

13.10.2. 骨髄塗抹標本作製方法

炭酸ガスにより安楽死させ、大腿骨を摘出し、骨髄細胞懸濁液を調製した。1個体あたり4枚の塗抹標本作製し、乾燥させた後、メタノール固定した。0.007%アクリジンオレンジ液を用いて染色した。

13.11. 観察及び測定

13.11.1. 生死及び一般状態

投与日の急速投与前、持続投与中、持続投与後約30分及び2時間、投与後1日にそれぞれ1回、一般状態の変化及び死亡の有無を観察した。

13.11.2. 体重

投与日及び標本作製日に測定した。

13.11.3. 骨髄塗抹標本観察

蛍光顕微鏡を用いて観察した。成熟赤血球は無蛍光の赤血球、幼若赤血球は橙赤色蛍光、幼若赤血球中の小核は黄緑色蛍光によって識別した。小核は主核の1/2以下の大きさとし、微小の小核は含めなかった。

1個体2枚のスライドについて、倍率1000倍下で成熟赤血球、幼若赤血球及び小核を有する幼若赤血球を観察し、全赤血球中に占める幼若赤血球の比率（以下、幼若赤血球比率）と幼若赤血球の小核出現率（以下、小核出現率）を求めた。

幼若赤血球比率については、1スライドあたり500個、1スライドあたり1000個の赤血球〔成熟赤血球及び幼若赤血球〕を観察して、下記の計算式から幼若赤血球比率を求めた。

$$\text{幼若赤血球比率 (\%)} = \frac{\text{IE} + \text{MNIE}}{(\text{IE} + \text{MNIE}) + \text{ME}} \times 100$$

小核出現率については、1スライドあたり1000個、1個体あたり2000個の幼若赤血球を観察して小核を有する幼若赤血球数を求め、下記の計算式から小核出現率を求めた。

$$\text{小核出現率 (\%)} = \frac{\text{MNIE}}{\text{IE} + \text{MNIE}} \times 100$$

IE：幼若赤血球 (immature erythrocyte) 数

MNIE：小核を有する幼若赤血球 (micronucleated immature erythrocyte) 数

ME：成熟赤血球（mature erythrocyte）数

13.12. 試験成立条件

本試験での陰性対照群の小核出現率が背景データの陰性対照変動範囲（0.00～0.45%）内であった時、試験成立として結果を評価した。

13.13. 統計学的処理

定量データについて Microsoft® Excel 2000 Windows 版（Version 9）を用いて平均値と標準偏差の算出を行った。統計解析は、Microsoft Windows 版 SAS® 9.1.3 を用いて行った。

小核出現率は、Kastenbaum and Bowman の方法により、陰性対照群と被験物質投与群間で比較した。陰性対照群と AcPepA 40 mg/kg 投与群間で有意差が認められたため、Cochran-Armitage の傾向検定を行った。

幼若赤血球比率及び体重は、Dunnnett's の方法により、陰性対照群と被験物質群間で比較した。有意水準は片側 5%とした。

14. 試験結果

14.1. 生死及び一般状態

生死及び一般状態観察の成績を Table 1 に示した。

陰性対照群、AcPepA 40 及び 80 mg/kg 群のいずれの群においても死亡はなく、一般状態にも異常は認められなかった。

14.2. 体重

体重の成績を Table 2 に示した。

体重は、AcPepA 40 及び 80 mg/kg 群のいずれの群においても陰性対照群との差は認められなかった。

14.3. 骨髄塗抹標本観察

骨髄塗抹標本観察の成績を Table 3 に示した。

陰性対照群の小核出現率は 0.11%であった。背景データの変動範囲内であったことから、試験は成立した。

小核出現率について、AcPepA 80 mg/kg 群では陰性対照群と比較して増加は認められなかったが、40 mg/kg 群で統計学的に有意な増加が認められた。1/6 例のみでの増加だった。Cochran-Armitage の傾向検定において用量依存性は認められなかった。

