(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3681393号
(P3681393)
(45)発行日　平成17年8月10日(2005.8.10)　(24)登録日　平成17年5月27日(2005.5.27)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C08J 3/28	C08J 3/28 CEZ
A61L 27/00	A61L 27/00 D
// C08L 71:02	C08L 71:02

請求項の数 10　(全 9 頁)

(21)出願番号	特願平8-508843
(86)(22)出願日	平成7年8月30日(1995.8.30)
(65)公表番号	特表平10-505115
(43)公表日	平成10年5月19日(1998.5.19)
(86)国際出願番号	PCT/US1995/010733
(87)国際公開番号	WO1996/006883
(87)国際公開日	平成8年3月7日(1996.3.7)
審査請求日	平成14年6月19日(2002.6.19)
(31)優先権主張番号	08/299,583
(32)優先日	平成6年9月1日(1994.9.1)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
ユニバーシティ　オブ　マイアミ
アメリカ合衆国、３３１０１　フロリダ州、マイアミ、ピーオーボックッス　０１６９６０（エム８１１）　オフィス　オブ　テクノロジー　トランスファー
(74)代理人
弁理士　小林　孝次
(72)発明者　ビライン、フランク、エル.
フランス共和国、エフ－７４０００　アネシー、リュ　ソメイリエ、４３
(72)発明者　パレル、ジーンマリー、エイ.
アメリカ合衆国、３３１３８　フロリダ州、マイアミ　ショアーズ、ノースイースト　セカンド　ストリート　３３２
最終頁に続く

(54)【発明の名称】角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲルを製造する方法、及び該方法で製造された角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲル

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ポリエチレンオキシドを塩類溶液に溶解してポリエチレンオキシド溶液を得、

該ポリエチレンオキシド溶液を密閉キャニスタ中で真空吸引して酸素を除去してから該酸素の代わりに不活性ガスを入れ、

該キャニスタをガンマ放射線で照射して上記ポリエチレンオキシドを架橋してゲルにする、

以上のステップを有することを特徴とする、

弾性係数４×１０^{4}ニュートン／m^{2}以下、屈折率１．３～１．５２の角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲルを製造する方法。

【請求項２】

上記ポリエチレンオキシドを架橋前に少なくとも分子量200,000ダルトンとする請求項１に記載の角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲルの製造方法。

【請求項３】

上記ポリエチレンオキシドを架橋するガンマ放射線照射ステップを同時に同ポリエチレンオキシドゲルの殺菌ステップともする請求項１又は２に記載の角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲルの製造方法。

【請求項４】

上記塩類溶液中でポリエチレンオキシドを溶解して形成されるポリエチレンオキシド溶液の濃度を０．８重量％～８重量％にする請求項１～３のいずれかに記載の角膜に移植され

る架橋ポリエチレンオキシドゲルの製造方法。
【請求項５】
ガンマ放射線照射ステップ後にポリエチレンオキシドゲルから余分な水を排水させるステップを含む請求項１～４のいずれかに記載の角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲルの製造方法。
【請求項６】
上記塩類溶液が次の成分である、請求項１～５のいずれかに記載の角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲルの製造方法。

溶　体	重量％
塩化ナトリウム	０.６４
塩化カリウム	０.０７５
塩化カルシウム	０.０４８
塩化マグネシウム	０.０３
酢酸ナトリウム	０.０３９
クエン酸二水化物ナトリウム	０.１７

