

健康長寿の実現に向けた基盤的測定技術開発：
ステロイドホルモンのLC-MS/MSスクリーニングアッセイ

高山 卓大¹⁾ 神農 幸恵¹⁾ 藤江 隼平^{2,3)}
家光 素行^{2,3)} 井之上 浩一^{1,3)}

=====
**Analytical technique development towards for health longevity:
Screening assay of steroid hormones based on LC-MS/MS**

**Takahiro Takayama¹⁾, Yukie Kanno¹⁾, Shumpei Fujie^{2,3)},
Motoyuki Iemitsu^{2,3)} and Koichi Inoue^{1,3)}**

Steroid hormones (SH) play an important role in living bodies such as control of homeostasis, immunogenic reaction, and ageing/development for health longevity. Thus, the similar SH effect of phytochemicals has indicated human promoting health using these supplements. Previous study showed that diosgenin (similar SH chemical) from *Dioscorea esculenta* have improvement effect of motor ability. On the other hand, these biological monitoring and investigation of SH and diosgenin are insufficient. In the development phase, SH profiling from various types of studies such as *in vitro*, *in vivo*, and clinical studies have to be analyzed. Here, in this study, we tried to develop the simple and simultaneous analytical method for 17 series of SHs using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method validated *in vitro*, *in vivo*, clinical model samples and applied to diosgenin supplied rat serum analysis.

Keywords; Health longevity, Steroids, Screening assay, Liquid chromatography tandem mass spectrometry

E-mail: kinoue@fc.ritsumeikan.ac.jp (K. Inoue)

=====
¹⁾立命館大学薬学部、²⁾立命館大学スポーツ健康科学部

³⁾立命館大学スポーツ健康科学総合研究所

¹⁾College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University

²⁾Faculty of Sport and Health Science, Ritsumeikan University

³⁾Institute of Advanced Research for Sport and Health Science, Ritsumeikan University

Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

1. 背景

テストステロンやアルドステロンをはじめとするステロイドホルモン (SH) は、多種多様な生理活性を有しており、ホメオスタシスの維持、免疫、ストレス反応や生殖及び発生等に重要な機能を示す^{1,2)}。そのため、これらSHの分泌挙動を調節する作用を有する化合物や、SH受容体を直接作用あるいは阻害する化合物は、医薬品として脚光を浴び、様々な製品が開発されてきた^{3,4)}。また、他の医薬品においてはSH様作用は副作用として位置づけられるため、毒性学的観点からSH分泌挙動を*in vitro*でスクリーニングする技術の開発も取り組まれている⁵⁻⁷⁾。さらに、近年では食品に含まれるSH様化合物をサプリメントとして活用する潮流もある。テストステロンやDHEAに代表される性SHは加齢に伴って減少していくことが知られている。加齢に伴った生体変化としては筋力低下及び肥満等が挙げられ、これらの変化は健康寿命に直接影響する因子である。加齢性変化の予防 (アンチエイジング) には性SHの分泌維持が重要であることが明らかとなっている^{8,9)}。性SHの中でもDHEAの慢性投与は、筋肉を活性化させ高血糖や高脂肪状態を解除することが知られている¹⁰⁾。そのため、DHEAを補充することがアンチエイジングに重要な役割を果たすと考えられるが、直接的なSH補充療法は副作用などの観点から日常的に実施するにはハードルが高く、サプリメントのような形態での機能摂取が望まれる。この課題に対し、立命館大学スポーツ健康科学部においては、トゲドコロ (*Dioscorea esculenta*) というイモに含まれるDHEA様化合物ジオスゲニンを配合したサプリメントの開発に挑んでいる¹¹⁾。ジオスゲニンはDHEAと類似した構造を有しており、同様の作用を有することが様々な研究で明らかとなっているがその強度はDHEAよりも弱く継続的な摂取を行っても副作用が出現しにくいと考えられる。このようなサプリメントが広く流通するようになれば、人々が健康でいきいきとした生活を営む助力となり、健康長寿社会の実現の糧となると考えられる。

