

ッセイによって求め、そこから許容される最大の微粒子負荷面密度を決定した。

C. 結果と考察

C.1 液中培養での DR 関係

評価した3種の原体および3種の代謝物すべてについて、用量作用関係が得られた。結果を図1から3に記す。また、それぞれの物質の細胞生存率を指標としたEC₅₀値を表1に示す。

全ての物質について、mMレベルの極めて高い濃度領域で生存率の低下が見られた。モノエステルとジエステルのモル濃度当り毒性を比較すると、BBPおよびDBPについてはモノ体の方が低い毒性を示したが、MEHPのみジエステルよりも強い毒性を示した。

プラスチック可塑剤として使用量が最も多いとされるMEHPについて、生体内でのモノ体への代謝による毒性亢進が見られたことは注意を要するであろう。モノ体は生体内での代謝によって容易に生成することから、細胞内代謝の寄与を今後評価する必要がある。

また、今回はDMSOに予め溶解してから暴露したが、高濃度領域では培養液に最終添加後に高濃度領域で白濁現象が見られた。MEHPは3つの原体の中で水への最も溶解度が高いことから、細胞への暴露がより完全に行われたためであることも否定はできず、今後の検討が必要である。また、フタル酸エステル類の分子レベルでの毒性発現メカニズムには未だ明らかでないことから、この方面での今後の研究の進捗が求められる。

C.2 半透膜培養における経上皮電気抵抗の変化

膜型培養器 (Costar 3460(12穴)) での細胞層の形成・TEER変化を図4に示す。TEERを指標とする限り、肺上皮障害性や透過率7日間程度で十分と思われる。TEERの推移に気液界面培養の実施は大きな影響を与えないことを確かめているが、一方で、モノ体についてより高い毒性が検出されたものもあることから、カルボキシエステラーゼ等の代謝酵素を指標とした細胞層の形成過程をも把握しておく必要がある。

C.3 膜型培養器を用いた上皮障害性・過量の評価

半透膜型培養器を用いて予め細胞層を形成し、その後上面(肺胞内腔側)のみにBBPを暴露した際における、用量作用関係を図5に示す。半透膜型培養器では完全平衡濃度は4倍に希釈されることとなる。上面での暴露濃度基準・平衡時の予想曲線・図1の用量作用曲線を比較すると、上面での暴露濃度基準のものと平衡時の予想曲線とが近かったことから、半透膜上で培養された細胞における細胞障害は、底面での単層培養で与えられるものとほぼ同じになることが判明した。このメカニズムについては、少なくとも低濃度の暴露における細胞障害プロセスは緩慢であることが推察される。しかし、詳細については、後述のようにモノ体をも含めた計測を実施しておく必要がある。

同じく様々な濃度で肺胞上皮上面に

BBP を暴露した場合について、48 時間後の上皮下面（体内側）の BBP 原体の濃度を図 6 に示す。濃度が上昇するにつれて、透過量は上昇することが確かめられたが、どの濃度においても、膜下の濃度は 1/10 から 1/100 であった。

BBP の高い疎水性から考えて、膜下面への透過は、細胞間隙の水相経由（パラセラールート）ではなく、一旦細胞内に取り込まれるトランスセラールートによるであろう。この透過ルートを想定すると、容易に想定されるように、低い原体透過率は細胞の持つカルボキシエステラーゼによって、原体が細胞内に取り込まれた後にすぐに代謝されたためであることが第一に考えられる。また、A549 層に発現するトランスポータが BBP の基底膜側への輸送を阻害した可能性も考えられる。今回は GC-MS を使用したため、ジエステルしか検出が出来なかった。いずれにせよ、A549 細胞でのカルボキシエステラーゼ活性の評価と、モノエステルも検出できるよう HPLC を用いた分析が、今後は不可欠であろう。

C.4 透過率評価用の新規デバイス作成

対象物質の透過量を計測するのに適した評価デバイスの作成を行った。模式図を図 7 に、実際のデバイス写真を図 8 に示す。

このデバイスは、スルーポットは落ちるが透過性評価に特化したものである。予め膜型培養器を用いて形成した肺胞上皮モデル（6 穴のトランスウェル）を着装し、数時間までの透過を評価可能である。培養液側（体内側）はスターラー攪拌を

することで、サンプリング時の誤差をなくす構造とした。

C.5 吸着担体としてのシリカ粒子

フタル酸エステルの人への暴露シナリオの詳細は依然として不明確であるが、その低揮発性から考えて、プラスチック製家庭用品から室内の埃に一旦移行し、その埃が経気道的に暴露されるというシナリオが最も可能性が高い。この場合、埃に吸着した物質は肺胞内の極薄い液相（厚さ約 10 μm ）に溶離し、肺胞上皮に暴露される。この暴露シナリオによる忠実な細胞層への暴露を行うために、フタル酸エステル類を一旦扱いやすい微粒子に液相で吸着させ、その粒子を気液界面培養上体の肺胞上皮モデルに接触暴露させる手法が考えられる。

そこで、材質としてはフタル酸エステル類を溶かし込むことなく生物学的に不活性であり、また比重が大きいなど細胞層への沈着を容易に行えるものとして、シリカ微粒子に着目した。今回用いたシリカ粒子の平均径は 1 μm であり、エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれることはなく、また実際の人への暴露でも肺胞に到達が可能なものである。予備実験として、何も吸着していないシリカ粒子（粒径）を細胞層に様々な面密度で暴露した場合における細胞生存率の変化を図 9 に示す。

高濃度暴露ではおそらく物理的要因による細胞呼吸の阻害によって顕著な生存率低下が見られたが、十分低い濃度領域（0.1 mg/cm^2 以下）においてシリカ粒子の使用は可能であることが確かめられた。

今後、実際に使用するにあたって、粒子へのフタル酸エステルの吸脱着挙動の評価が必要となる。

D. 結論

対象物質であるフタル酸ジエステル並びにその代謝物であるモノエステルは肺に対して用量作用関係が見られた。また、DEHPのみ代謝の結果生じるモノ体で細胞傷害性が向上した。さらに、肺胞上皮モデルの上面（肺胞内腔側）からBBPを添加した場合、下面（体内側）への透過は1/10-1/100程度と極めて小さかったことから、細胞内での代謝の寄与が示唆された。一方、ガス状および粒子状暴露での透過量評価を目的とした新たなデバイスを作成した。また、埃の経気道的暴露というシナリオの再現のため、物質を予めシリカ微粒子に吸着させ、それを細胞層に接触暴露する方法を提案した。