【請求項７】
上記請求項１～６のいずれかの方法で製造される角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲル。
【請求項８】
殺菌されている請求項７の角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲル。
【請求項９】
移植前に割られる請求項７に記載の角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲル。
【請求項１０】
移植中に割られる請求項７に記載の角膜に移植される架橋ポリエチレンオキシドゲル。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
本発明はポリエチレンオキシドからなる移植組織片の製造方法に関する。具体的には組織交換および組織付加を目的として人体に注入することができる生体両立性の架橋されたポリエチレンオキシドゲルの製造方法に関する。
ヒドロゲルは無毒性で生体組織と両立できるので、さまざまな生体医学に適用されてきたことは周知の事実である。Civerchiaに1991年付与された米国特許第4983181号及び第4994081号は架橋剤の存在下でヒドロゲルを重合し、既知の大きさの巨大分子をアンカーし、その巨大分子が重合親水性モノマーのポリマーメッシュ体内にほぼ均等に散在することを確実にするように、それら分子間に一定の制御された間隔をあけた三次元ポリマーメッシュ体を形成する方法につき記載している。ヒドロゲルの架橋形成ステップは紫外線放射のような外界の架橋剤あるいは例えばエチレングリコールジメタクリレートのようなヒドロゲルの透明な強粘性モノマー溶液に添加される架橋剤で行うことができる。上記特許に記載のヒドロゲルは、上皮細胞の成長を促進させることができる透明なコラーゲンヒドロゲルである。
コラーゲンゲルを使う場合の問題は、コラーゲンゲルが大体３～６カ月で生体劣化してしまい、伝染性反応や免疫性反応を示すことである。また、コラーゲンの移植組織片は時間の経過とともにレシピアントの細胞や臓器によってコロニー化されることである。
生体医学の適用として一般に使用されているもう一つのタイプはシリコンゲルである。しかしシリコンゲルは免疫学的反応を誘発し、移植部位から移動してしまう傾向が観察されることが知られている。さらにシリコン移植組織片は、組織内に移植された異物に対し細胞反応から形成される濃密な繊維組織がそれを封入してしまうという問題がある。最後に

シリコンゲルは効果的な酸素拡散を可能にするものではあるが、その移植されたものが占領する場所に栄養素の十分な輸送が行われないという問題もある。

発明の概要

そこで本発明の目的は、人体と生体両立性で非腐食性のゲル移植組織片の製造方法を提供することにある。

もう一つの目的は必要なときは人体から容易に除去することができる移植組織片を提供することにある。

また、移植後に伝染性、炎症性または免疫性反応を起こさない人体に注入できる生体両立性のゲルを提供することにある。

さらに、注入部位から移動しない、酸素と栄養素の双方の供給ができる生体両立性の注入可能なゲルを提供することにある。

さらに、ゲル化後は割ることができるが人体に入る前や注入時には割れないポリエチレンオキシドゲルを提供することにある。

これら及びこれら以外の目的は、移植組織片として人体中に注入することができるポリエチレンオキシド（以下、「ＰＥＯ」と言う）ゲルの新規な製造方法を使うことによって達成される。角膜屈折外科、網膜剥離外科、眼部プラスチックのような眼科関連医術とか、プラスチックによる再建外科などに使うために、ガンマ放射架橋で脱酸素した塩類溶液中のＰＥＯゲルを組織交換または組織付加に用いる恒久性ソフト移植組織片として合成する。

本願の新規な方法を使えば、ＰＥＯゲルは生体両立性であるから、その特性を具体的な医療上の要請に合わせてＰＥＯ－水濃度および放射線投射量（透明度および硬度を制御する目的）、また電解液濃度（容積膨張度および最終含水量を制御する目的）を調節することによって如何ようにも操作することができる。本発明のゲルは小さいゲージ針（例、２５ga）で注入することができ、ストロマ内で[intrastromally]、また皮下で[subcutaneously]生体両立性であることが認められた。このゲルは細胞や臓器でコロニー化されることがなく、したがって塩類溶液（好ましくは高張のもの）で洗浄して容易に除去することができる。本発明のＰＥＯゲルで作られる移植組織片の形状は、移植組織片を取り巻く組織を指でマッサージすることによって整形することができる。

【図面の簡単な説明】

図１は１個のＰＥＯ分子をスケッチしたものである。

図２はゲル化に必要な投与量を左右する分子量を示すグラフである。

図３は光の波長に対するヒト角膜と本発明のＰＥＯゲル移植組織片の双方通過の光透過率を示すグラフである。

図４Ａおよび図４Ｂは角膜内の移植組織片からの光反射を示す。

図５は移植組織片の屈折率との関係で、その移植組織片を埋め込んだ角膜からの光反射率を示すグラフである。

図６は弾性係数が測定される緯度と経度方向双方を示す角膜の図解である。

好ましい実施例

ポリエチレンオキシド（ＰＥＯ）とポリエチレングリコール（ＰＥＧ）は２通りの方法でつくることができるが、一般には次の化学式の同じポリマー合成物と言われている。

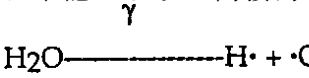
$-(-CH_2-CH_2-O-)_n-$

これら二つのポリマー間の違いは、それぞれの分子量のならわしに存する。ＰＥＧは数千ダルトン以下の分子量であるのに対し、ＰＥＯは７千～７百万ダルトンの分子量である。ＰＥＯは、ベンゼン、フレオン、クロロホルム、テトロヒドロフレンに溶けるし、また、沸騰点近辺を除けばどんな温度下でも水にも溶ける。ＰＥＯはまた食塩水にも溶ける。

