

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4287139号
(P4287139)

(45) 発行日 平成21年7月1日 (2009.7.1)

(24) 登録日 平成21年4月3日 (2009.4.3)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 P 13/00 (2006.01) C 1 2 P 13/00
C 1 2 P 17/00 (2006.01) C 1 2 P 17/00

請求項の数 8 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2002-377734 (P2002-377734)	(73) 特許権者	599065370
(22) 出願日	平成14年12月26日 (2002.12.26)		デーエスエム・ファイン・ケミカルズ・オーストリア・ナッハフォルゲル・ゲゼルシヤフト・ミト・ベシユレンクテル・ハフツング・ウント・コンパニー・コマンデイトゲゼルシヤフト
(65) 公開番号	特開2003-250593 (P2003-250593A)		オーストリア国、4021リンツ、ザンクト・ペーター・ストラーセ、25
(43) 公開日	平成15年9月9日 (2003.9.9)	(74) 代理人	100069556
審査請求日	平成17年11月9日 (2005.11.9)		弁理士 江崎 光史
(31) 優先権主張番号	A2033/2001	(74) 代理人	100092244
(32) 優先日	平成13年12月27日 (2001.12.27)		弁理士 三原 恒男
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)	(74) 代理人	100093919
			弁理士 奥村 義道

最終頁に続く

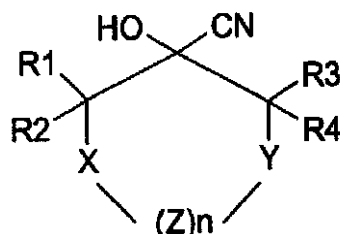
(54) 【発明の名称】 ヘテロ環式 (R) - および (S) - シアンヒドリンの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エナンチオマーの豊富な式 (I)

【化 1】



[式中、R 1、R 2、R 3 および R 4 は互いに無関係に H、反応条件のもとで不活性の置換基でモノ置換またはポリ置換されたまたは非置換の直鎖状の、分岐したまたは環状の C₁ ~ C₂₄-アルキル、アルケニルまたはアルキニル基、ただしその鎖中の 1 つ以上の炭素原子が酸素原子、窒素原子、硫黄原子、S O または S O₂ 基に交換されていてもよく；反応条件のもとで不活性の置換基でモノ置換またはポリ置換されていてもよいまたは非置換のアリールまたはヘテロアリールまたはヘテロ環式基；またはハロゲン、水酸基、N R 5 R 6、アセチル、オキソ、C₁ ~ C₆-カルバルコキシ、C₁ ~ C₆-カルバルコキシアミノ、C O O R 7、シアノ、アミド、ベンゾイルアミノまたは N O₂ であり、

R 5 および R 6 は互いに無関係に H、直鎖状の、分岐したまたは環状の $C_1 \sim C_6$ - アルキル基、フェニル基、ベンジル基、 $COOR$ 7、または一緒になって $C_2 \sim C_8$ - アルキレンまたはヘテロアルキレン基であり、

R 7 は H または $C_1 \sim C_6$ - アルキルであり、

X および Y は互いに無関係に、反応条件のもとで不活性の置換基でモノ置換されたまたはジ置換されたまたは非置換の炭素原子、または N、O、S または NR 5 R 6 よりなる群から選択される基であり、その際に R 5 および R 6 は上記の通り、SO または SO_2 であり、

n は 0、1、2 または 3 であり、

Z は反応条件のもとで不活性の置換基でモノ置換されたまたはジ置換されたまたは非置換の炭素原子、または N、O、S または NR 5 R 6 よりなる群から選択される基であり、その際に R 5 および R 6 は上記の通り、SO または SO_2 であり、

そして基 X、Y および Z の少なくとも 1 つは炭素原子でない。]