E. 今後の課題

次年度においては、埃経由の暴露シナリオの模倣として提案したシリカ微粒子吸着暴露法については、フタル酸エステル類の吸脱着の把握がまず必要である。この手法を確立させた後、代謝の結果生じるモノ体をも計測可能なHPLC法で原体濃度減少・代謝物濃度増加の時間的変化を計測する必要がある。また、細胞内カルボキシエステラーゼ活性の定量も必要である。これらの知見に基づき、細胞膜代謝透過を考慮する肺胞上皮透過を記述する簡便な数理モデルを作成する予定である。構築される数理モデルはすなわち、メカニズムベースでの予測手法の基

礎となり、各種分配平衡定数を用いたガス・血液分配予測法を超えるものとなることが期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

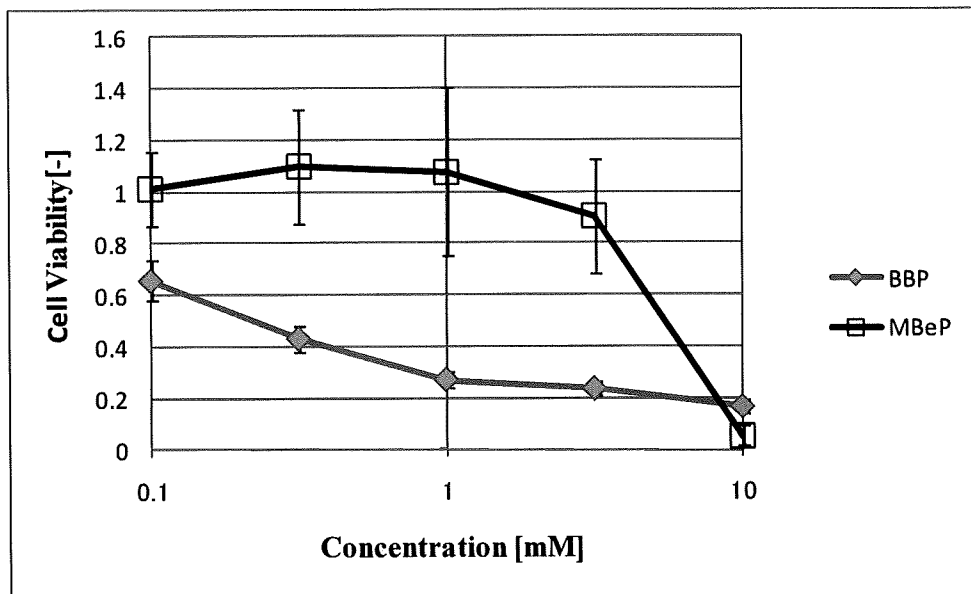


図 1 A549 細胞に対する BBP、MBeP の用量作用関係 (バーは SD (N=7))

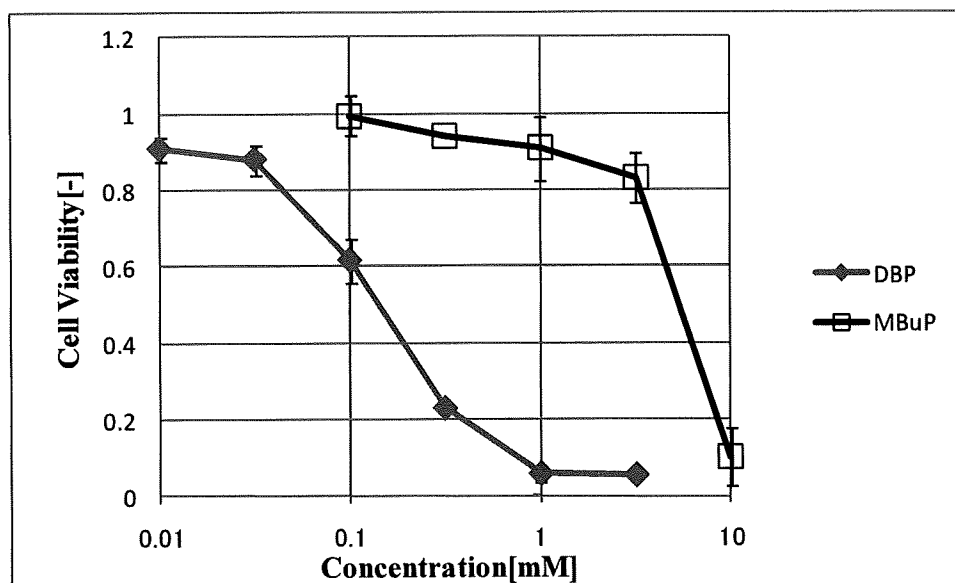


図 2 A549 細胞に対する DBP、MBuP の用量作用関係 (バーは SD (N=7))

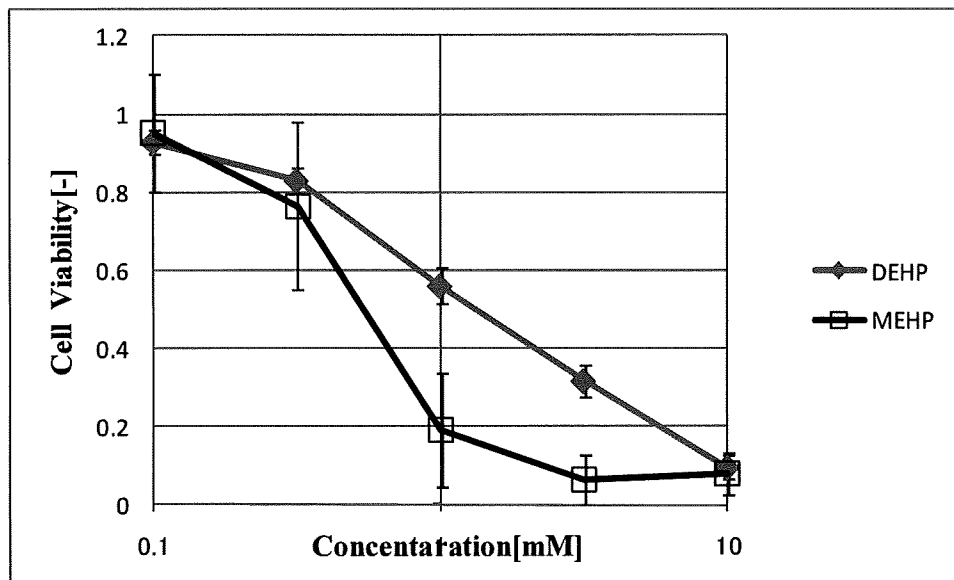


図 3 A549 細胞に対する DEHP、MEHP の用量作用関係 (バーは SD (N=7))