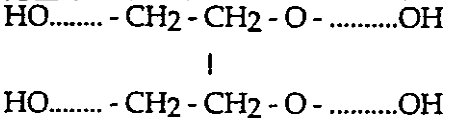
ＰＥＯポリマーはきわめて高い水溶性を有しているので、生体両立性材料としてＰＥＯを使うにはその水溶特性を減殺する必要がある。これが図１に示すような不溶性の橋かけ網を作ることで達成できる。図１で架橋各々は結節点１で示してある。この網は親水性であるという長所を有しているので、水中で膨張する。

橋かけＰＥＯを作る１方法は、例えばヘキサメチレンジイソシアナートを架橋剤として、

また、マンニトール、ペンタエリトリトール、あるいは1,2,6-ヘキサメトリオールのような分岐剤を使って化学反応で網をエンドリンクして行われるものである。しかし毒性のある試薬が（ＰＥＯと同様の濃度レンジで）架橋させる際に使われるので、試薬の残滓を除去するため洗浄工程を追加採用する必要がある。
この網をつくるもう一つの方法は、ＰＥＯをガンマ放射線に当てるやり方である。これは純粋なＰＥＯを無水でガンマ線架橋することができるが、このやり方は非常に多量の放射線投射を必要とするので（１００Mrad以上）、実際的でない。ＰＥＯ－水の溶液を使うことによって、ずっと少量の放射線投射で（約１Mrad）架橋させることができる。この架橋は下記のように間接的なもので、水分子を取り込む。



発生したラジカルがＰＥＯポリマーの鎖に反応して下記を生成する。



架橋ＰＥＯ鎖は反応に用いられるベースのＰＥＯよりずっと高い分子量となっている。２００，０００ダルトンの２本の鎖間に１回リンクがあれば、４００，０００ダルトンの分子が得られる。上記式に示されるように、２つの異なるＰＥＯ分子のどの２つの炭素部分間にでもリンクが行われる。当初から存在しているポリマー鎖１個につき少なくとも１つの架橋があるとき、ゲル化が起こる。
ゲル化の発生はいくつかのパラメータにかかっている。すなわちＰＥＯ濃度、分子量、放射線投射量である。これらの影響度合を図２にグラフで示す。ＭＷ１＞ＭＷ２＞ＭＷ３＞ＭＷ４と、さまざまな分子量（ＭＷ）の水溶液中のＰＥＯ濃度に対する放射線投射量が示されている。図２に示されるように、一定の濃度では分子量が高くなればなるほど、ゲル形成に必要な放射線投射量は低くて済む。しかし溶液中に溶けた酸素がγ線の清浄剤として作用して架橋工程を抑制するので、ゲル化は起こらないおそれがある。
これを防ぐためにはＰＥＯ溶液は慎重に脱ガスされなければならない。ＰＥＯ溶液は、溶液中にガス泡が全くなくなるまで真空除去され、次にアルゴンその他の不活性ガスで充填される。溶液中に残る酸素残量を減らすため、この工程を数回繰り返す。
好ましい実施例では、ＰＥＯ標本（例、２００，０００ダルトン）を塩類溶液中に溶かして０．８重量％～８重量％のＰＥＯ溶液を調製した。使った溶液は平衡塩類溶液（ＢＳＳ）で、目的とする医療の適用にとって最適なものを選択した。ゲルの用途によって、これ以外の溶液でも使用可能である。ＢＳＳ組成物を表Ｉにリストアップする。これはAlcon, Inc.から購入可能である。

表Ｉ

溶　質	重量％
塩化ナトリウム	０．６４
塩化カリウム	０．０７５
塩化カルシウム	０．０４８
塩化マグネシウム	０．０３
酢酸ナトリウム	０．０３９
クエン酸二水化物ナトリウム	０．１７

その後、真空装置を使って真空にした密閉容器中に当該溶液を入れて溶液から遊離する酸素を除去し、次に大気中の雑菌によるガス汚染を防ぐため純粋なアルゴンガス（＞９９．９９９％）を充填する。ＰＥＯを架橋するため、このキャニスタをガンマ線源（コバルト