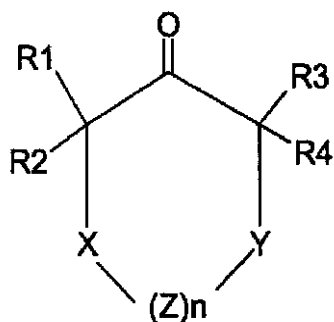
で表されるヘテロ環式 (R) - および (S) - シアンヒドリンであって、式 (I) の化合物が、5 員環では二重結合が $-C(OH)CN-$ 基と共役二重結合していないという前提条件のもとで環の大きさに依存して環中に 1 つ以上の二重結合を有していてもよく、

および/または 0 ~ 3 個のヘテロ原子を持つ 5 員、6 員または 7 員環によってモノ縮合またはポリ縮合されていてもよく、

および/またはアルキル鎖において 1 つ以上のヘテロ原子で中断されていてもよくおよび/または二重結合を有していてもよい直鎖状のまたは分岐した $C_1 \sim C_6$ - アルキレン基で橋架けされていてもよい

上記ヘテロ環式 (R) - および (S) - シアンヒドリンを製造する方法において、式 (II)

【化 2】



[式中、R 1、R 2、R 3、R 4、X、Y、Z および n が上述の意味を有する。]

で表されるケトン類を (R) - および (S) - ヒドロキシニトリル-リアーゼと、有機-、水性-または二相系においてまたはエマルジョン状態でシアニド基供与体の存在下で反応させ、所望の (R) - および (S) - シアンヒドリンを得ることを特徴とする、上記方法。

【請求項 2】

R 1、R 2、R 3 および R 4 は互いに無関係に H、鎖中の炭素原子が酸素原子、窒素原子または硫黄原子で交換されていてもよい飽和またはモノ不飽和の、直鎖状の、分岐したまたは環状の $C_1 \sim C_{12}$ - アルキル；フェニル、ビフェニルまたはナフチル基であり、これらの基は $C_1 \sim C_6$ - アルキル、 $C_1 \sim C_6$ - アルコキシ、 $C_1 \sim C_{12}$ - アルキルアルコキシ、 $C_1 \sim C_{20}$ - アリールオキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシル、非置換の、またはハロゲン、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_4$ - アルキルまたは $C_1 \sim C_4$ - アルコキシでモノ置換またはジ置換されていてもよいフェニルよりなる群から選択された 1 つ以上の置換基で置換されていてもよく、

またはハロゲン、ヒドロキシル、オキソ、 $C_1 \sim C_6$ - カルバルコキシ-、 $C_1 \sim C_6$ -

カルバルコキシアミノ、NR₅R₆、アセチル、COOR₇、シアノ、アミド、ベンゾイルアミノまたはNO₂であり、

R₅およびR₆は互いに無関係にH、直鎖状の、分岐したまたは環状のC₁～C₆ーアルキル基または一緒になってC₂～C₈ーアルキレン基を形成し、

R₇はHまたはC₁～C₆ーアルキルであり、

nは0、1または2であり、

X、YおよびZは互いに無関係に、C₁～C₆ーアルキル、C₁～C₆ーアルコキシ、C₁～C₁₂ーアルキルアルコキシ、C₁～C₂₀ーアリアルオキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシル、非置換の、またはハロゲン、ヒドロキシ、C₁～C₄ーアルキルまたはC₁～C₄ーアルコキシでモノ置換またはジ置換されていてもよいフェニルによってモノ置換またはジ置換されたまたは非置換の炭素原子、またはN、O、SまたはNR₅R₆よりなる群から選択される基であり、その際にX、YまたはZの1つまたは2つは炭素原子ではなく、n=0の時に式(II)のケトン類は二重結合を有しておらず、n=1の時に二重結合を有していないかまたは1つの二重結合を有しそしてn=2の時に0～2つの二重結合を有しおよび／または0または1つのヘテロ原子を有する5員または6員環と縮合されていてもよく、

および／または二重結合を有していてもよい直鎖状のまたは分岐したC₁～C₆ーアルキレン基によって橋架けされていてもよい

式(II)で表されるケトン類を出発物質として使用する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

有機系で反応に使用される有機系希釈剤がハロゲン化されていてもよい水非混和性または僅かに水混和性の脂肪族または芳香族炭化水素、アルコール、エーテルまたはエステルまたはそれらの混合物である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