上述したように、SH様作用を有する化合物は、日常的に服用されるようなサプリメントとしても脚光を浴び始めているが、この開発の過程では、*in vivo*、*in vitro*及び臨床研究が必須となる。多くのSHモニタリング法はELISAやRIAをはじめとする免疫学的測定法に基づいており、個別のSH測定と考察に留まっている。また、免疫学的測定法の欠点として、特にSHのような低分子では交差反応性により偽測定値を示すことがある¹²⁾。正確にSH分泌挙動を解釈するために、今後の測定法には液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC-MS/MS) が主流となってきている¹³⁾。これらの手法の多くは、コレステロール下流のSHカスケード上の合成経路を高感度かつ包括的に測定している。LC-MS/MSに基づく手法の台頭により、SHの一斉分析が可能となったため、現在では測定が求められる試料が多岐にわたる。一方で、測定対象試料が統一されたフォーマットは存在せず、それぞれ別々かつ煩雑な前処理を踏まえて測定用試料を調製する必要がある。

2. 目的

本研究では、LC-MS/MS測定に基づいて、簡便かつ*in vivo*、*in vitro*及び臨床由来の様々な試料にも対応できる分析方法の開発を目的とした。コレステロール以下のSHカスケード18種類を対象としてLC-MS/MSによる分離・検出の最適化を行った。次に、*in vitro*及び*in vivo*研究から提案される様々な試料 (ヒト・動物血清、培養細胞など) に適用可能な試料前処理法を検討した。この時、多検体測定への応用を指向して、必要感度及び精度を維持しつつ簡便な前処理にて測定が可能な条件とした。決定した前処理条件にて、分析法バリデーションとして測定感度、直線性、日内・日間再現性、試料中SHの安定性 (-80℃での保管、5回の凍結融解、オートサンプラー内) を検証した。最後に、開発した方法の応用として、実際にジオスゲニン含有のトゲドコロを摂食したラットの血清中SHの包括的測定を試みた。

3. 方法

測定対象のステロイドホルモンは、プレグネノロン (PRN)、プロゲステロン (PRG)、11-ヒドロキシプロゲステロン (11HPRG)、11-デオキシコルチゾール (11DCTS)、コルチゾール (CTS)、コルチゾン (CTSN)、DHEA、19 α -ヒドロキシアンドロステンジオン (19HADSD)、アンドロステンジオン (ADSD)、コルチコステロン (CTCS)、アルドステロン (ALD)、17 α -ヒドロキシプレグネノロン (17HPGN)、17 α -ヒドロキシプロゲステロン (17HPRG)、11-デオキシコルチステロン (11DCTCS)、テストステロン (TST)、ジヒドロテストステロン (DHT)、エストラジオール (E2) 及びエストロン (E1) の18種とした。全種混合液 (100 ng/mL) を定量用溶液としてLC-MS/MSの検出条件を検討した。内標準物質としては、プレグネノロン- d_4 (17.21.21.21- d_4)、プロゲステロン- d_9 (2.2.4.6.6.17a.21.21.21- d_9)、コルチコステロン- d_8 (2.2.4.6.6.17a.21.21- d_8)、17 α -ヒドロキシプロゲステロン- d_8 (2.2.4.6.6.21.21.21- d_8) 及びエストラジオール- d_3 (16.16.17- d_3) の安定同位体5種類を設定した。測定機器としてWaters社製のLC-MS/MS (ACQUITY UPLC H-Class Plus/Xevo TQXS) を用い、カラムにはACQUITY BEH C18 (2.1 \times 100 mm、1.7 μ m、Waters)、移動相は0.1%ギ酸水溶液及び0.1%ギ酸アセトニトリル溶液とし、次のグラジエント溶出で分析を行った；B% (分) = 10% (0) -75% (9) -98% (9.1) -98% (10.5) -10% (10.6) -10 (12)。検出はESI positive modeのMultiple Reaction Monitoring (MRM) 測定とした。コーン電圧やコリジョン電圧は単一の標準品を用いて逐一最適化した。作業溶液を希釈して各濃度の混合液を調製し、直線性と検出限界 (LOD、S/N=3)、定量限界 (LOQ、S/N=10) の算出を行った。対象とする試料はヒト血清 (コンセーラ、NISSUI)、ラット血清 (KAC)、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) として、各種試験に用いた。前処理として除タンパク法或いはリン脂質除去による最小限の処理を採用し、マトリックス効果による感度損失を含む回収率から比較を行った。除タンパク質法では、測定試料に対して4倍量のアセトニトリルを用いてタンパク質を変性後、遠心分離 (10000 \times g、1分間、4 $^{\circ}$ C) して得られた上清を、0.45 μ mフィルターにてろ過することでタンパク質を除いた。ろ過溶液を遠心エバポレーターにて濃縮し、LC-MS/MSの初期移動相条件の溶液に再溶解して測定試料とした。リン脂質除去として、試料の4倍量の1%ギ酸含有アセトニトリル溶液を加えて遠心分離 (10000 \times g、1分間、4 $^{\circ}$ C) 後、GLサイエンス社製のPhospholipid removerにロードし20 \times gにて3分間遠心分離後ろ過溶液を得た。溶出液を遠心エバポレーターにて濃縮し、LC-MS/MSの初期移動相条件の溶液に再溶解して測定試料とした。決定した前処理及び測定条件を用いて、分析法バリデーション試験としてN=3の3日間で日内日間再現性試験や各種保存条件 (-80 $^{\circ}$ Cでの保管安定性、5回の凍結融解、オートサンプラー内) での安定性を検証した。立命館大学スポーツ健康科学部によるジオスゲニン含有トゲドコロ (0.3%含有) 摂食ラットから得られた血清を測定し、対照群と比較した。

