

# Bifidobacterium pseudolongum JBP01株含有腸溶性カプセルを投与された犬における免疫応答

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者名	深田,恒夫 深民,敦子 上林,謙
発行元	日本獣医師会
巻/号	58巻1号
掲載ページ	p. 46-50
発行年月	2005年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## *Bifidobacterium pseudolongum* JBP01 株含有腸溶性 カプセルを投与された犬における免疫応答

深田恒夫<sup>1)†</sup> 深民敦子<sup>1)</sup> 上林 譲<sup>1,2)</sup>

1) 岐阜大学農学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

2) 京都府 開業 (〒610-0121 城陽市寺田水度坂15-124)

(2004年2月26日受付・2004年8月17日受理)

### 要 約

犬を対象に新しく開発されたカプセル化 *Bifidobacterium pseudolongum* JBP01 製剤を5頭の正常なビーグル雄犬(3歳から6歳)に経口投与し免疫能への影響について検討した。免疫能の評価のため、末梢血中リンパ球サブセット、in vitroにおけるマイトジェン刺激に対するCD25+リンパ球発現率、および顆粒球の蛍光ビーズ貪食能の3項目についてFACSを用いて測定した。本製剤を30日間ビーグル犬5頭に投与したところ、投与前と比較し、リンパ球サブセットにおけるCD4+リンパ球数と割合、CD3+リンパ球数およびCD4/CD8+リンパ球比がそれぞれ増加した。また、PHA、ConAおよびPWMの各マイトジェン刺激によるCD25+リンパ球発現率が増加したことから、リンパ球の反応性が增强されたと考えられた。顆粒球の貪食能には変化がみられなかった。本製剤は、これまでに人などで報告されているプロバイオティクスの免疫能調整作用の中でも、特にリンパ球に対する刺激作用を有することが示唆された。

—キーワード: *Bifidobacterium pseudolongum*, 犬, FACS, 免疫応答, リンパ球.

日獣会誌 58, 46~50 (2005)

プロバイオティクスの経口投与による免疫能の変化については、人やマウスにおいて多くの報告があるが [8, 17, 19], 犬におけるプロバイオティクスの免疫能への効果については報告されていない。

先に筆者ら [6] はプロバイオティクスの1種である *Bifidobacterium pseudolongum* (ピフィズス菌) 製剤を健康な犬に経口投与することによって、糞便中 *Bifidobacterium* の菌数と総菌数に占める割合が有意に増加することを報告した。

今回、同じ製剤を用いて、ピフィズス菌の経口投与が犬の末梢血におけるリンパ球サブセット、リンパ球の反応性および顆粒球貪食能の3項目について測定することにより、免疫能に与える影響を検討した。

### 材 料 お よ び 方 法

**供試動物:** 身体検査とCBCおよび血液生化学検査で健康と思われるビーグル犬5頭(3~6歳齢, すべて雄, 体重9~13kg)を用いた。前回報告した [6] ピフィズス菌製剤 (JBP01株)<sup>a)</sup> 1包を1日1回, 成犬用ドッグフード<sup>b)</sup> とともに与えた。投与前と投与30日目に橈側皮静脈より末梢血を採取した。

**血液一般検査:** 血球の計測は全自動血球計数機<sup>c)</sup> で行った。白血球百分率は血液塗抹を簡易染色<sup>d)</sup> 後、顕微鏡で測定した。

**FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) によるリンパ球表面抗原の解析:** 末梢血からの単核球の分離は、Hallら [12] の方法に準じて、濃度勾配遠心法で行った。リンパ球サブセットの測定のため、各サブセット特異的な表面抗原に対するモノクローナル抗体を使用し、五十嵐 [14] の方法に準じて染色を行った。CD3+リンパ球 (Tリンパ球)<sup>e)</sup>, CD21+リンパ球 (Bリンパ球)<sup>e)</sup>, CD25+リンパ球 (IL-2レセプター- $\alpha$ 鎖)<sup>f)</sup>, MHC class II<sup>e)</sup> は間接法による単染色, CD4+リンパ球 (ヘルパーTリンパ球)<sup>e)</sup> とCD8+リンパ球 (細胞傷害性Tリンパ球)<sup>e)</sup> は直接法による2重染色を行った。フローサイトメトリー装置<sup>g)</sup> を用いてFSC (細胞の大きさ), SSC (細胞内構造の複雑さ), FL1 (FITCの蛍光

a) 森下仁丹(株), 大阪。 b) 日本農産工業(株), 神奈川。

c) Celltac, 日本光電工業(株), 東京。

d) ヘマカラー, Merck, Germany。

e) Serotec, UK。 f) DAKO Denmark。

g) FACS Calibur, Becton Dickinson, U.S.A.