表 1 フタル酸エステル類（原体およびモノ体）の EC₅₀ 値

曝露物質	EC ₅₀ 値 [mM]
BBP	0.17
MBeP	4.50
DBP	0.13
MBuP	5.50
DEHP	1.20
MEHP	0.56

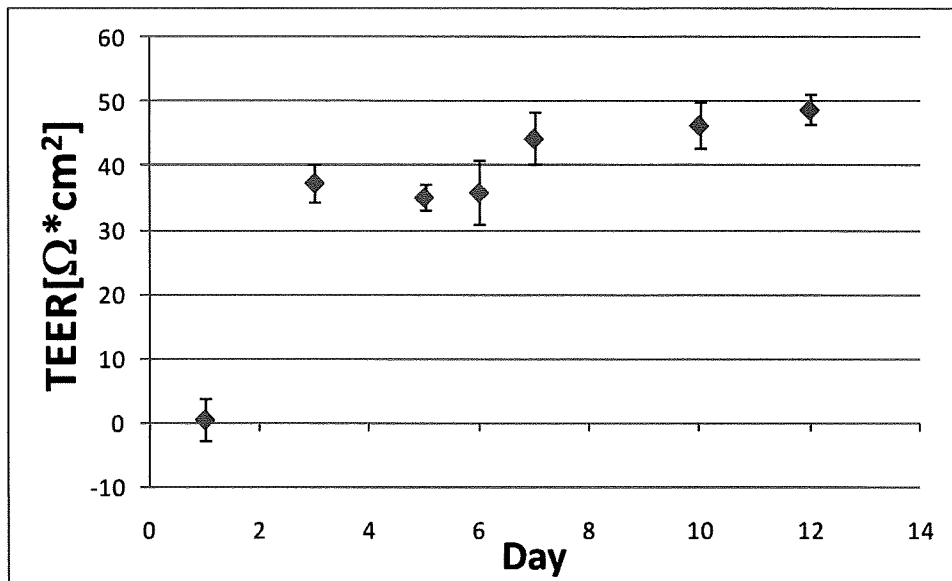


図 4 12 穴トランズウェルプレート上の A549 細胞の TEER の経日変化 (バーは SD (N=12))

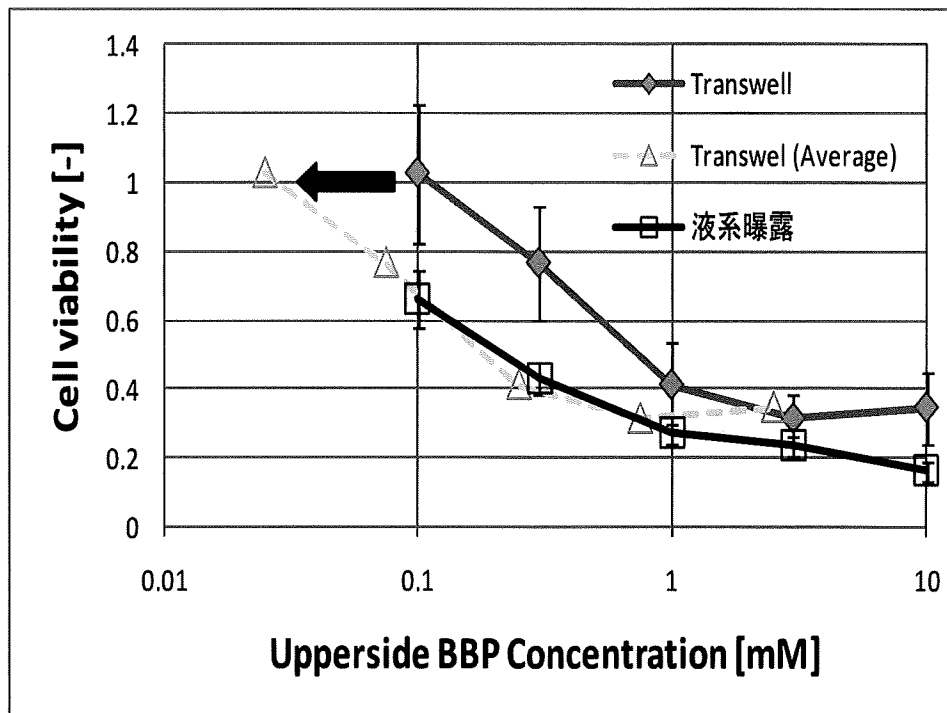


図 5 トランズウェルプレートでの液系曝露 BBP 用量作用関係 (バーは SD (N=4))