4. 結果

LC-MS/MSによる各種SHの検出を最適化した条件にてMRM測定を実施して得られたクロマトグラムをFigure 1に示す。12分以内に同重体を含む完全分離が達成され、測定感度はLODで0.0500~1.00 ng/mL sample、LOQで0.100~5.00 ng/mL sampleとなった。直線性は0.0500~400 ng/mL sampleの間で、R²>0.99以上の良好な値が得られた。

Figure 2には除タンパク質法と、リン脂質除去法により前処理を行ったヒト血清のMSスキャン及びMRMクロマトグラムを比較した結果を示した。リン脂質除去法により夾雑物質は大幅に除去され、MRMクロマトグラム上では明確にマトリックス効果が低減された。従って、リン脂質除去法が前処理として適切であると判断した。なお、メーカー取載のプロトコルではマニフォールドを使用して減圧下の処理を行うこととされている。我々はさらにスループットを高め、遠心分離のみで

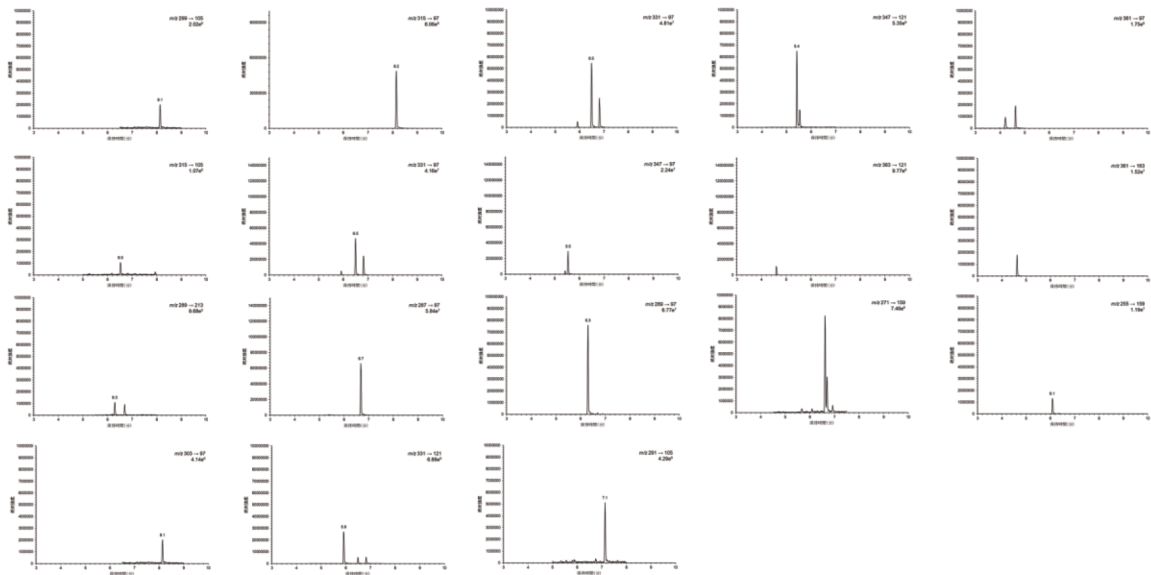


Figure 1 MRM chromatograms of SH analytes

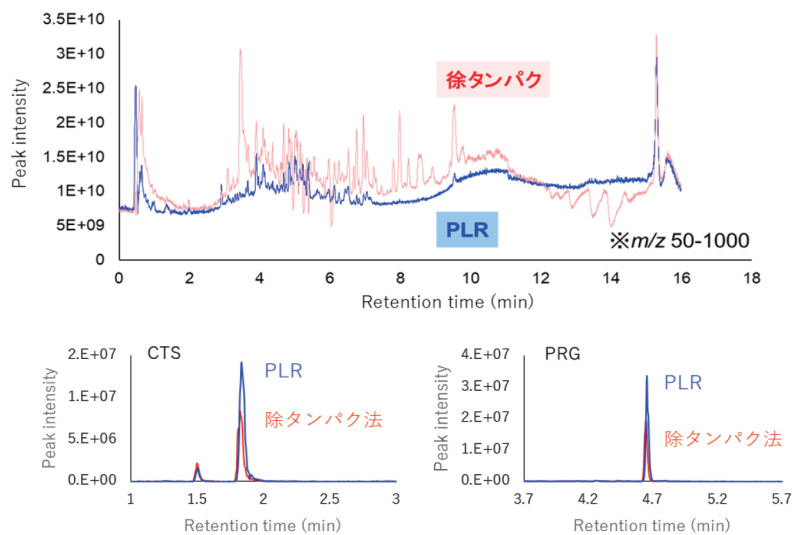


Figure 2 MS scan and representative MRM chromatograms of human serum

処理を可能とできるように、圧力を計算して $20 \times g$ での遠心分離による通液に処理方法を改変した。

決定した条件を用いて分析法バリデーション試験を実施し、再現性及び試料中の安定性を検証した結果を、それぞれTable 1及び2に示す。n=3の3日間の再現性試験の結果、10 ng/mL及び80 ng/mLの添加において全種類で真度 $\pm 20\%$ 及び精度20%以内の良好な値を得た。また、いずれの安定性試験においても真度 $\pm 20\%$ の良好な値が得られ、試料の保管および取り扱い時にSHは安定であることが明らかとなった。

以上の結果から、*in vitro*、*in vivo*及び臨床由来の試料に対応可能な分析法のフォーマットが構築されたと判断したため、本分析法を用いてジオスゲニン含有トゲドコロ摂食ラットから得られた血清を測定し、対照群と比較した。結果、Figure 3に示した通り、PRGに有意な減少、TSTに有意な増加が認められた。

Table 1 Reproducibility of analytical method based on LC-MS/MS for intra-/inter-day