† 連絡責任者: 深田恒夫 (岐阜大学農学部)

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 ☎・FAX 058-293-2960

表1 *Bifidobacterium pseudolongum* JBP01製剤投与による白血球数の変化

	投与前	投与30日目
総白血球数 (/μl)	9,720 ± 1,251 <sup>a)</sup>	9,160 ± 554
好中球 <sup>b)</sup>	6,051 ± 1,525	5,017 ± 1,049*
好酸球	263 ± 250	312 ± 301
リンパ球	2,828 ± 939	3,366 ± 782
単球	263 ± 250	312 ± 301

a) 平均値 ± 標準偏差

b) 桿状核好中球および分葉核好中球

\*P<0.05

強度), FL2 (PEの蛍光強度)について測定した. 測定値の解析は, 装置に付属のソフトウェアである Cell Questで行った. 細胞取り込み時の機器設定は, 予備実験によって適切な設定値を求め, 常に一定の設定値で行った. 細胞の取り込みは, 1検体につき10,000個行った. FITCのみの単染色の場合, ゲート内のリンパ球集団をFL1蛍光強度のヒストグラム(logスケール)で表し, 陰性コントロールの蛍光強度の高いリンパ球の割合が1%になる領域にヒストグラムマーカーを設定した. マーカー内に含まれる細胞を陽性細胞とし, CD3+, CD21+, MHC II+およびCD25+リンパ球の割合を求めた. FITCとPEによる二重染色の場合, ゲート内のリンパ球集団をFL1 vs FL2ドットプロットで示し, 蛍光四分画マーカーを設定してCD4+, CD8+リンパ球数の割合を求めた. また, CD4+とCD8+リンパ球の比(CD4/CD8)も求めた.

リンパ球反応性の測定: リンパ球活性化マーカーの一つであるCD25+リンパ球の発現率の変化をFACS解析し, フィトヘマグルチニン(PHA), コンカナバリンA(ConA), アメリカヤマゴボウマイトジェン(PWM)のマイトジェン刺激によるリンパ球の反応性を評価した. 上記と同様の方法で単核球を無菌的に分離し, Isaacsonら[15]およびSombergら[25]の方法に準じて単核球を培養した. 予備試験で培養液中の濃度を, PHAとPWMは10μg/ml, ConAは5μg/mlに決定し, 末梢血単核球の培養に用いた. 72時間培養終了後, 五十嵐の方法[14]に準じて細胞表面CD25の染色を行った. 細胞表面CD25+リンパ球の検出にはマウス抗ヒトCD25モノクローナル抗体<sup>h)</sup>を使用した. これは人に対する抗体であるが, Galkowskaら[7]の報告により, 犬CD25+リンパ球との交差反応が証明されており, 予備実験でも反応性が認められたため使用した. FACS Caliburを用い, CD25陽性リンパ球の割合を求めた.

顆粒球貪食能の測定: 末梢血顆粒球の貪食能の測定は, 東[2], 酒井ら[22]および鈴木ら[26]の方法に準じて, 微量全血蛍光ビーズ法で行った. 蛍光ビーズ<sup>h)</sup>はグルコース培地(KCl: 0.3g, NaCl: 5.9g,