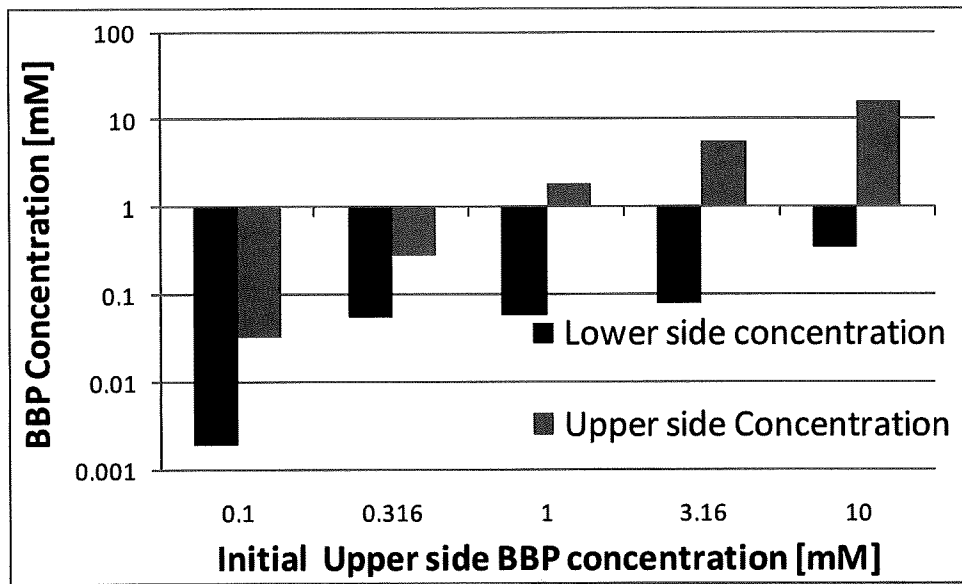


図 6 上部暴露量と下部への透過量関係

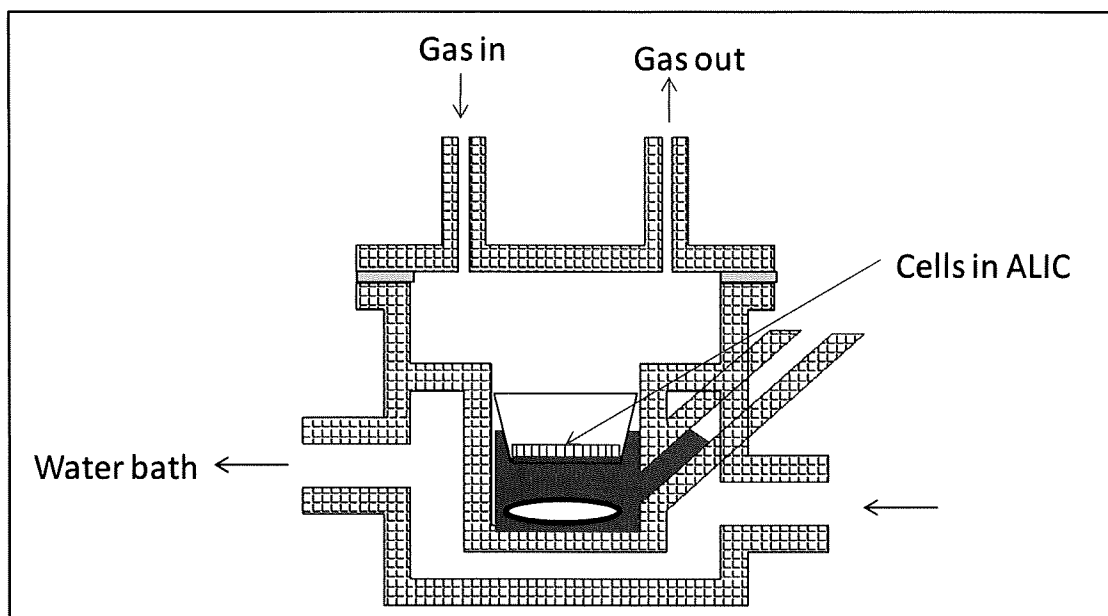


図 7 肺胞透過率評価のための新規デバイスの概念図

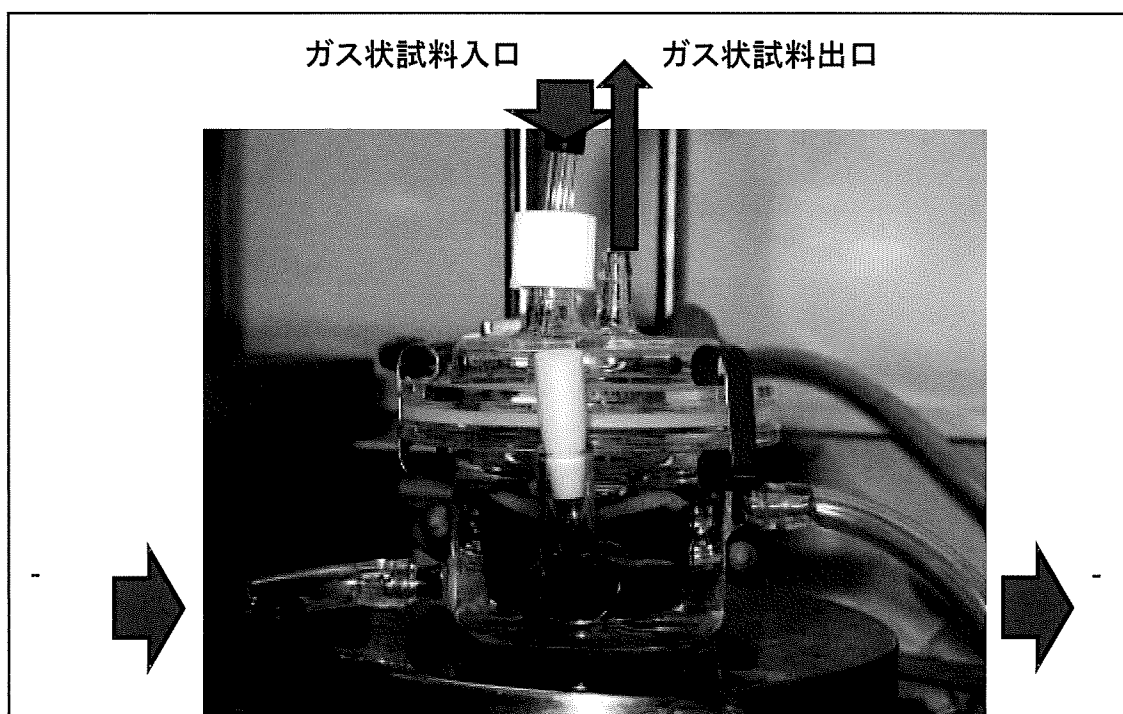


図 8 作成した新規デバイスの写真

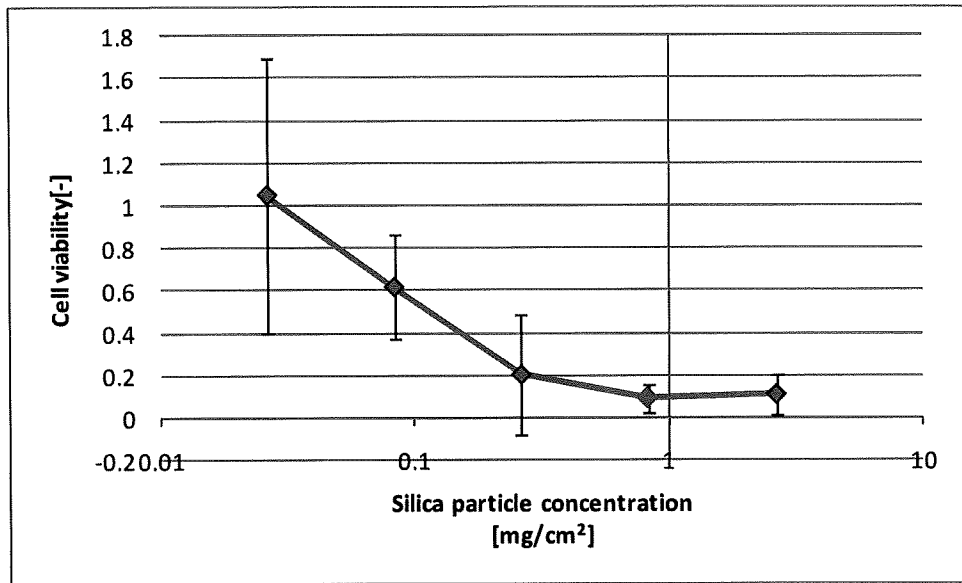


図 9 シリカ粒子の用量作用関係 (バーは SD (N=12))