Intra-day (Day1, n=3)	Low (10 ng/mL)						High (80 ng/mL)					
	Human		Rat		DMEM		Human		Rat		DMEM	
	Acc.	Prec.	Acc.	Prec.	Acc.	Prec.	Acc.	Prec.	Acc.	Prec.	Acc.	Prec.
DHEA	100.7	2.2	91.1	4.9	103.4	8.2	97.2	0.7	90.1	4.5	92.2	10.7
E1	112.3	5.4	107.3	4.4	99.8	10.2	111.1	6.7	107.1	3.6	87.8	14.6
E2	100.2	1.6	103.2	2.9	105.0	3.8	100.2	4.4	106.2	1.1	88.5	11.6
ADSD	113.4	2.3	106.7	0.5	108.0	7.0	112.0	4.6	100.2	4.1	87.3	10.8
TST	111.9	2.3	106.5	1.9	110.7	12.2	109.1	4.5	109.4	4.9	96.7	13.9
DHT	95.3	1.3	99.0	5.3	109.7	5.9	86.1	4.2	106.2	4.4	93.3	10.8
PRN	99.7	7.2	100.3	7.0	100.3	7.6	102.2	5.1	95.7	6.8	100.5	10.9
19HADSD	104.0	2.8	109.3	1.9	110.0	7.2	113.2	2.4	108.2	6.2	109.3	2.7
PRG	111.7	0.5	100.6	1.9	113.0	8.8	108.8	2.2	102.2	4.3	105.7	0.8
17HPRG	108.7	0.9	110.8	1.0	114.3	8.5	108.8	2.9	107.6	3.8	104.4	3.3
11HPRG	110.7	1.4	109.8	2.1	114.3	10.6	109.4	3.5	99.9	1.3	101.3	1.4
11DCTCS	112.9	0.9	107.5	4.2	114.2	11.7	103.3	1.5	95.6	2.6	103.5	1.5
CTCS	112.7	4.2	96.1	2.7	109.4	13.2	110.1	4.2	90.5	2.9	106.5	8.8
11DCTS	111.4	5.8	19.4	11.5	112.7	10.6	113.1	4.5	70.6	4.1	102.9	4.4
CTSN	107.6	3.6	112.7	2.2	109.9	6.4	109.5	2.3	103.8	0.8	111.9	6.5
CTS	109.4	2.6	105.3	4.7	108.0	9.8	107.8	4.4	111.2	3.8	108.3	5.6
17HPGN	102.3	0.6	101.9	7.2	101.1	4.8	99.5	3.8	98.9	5.8	110.5	3.4

Inter-day (Three days)	Low (10 ng/mL)						High (80 ng/mL)					
	Human		Rat		DMEM		Human		Rat		DMEM	
	Acc.	Prec.	Acc.	Prec.	Acc.	Prec.	Acc.	Prec.	Acc.	Prec.	Acc.	Prec.
DHEA	99.2	11.7	90.2	6.0	101.7	6.2	97.3	4.2	89.9	5.8	102.2	10.7
E1	107.4	5.2	107.7	4.6	92.8	9.9	103.5	7.0	109.0	4.3	89.3	8.3
E2	103.4	7.1	106.4	3.7	96.5	8.1	98.7	3.2	107.0	3.8	89.3	6.7
ADSD	113.2	2.5	107.7	4.3	106.2	6.5	108.5	5.0	104.7	6.3	101.7	12.2
TST	107.9	3.7	109.9	4.0	110.7	10.6	107.6	4.7	110.4	3.0	104.5	9.5
DHT	96.3	5.7	99.7	5.6	98.6	10.3	91.0	8.6	105.7	3.8	94.2	12.4
PRN	99.6	14.2	100.6	4.7	93.9	9.2	102.7	6.7	98.7	5.1	93.8	9.1
19HADSD	104.8	2.6	105.3	4.1	105.2	8.2	108.5	4.8	104.8	6.0	100.8	7.6
PRG	107.2	5.0	101.4	3.1	94.2	13.4	108.3	3.7	106.0	6.0	95.5	8.4
17HPRG	102.2	5.2	107.4	3.2	97.8	13.6	103.7	4.6	104.5	3.6	98.0	8.0
11HPRG	102.0	7.5	101.1	7.5	101.0	12.1	100.9	9.2	98.5	3.8	97.8	3.7
11DCTCS	106.1	5.1	103.4	4.0	109.1	7.3	100.5	5.0	96.4	4.0	103.0	2.7
CTCS	106.2	5.9	98.9	5.3	105.2	9.1	105.2	5.1	96.3	2.2	100.3	7.3
11DCTS	102.3	7.5	74.7	7.5	102.8	10.7	104.0	8.2	93.8	4.2	94.8	9.2
CTSN	101.8	4.8	106.1	5.9	105.9	4.9	103.7	6.4	102.3	1.6	103.1	8.7
CTS	103.3	6.2	106.8	3.7	103.8	6.4	102.5	5.8	107.9	3.7	102.1	6.2
17HPGN	100.3	6.2	100.4	6.1	100.0	7.4	99.9	6.3	98.3	4.3	104.4	6.8

Table 2 Stability of SH in three situations i.e., -80°C, five-time freeze-thaw and contained in autosampler at 4°C.