幼若赤血球比率について、AcPepA 40及び80 mg/kg群において、陰性対照群と比較して差は認められなかった。

15. 考察及び結論

AcPepA 40 mg/kg群において、陰性対照群と比較して小核出現率の有意な増加が認められたが、用量依存性は認められなかった。

40 mg/kg群の小核出現率の有意な増加について、No. 1201の小核数が25であるのに対して他の5匹では陰性対照群に近い値であり、1個体に限定した増加であった。80 mg/kg群では増加が認められなかったこと、小核の増加はストレス、体温変化、赤血球生成障害及び環境の変化等によっても生じるという報告もあることから^{1),2)}、40 mg/kg群の小核出現率の増加は偶発的なものと判断した。

以上のことから、本試験条件下において、AcPepAには小核誘発性はないと判定した。

16. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

該当する事項はなかった。

17. 参考文献

- 1) Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards., Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M. R. O'Donovan, Y. F. Sasaki, T. Sofuni and R. Tice, Mutation Research, 627:78-91, 2007.
- 2) Report of the IWGT working group on strategy/interpretation of regulatory in vivo tests. II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test., Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M. R. O'Donovan, Y. F. Sasaki, T. Sofuni and R. Tice, Mutation Research, 627:92-105, 2007.

Table 1 Clinical signs in the micronucleus test of AcPepA in rats

Test substance	Dose (mg/kg)				Animal No.	Time after infusion dosing				
	Total	Rapid (2min)	+	Infusion (1h)		Pre	During	30min	2h	1day
Negative control (Saline)	0	0	+	0	1101	-	-	-	-	-
					1102	-	-	-	-	-
					1103	-	-	-	-	-
					1104	-	-	-	-	-
					1105	-	-	-	-	-
					1106	-	-	-	-	-
AcPepA	40	10	+	30	1201	-	-	-	-	-
					1202	-	-	-	-	-
					1203	-	-	-	-	-
					1204	-	-	-	-	-
					1205	-	-	-	-	-
					1206	-	-	-	-	-
AcPepA	80	20	+	60	1301	-	-	-	-	-
					1302	-	-	-	-	-
					1303	-	-	-	-	-
					1304	-	-	-	-	-
					1305	-	-	-	-	-
					1306	-	-	-	-	-

Pre: Pre rapid dosing, During: During infusion dosing.

-: No abnormalities.

Table 2 Body weights in the micronucleus test of AcPepA in rats

Test substance	Dose (mg/kg)				Animal No.	Dosing day	Specimen preparation day
	Total	Rapid (2min)	+	Infusion (1h)			
Negative control (Saline)	0	0	+	0	1101	289	293
					1102	312	311
					1103	299	309
					1104	311	314
					1105	303	305
					1106	295	304
					Mean	302	306
					SD	9	7
AcPepA	40	10	+	30	1201	306	315
					1202	301	302
					1203	296	294
					1204	322	331
					1205	297	305
					1206	294	290
	Mean	303	306				
	SD	10	15				
	80	20	+	60	1301	297	300
					1302	320	313
					1303	298	304
					1304	293	290
1305					306	302	
1306					309	313	
Mean	304	304					
SD	10	9					

Unit: g.

Table 3 Results of micronucleus test of AcPepA in rats

The incidence of micronuclei (%)

Preparation time (h)	Test substance	Dose (mg/kg)				No. of animals	MNIE/2000IE						Mean \pm SD (%)	
		Total	Rapid (2min)	+	Infusion (1h)		individual data of							
						1	2	3	4	5	6	Total		
24	Negative control (Saline)	0	0	+	0	6	1	1	2	3	3	3	13	0.11 \pm 0.05
	AcPepA	40	10	+	30	6	25	7	8	2	1	1	44	0.37 \pm 0.46 **
		80	20	+	60	6	1	3	5	5	4	2	20	0.17 \pm 0.08

The frequency (%) of polychromatic erythrocytes to the total erythrocytes

Preparation time (h)	Test substance	Dose (mg/kg)				No. of animals	IE/1000(IE+ME)						Mean \pm SD (%)	
		Rapid (2min)	+	Infusion (1h)	individual data of									
						1	2	3	4	5	6			
24	Negative control (Saline)	0	0	+	0	6	416	498	530	512	490	540		49.8 \pm 4.4
	AcPepA	40	10	+	30	6	411	575	474	466	520	408		47.6 \pm 6.4
		80	20	+	60	6	443	527	453	413	493	500		47.2 \pm 4.2

IE: Immature Erythrocyte, MNIE: Micronucleated Immature Erythrocyte, ME: Mature Erythrocyte.