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究年度終了報告書

家庭用品に由来する化学物質の多経路暴露評価手法の開発に関する研究

家庭用品から溶出する化学物質の経皮吸収評価手法の開発に関する研究

研究分担者：杉林 堅次 城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学講座 教授
研究協力者：藤堂 浩明 城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学講座 助教
研究協力者：鈴木 貴雅 城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学講座

研究要旨：フタル酸エステル類はプラスチックの可塑剤などに使用され、皮膚を介した人体への流入が考えられる。本研究では、フタル酸エステル類からフタル酸ジブチルを選択し、皮膚透過性並びに皮膚貯留性を評価した。

まず初めに、建材などに多く含まれている可塑剤であるフタル酸ジブチル並びにその代謝物として想定されるフタル酸モノ体の HPLC を用いた同時定量条件を確立した。

続いて、フタル酸ジブチルの皮膚中での代謝挙動を把握することとした。フタル酸ジブチルは皮膚ホモジネート中のエステラーゼにより代謝を受け、モノ体となることが確認された。また、皮膚ホモジネート中でモノ体からフタル酸への代謝は受けず、皮膚中ではモノ体として存在した。

最後にフタル酸の皮膚透過性試験を行った。フタル酸ジブチルは皮膚に分配し、速やかに代謝され、モノ体となり皮膚を透過することが分かった。また、エステラーゼを阻害した系では、フタル酸ジブチルは皮膚中に貯留することが分かった。

A. 研究目的

フタル酸エステル類はプラスチックの可塑剤などに使用され、家庭内でも家具、カーペットや建材など皮膚に触れることが想定されるモノにも多数含まれており、皮膚を介した人体への流入が懸念される。

また、フタル酸エステル類の多くは低分子（分子量 500 Da 以下）で脂溶性が高く（ $\text{Clog}P$ が正の値）、経皮暴露後のヒトへの健康被害が懸念される。

本研究では、家庭用品に由来する化学

物質の経皮暴露評価手法の開発を目的とした。化学物質を皮膚透過性の観点から分類し、それぞれに適した毒性評価を行うことにより安全性の確保に努めた。

B. 研究方法

B-1. 化学物質の分類と毒性評価

化学物質は皮膚透過性の観点より 3 種類に分類され、それぞれに適した毒性評価を選択した。Figure 1 に化学物質の皮膚透過性と毒性評価方法の関係を示す。

Type Aは化学物質が基剤から皮膚に分配せず、皮膚を介した体内への流入は起きないと考え、経皮暴露しても安全であるとする。

Type Bは皮膚に貯留するため、経皮暴露すると皮膚刺激性が懸念されるため、皮膚刺激性の評価が必須であると考えた。

Type Cは高い皮膚透過性を示すため、皮膚刺激性に加えて、血中移行後に全身の各臓器での障害評価が必須であると考えた。よって、毒性評価項目に皮膚刺激性と全身毒性のパラメータとなりうる血中濃度を測定することを選択した。

B-2. 毒性評価における化学物質の分類定義

上記に示した分類法は化学物質の皮膚透過性に基づいて行っている。皮膚透過性を評価するために、皮膚透過係数 P すなわち化学物質の皮膚への流入速度を算出する。化学物質が皮膚に暴露されると、化学物質はFickの拡散則に従い皮膚を流入・透過する。ここで、単位面積当たりの累積皮膚透過量 Q (nmol/cm²) は、式(1)で示すことができる。

$$Q = \frac{DKC_v}{L} \left(t - \frac{L^2}{6D} \right) - \frac{2KC_v L}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2}{L^2} t\right) \quad (1)$$

ここで、 D 、 K 、 C_v 、および L は皮膚バリアー中拡散係数 (cm²/h)、皮膚バリアー/基剤分配係数 (無次元)、化学物質基剤中濃度 (nmol/mL) および皮膚バリアーの厚み (cm) である。また、式(1)を微分し皮膚透過速度 (nmol/cm²/h) を表すと式(2)のようになる。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DKC_v}{L} \left[1 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp\left\{-\frac{Dn^2\pi^2}{L^2} t\right\} \right] \quad (2)$$

式(2)は定常状態では右辺第二項がゼロになり、次式に簡略化できる。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DKC_v}{L} = PC_v \quad (3)$$

式(3)より透過係数 P (cm/s) は算出される。

また、皮膚の最外層に存在する角層は、部位によって異なるが背部、腹部さらには顔面では、約20層の角質細胞からなり、約20 μmの厚みがある。角層は最外層から一日一層剥がれ落ちるので、角層落屑速度は1 μm/dayすなわち約1 × 10⁻⁹ cm/sと算出することができる。

経皮暴露した化学物質の分類は化学物質の透過係数 P と角層落屑速度との比較により行い、透過係数が角層落屑速度以下の化学物質は皮膚を介した体内への吸収はほとんどないと考えた。Table 1に毒性評価における化学物質の分類定義を記した。

B-3. 試薬

フタル酸ジブチル、フタル酸モノブチルおよびフルオロリン酸ジイソプロピル (DFP) は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。その他の試薬は、特級、HPLC用または試薬グレードのものを精製せず使用した。

B-4. 実験動物

雄性ヘアレスラット (WBM/ILA-Ht、体重 200-250 g) は城西大学生命科学セン

ター（埼玉、日本）または石川実験動物研究所（埼玉、日本）から購入した。

B-5. 倫理面への配慮

動物の飼育及び実験は当該研究実施機関の動物実験管理委員会である城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、「城西大学動物実験規定（平成21年4月）」に従い、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を行った。

B-6. フタル酸ジブチル並びにフタル酸モノブチルの一斉定量条件検討

フタル酸エステル類の中から、フタル酸ジブチルを選択し、研究を進めた。フタル酸ジブチル並びにその代謝物であるフタル酸モノブチルの同時定量条件を検討した。Tables 2, 3 に HPLC の装置および HPLC 条件を示す。

B-7. フタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチルの皮膚内代謝試験

ペントバルビタール麻酔下（50 mg/kg、*i.p.*）のヘアレスラットの腹部皮膚を剃毛後、摘出した。同皮膚をはさみで細断後、氷冷下にて電動ホモジナイザー

（Polytron PT-MR 3000、Kinematica、Lucerne、Switzerland）を用いて、ホモジナイズ（12,000 rpm、5 min）し 10% 皮膚ホモジネートを調製した。40 μ M に調製したフタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチル 9.0 mL に上記皮膚ホモジネート 1.0 mL を添加し（最終皮膚ホモジネートは 1% に調製）、経時的に HPLC を用いてフタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチルの濃度を定量した。解析は 0 時