６０）にさらして２．５～２５Mradの線量を投射した。均質なゲル（Isotrope）を得るため、たとえ放射中でも（rocking platform oscillatory shakerを使って）この溶液を継続的に撹拌することができる。無菌、非汚染のＰＥＯゲルを殺菌シリンジへ移し換えることは、実験段階での使用のため紫外線放射で予め殺菌した層流フード中で行った。これについては後述する。

特定の電解液濃度のＰＥＯヒドロゲルは、それより低い濃度の電解液で塩類溶液中に浸積されると膨張し、それより高い濃度の電解液で塩類溶液中に浸積されると縮小することが知見された。したがって周囲の組織と異なる電解液濃度の塩類溶液中で架橋したＰＥＯゲルを移植することは、外科処置後にその移植組織片の量を変化させることにつながるおそれがある。この現象はある種の医療適用には外科処置後の合併症誘発のおそれを考えさせるが、ポリマーのガラス質代用物、組織に対する組織の一定の制御された圧迫状態が要求される網膜剥離外科のような応用例では利点がある。

一定のＰＥＯ溶質濃度にとって、照射量が高ければ高いほど、架橋密度は高くなる。０．８％のＰＥＯ溶液を使う場合、照射量は０．８Mradから１３Mrad以上になる。０．８Mradはポリマーの重力破壊[gravitational collapse]なしにゲル化を得るのに必要な最低限の投与量と考えられるが、９Mrad以上の投与量ではどんな量でもＰＥＯの物理的特性に大して影響を与えないようである。最低限の２．５Mradの投与量がガンマ線殺菌に必要な最低限の投与量に相当するので、これが照射量として選択された。これより高い投与量を使えばＰＥＯゲル移植組織片の架橋と殺菌を同時にすることが可能である。

図２を参照すると、架橋密度が一定のとき、ＰＥＯ溶質濃度が高ければ高いほど、照射量は低くしか要求されないことが観察される。約２００，０００ダルトンのＰＥＯで行った第１回目のテストは、０．５％以下では、たとえ照射量を多くしてもゲル化を得るのが困難なことを示した。したがって０．８％と８．０％の間の溶質濃度が選択された。

５Mradで照射した０．８％の２００，０００ダルトンのＰＥＯ溶液なら、その架橋ゲルは透明で、米国特許第5,090,955号に記載のGel Injection Adjustable Keratoplasty(GIAK)のような角膜組織増加処置の眼科学で使うことができる。上記米国特許は本発明の出願人に譲渡されている。ここに言及して本願に組み込むものとする。

眼中のゲルの視界は、GIAK処置に関係する美容整形的、治療法的な関心事である。ゲルの視界は使われたゲルの反射率および吸光度の双方に直接関係している。したがってどんな可視波長でも、移植組織片を通る光の透過率は角膜を通る透過率と少なくとも同じでなければならない。図３は角膜と本発明の移植組織片の両方を通る光の透過状態を光波長の関数としての角膜を通る光の透過率として表すグラフである。本発明のゲルを通る光透過のグラフは鎖線２、角膜を通る光透過のグラフは実線４である。図３に示されたように、可視光線スペクトル（４００ナノメータ～８００ナノメータ）で、本発明のゲルを通る光の透過率は１００％に近い。したがって本発明の移植組織片は該移植組織片を通過する光に対し光学的に透明である。図３はまた、移植組織片が正常の角膜（３００～１３５０nmの波長）より紫外線領域近辺、可視光線領域および赤外線領域近辺で、より多くの光を通すことも示している。

眼は反射における約１０％の違いを知覚することができるから、ゲルの屈折率は角膜の屈折率より±１０％以内の違いしかないことが重要である。図４Ａは眼の角膜内に置かれた移植組織片中を通る光線を示している。光線１０が角膜１２の前面を通って移植組織片１４の前面１４ａに当たり、そこで一部が１６のように反射する。光線１０は移植組織片１４をそのまま通過するので、移植組織片１４の後面１４ｂに当たり、その当たった光線の一部が１８で示されるように反射する。