Stability (n=3)	Auto-sampler (72 hr)						Freeze-Thaw (5 times)						-80°C (10 days)					
	Low (10 ng/mL)			High (80 ng/mL)			Low (10 ng/mL)			High (80 ng/mL)			Low (10 ng/mL)			High (80 ng/mL)		
	Human	Rat	DMEM	Human	Rat	DMEM	Human	Rat	DMEM	Human	Rat	DMEM	Human	Rat	DMEM	Human	Rat	DMEM
DHEA	95.6	86.9	105.6	98.2	91.1	91.0	98.5	99.0	85.2	100.0	91.0	93.5	96.3	88.7	103.6	97.5	89.1	111.2
E1	92.7	112.6	109.5	106.9	111.9	87.7	103.4	103.9	100.9	101.7	99.3	101.1	102.7	107.4	86.6	99.4	114.3	88.8
E2	100.6	107.3	100.2	98.0	104.5	88.9	93.5	108.6	90.9	94.0	113.1	106.9	97.6	110.6	94.4	96.3	107.5	92.3
ADSD	111.9	113.4	103.4	103.2	107.9	87.7	98.5	95.4	95.5	91.2	93.0	90.1	114.4	112.6	102.7	110.8	112.4	107.0
TST	108.1	106.6	110.7	104.4	109.2	91.1	103.7	109.9	110.7	98.5	108.9	105.0	104.1	116.1	110.7	102.6	111.6	106.5
DHT	102.0	103.2	105.5	86.1	106.1	90.6	96.1	97.7	84.0	95.0	106.2	83.6	94.5	101.7	97.7	98.4	107.9	104.1
PRN	107.9	94.3	104.9	97.2	96.8	102.1	103.2	99.2	87.4	102.3	100.0	92.5	97.8	98.5	95.3	104.9	102.0	92.4
19HADSD	112.9	107.7	109.4	107.8	108.8	100.7	104.3	102.4	103.0	102.6	102.5	99.5	105.3	105.5	108.5	102.6	107.5	98.3
PRG	111.4	101.1	117.8	106.9	100.3	106.1	103.0	102.9	80.9	99.7	100.1	86.2	101.8	100.7	83.6	103.9	102.7	92.0
17HPRG	109.0	113.3	113.5	108.9	109.6	112.0	100.0	103.4	95.4	96.8	109.9	90.0	99.7	105.0	89.2	102.2	102.2	100.3
11HPRG	110.2	96.0	110.5	116.6	103.0	102.1	89.0	92.8	100.6	87.6	98.2	94.9	95.5	95.1	96.6	89.5	94.9	97.5
11DCTCS	109.3	109.0	113.9	110.6	100.8	104.3	96.7	102.2	106.8	88.7	93.5	99.7	102.9	103.0	108.3	94.2	93.4	105.0
CTCS	107.8	100.0	106.3	105.5	101.9	99.3	102.4	100.2	99.2	97.1	100.3	90.6	104.4	100.3	107.5	101.0	100.2	97.1
11DCTS	105.8	96.6	105.7	100.3	104.0	98.1	94.6	109.0	89.2	92.1	102.5	80.5	98.5	105.3	98.8	95.4	108.9	86.6
CTSN	110.9	116.0	105.5	109.3	110.5	83.8	96.5	108.0	117.1	100.0	105.4	109.1	100.6	100.1	105.7	95.9	100.3	96.3
CTS	101.2	119.5	106.7	101.9	112.3	85.1	98.5	95.4	95.5	91.2	93.0	90.1	101.0	104.8	103.5	102.9	108.0	98.1
17HPGN	92.9	105.2	108.7	97.3	103.6	104.7	101.6	100.4	99.1	98.2	104.5	91.3	103.2	104.7	99.1	106.5	100.5	106.4