表2 *Bifidobacterium pseudolongum* JBP01製剤投与によるリンパ球サブセットの変化

		投与前	投与30日目
CD3	%	68.6 ± 16.0	84.5 ± 7.6
	/μl	1,855 ± 546	2,883 ± 887*
CD21	%	18.1 ± 7.5	15.1 ± 7.6
	/μl	502 ± 234	499 ± 282
CD4	%	38.1 ± 8.7	44.5 ± 8.3**
	/μl	1,131 ± 549	1,543 ± 602*
CD8	%	20.5 ± 4.4	20.9 ± 4.6
	/μl	560 ± 183	700 ± 219
CD4/CD8比		1.92 ± 0.50	2.20 ± 0.51*
CD25	%	1.5 ± 0.6	3.2 ± 2.0
	/μl	63 ± 36	112 ± 87
MHC II	%	86.0 ± 7.7	90.0 ± 4.6
	/μl	2,484 ± 970	3,044 ± 802

a) 平均値 ± 標準偏差

\*: P<0.05 \*\* : P<0.01

CH<sub>3</sub>COONa: 2.5g, CaCl<sub>2</sub>: 0.44g, Mg Cl<sub>2</sub>: 0.22g, グルコース1.26g, 精製水: 1000ml)で洗浄後, グルコース培地中に粒子数が4 × 10<sup>7</sup>個/ml(50~500μg/ml)になるように調整し, 使用した. ヘパリンで抗凝固処理した全血と蛍光粒子浮遊液を加え, 37℃の恒温槽で60分間振盪培養した. 氷上で溶血剤を加えて数回転倒混和し, 塩化アンモニウム溶血剤による溶血と貪食停止を行った. FACS Caliburで細胞を取り込んで測定し, 顆粒球中の貪食陽性細胞の割合を求めた.

統計処理: 5頭のビフィズス菌製剤投与前と投与30日目の各検査結果は, 平均値 ± 標準偏差で表し, ビフィズス菌投与前の値を基準にして, 30日目の値をt検定によって有意差を調べた.

## 成 績

健康状態: 投与期間中, 体重の変化は認められず, 健康状態も良好であった. CBCおよび血液生化学検査においても異常な値は認められなかった.

白血球数とリンパ球サブセット: ビフィズス菌製剤投与による白血球数の変化を表1に示した. 投与前と比べ好中球が有意に減少した(P<0.05). 総白血球数, リンパ球数, 単球数, 好酸球数に変化はみられなかった. リンパ球サブセットの変化を表2に示した. リンパ球におけるCD4+リンパ球の割合が有意に増加した(P<0.01). CD8+リンパ球に変化はみられなかったことから, CD4/CD8比は有意に増加した(P<0.05). FACS解析で求めた各サブセットの全リンパ球に対する割合から, 循環血中の各サブセットの細胞数を求めたところ, CD3+リンパ球数とCD4+全リンパ数が有意に増加していた(P<0.05).

h) FITC標識ラテックスビーズ, Polyscience, U.S.A.

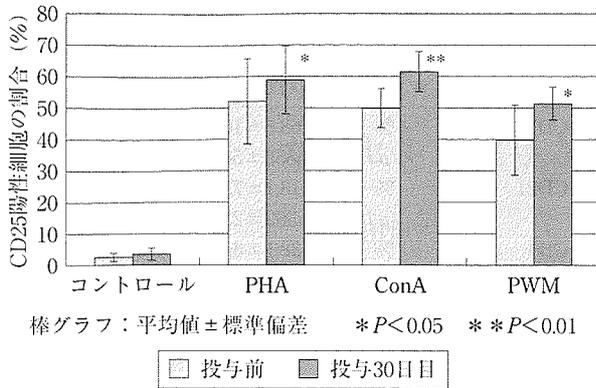


図1 *Bifidobacterium pseudolongum* JBP01 製剤投与によるCD25陽性細胞の割合の変化

リンパ球反応性の変化：マイトジェンとともにリンパ球を72時間培養したときの、CD25 + リンパ球数の変化を図1に示した。PHA ( $P < 0.05$ ), ConA ( $P < 0.01$ ) そしてPWM ( $P < 0.05$ ) すべてのマイトジェンに対してCD25 + リンパ球の陽性率の有意な増加がみられた。