次に図４Ｂにおいて、移植組織片を内包する角膜に光線が通らない場合の角膜の反射特性について考察している。光線１０’は角膜１２’の涙膜２０の前面２０ａに当たると、一部が２２で示したように反射する。光線１０’はこの涙膜２０を通るのであるが、その一部は２４で示すように角膜１２’の前面１２ａ’で反射する。光線１０’は角膜１２’中にそのまま入り、そこで移植組織片１４’の前面１４ａ’で２６で示すように一部が反射する。後面１４ｂ’も２８で示すように光線１０’が後面１４ｂ’を通るとき光線１０’

を一部反射する。そして光線１０’は、３２で示すように、角膜１２’の後面１２ｂ’に当たると反射される。
図５は本発明に従って作られた移植組織片の屈折率の関数として光の反射率を示すものである。３６で示される曲線はこの移植組織片の屈折率関数として角膜と移植組織片双方の光の反射率を示している。図５に見られるように、移植組織片の屈折率が角膜の屈折率（１．３７６）と等しいなら、反射される入射光の率は最小で約４％となる。角膜と移植組織片双方の総反射量が角膜単独の反射総量と約１０％以内しか違わないものであることが理想であるから、移植組織片と角膜との総反射量は４．４％以下でなければならない。総反射量４．４％となる点を線３６上に見つけるなら、それが約１．５２という移植組織片の屈折率に対応するものであることが分かる。ヒドロゲルは大部分が水であって、水の屈折率は約１．３であるから、移植組織片の屈折率は少なくとも１．３なければならない。したがってGIAK外科で使われるゲルは、１．３より大きく１．５２より小さい屈折率のものであることが最も好ましい。
注入されるゲルの吸光度が角膜の吸光度に限りなく近く合致することも重要である。これは眼にその後さらに処置を施さなければならなくなったときに重要である。もしゲルが異なる吸光度であれば、光エネルギはゲルと角膜の双方に統一された効果を持たなくなるから、レーザによる眼外科やフォト凝結[photocoagulation]は不可能になる。
眼中で作用する注入ゲルのもう一つの重要な特徴は、その弾性係数である。この問題については、Refractive and Corneal Surgeryの1993年5月号、6月号に掲載された“Keratoprosthesis: Engineering and Safety Assessment”と題する記事に論じられている。注入された移植組織片が角膜より硬質であれば、角膜を変形させてしまうし、逆に角膜の方が移植組織片より硬ければ、移植組織片を変形させてしまうことになる。例えば、ガラスとかポリメチルメタクリレート（PMMA）でできている角膜の人工的補欠物は、相対的に硬い物質であって角膜の弾性係数よりずっと大きい弾性係数なので、角膜から突出することになる。このようなゲルの角膜からの突出を防止するには、ゲルの弾性係数は角膜のそれより小さくなければならない。図６は緯度方向、経度方向に最適の弾性係数を選択する部位を探すための角膜を描いたものである。角膜４０は複数のレイヤー即ちストロマを形成するラメラー４２[lamellae]からできている。角膜の表面は４６、眼の前室は４８で示してある。この処置にとって角膜の切開部位（角膜の中心から約２．５mm）で、角膜の厚さは５５０～６５０ミクロンである。図６に５０で示した環状のチャネルを形成するレベルで、角膜は半径方向の弾性係数と縦断方向の弾性係数の両方を有している。半径方向の係数は５２で示された面にあり、縦断方向の係数は５４で示された面にある。縦断方向の弾性係数は2.19×10^{4}～4.12×10^{4}ニュートン／m^{2}、半径方向の弾性係数は2×10^{6}～5×10^{6}ニュートン／m^{2}である。突出に伴う問題を回避するため、ゲルは角膜の半径方向および縦断方向双方の弾性係数より小さい弾性係数のものでなければならない。
この処置に使われる注入ゲルにとって上記以外に必要な特性としては、細胞の移植組織片への移転を損なう可能性がある移植組織片への細胞移転を防止すること（必要なら角膜湾曲を再調整して）、および眼全体の各所にゲルを通って酸素その他の必要な栄養素を運搬させることである。
上記の特許に記載された処置で使われた実験では、殺菌した架橋ゲルを、角膜の中心部から一距離間隔をあけた箇所でウサギ角膜のラメラー層[lamellar layers]間に形成したストロマ内の環状チャネル中に注入した。このチャネルを角膜内に形成後、１９～２５ゲージ針を使ってゲルをチャネル中に注入した。使ったＰＥＯゲルはウサギ角膜に対し優れた角膜透明度をもち、表面不透明化のない、突出も移転もない、無毒性なものであることを示した。生体組織学的にみて、巨大細胞も壊死もなく、また、移植組織片周辺には正常な角膜のポピュレーション[keratocyte population]が見られた。さらにＰＥＯゲルは可視スペクトルで光学的に透明で、屈折率（１．３３４）も角膜の屈折率（１．３７６）に比較的近いものとなっている。ゲルの弾性係数は針入度計で1.7×10^{3}ニュートン／m^{2}と推定された。本発明の方法で作ったゲルはウサギ角膜中で２２カ月以上安定であるこ