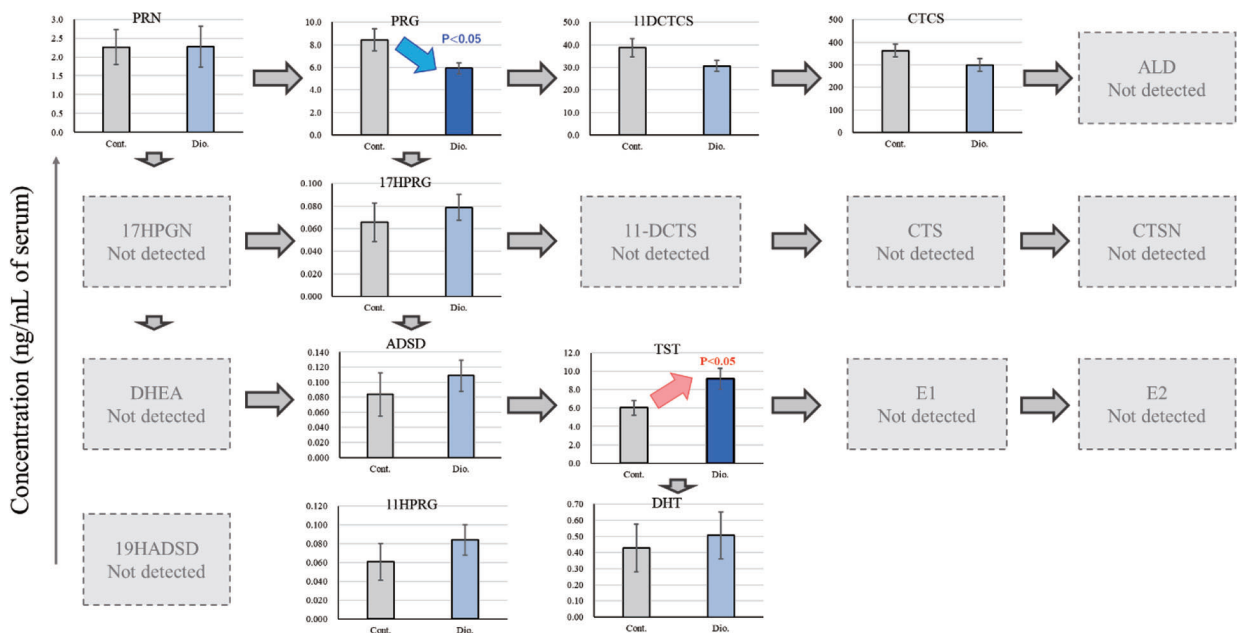


Figure 3 SH cascade of serum from dioscorea esculenta fed rat containing diosgenin.

5. 考察

本研究では、*in vitro*、*in vivo*及び臨床から提案される研究試料のいずれにも対応可能で、かつ前処理を最小化したLC-MS/MSによるSHアッセイ法の開発に取り組んだ。これらの試料は通常、複雑系であるため、LC-MS/MSの測定を妨害する因子を排除する必要がある。その中でも、タンパク質、リン脂質は存在濃度の観点から妨害効果が高いため、これらの除去効率の良い処理方法の検討を実施した。初めに除タンパク質法のみで分析可能か検討したが、マトリックス効果による測定妨害が多くSHで認められた。この測定妨害は系に残存しているリン脂質の干渉と考えられるため、続いてリン脂質と除タンパク質を同時に実施できる系を検討した。リン脂質除去の工程は液-