** $p < 0.01$: Significant difference from the negative control by Kastenbaum and Bowman method.

添付資料 1

ラット小核試験背景データ

施設：スギ生物科学研究所株式会社

動物：ラット(SD), SPF 性：雄, 週齢：8週齢, 1群5～6匹

標本作成：陰性対照物質又は陽性対照物質の投与後24時間

観察数：幼若赤血球；2000個/匹, 赤血球；1000個/匹

実験期間：2007～2008年3月

作成：2008年3月

2007～2008年に行われた小核試験における小核を有する幼若性赤血球の出現頻度(表1)、及び全赤血球に占める幼若赤血球の割合(表2)について、平均(Mean)及び標準偏差(SD)を算出し、適切な範囲を設定した。

表1 小核を有する幼若赤血球の出現頻度

	動物数	平均値 (%)	標準偏差	*変動範囲 (%)	Min(%)	Max(%)
陰性対照群	65	0.15	0.1	0.00～0.35	0	0.4
陽性対照(CP 20mg/kg)	34	2.93	1.18	0.57～5.29	1.1	6.10

*変動範囲 (%) の算出：Mean±2SD

表2 全赤血球に占める幼若赤血球の割合

	動物数	平均値 (%)	標準偏差	*変動範囲 (%)	Min(%)	Max(%)
陰性対照群	65	52.1	4.79	42.5～61.7	41.0	63.4
陽性対照(CP 20mg/kg)	34	34.8	8.22	26.6～43.1	18.6	52.9

*変動範囲 (%) の算出：Mean±2SD

DRAFT

FBM 09-9544

最終報告書

(第1稿)

試験表題：AcPepA の hERG 細胞を用いた K^+ チャンネルへの影響

試験番号：FBM 09-9544

スギ生物科学研究所株式会社
(旧社名：株式会社富士バイオメディックス)

試験責任者署名：

小川光英

年 月 日

本最終報告書は表紙を含む 14 枚

目次

	(頁)
1. 試験表題.....	4
2. 試験番号.....	4
3. 試験目的.....	4
4. 試験施設.....	4
5. 試験委託者.....	4
6. 試験実施期間.....	4
7. 試験責任者.....	4
8. 担当責任者.....	5
9. GLP 及びガイドライン.....	5
10. 信頼性保証.....	5
11. 試験関係資料の保存.....	5
12. 要約.....	6
13. 被験物質及び媒体.....	7
13.1. 被験物質.....	7
13.2. 媒体.....	7
14. 適用検体の調製方法.....	7
15. 試験系.....	7
15.1. 細胞株.....	7
15.2. 細胞株選択の理由.....	8
15.3. 入手先.....	8
16. hERG 細胞培養.....	8
16.1. 培養液.....	8
16.2. 培養条件.....	8
16.3. 培養方法.....	8
17. hERG 電流の測定.....	9
17.1. 操作方法.....	9
17.2. パルスプロトコール.....	9
18. 適用.....	10
18.1. 適用方法, 適用回数及び適用時間.....	10
18.2. 適用方法, 適用回数及び適用時間の選択理由.....	10
18.3. 群構成及び適用濃度.....	10

18.4. 適用濃度設定の理由.....	10
19. 細胞の群分け.....	10
20. 記録及び解析.....	11
21. 試験結果.....	11
22. 考察及び結論.....	11

Table 1 Effects of AcPepA on Tail peak currents in hERG transfected HEK-293 cells.

Appendix 1 Effects of AcPepA on Tail peak currents in hERG transfected HEK-293 cells.

1. 試験表題

AcPepA の hERG 細胞を用いた K^+ チャネルへの影響

2. 試験番号

FBM 09-9544

3. 試験目的

hERG (human ether-a-go-go) 遺伝子を導入し、カリウムイオンチャネルを安定発現させた HEK-293 細胞における、AcPepA の hERG 電流に及ぼす影響を検討した。

4. 試験施設

スギ生物科学研究所株式会社 (旧社名：株式会社富士バイオメディックス)
〒408-0044 山梨県北杜市小淵沢町 10221 番地
TEL 0551-36-2455 FAX 0551-36-3895