食食能の変化：ビフィズス菌製剤投与30日目では、投与前と比べると増加傾向を示したが、有意差は認められなかった。

### 考 察

リンパ球サブセットでは、ヘルパーTリンパ球であるCD4 + リンパ球数と割合の増加、CD4/CD8比の増加そしてCD3 + リンパ球数の増加がみられた。CD4/CD8比の増加とCD3 + リンパ球数の有意な増加は、ヘルパーTリンパ球数の増加に付随したものであると考えた。ヘルパーTリンパ球は、さまざまなサイトカインを分泌し、細胞性免疫にとって中枢的な役割を果たす。また、Bリンパ球による抗体産生の補助など、液性免疫にも重要な役割を担う。したがってビフィズス菌投与によるヘルパーTリンパ球数の増加は、全身性免疫能に大きな意味を持つものと思われる。循環血中のヘルパーTリンパ球の増加がもたらす実際の効果として、人において、インフルエンザワクチンに対する抗体産生増強と、感染症罹患期間の減少に一致するという報告があり [3]、ビフィズス菌製剤投与犬においてもこのような効果が期待できることが示唆された。

今回はビフィズス菌製剤投与がリンパ球サブセットに影響を与えたが、プロバイオティクスの投与がリンパ球サブセットに影響を与えるという報告は少ない。人において、*Lactobacillus acidophilus* と *Bifidobacterium bifidum* は顆粒球の食食能増強作用を示す一方、リンパ球サブセットに影響を与えなかった [24]。マウスの *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *Bifidobac-*

*terium lactis* の経口投与実験においても、自然・獲得免疫のいくつかの項目が増強されたが、末梢血リンパ球サブセットにおける変化はみられなかった [11]。しかし、人において高齢者に *B. lactis* を投与した場合、食食能とNK細胞活性の増加とともに、末梢CD4 + リンパ球とCD25 + リンパ球の割合が有意に増加する [10]。さらに、これらの変化は投与前の値がより低い人に強く現れたことから、*B. lactis* 投与は免疫機能が低下している人に対してより有効であるとしている。犬においても年齢とともにCD4 + リンパ球数とCD4/CD8比が低下することが報告されている [5, 11]。したがって、ビフィズス菌投与によるリンパ球サブセットへの影響は、老齢犬においてより有効に現れることが考えられた。

ビフィズス菌製剤投与によりPHA, ConAおよびPWMの各マイトジェンによるCD25 + リンパ球の発現率が有意に増加した。リンパ球表面CD25は、IL-2レセプター $\alpha$ 鎖のことである。 $\alpha$ 鎖(CD25)は活性化によって初めて誘導され、この結果、高親和性のIL-2レセプター三量体が形成される [13]。マイトジェンによるリンパ球の増殖には、まずMHC II分子と協力した刺激リガンドの認識が必要とされる [14]。そして、抗原提示を受けたTヘルパー1 (Th1) 細胞はIL-2を産生し、IL-2レセプターを発現する。IL-2がIL-2レセプターに結合することにより、Th1細胞は分裂増殖する。また、Tヘルパー2 (Th2) 細胞もIL-2レセプターを発現し、IL-2と結合することにより分裂増殖する。これらのことから、ビフィズス菌製剤投与によるCD25 + リンパ球発現率の増加は、リンパ球が抗原刺激を受け、Th1がIL-2を分泌し、リンパ球が分裂増殖するという一連の過程のいずれかを増強したと考えられた。末梢血リンパ球サブセットの測定では、ヘルパーT細胞数の増加が認められたことから、特にヘルパーT細胞に対する刺激作用が示唆された。

プロバイオティクスの経口投与により、人 [1, 4, 9, 24] や動物 [10, 21] において、食食細胞の機能が増強されたと報告されているが、今回の結果はこれらに反して顆粒球食食能の有意な増加は認められなかった。しかし、食食能の増強レベルは、乳酸菌の菌種、用量、生存力に依存するという報告もある [8]。ビフィズス菌の経口投与による食食能増強作用は、これまでどの動物においても報告されていない。今回の結果からは本菌種では投与30日間では食食能に有意差がなかったが増加傾向を示したので、今後、ビフィズス菌製剤を長期間投与することによって、この増加傾向を示した食食能が有意に増加するか検討したい。

