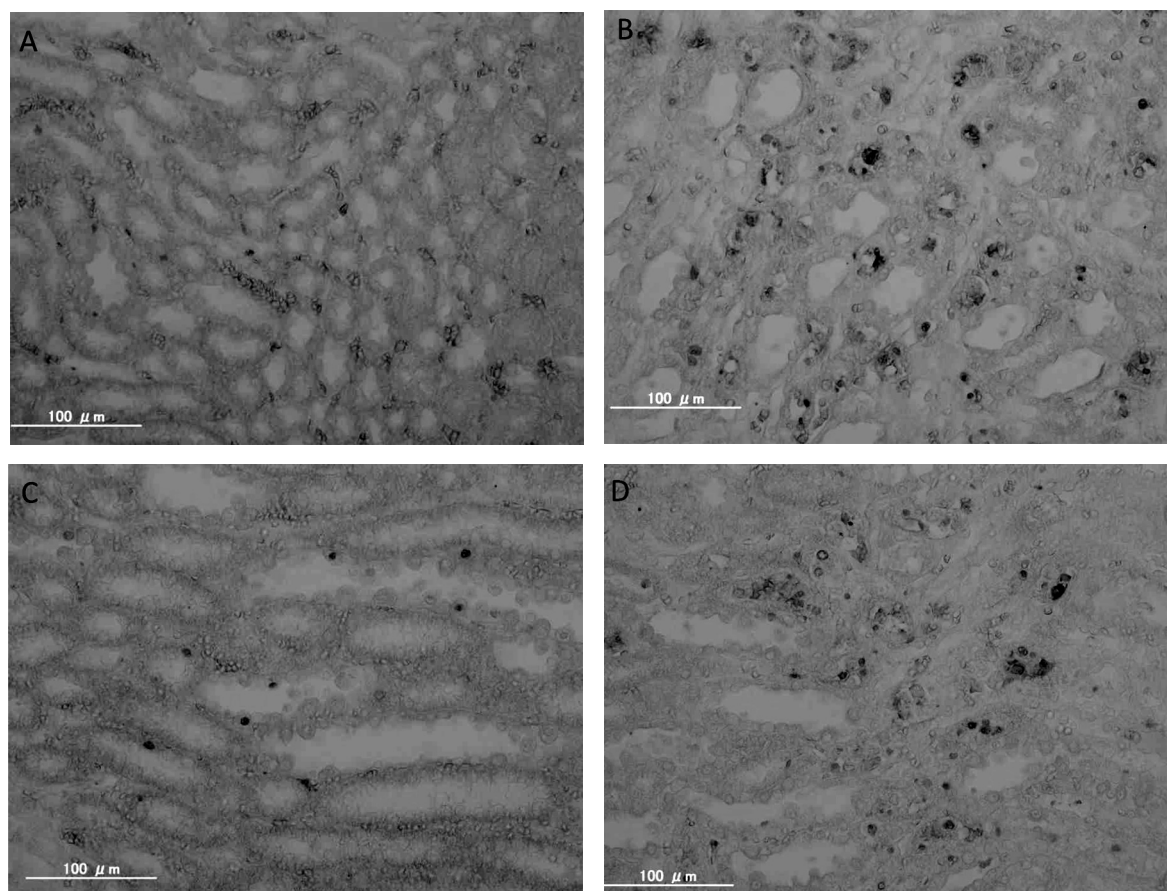


**Fig. 2.** The serum active oxygen levels at 6 hours before and after ischemia-reperfusion. Serum active oxygen was measured with the total ROS assay system by means of the phenytoin reaction method using a 96-multiwell plate.

