2．2　原液

2．2．1　精製ポリサッカライド

2．2．1．1　菌の培養

莢膜血清型別にそれぞれの肺炎球菌の株を36±2℃で培養する。培養終了後、型特異免疫血清による莢膜膨化反応若しくは型特異免疫抗体による凝集反応により莢膜血清型又はポリメラーゼ連鎖反応による増幅ＤＮＡの融解温度により血清型特異的な遺伝子型を確認する。適当な培養法により検査するとき、培養液に他の細菌の混入を認めてはならない。

2．2．1．2　不活化

培養液にデオキシコール酸ナトリウムを0.13%となるように加え、少なくとも30分間撹拌することによって行う。

2．2．1．3　精製

遠心分離及びろ過により不活化した菌体を除く。限外ろ過その他適当な方法により菌体残渣及びたん白質を除去し、精製ポリサッカライドとする。精製ポリサッカライドについて、3．1の試験を行う。

2．2．2　精製CRM_{197}

2．2．2．1　菌の培養

ジフテリア菌CRM_{197}産生株を32±2℃で培養する。培養終了後、適当な方法によって検査するとき、培養液に他の細菌の混入を認めてはならない。

2．2．2．2　精製

ろ過等により菌体を除き、塩析法により得たCRM_{197}を更に精製し、精製CRM_{197}とする。精製CRM_{197}について、3．2の試験を行う。

2．2．3　ポリサッカライド―CRM_{197}結合体

精製ポリサッカライドを適当な酸化剤により酸化し、活性化ポリサッカライドとする。適当な還元剤により、活性化ポリサッカライドと精製CRM_{197}を結合させ、これを精製し、原液とする。原液について、3．3の試験を行う。

2．3　最終バルク

1mL中にポリサッカライドが、莢膜血清型1、3、4、5、6A、7F、9V、14、18C、19A、19F及び23Fでは4.4μg、莢膜血清型6Bでは8.8μg、それぞれ含まれるように、各莢膜血清型の原液を塩化ナトリウム、コハク酸及びポリソルベート80を含む液で希釈混合し、アルミニウム塩を加えて最終バルクとする。

3　試験

3．1　精製ポリサッカライドの試験

各莢膜血清型の精製ポリサッカライドについて、次の試験を行う。

3．1．1　核磁気共鳴スペクトル測定（^{1}H）試験

各莢膜血清型の精製ポリサッカライドを凍結乾燥し、核磁気共鳴スペクトル測定用重水に溶かす。さらに、内部基準物質溶液として核磁気共鳴スペクトル測定用3―トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム―d_4を、内部標準溶液としてジメチルスルホキシドを、それぞれ加え、1mL中約5～9mgに相当するポリサッカライドを含む試料溶液を調製する。各試料溶液につき、日本薬局方一般試験法の核磁気共鳴スペクトル測定法（^{1}H）により試験を行うとき、C―ポリサッカライドの含量は次の表に掲げる値以下に、メチルペントース、O―アセチル基、N―アセチルヘキソサミン、N―アセチルグリコサミン、メチルグリコサミン、N―アセチルフコサミン及びピルビン酸の含量は次の表に掲げる値以上に、それぞれならなければならない。

莢膜血清型	C―ポリサッカライド含量（%）	メチルペントース含量(%)	O―アセチル基含量（%）	N―アセチルヘキソサミン含量(%)	N―アセチルグリコサミン含量(%)	メチルグリコサミン含量（%）	N―アセチルフコサミン含量（%）	ピルビン酸含量※（mol／mol）
1	14		2.6		20	21		
3	5							
4	14				53		17	0.7
5	24				45	41		
6A	11	16						
6B	5	16						
7F	14	18	2.0	25				
9V	9		4.5	18				
14	12			22				
18C	10	12	2.8					
19A	6	19		25				
19F	9	19		25				
23F	10	29						

※N―アセチルフコサミンに対するピルビン酸の比

3．2　精製CRM_{197}の試験

精製CRM_{197}について、次の試験を行う。

3．2．1　ＡＤＰリボシルトランスフェラーゼ活性試験

^{14}C標識したニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを用いて、検体及びジフテリア毒素のＡＤＰリボシルトランスフェラーゼ活性を測定するとき、ジフテリア毒素に対する検体の活性は0.0135%以下でなければならない。

3．2．2　純度試験

サイズ排除クロマトグラフィーにより試験を行うとき、検体に含まれるCRM_{197}の割合は、95%以上でなければならない。

3．3　原液の試験

各莢膜血清型の原液について、次の試験を行う。

3．3．1　遊離サッカライド試験

適量の原液をとり、血清型3を除く原液についてはアルミニウム塩を加えて試料原液とする。血清型3については、希釈した原液を試料原液とする。適量の試料原液を希釈したものを総サッカライド測定用試料溶液とする。また、残りの試料原液（血清型3については、デオキシコール酸塩を加えたもの）を遠心分離し、その上清を遊離サッカライド測定用試料溶液とする。3．3．4の試験法によりサッカライド含量を求めるとき、総サッカライドに対する遊離サッカライドの割合は、莢膜血清型ごとにそれぞれ次の表に掲げる値以下でなければならない。