液抽出などが一般的であるが、SHはリン脂質と極性が類似しているため、より選択性の高い処理法を採用する必要がある。そこで、固相カートリッジによる除去を検討した結果、妨害の大幅な改善が認められ高い検出感度がえられた。この前処理工程は非常にシンプルであり、固相カートリッジに試料溶液をチャージして20×gにて遠心分離するのみである。本前処理法及び決定した分析条件にて、分析法バリデーション（LOD、LOQ、3日間の分析再現性及び試料中SH安定性）を検証した。結果の項に示している通り、10及び80 ng/mL sampleにおいて良好な再現性が得られ、さらに種々の安定性試験においてSHは安定であることが確認された。以上から、本法は極めてシンプルな前処理において、様々な生体試料中のSHを分析可能な性能を有すると判断された。最後に、本法をDHEA様ホルモンとして知られるジオスゲニン含有トゲドコロを摂食させた、ラットの血清中SHプロファイリングに適用した。その結果、対照群と比較してPRGに有意な減少、TSTに有意な増加が認められた。この様な解析は、従来のようなSHを単品で定量する手法では実施できず、例えばTSTのみをターゲットとした場合、他のSHの変化やカスケードのプロファイルを正確に考察不可能である。今回、開発した分析法では、17種のSHカスケードの包括アッセイを可能としたため、様々な研究目的の試料に適用可能なフォーマットであるといえる。ただし、DHEA、PRN及び17HPGNは本系においてはイオン化効率が悪く、検出感度が低いため、より微量なサンプルの測定のためには包括的な感度向上が必要である。簡便性を維持しながら今後も継続的に、分析法の改良に取り組んでいく予定である。

6. 結論

開発したLC-MS/MSに測定に基づく、*in vitro*、*in vivo*及び臨床試料の包括的SHアッセイ法は、正確なSH分泌プロファイリングを可能とした。夾雑成分除去のための前処理は、固相カートリッジによる遠心抽出と濃縮のみと極めて簡便なものとなった。本法はLC-MS/MS測定に基づくため、選択性が担保されることから、ELISA等の免疫学的アッセイ法よりも信頼性の高い定量値を示すことができるものと考えられる。本法により、ジオスゲニン含有投与ラットの血清中SH産生カスケードのプロファイリングを実施し、その作用がTSTの産生増加に伴って発現している可能性を示すことができた。

7. 参考文献

- 1) Schwartz N, Verma A, Bivens CB, Schwartz Z, Boyan BD. Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1863(2016)2289-2298.
- 2) Farach-Carson MC, Davis PJ. Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 307(2003)839-845.
- 3) BIASON-LAUBER A. Molecular medicine of steroid hormone biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 19(1998)155-220.
- 4) Northey JJ, Weaver VM. Mechanosensitive Steroid Hormone Signaling and Cell Fate. *Endocrinology*. 1 (2022) bqac085.
- 5) Zhong L, Sun J, Liu GH, Zhu YJ, Zhu J. Research on the steroidogenesis of proliferated Leydig cells in vitro. *J Artif Organs*. 16(2013)229-33.
- 6) Saito R, Terasaki N, Yamazaki M, Masutomi N, Tsutsui N, Okamoto M. Estimation of the Mechanism of Adrenal Action of Endocrine-Disrupting Compounds Using a Computational Model of Adrenal Steroidogenesis in NCI-H295R Cells. *J Toxicol*. 2016(2016)4041827.
- 7) Kempná P, Hofer G, Mullis PE, Flück CE. Pioglitazone inhibits androgen production in NCI-H295R

- cells by regulating gene expression of CYP17 and HSD3B2. *Mol Pharmacol.* 71(2007)787-798.
- 8) Yamaguchi Y, Tanaka S, Yamakawa T, Kimura M, Ukawa K, Yamada Y, Ishihara M, Sekihara H. Reduced serum dehydroepiandrosterone levels in diabetic patients with hyperinsulinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 49(1998)377-83.
 - 9) Villareal DT, Holloszy JO. Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial. *JAMA.* 10(2004)2243-2248.
 - 10) Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Mesaki N, Fujita S. Increased muscular dehydroepiandrosterone levels are associated with improved hyperglycemia in obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 301(2011)274-280.
 - 11) Sato K, Fujita S, Iemitsu M. *Dioscorea esculenta*-induced increase in muscle sex steroid hormones is associated with enhanced insulin sensitivity in a type 2 diabetes rat model. *FASEB J.* 31(2017)793-801.
 - 12) Sauer FJ, Gerber V, Frei S, Bruckmaier RM, Groessl M. Salivary cortisol measurement in horses: immunoassay or LC-MS/MS? *Domest Anim Endocrinol.* 72(2020)106445.
 - 13) Keevil BG. LC-MS/MS analysis of steroids in the clinical laboratory. *Clin Biochem.* 49(2016)989-997.