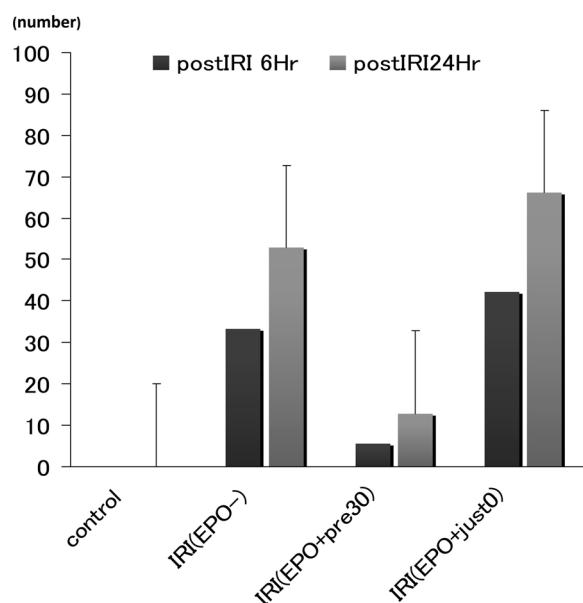


**Fig. 3.** The concentration of NGAL in spot urine using ELISA. Urine NGAL before and 6 hours and 24 hours after ischemia-reperfusion between the group without EPO administration and the group that received administration 30 minutes before the ischemia-reperfusion as compared to the control group. \* $P < 0.05$  vs the group without EPO administration.

群と非投与群とで比較した。実際、虚血再灌流障害モデルでの腎組織は apoptosis を起こした細胞が尿細管上皮に多数確認された (Fig. 4)。rhEPO 投与群ではその apoptosis 細胞が明らかに減少しているのが確認された。



**Fig. 4.** TUNEL staining in the renal tissue at 24 hours after ischemia-reperfusion. A: The control group, B: The group with only ischemia-reperfusion (EPO -), C: The group in which EPO was administered 30 minutes before ischemia-reperfusion (EPO + pre 30) and D: The group in which EPO was administered concurrently with ischemia-reperfusion (EPO + just 0).



**Fig. 5.** The number of positive cells in TUNEL staining at 6 hours and 24 hours after ischemia-reperfusion. The number of positive nuclear staining cells in TUNEL staining was shown as the average value from three viewpoints in the control group, the group without ischemia-reperfusion and EPO administration (EPO-), the group in which EPO was administered 30 minutes before ischemia-reperfusion (EPO + pre 30), and the group in which EPO was administered concurrently with ischemia-reperfusion (EPO + just 0).

## 考 察

本論文ではラットを用いた腎虚血再灌流モデルにより rhEPO の腎機能保護作用を確認すると共にスポット尿での NGAL を測定することにより虚血再灌流によって生じる急性腎障害に対するバイオマーカーとしての利用可能性を検討した。ラットモデルを用いた検討で rhEPO は虚血再灌流腎障害を有意に抑制していることを確認したが、その投与時期により rhEPO の効果が期待できないことも確認した。すなわち今回の検討では虚血操作前30分の時点で rhEPO を投与した群では有意に腎機能障害が抑制されたにもかかわらず、虚血と同時に rhEPO を投与した群では rhEPO 投与なし群と同様腎機能の悪化進行が確認された。rhEPO の組織障害からの保護機序は直接作用として腎組織で glutathione peroxidase 活性を亢進させ、HO-1 (heme oxygenase-1) の産生を促し細胞内酸化ストレスを抑制することで組織保護的に働くと考え<sup>9)</sup>、また間接的には rhEPO は骨髄において血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) 誘導能を示し生理活性物質の1つである VEGF (Vascular endothelial growth factor) の発現を亢進させ腎機能保護に働くと考えられている<sup>8)</sup>。したがって虚血再灌流障害が発生

する前に rhEPO が標的臓器に到達している必要があり、したがって今回の検討でも虚血と同時に rhEPO を投与した群は障害発症前に rhEPO が到達しておらず組織障害が投与していない群とまったく同じ程度に進行してしまったと考える。虚血腎不全モデルでの検討でも虚血再灌流後の rhEPO の投与では腎機能の改善がみられないとの報告もあり<sup>15,21)</sup>、rhEPO の効果を期待する投与時期は虚血前が適切と考える。本検討では活性酸素の血中濃度も検討したが、rhEPO の投与によりその変動は確認されなかった。先述の通り、rhEPO の効果としては活性酸素量を減少させる点ではなく産生された活性酸素の障害を抑制する点にあり本検討結果でもその点が確認された。