5. 試験委託者

医療法人さわらび会福祉村病院 長寿医学研究所
〒411-8126 愛知県豊橋市野依町山中 19-14
TEL 0532-46-7501 FAX 0532-46-8940
試験委託担当者：岡田秀親

6. 試験実施期間

試験期間	2009年3月11日	～	2009年3月	日
試験開始日	2009年3月11日			
細胞培養開始日	2009年3月12日			
hERG 電流測定開始日	2009年3月17日			
試験終了日	2009年3月			

7. 試験責任者

小川光英
スギ生物科学研究所株式会社 薬理試験部

8. 担当責任者

hERG 電流測定 高橋善康

9. GLP 及びガイドライン

本試験は GLP 非適用試験として実施した。

10. 信頼性保証

スギ生物科学研究所株式会社の信頼性保証部門が最終報告書に記載したデータと生データの整合性について確認し、最終報告書に確認証明（信頼性保証部門報告）を添付した。

11. 試験関係資料の保存

保存場所：スギ生物科学研究所株式会社 資料保存施設

保存資料：最終報告書（原本），試験計画書（原本），被験物質及び試験系に関する記録，生データ，試験操作記録，その他記録文書

保存期間：本試験終了後 5 年間保存。その後の措置については試験委託者と協議の上決定する。

12. 要約

AcPepA の K⁺チャンネルに及ぼす影響を検討するために、AcPepA の 6.5, 65 及び 650 µg/mL を、hERG チャンネルを安定発現させた HEK-293 細胞に適用し、パッチクランプ法を用いて hERG 電流を測定した。

その結果、被験物質適用群の hERG 電流の変化率は 6.5 µg/mL 適用群で -1.8%、65 µg/mL 適用群で -3.1%、650 µg/mL 適用群で -3.5%であり、いずれの群においても hERG 電流に対する抑制は認められなかった。

以上の結果から、AcPepA は 650 µg/mL 以下の濃度において、hERG チャンネルを安定発現させた HEK-293 細胞における K⁺チャンネルに影響しないものと考えられた。

13. 被験物質及び媒体

13.1. 被験物質

名称：AcPepA

ロット番号：2K08045

供給元：株式会社バイオロジカ（NeoMPS）

性状：凍結乾燥品

含量：97.7%

溶解性：4 mg/mL in saline

入手量：2 g

保存条件：冷凍（-20°C 以下），遮光，気密

保存場所：研究本館 検体調製室 メディカルフリーザー（設定温度：-30°C，許容範囲：-40
～ -20°C）

取扱い上の注意：マスク及び手袋を着用する。

13.2. 媒体

名称：日本薬局方生理食塩液

ロット番号：80513D

製造元：扶桑薬品工業株式会社

保存条件：室温

14. 適用検体の調製方法

被験物質 650.04 mg 及び 325.04 mg を秤量し，媒体：灌流液 = 1 : 9 の溶液 10 mL 及び 5 mL に溶解して高用量群の調製原液を調製した。高用量群の調製原液を段階希釈し中用量群及び低用量群の調製原液を調製した。調製原液 500 μ L を灌流液で 50 mL にメスアップして適用検体を調製した。

15. 試験系

15.1. 細胞株

hERG (human ether-a-go-go related gene) 導入 HEK-293 細胞 (human embryo kidney 293 cell) を用いた。

15.2. 細胞株選択の理由

本細胞株は、薬物誘発性QT延長と関連が深いとされるhERGチャネルを安定的に発現させたもので、hERG電流測定に汎用されているため。

15.3. 入手先

Cytomyx Limited

16. hERG細胞培養

16.1. 培養液

非働化した牛胎児血清(FBS, Lot No. 1350820, 有効期限:2011年7月, Invitrogen Corporation)を10%, Non essential amino acids (Lot No. 453203, 有効期限:2009年5月30日, Invitrogen Corporation)を1%及びGeneticin[®] (Lot No. 473075, 有効期限:2009年11月1日, Invitrogen Corporation)を400 µg/mL含むMEM (Lot No. 510522, 有効期限:2009年10月30日, Invitrogen Corporation)を用いた。