のフタル酸ジブチルの濃度を 100% とし各時間の減少率を求めた。また、エステラーゼによる代謝を確認するためにエステラーゼの阻害剤である DFP を使用し、同様の実験を行った。

B-8. フタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチルの皮膚透過実験

ペントバルビタール麻酔下（50 mg/kg、*i.p.*）のヘアレスラットの腹部皮膚を剃毛後、清拭しはさみを用いて摘出した。また、損傷皮膚を想定した *stripped skin* ではセロハンテープ（セロテープ®、ニチバン株式会社、埼玉）を使用し、角層を完全に除去するためテープストリッピングを 20 回行なった。真皮側の脂肪等を除去後、PBS または DFP を入れた 5 mL マイクロチューブで 30 min インキュベートし、*side-by-side* 型拡散セル（Fig. 2）に挟み、表皮側にフタル酸ジブチルまたはフタル酸モノブチルの PBS 溶液を、真皮側に PBS または DFP 溶液を適用し、これらの皮膚透過性を測定した。

B-9. フタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチルの皮膚中濃度測定

透過実験後のラット皮膚を PBS で三度洗い付着している適用化合物を洗い流し、ハサミで有効透過面積に切り取り細断した後、PBS を加え氷冷下で電動ホモジナイザーを用いて、ホモジナイズし 4% 皮膚ホモジネートを作成した。得られた皮膚ホモジネート 200 μ L に同量の PBS を加え、また、検量線作成時では同量の各濃度検量線溶液を加えサンプル溶液とした。

B-10. フタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチルの定量法

フタル酸ジブチルの代謝実験、皮膚透過試験および皮膚中濃度測定実験で得られたサンプル 100 μL に内部標準物質を含有したアセトニトリルを同量混和し、攪拌後、遠心分離 (15,000 rpm、5 min、4°C) によって除タンパク後、HPLC を用いて定量した。

C. 研究結果

C-1. フタル酸ジブチル並びにフタル酸モノブチルの一斉定量結果

Figure 3 に HPLC を用いたフタル酸ジブチル並びにフタル酸モノブチルの一斉定量したクロマトグラムを示す。本実験装置並びに測定条件で、フタル酸ジブチル並びにフタル酸モノブチルは一斉定量できた。また、最小定量感度はフタル酸ジブチル並びにフタル酸モノブチルで 1 μM であった。

C-2. フタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチルの皮膚内代謝試験結果

Figure 4 a にフタル酸ジブチルの皮膚内代謝試験結果を示す。フタル酸ジブチルは皮膚ホモジネート中で明らかな減少が認められたが、DFP により皮膚内エステラーゼを阻害した系では、代謝は阻害され濃度の減少は起こらなかった。また、フタル酸ジブチルの減少が認められた系で代謝物であると考えられるモノブチル体を同時定量したところ、ジブチル体の減少濃度とモノ体の増加濃度がほぼ一致した (Fig. 5)。したがって、フタル酸ジ

ブチルは皮膚内で代謝されモノ体を生成することがわかった。

Figure 4 b にフタル酸モノブチルの皮膚内代謝試験結果を示す。PBS および DFP を用いた皮ホモジネート系において、フタル酸モノブチルの減少は認められなかった。これより、フタル酸モノブチルは皮膚内でほとんど代謝されないものと思われた。

C-3. フタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチルの皮膚透過実験並びに皮膚中濃度測定結果

Figure 6 にフタル酸ジブチルをヘアレスラットの intact または stripped skin に適用した際の、単位面積当たりの累積透過量・時間プロファイルを示す。ジブチル体は、全ての時間において検出されず (Fig. 6a)、モノ体のみ検出された (Fig. 6b)。また、モノ体としてレシーバー中に検出された量は intact skin および stripped skin で同程度であり、DFP 存在下ではジブチル体もモノ体も検出されなかった。Figure 7 に透過実験終了後の皮膚中濃度を測定した結果を示す。皮膚透過性試験結果と同様にモノ体のみが検出されたのに対し、DFP 存在下ではジブチル体およびモノ体が共に検出された。皮膚中にモノ体のみが検出された理由として、ジブチル体がホモジネート溶液中のエステラーゼにより代謝されたためと考えられる。また、エステラーゼ阻害時 (DFP 存在時) にジブチル体が皮膚透過せず、皮膚に貯留する原因として、ジブチル体の高い脂溶性が ($\text{Clog}P=4.73$) が寄与していると考えられた。したがって、

生きた表皮・真皮などの水分含量の高い層への浸透が低く、脂溶性が高い角層もしくはその付近へ高い親和性を示したと考えられた。したがって、フタル酸ジブチルを経皮暴露すると皮膚内で速やかにモノブチル体に代謝され、モノブチル体が皮膚を透過することが分かった。

以上より、フタル酸ジブチルの適切な毒性評価は代謝物であるモノ体の皮内挙動を正確に把握する必要があると考えられたため、フタル酸モノブチルの皮膚透過性試験を行った。

Figure 8 にフタル酸モノブチルの皮膚透過性試験結果、Fig. 9 にフタル酸モノブチルの皮膚中濃度を示す。フタル酸モノブチルは高い皮膚透過性および非貯留性が確認された。また、フタル酸モノブチルの透過係数は intact skin で約 2.0×10^{-7} , stripped skin で約 3.5×10^{-6} (cm/s) であった。よって、フタル酸モノブチルはタイプ C に分類された。

D. 考察・結論

建剤やプラスチック製品などから溶出したフタル酸ジブチルに経皮暴露すると、同物質は皮膚に分配し、速やかに皮膚内のエステラーゼにより代謝され、モノブチル体として皮膚を透過することが考えられた。代謝物であるフタル酸モノブチルは親化合物であるフタル酸ジブチルより脂溶性が低く、レシーバーへの移行が速やかであった。また、フタル酸ジブチルの透過係数を算出する際には、フタル酸モノブチルへの代謝速度が律速段階となる可能性があるため、代謝パラメータの算出が必要であると考えられた。