rhEPO のもう1つの注目すべき点は apoptosis 抑制効果である。虚血による apoptosis への変化を抑制する分子には Bcl-2 が周知であり Bcl-2 トランスジェニックマウスでも腎尿管上皮細胞での apoptosis 抑制が確認されており<sup>23)</sup>、今後の応用が期待されているが臨床応用へはまだ距離が感じられる。われわれの結果でも示したとおり rhEPO 投与群で apoptosis 陽性細胞の減少が明らかに確認された。本検討でも腎機能の場合と同様やはり虚血再灌流直後に投与した群では apoptosis 陽性細胞はまったく投与していない群とほとんど変わりなく確認された。Apoptosis は細胞死の形式の中でも生体を選択して引き起こされるいわゆるプログラムされた死であり、組織や臓器が重篤な障害を受けたときにその制御は機能し始める。したがって重篤な障害を回避した後コントロールされていく臓器にとって非常に有用な機能でありまた効果でもある。本来生体内で産生された erythropoietin は組織細胞レベルでの低酸素状況により惹起される HIF1- $\alpha$  (Hypoxia inducible factor1- $\alpha$ ) によって活性化される分子の一員として、造血作用以外に低酸素から生じる障害により進行する autophagy から apoptosis への変化を可逆的にする機能を担っており、rhEPO の投与によりより強力に apoptosis への移行を阻止することを可能としている<sup>14)</sup>。

腎障害の程度を評価する標準的な腎機能検査法は血清クレアチニン検査であるが、クレアチニンは本来1日や2日で臨床的に重要な濃度まで上昇せず残存腎機能の評価としては後ろ向きに障害時点の影響を予測できるが、実際にその時点で発生している障害の程度を示すことは困難である。尿中の NGAL 濃度は急性腎障害発症後数時間で上昇し、まさに急性腎障害バイオマーカーとして最適であることが小児の開心術後に発症する急性腎不全の尿中 NGAL モニターで明らかにされた<sup>13)</sup>。腎移植医療の現場でも求められていた献腎マージナルドナーにおける死戦期でのリアルタイムでの腎障害のバイオマーカーとしての可能性も視野に

入れ、今回の検討を行った。検討の結果、クレアチニンの推移に裏付けられる腎障害のマーカーとして非常に有望なものであると認識された。

EPO による非常に歴史があり確立された造血作用への利用や最近確認され報告されるようになった組織保護能という効果が注目される反面、投与により懸念されている負の部分もある。いくつかの癌細胞、特に腎癌細胞は EPO 受容体を発現しているため、EPO が作用すると apoptosis 抑制能や VEGF を介した細胞増殖能が亢進し癌増殖が促進されることが懸念される<sup>5)</sup>。間接的にはエンドセリンを介して腎臓の血管を収縮させ生理機能を低下させる恐れがある<sup>22)</sup>。われわれの設定した投与量は一般臨床での投与量と同様であるが、以前に検討されていたような<sup>15)</sup> 高容量の rhEPO 投与では赤血球増加症を引き起こし血液の粘性を高めて血栓症の発症率を増加させることが懸念される。最近ではこのような EPO の造血作用を目的としない、貧血のない患者を対象とするに当たり、強い造血作用を発揮しないよう脱シアル酸化された EPO により神経細胞での細胞保護作用が報告されている<sup>2)</sup>。また、ほかの誘導体であるカルバミル化 EPO も造血活性を有さないものの in vitro での細胞保護作用<sup>12)</sup>や腎において虚血再灌流障害保護作用を有することが報告されている<sup>6)</sup>。今後の組織保護作用にたいする選択肢として希望が持たれる。

結論、rhEPO は一般臨床での使用量で虚血再灌流障害を抑制し apoptosis への誘導を阻止することが確認された。スポット尿での NGAL 測定は死戦期における腎の real time biomarker として利用できる可能性が示唆された。今後死戦期の長いマージナルドナーでの rhEPO による marginal graft 保護が臨床利用できるようさらに検討を継続する。