食物アレルギーを持つ幼児では食食細胞の機能増強が見られることが報告されている [16]。また、プロバイオティクス投与は、健康な人とアレルギー疾患をもつ人

において、異なる貪食能調整作用を示す [20]。つまり、プロバイオティクスの投与は、健康な人では免疫刺激効果を示すが、一方で、アレルギーを持つ人では、炎症反応に対し、抑制作用を示すことが示唆される。健康な人では、免疫機能は正常に機能するため、必ずしもプロバイオティクスによる免疫増強作用が現れるとは限らない [18]。今回は正常犬に対して投与を行ったため、貪食能刺激作用が表れなかったとも考えられた。しかし、ビフィズス菌製剤投与により末梢血中のCD4+リンパ球数、CD3+リンパ球数、CD4/CD8比そしてマイトジェンに対するリンパ球の反応性は高められた。高齢犬ではリンパ球サブセットの変化に加え、マイトジェン刺激による反応性の低下も報告されている [11, 25]。今回用いた犬の年齢は3~6歳齢であるが、ビフィズス菌投与による結果は、いずれも高齢犬の免疫低下を特徴付ける項目に相対するものである。したがって、今後さらに高齢のグループを用いて実験することにより、ビフィズス菌に特徴的な免疫増強作用が明らかとされる可能性が示唆された。

今回の実験では、液性免疫に関する項目については調査しなかった。人ではプロバイオティクスの投与により、腸内病原体や経口ワクチンに対する特異的な抗体反応が増強されることが示されている [8, 23]。また、腫瘍に対する抵抗性の中核的な役割を担うNK細胞機能の増強も報告されている [8]。ビフィズス菌の免疫調整作用を全体的に捉えるためには、さらにいくつかの自然・獲得免疫に関する項目を調査する必要があると考える。

本稿を終えるに当たり、一連の研究に対してご指導をいただいた東京大学名誉教授光岡知足先生に深謝する。

#### 引用文献

- [1] Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK : *Eur J Clin Nutr* 54, 263-267 (2000)
- [2] 東 克己 : *臨床検査*, 41, 1131-1134 (1997)
- [3] Chandra RK : *Lancet* 340, 1124-1127 (1992)
- [4] Chiang BL, Sheih YH, Wang LH, Lio CK, Gill HS : *Eur J Clin Nutr* 54, 849-855 (2000)
- [5] Faldyna M, Leva L, Knotigova P, Toman M : *Vet Immunol Immunopathol* 82, 23-37 (2001)
- [6] 深田恒夫, 深民敦子, 柴田早苗, 吉田尚子, 坂東義文, 小崎敏男, 田邊民義, 河原有三 : *日獣会誌*, 55, 735-738 (2002)
- [7] Galkowska H, Waldemar LO, Wojewodzka U : *Vet Immunol Immunopathol* 53, 329-334 (1996)
- [8] Gill HS : *Int Dairy J* 8, 535-544 (1998)
- [9] Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK : *Am J Clin Nutr* 74, 833-838 (2001)
- [10] Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK : *Br J Nutr* 83, 167-176 (2000)
- [11] Greely EH, Kealy RD, Ballam JM, Lawler DF, Segre M : *Vet Immunol Immunopathol* 55, 1-10 (1996)
- [12] Hall JA, Wander RC, Gradin JL, Du SH, Jewell DE : *Am J Vet Res* 60, 319-327 (1999)
- [13] Helfand SC, Modiano JF, Nowell PC : *Vet Immunol Immunopathol* 33, 1-16 (1992)
- [14] 五十嵐 脩 : *微生物学実習提要第2版* 東京大学医科学研究所学会編, 丸善株式会社, 東京, 251-253 (1998)
- [15] Isaacson JA, Flaming KP, Roth JA : *Vet Immunol Immunopathol* 64, 235-248 (1998)
- [16] Isolauri E, Pelto L, Nuutila J, Majamaa H, Lilius EM, Salminen S : *J Allergy Clin Immunol* 99, 707-713 (1997)
- [17] Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S : *Am J Clin Nutr* 73, 444-450 (2001)
- [18] Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM : *Immunol Med Microbiol* 10, 55-63 (1994)
- [19] Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E : *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 279-289 (2002)
- [20] Pelto L, Isolauri E, Lilius EM, Nuutila J, Salminen S : *Clin Exp Allergy* 28, 1474-1479 (1998)
- [21] Perdigon G, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP : *Immunology* 63, 17-23 (1998)
- [22] 酒井 寛, 森 勝志, 片山善章, 松山辰男 : *臨床病理*, 42, 986-991 (1994)
- [23] Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC : *Br J Nutr* 80 (suppl), 147-171 (1998)
- [24] Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A : *J Dairy Sci* 78, 491-497 (1995)
- [25] Somberg RL, Robinson JP, Felsburg PJ : *Vet Immunol Immunopathol* 33, 17-24 (1992)
- [26] 鈴木是光, 金沢裕子, 川原田理子, 松田琢磨 : *臨床病理*, 12, 1338-1347 (1985)