E. 研究発表

E-1. 論文発表
なし

E-2. 学会発表

鈴木 貴雅、中田 圭一、石井 宏、藤堂 浩明、神野 秀人、杉林 堅次、家庭内化学物質の定量的経皮暴露評価、日本薬学会 130 年会、岡山

F. 知的所有権の取得状況

F-1. 特許取得
なし

F-2. 実用新案登録
なし

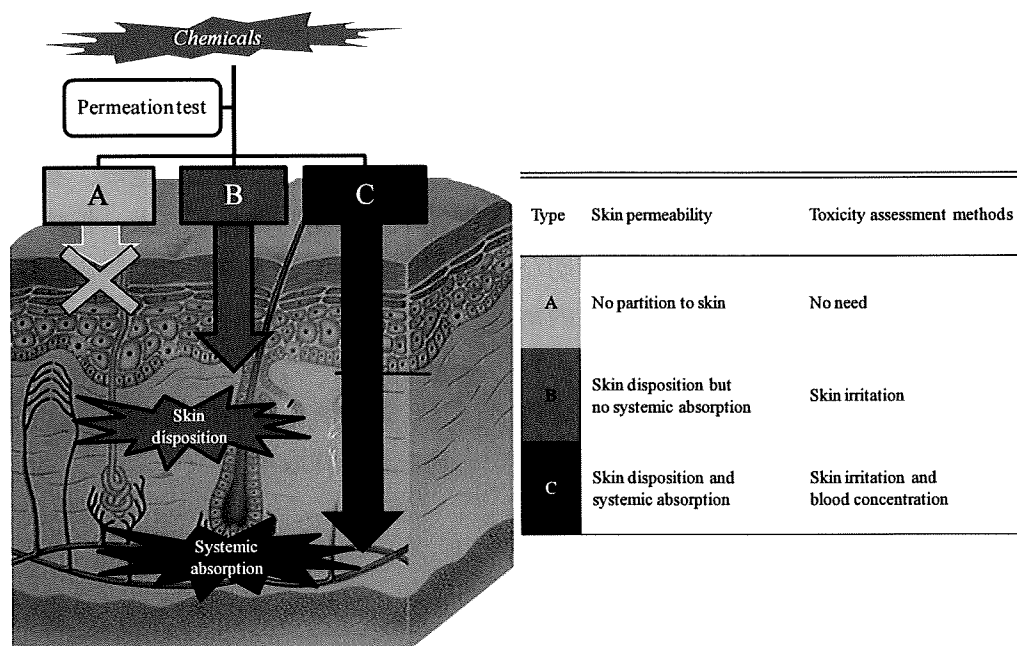


Fig. 1 Relationship of skin permeability and toxicity assessment methods

Table 1 Classification of chemicals in the transdermal toxicity assessment against skin exposure

Type	Permeability coefficient	Skin conc.	Blood conc.
A	$\ll 1.0 \times 10^{-9}$	Extremely low	Not detected
B	$\leq 1.0 \times 10^{-9}$	High	Extremely low
C	$> 1.0 \times 10^{-9}$	High	High

Table 2 HPLC system

システムコントローラー	CBM-20A	(島津製作所, 京都, 日本)
送液ユニット	LC-20AD	(島津製作所)
オートインジェクター	SIL-20AC	(島津製作所)
カラムオーブン	CTO-20AC	(島津製作所)
UV検出器	SPD-20AC	(島津製作所)
解析ソフト	LCsolution	(島津製作所)

Table 3 HPLC condition for determination of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate

カラム	Inertsil C8-3 5 μ m 4.6 \times 250 mm (ジーエルサイエンス, 東京, 日本)
移動相	Acetonitrile: 0.5% phosphoric acid = 8: 2
検出波長	254 nm
流速	1.0 mL/min
カラム温度	40°C
注入量	20 μ L
内部標準物質	n-Hexyl 4-hydroxybenzoate

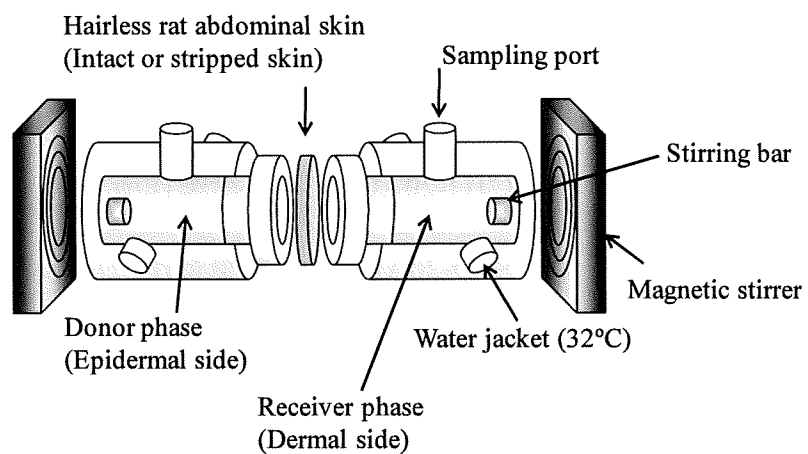


Fig. 2 Set-up of side-by-side diffusion cell for skin permeation experiment

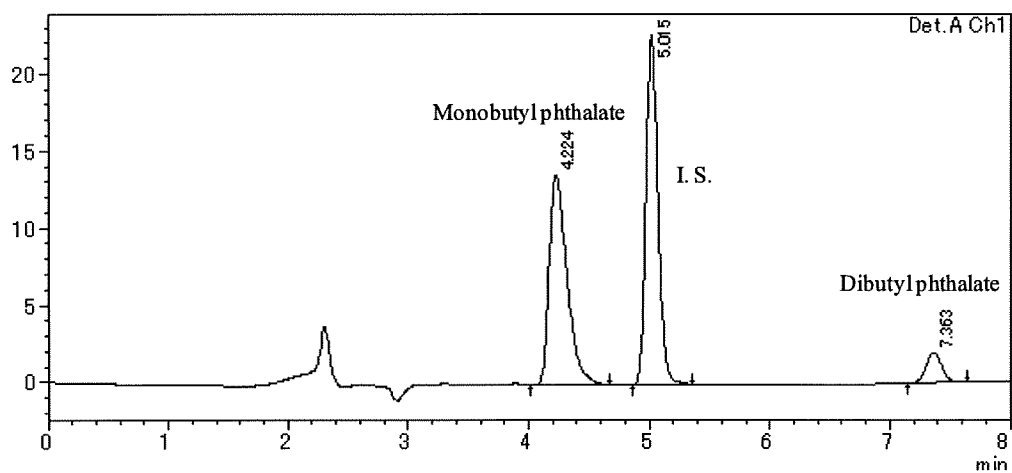


Fig. 3 Chromatogram of di-n-butylphthalate and monobutylphthalate determination used by HPLC

