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±1℃で培養する。培養終了後、型特異免疫血清による凝集反応により莢膜血清型を確認する。適当な培養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。

2.2.1.2　不活化

培養液にフェノールを1.2%になるように加え、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

沈殿その他適当な方法により菌体残渣、核酸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　精製プロテインD

2.2.2.1　菌の培養

組換えインフルエンザ菌プロテインD産生大腸菌株を30±1℃で培養する。培養終了後、適当な培養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

限外ろ過その他適当な方法により培養液から精製し、精製プロテインDとする。精製プロテインDについて、3.2の試験を行う。

2.2.3　精製破傷風トキソイド

2.2.3.1　菌の培養

破傷風菌Harvard株を35±1℃で培養する。培養終了後、鏡検又は適当な培養法によって検査するとき、他の細菌の混入を認めてはならない。WHO破傷風国際標準品(フロキュラシオン用)で標定した破傷風抗毒素を用いた沈降反応によって試験するとき、1mL中に毒素の45Lf以上を含まなければならない。

2.2.3.2　トキソイド化及び精製

トキソイド化には、ホルマリンを用いる。トキソイド化の後に精製し、精製破傷風トキソイドとする。この精製破傷風トキソイドについて、3.3の試験を行う。

2.2.4　精製ジフテリアトキソイド

2.2.4.1　菌の培養

ジフテリア菌MDH　#353株を35±1℃で培養する。培養終了後、鏡検又は適当な培養法によって検査するとき、他の細菌の混入を認めてはならない。WHOジフテリア国際標準品（フロキュラシオン用）で標定したジフテリア抗毒素を用いた沈降反応によって試験するとき、1mL中に毒素の120Lf以上を含まなければならない。

2.2.4.2　トキソイド化及び精製

トキソイド化には、ホルマリンを用いる。トキソイド化の後に精製し、精製ジフテリアトキソイドとする。この精製ジフテリアトキソイドについて、3.4の試験を行う。

2.2.5　ポリサッカライドーたん白質結合体（原液）

莢膜血清型1、4、5、7F、9V、14、18C及び19Fの精製ポリサッカライドは、たん白質（精製プロテインD、精製破傷風トキソイド又は精製ジフテリアトキソイド）との結合前に微粒化させる。精製破傷風トキソイドは、精製ポリサッカライドとの結合前に更に精製し、その後適当な誘導化剤により誘導体化させる。精製ジフテリアトキソイドは、精製ポリサッカライドとの結合前に更に精製する。

精製ポリサッカライドを適当な活性化剤により活性化させ、莢膜血清型1、4、5、6B、7F、9V、14及び23Fの精製ポリサッカライドは精製プロテインDと、莢膜血清型18Cの精製ポリサッカライドは精製破傷風トキソイドと、莢膜血清型19Fの精製ポリサッカライドは精製ジフテリアトキソイドとそれぞれ結合させ、精製し、原液とする。これらの原液について、3.5の試験を行う。

2.3　単価吸着バルク

各原液にリン酸アルミニウム懸濁液を加えて吸着させ、単価吸着バルクとする。これらの単価吸着バルクについて、3.6の試験を行う。

2.4　最終バルク

1mL中のポリサッカライド含量が莢膜血清型1、5、6B、7F、9V、14及び23Fはそれぞれ2μg、莢膜血清型4、18C及び19Fはそれぞれ6μg含まれるように、リン酸アルミニウム濃度及びpHを調整した各単価吸着バルクを混合し、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試験

各莢膜血清型の精製ポリサッカライドをウリジル酸ナトリウム又はギ酸ナトリウムを内部基準物質として含む核磁気共鳴スペクトル測定用重水に溶かす。各溶液につき、核磁気共鳴スペクトル測定法により試験を行い、検体中のC－ポリサッカライド、ウロン酸、ヘキソサミン、メチルペントース及びO－アセチル基の含量を求めるとき、C－ポリサッカライドの含量は次の表に掲げる値以下に、ウロン酸、ヘキソサミン、メチルペントース及びO－アセチル基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（%）	ウロン酸含量（%）	ヘキソサミン含量（%）	メチルペントース含量（%）	O－アセチル基含量（%）
1	8.0	36.0			1.8
4	4.0		51.0		
5	10.0	14.0	32.0		
6B	4.0			12.0	
7F	4.0			13.0	1.8
9V	4.0	14.0	13.0		3.6
14	4.0		18.0		
18C	4.0			10.0	1.8
19F	4.0		17.0	14.0	
23F	4.0			30.0	