16.2. 培養条件

継代培養用の細胞はコラーゲンコートした60 mmのディッシュ (Lot No. 1140801, 有効期限:2009年10月, AGCテクノグラス株式会社)で培養した。培養は炭酸ガス培養器(エスベック株式会社)を使用し、培養期間は2009年3月12日~2009年3月18日、培養温度は37°C(許容範囲:36~38°C, 実測値36.9~37.0°C)、5%CO₂存在下(許容範囲:4.0~6.0%, 実測値5.0%)で培養した。

16.3. 培養方法

16.3.1. 継代培養

凍結保存された細胞懸濁液を速やかに解凍し、培養液に懸濁した。1000 rpm, 4°Cで2分間遠心し、上清を除去した。残った細胞を培養液に再懸濁し、60 mmのディッシュに播種し、コンフルエントになるまで炭酸ガス培養器で培養した。コンフルエントになった時点で、トリプシンEDTA (0.25%トリプシン1 mmol/L EDTA-4Na, Lot No. 443817, 有効期限:2009年10月30日, Invitrogen Corporation)をPBS pH 7.4 (Lot No. 453252, 有効期限:2010年5月30日, Invitrogen Corporation)で0.05%に希釈した液で、ディッシュから細胞を剥離して培養液で回収及び希釈し、再度60 mmのディッシュに播種した。継代数は1回であった。

16.3.2. 測定用細胞の培養

35 mm のディッシュ (Lot No. 34407010, Corning Incorporated) にコラーゲンコートしたカバーガラス (Lot No. 0630801, 有効期限: 2009 年 9 月, AGC テクノグラス株式会社) を入れ、継代培養時に回収した細胞を播種して、測定用の細胞を培養した。

16.3.3. 試験系の識別方法

ディッシュの底に油性インクペンで試験番号、ディッシュ番号及び培養開始日を記載した。

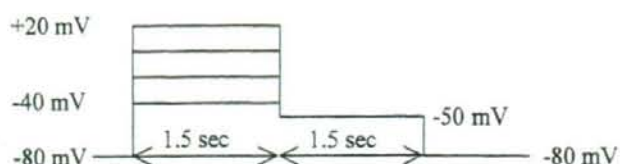
17. hERG 電流の測定

17.1. 操作方法

測定用細胞を接着させたカバーガラスを 35 mm のディッシュに入れ、灌流液 [組成 (mmol/L): NaCl:137 (Lot No. TSE1146, 和光純薬工業株式会社), KCl:4 (Lot No. LTQ4311, 和光純薬工業株式会社), MgCl₂:1 (Lot No. WKH4930, 和光純薬工業株式会社), CaCl₂:1.8 (Lot No. SDJ5372, 和光純薬工業株式会社), glucose:10 (Lot No. TSF0726, 和光純薬工業株式会社), HEPES:10 (Lot No. WE032, 株式会社同仁化学研究所), pH:7.4] を灌流した。灌流液の温度は Automatic Temperature Controller (TC-344B, Warner Instrument Corp.) を用いて 25.8~26.2°C に維持し、灌流速度は Peristaltic Pump (Dynamax[®], Model RP-1, Rainin Instrument Co. Inc.) で 120 mL/h に設定した。ガラス電極は硼珪酸ガラス管 (GC150F-10, Harvard Apparatus) をブラー (P-97, Sutter Instrument) を用いて作製した。位相差顕微鏡下でマイクロマニピュレーターを操作し、電極内液 [組成 (mmol/L): KCl:130 (Lot No. LTQ4311, 和光純薬工業株式会社), MgCl₂:1 (Lot No. WKH4930, 和光純薬工業株式会社), EGTA:5 (Lot No. 078K5430, Sigma-Aldrich Co.), Mg-ATP:5 (Lot No. 054K7013, Sigma-Aldrich Co.), HEPES:10 (Lot No. WE032, 株式会社同仁化学研究所), pH 7.2] を充填したガラス電極 (3.9~7.8 MΩ) を細胞に押し当て、弱い吸引を電極内にかけることでギガオームシールを形成した。更に吸引して細胞膜を破り、ホールセル状態にした。pClamp 9 ソフトウェア (Axon Instruments) のコントロールにより、EPC 8 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH) を用いて電圧固定モードにより、hERG 電流を測定した。

17.2. パルスプロトコール

保持電位は -80 mV, 脱分極パルスは -40 mV から 20 mV 間隔で +20 mV まで 4 ステップで 1.5 秒間, 再分極パルスは -50 mV で 1.5 秒間とした。パルスの間隔を 15 秒とした。