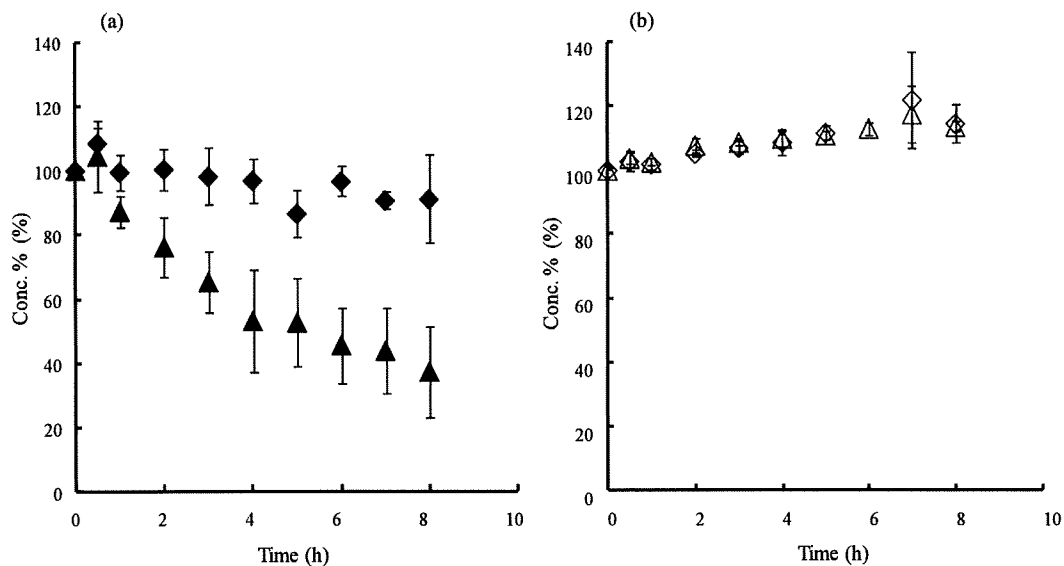


Fig. 4 Time course of concentration ratio of dibutyl phthalate (a, closed symbols) and monobutyl phthalate (b, open symbols) in skin homogenate with $\blacklozenge, \blacktriangle$ or without DFP $\blacktriangle, \blacktriangle$. Each value shows the mean \pm S.D.(n = 3).

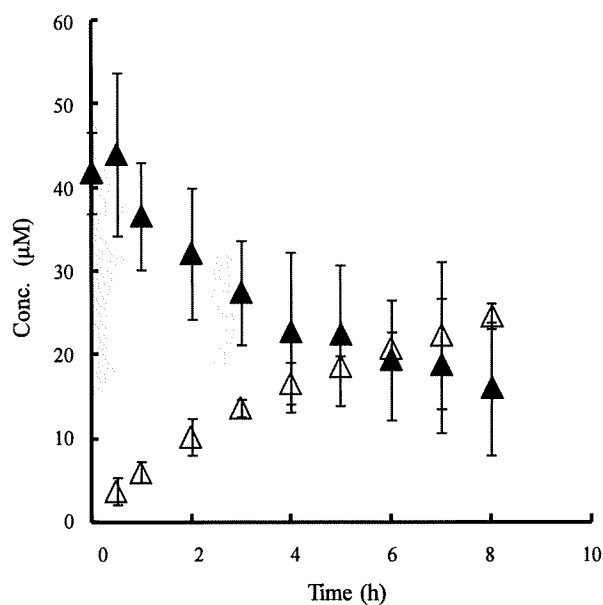


Fig. 5 Time course of decrease of dibutyl phthalate; \blacktriangle and increase of monobutyl phthalate as coproducts; \blacktriangle . Each value shows the mean \pm S.D.(n = 3).

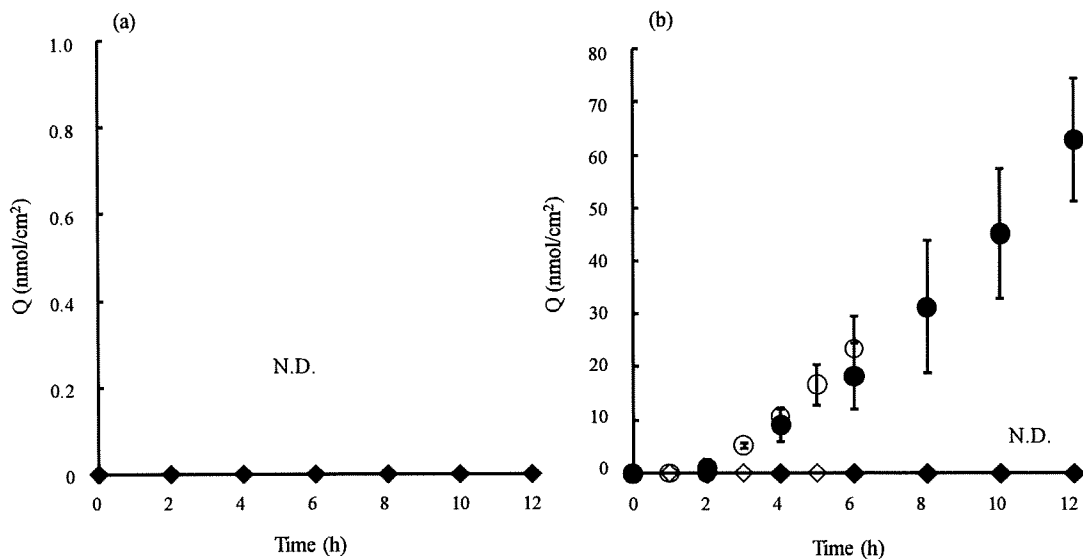


Fig. 6 Time course of cumulative amount of dibutyl phthalate (a) or monobutyl phthalate (b) after applied dibutyl phthalate through hairless rat intact (closed symbols) or stripped skin (open symbols) with DFP; ◆, ◇ or without DFP; ●, ○. Each value shows the mean \pm S.D.(n = 3).

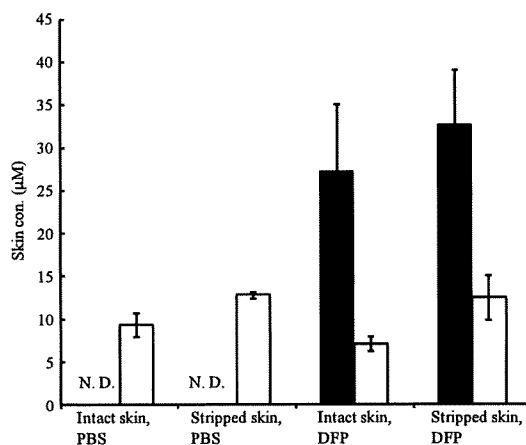


Fig. 7 Skin conc. of dibutyl phthalate (closed column) or monobutyl phthalate (open column) after applied dibutyl phthalate. Each value shows the mean \pm S.D.(n = 3).