とが判明した。ＰＥＯゲルの調製中に電解液の濃度または角膜の浸透活性を模倣する溶液を使うことによって、移植組織片の体積変更を最小限に抑えることが可能であろう。
その他の用途としてはガラス代用物やKeratophakia lenticuleが考えられる。ＰＥＯ濃度を高めることは、ゲルの機械的力を増大させるが反面、透明度を低下させる。例えば５Mradで照射した１％ＰＥＯ溶液は、プラスチックや再建外科、眼科整形その他の透明度が特に要求されない処置に使われる皮下組織の拡張処置に使うことができる。皮下注射したときの本願のＰＥＯゲル生体両立性を証明するためインビボでいくつかの実験を行った。６匹のウサギの背部と耳に本発明のＰＥＯゲルを皮下注射した。結果はこの物質の良好な耐性を示し、２カ月後も本製品の劣化は目につかなかった。
ＰＥＯ溶液のガンマ線による架橋工程は余分な離液（シネレシス）を出した。こうした離液はある種の外科では好ましくないものとされていて、ゲルをキャニスタからシリンジへと移す前に除去しなければならない。このためキャニスタを目の細かいメッシュのスクリーンで第１室から隔離した第２室に備え付けた。照射後、キャニスタを逆さまにして余分な水を下側のキャニスタに排水し、架橋したＰＥＯを殺菌環境中に維持した。
場合によっては、ある具体的な移植組織片にとって必要な形状と大きさはどんなものなのかを、ＰＥＯ製造中に予想することは困難であろう。こうした場合には、ＰＥＯゲルは数ミクロンから１cm以上の平均粒子サイズの小さなかけら（例えば、割ることによって）にすることができる。割る工程は移植組織片埋め込みの前に、あるいは埋め込み中にするであろう。