18. 適用

18.1. 適用方法, 適用回数及び適用時間

+20 mV のパルスで記録された波形におけるテール電流のピーク値が 500 pA 以上の細胞を各適用検体で灌流して適用した。適用は 1 細胞について 1 濃度を 1 回, 10 分間行った。

18.2. 適用方法, 適用回数及び適用時間の選択理由

hERG 電流への影響が確実に判断できる方法として選択した。

18.3. 群構成及び適用濃度

群構成は, 以下の通り 3 群, 各群 5 細胞とした。

群	適用区分	適用濃度 (µg/mL)	細胞数 (細胞番号)
1	AcPepA	6.5	5 (1101~1105)
2	AcPepA	65	5 (1201~1205)
3	AcPepA	650	5 (1301~1305)

18.4. 適用濃度設定の理由

AcPepA のラットを用いた 3 日間反復静脈内投与による用量設定試験 (試験番号 FBM 08-2522) におけるトキシコキネティクス測定での最高血中濃度である 6.5 µg/mL を低用量とし, 公比 10 で中用量, 高用量を設定した。

19. 細胞の群分け

測定に使用する細胞の群分けは, 電卓 (EL-510R, シャープ株式会社) の乱数により測定前にランダムに各群に割り振った。

20. 記録及び解析

適用前から適用開始後 10 分間の hERG 電流の波形を連続で記録した。Clampfit 9 (Axon Instruments) を用いて、適用前及び適用開始後 10 分の +20 mV のパルスで記録された波形におけるテール電流のピーク値を解析し、適用前に対する適用後の変化率を算出し、各適用区分の平均値と標準偏差を求めた。

21. 試験結果

測定結果を Table 1 及び Appendix 1 に示した。

被験物質適用群の hERG 電流の変化率は 6.5 µg/mL 適用群で -1.8%、65 µg/mL 適用群で -3.1%、650 µg/mL 適用群で -3.5%であった。

22. 考察及び結論

AcPepA の 6.5 µg/mL、65 µg/mL 及び 650 µg/mL を hERG 導入 HEK-293 細胞に適用し、パッチクランプ法を用いて AcPepA の K⁺チャンネルに及ぼす影響を検討した。

その結果、AcPepA による hERG 電流の変化率は、弊社における陰性対照群成立基準である 10%以内であり、AcPepA による hERG 電流の抑制は認められなかった。

以上の結果から、AcPepA は 650 µg/mL 以下の濃度において、hERG チャンネルを安定発現させた HEK-293 細胞における K⁺チャンネルに影響しないものと考えられた。

Table 1 Effects of AcPepA on Tail peak currents in hERG transfected HEK-293 cells.

Test substance	AcPepA		
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	6.5	65	650
Changes from pre-application (%)	-1.8 \pm 2.2	-3.1 \pm 1.7	-3.5 \pm 2.2

Values are the mean \pm standard deviation for 5 cells.

Appendix 1 Effects of AcPepA on Tail peak currents in hERG transfected HEK-293 cells.

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell No.	Current amplitude (pA)		Changes from Pre-application (%)
			Pre-application	Post-application	
AcPepA	6.5	1101	1015.3	1005.6	-1.0
		1102	1822.5	1839.0	0.9
		1103	712.6	676.3	-5.1
		1104	1673.6	1630.2	-2.6
		1105	674.7	665.3	-1.4
		Mean	1179.7	1163.3	-1.8
	SD	537.9	544.2	2.2	
	65	1201	1072.7	1048.6	-2.2
		1202	832.2	795.9	-4.4
		1203	1376.6	1360.2	-1.2
		1204	994.6	941.5	-5.3
		1205	1979.1	1931.8	-2.4
		Mean	1251.0	1215.6	-3.1
	SD	452.4	450.8	1.7	
	650	1301	1351.6	1267.4	-6.2
		1302	969.5	961.0	-0.9
		1303	740.7	707.7	-4.5
		1304	625.0	614.9	-1.6
		1305	1093.4	1045.8	-4.4
		Mean	956.0	919.4	-3.5
SD	287.9	262.8	2.2		

Changes from pre-application (%) = (Post-application - Pre-application) / Pre-application \times 100.