Immune Responses in Dogs Given Enteric-coated Capsulized  
*Bifidobacterium pseudolongum* (JBP01)

Tsuneo FUKATA\*†, Atsuko FUKATAMI and Yuzuru KAMBAYASHI

\* Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Agriculture, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

SUMMARY

This study investigated immune responses in 5 normal male beagle ranging from 3 to 6 years old orally given an enteric capsulate preparation containing *Bifidobacterium pseudolongum* (JBP01). After 30 days, the number and ratio of CD4-positive lymphocytes, the number of CD3-positive lymphocytes, and the ratio of CD4/CD8 positive lymphocytes in peripheral-blood were significantly higher in all 5 dogs than those before inoculation. The number of CD25-positive lymphocytes after the stimulation by mitogen irritants (PHA, ConA and PWM) had increased significantly. No significant difference in granulocyte phagocytosis was observed between pre and post-inoculation. These data suggest that *B. pseudolongum* had immunopotentialized lymphocytes.

— Key words : *Bifidobacterium pseudolongum*, dog, FACS, immune-response, lymphocyte.

† Correspondence to : Tsuneo FUKATA (Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Agriculture, Gifu University)  
1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan TEL · FAX 058-293-2960

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 58, 46 ~ 50 (2005)

日生研の動物用ワクチン

- 日生研ニューカッスル生ワクチンS
- 日生研C-78・IB生ワクチン
- 日生研MI・IB生ワクチン
- 日生研NB生ワクチン
- 日生研NB不活化オイルワクチン
- 日生研MGオイルワクチン
- 日生研NBBAC不活化ワクチン
- 日生研MGオイルワクチンWO
- 日生研コリーザ2価ワクチンN
- 日生研ILT生ワクチン
- 日生研ACM不活化ワクチン
- 日生研IBD生ワクチン
- 日生研EDS不活化ワクチン
- 日生研IBD不活化ワクチン
- 日生研EDS不活化オイルワクチン
- AE乾燥生ワクチン
- 日生研鶏サルモネラ不活化ワクチン
- 日生研穿刺用鶏痘ワクチン
- 日生研乾燥鶏痘ワクチン
- 日生研鶏コクシ弱毒3価生ワクチン(TAM)
- 日生研鶏コクシ弱毒生ワクチン(Neca)
- 日生研MG不活化ワクチンN
- 日生研日本脳炎TC不活化ワクチン
- 馬鼻肺炎不活化ワクチン“日生研”
- 日生研日脳・馬ゲタ混合不活化ワクチン
- 日生研馬ロタウイルス病不活化ワクチン
- 日生研馬JIT3種混合ワクチン03
- 日生研馬インフルエンザワクチン03
- 破傷風トキソイド「日生研」
- 日生研日本脳炎TC不活化ワクチン
- 日生研日本脳炎TC不活化ワクチン
- 日生研PED生ワクチン
- 日生研TGE・PED混合生ワクチン
- 日生研豚TGE生ワクチン
- 日生研豚TGE濃縮不活化ワクチン
- 日生研グレーサー病2価ワクチン
- 日生研豚丹毒生ワクチンC
- 日生研豚丹毒不活化ワクチン
- 日生研豚ARワクチンN
- 日生研AR混合ワクチンBP
- 日生研ARBP・豚丹毒混合不活化ワクチン
- 日生研豚APM不活化ワクチン
- 日生研豚APワクチン125RX
- 日生研MPS不活化ワクチン
- イバネキ病生ワクチン“日生研”
- 日生研BEF・IK混合不活化ワクチン
- アカバネ病生ワクチン“日生研”
- 日生研牛異常産3種混合不活化ワクチン

日生研株式会社  
http://www.jp-nisseiken.com/

〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目 2221 番地の1  
TEL. 0428-33-1004 ~ 1009(営業部)  
FAX. 0428-31-6696

■印は要指示医薬品です。獣医師の処方せん・指示により使用して下さい。