3.2　精製プロテインDの試験

精製プロテインDについて、次の試験を行う。

3.2.1　プロテインD含量試験

プロテインDに対するポリクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法によりプロテインD含量を求めるとき、ローリー法により求めた総たん白質含量に対するプロテインDの割合は70～130％でなければならない。

3.2.2　純度試験

還元条件下においてＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、クマシー染色するとき、総たん白質に対するプロテインDの割合は95％以上でなければならない。

3.2.3　エンドトキシン試験

日本薬局方一般試験法のエンドトキシン試験法を準用して試験するとき、100ＥＵ／mL以下でなければならない。

3.3　精製破傷風トキソイドの試験

精製破傷風トキソイドについて、次の試験を行う。

3.3.1　ホルムアルデヒド含量試験

アセチルアセトン存在下でインキュベートした後、吸光度測定によりホルムアルデヒド含量を求めるとき、200μg／mL以下でなければならない。

3.3.2　純度試験

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り、破傷風トキソイド含量を求める。窒素定量法により求めた窒素含量に対する破傷風トキソイド含量は、窒素１mg当たり1000Lf以上でなければならない。

3.3.3　無毒化試験

検体を500Lf／mLに希釈し、体重250～350ｇの健康なモルモット５匹を用い、１匹当たり１mLを皮下に注射して21日間観察する。この間、いずれの動物も破傷風毒素に起因する異常や死亡が認められてはならない。

3.3.4　毒性復帰試験

27Lf／mLになるように検体を希釈したものを２本用意し、37±１℃及び５±３℃に42日間置いた試料について次の試験を行う。それぞれ体重250～350ｇの健康なモルモット５匹を用い、１匹当たり５mLを皮下に注射して30日間観察する。この間、いずれの動物も破傷風毒素に起因する異常や死亡が認められてはならない。

3.4　精製ジフテリアトキソイドの試験

精製ジフテリアトキソイドについて、次の試験を行う。

3.4.1　ホルムアルデヒド含量試験

アセチルアセトン存在下でインキュベートした後、吸光度測定によりホルムアルデヒド含量を求めるとき、200μg／mL以下でなければならない。

3.4.2　純度試験

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りジフテリアトキソイド含量を求める。窒素定量法により求めた窒素含量に対するジフテリアトキソイド含量は、窒素１mg当たり1500Lf以上でなければならない。

3.4.3　無毒化試験

100Lf／mLになるように検体を希釈したものを用意し、５℃に42日間置いた試料についてVero細胞によって試験するとき、ジフテリア毒素による細胞変性が認められてはならない。

3.4.4　毒性復帰試験

100Lf／mLになるように検体を希釈したものを用意し、37℃に42日間置いた試料についてVero細胞によって試験するとき、ジフテリア毒素による細胞変性が認められてはならない。

3.5　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。

3.5.1　遊離サッカライド試験

原液を適当な濃度に希釈したものに各キャリアタンパクに対するポリクローナル抗体を添加し、硫酸アンモニウム飽和溶液を加えて、遠心分離した上清を試料溶液とする。試料溶液について、各サッカライドに対する抗体を用いた酵素免疫測定法により遊離サッカライド含量を求めるとき、3.5.4の試験法により求めたサッカライド含量に対する遊離サッカライドの割合は、莢膜血清型１、６Ｂ、７Ｆ、９Ｖは５％以下、14、18Ｃ、23Ｆは10％以下、４、19Ｆは15％以下、５は20％以下でなければならない。

3.5.2　遊離たん白質試験

液体クロマトグラフィーにより試験を行うとき、各莢膜血清型の原液に含まれる遊離たん白質は、3.5.5の試験法により求めたたん白質含量に対し、莢膜血清型６Ｂ、７Ｆ、９Ｖ、14、18Ｃ、19Ｆは５％、１、４、５、23Ｆは10％以下でなければならない。

3.5.3　分子量分布試験

原液及びデキストランの標準溶液につき、液体クロマトグラフィーにより試験を行う。デキストランの標準溶液の保持時間から、規定のカットオフ値（保持時間）を求める。原液につき、全ピーク面積に対するカットオフ値前のピーク面積の割合を求めるとき、承認された判定基準に適合しなければならない。

3.5.4　サッカライド含量試験

原液を適当な濃度に希釈したものにレソルシノール及び硫酸を加え、100℃で加熱する。冷却後、波長430nmにおける吸光度を測定し、各莢膜血清型の原液に含まれるサッカライド含量を求めるとき、莢膜血清型18Ｃは150μg／mL、それ以外の莢膜血清型は210μg／mL以上でなければならない。

3.5.5　たん白質含量試験

ローリー法を準用し各莢膜血清型の原液に含まれるたん白質含量を求めるとき、次の表に掲げる値以上でなければならない。

莢膜血清型	たん白質含量（μg／mL）
1	260
4	260
5	145
6 B	130
7 F	180
9 V	230
14	230
18C	270
19F	250
23F	90