## 文 献

- 1) Bandorff E and Jalavisto E: A humoral mechanism in anatomic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand* **16**: 150-170, 1948
- 2) Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, et al.: Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6741-6746, 2003
- 3) Garcia DL, Anderson S, Rennke HG, et al.: Anemia lessens and its prevention with recombinant human erythropoietin worsens glomerular injury and hypertension in rats with reduced renal mass. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6142-6146, 1988
- 4) Gouva C, Nikolopoulos P, Ioannidis JP, et al.: Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. *Kidney Int* **66**: 753-760, 2004
- 5) Henke M, Laszig R, Rube C, et al.: Erythropoietin to treat head neck cancer patients with anemia undergoing radiotherapy: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **362**: 1255-1260, 2003
- 6) Imamura R, Okumi M, Isaka Y, et al.: Carbamylated erythropoietin improves angiogenesis and protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury. *Cell Transplant* **17**: 135-141, 2008
- 7) Jacobson LO, Goldwesser E, Plazak LF, et al.: Studies on erythropoiesis. IV. Reticulocytes response of hypophysectomized and polycythemic rodents to erythropoietin. *Proc Soc Exp Biol Med* **94**: 243-249, 1957
- 8) Kang DH, Park EY, Yu ES, et al.: Renoprotective effect of erythropoietin of renal hypoxia with stimulation of angiogenesis in the kidney. *Kidney Int* **67**: 1683, 2005
- 9) Katavetin P, Inagi R, Miyata T, et al.: Erythropoietin induces heme oxygenase-1 expression and attenuates oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* **359**: 928-934, 2007
- 10) Koene RA and Frenken LA: Role of rHuEPO in treatment of uremic anemia prior to end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl* **38**: S142-147, 1992.
- 11) Kuriyama S, Tomonari H, Yoshida H, et al.: Reversal of anemia by erythropoietin therapy retards the progression of chronic renal failure, especially in nondiabetic patients. *Nephron* **77**: 176-185, 1997
- 12) Leist M, Ghezzi P, Grasso G, et al.: Derivatives of erythropoietin that a tissue protective but not erythropoietic. *Science* **305**: 239-242, 2004
- 13) Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* **365**: 1231-1238, 2005
- 14) Moriyama T, Imamura R, Isaka Y, et al.: Erythropoietin induces hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  and protects against ischemia reperfusion injury in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* **17**: 511A, 2006
- 15) Nemoto T, Yokota N, Keane WF, et al.: Recombinant erythropoietin rapidly treats anemia in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* **59**: 246-251, 2001
- 16) Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, et al.: Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med* **148**: 810-819, 2008
- 17) Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, et al.: A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* **112**: 999-1007, 2003
- 18) Ramakrishnan R, Cheung WK, Farrell F, et al.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous dose administration in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 324-331, 2003

- 19) Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. : In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 4635-4640, 1998
- 20) Sasaki R, Masuda S and Nagao M : Pleiotropic functions and tissue-specific expression of erythropoietin. *News Physiol Sci* **16** : 110-113, 2001
- 21) Sharples EJ, Patel N, Brown P, et al. : Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* **15** : 2115-2124, 2004
- 22) Slowinski T, Schulz N, Ruschitzka FT, et al. : Pattern of prepro-endothelin-1 expression revealed by reporter-gene activity in kidneys of erythropoietin-overexpressing mice. *Clin Sci* **103** : 44S-47S, 2002
- 23) Suzuki C, Isaka Y, Shimizu S, et al. : Bcl-2 protects tubular epithelial cells from ischemia reperfusion injury by inhibiting apoptosis. *Cell Transplant* **17** : 223-229, 2008.
- 24) Tong EM and Nissenson AR : Erythropoietin and anemia. *Semin Nephrol* **21** : 190-203, 2001
- 25) Valderrábano F : Erythropoietin in chronic renal failure. *Kidney Int* **50** : 1373-1391, 1996

(Received on April 19, 2010)  
(Accepted on May 6, 2010)