【図１】

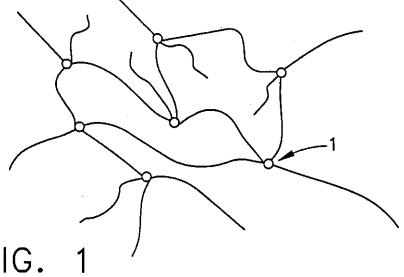


FIG. 1

【図２】

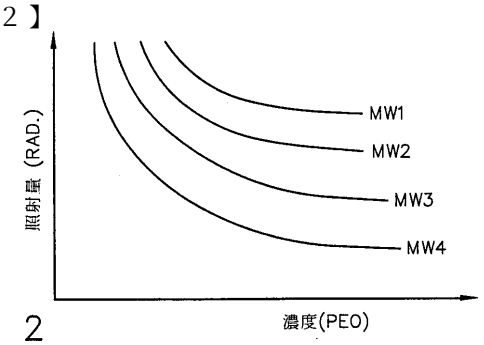


FIG. 2

【図３】

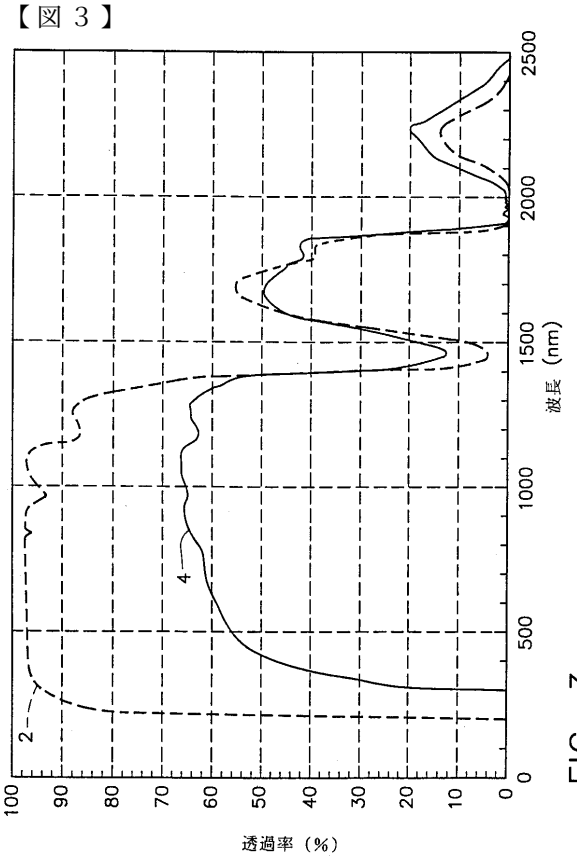


FIG. 3

【図６】

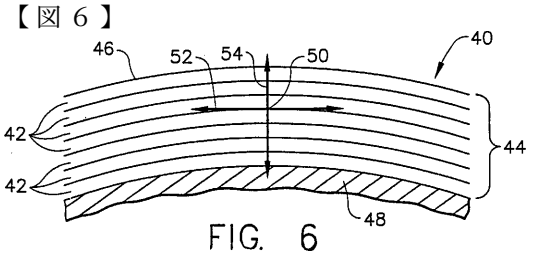


FIG. 6

【図４Ａ】

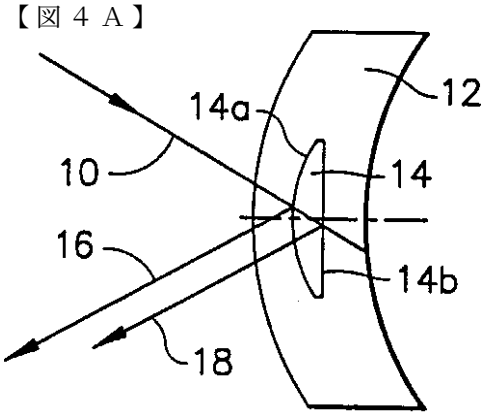


FIG. 4A

【図４Ｂ】

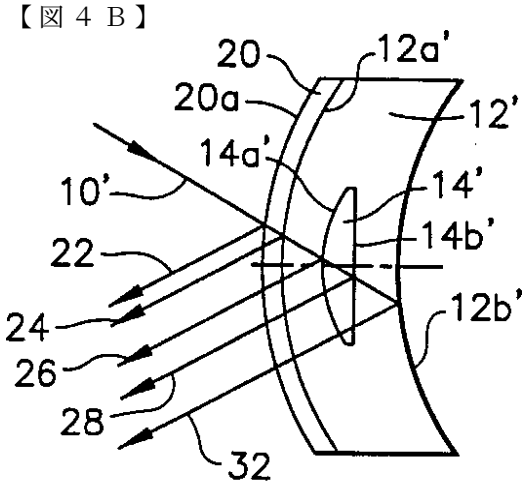


FIG. 4B

【図５】

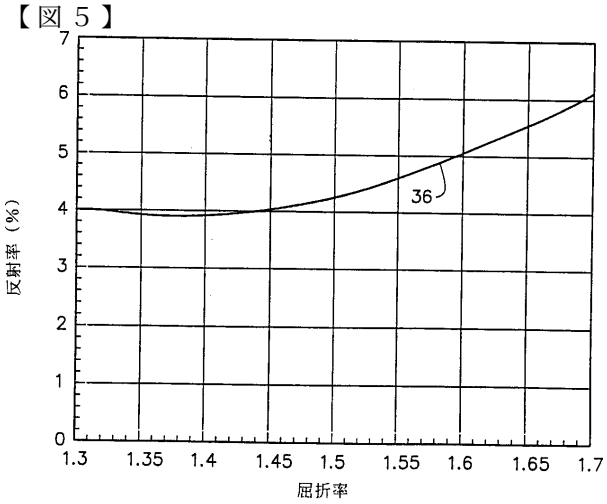


FIG. 5

フロントページの続き

(72)発明者　リー、ウイリアム　ジー.
アメリカ合衆国、３３１３９　フロリダ州、マイアミ　ビーチ、パーム　アベニュー　２０１
(72)発明者　サイモン、ガブリエル
スペイン、イー－０８９２４　エル　ブルック　バルセロナ、カサ、ブルック　デル　ミグ　６７

審査官　森川　聡

(56)参考文献　米国特許第０３２６４２０２（ＵＳ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
A61L 27/00
C08J 3/28
WPI/L(QUESTEL)