反応をエマルジョン状態で行う、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

エナンチオマー選択反応を水性系で実施し、その際に相応するヒドロキシニトリルルーリアーゼを含有する溶液またはアセテート緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、フタレート緩衝液、クエン酸塩緩衝液またはリン酸塩緩衝溶液またはこれらの緩衝溶液の混合物を反応媒体として役立てる請求項1に記載の方法。

【請求項6】

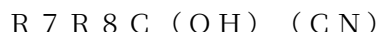
使用されるヒドロキシニトリルルーリアーゼがそのまままたは固定化されて存在する天然のまたは組換えられた(R)ーまたは(S)ーヒドロキシニトリルルーリアーゼである、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

使用されるヒドロキシニトリルルーリアーゼがカサバ(manioc)またはパラゴムノキ(Hevea)-ブラジリエンス(brasiliensis)からの天然の(S)ーヒドロキシニトリルルーリアーゼ、ピヒア・パストリス(Pichia pastoris)、E. コリ(E.coli)またはサッカロミセス・セレビスシア(Saccharomyces cerevisiae)よりなる群から選択される遺伝的に変性された微生物からの組替え(S)ーヒドロキシニトリルルーリアーゼ、プルナス・アミグダルス(Prunus amygdalus)、プルナス・ラウロセラサス(Prunus laurocerasus)またはプルナス・セロチナ(Prunus serotina)からの天然の(R)ーヒドロキシニトリルルーリアーゼ、または組替え(R)ーヒドロキシニトリルルーリアーゼである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

シアニド基供与体が青酸、シアン化アルカリ金属または一般式(III)



[式中、R₇およびR₈は互いに無関係に水素原子または非置換の炭化水素基であり、またはR₇およびR₈は一緒になって炭素原子数4または5のアルキレン基であり、その際にR₇およびR₈は同時に水素ではない。]

で表されるシアニドヒドリン類である、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、(R)－および(S)－ヒドロキシニトリル－リアーゼ(HNL)を使用して相応するヘテロ環式ケトン類からエナンチオマーの豊富なヘテロ環式(R)－および(S)－シアンヒドリンを製造するための酵素触媒による方法および相応する酸、エステルまたはアミドを製造するためにそれを更に反応させることに関する。

【0002】

【従来の技術】

シアンヒドリン類は、生物的活性物質、例えば医薬有効物質、ビタミンまたはピレスロイド化合物を製造するのに使用される α －ヒドロキシ酸、 α －ヒドロキシケトン類、 β －アミノアルコール類の合成にとって重要である。

10

【0003】

シアンヒドリン類は青酸をケトンまたはアルコールのカルボニル基に付加することによって製造される。

【0004】

既に文献に脂肪族、芳香族またはヘテロ芳香族アルデヒドまたは脂肪族または芳香族ケトンから(R)－および／または(S)－シアンヒドリンを製造することを説明する複数の変法が開示されている。

【0005】

20

例えばヨーロッパ特許出願公開(A)第0,326,063号明細書には、脂肪族、芳香族またはヘテロ芳香族アルデヒドまたはケトン類と青酸とをPrunus amygdalusからの(R)－オキシニトリラーゼ(EC4.1.2.10)またはSorghum bicolorからのオキシニトリラーゼ(EC.4.1.2.11)の存在下に反応させることによって光学活性の(R)－および／または(S)－シアンヒドリンを製造する酵素法が開示されているが、ケトン類の例、特にヘテロ環式ケトンは開示されていない。

【0006】

更にヨーロッパ特許第0,632,130号明細書には脂肪族アルデヒド類または非対称脂肪族ケトン類を青酸、およびHevea brasiliensisからのオキシニトリラーゼと立体特異的に反応させて(S)－シアンヒドリンを得る方法が開示されている。ヘテロ環式ケトン類は記載されていない。

30

【0007】

ヨーロッパ特許0,927,766号明細書には、脂肪族、芳香族またはヘテロ芳香族アルデヒド類またはケトン類からエマルジョン状態で光学活性の(S)－シアンヒドリンを製造する酵素法が開示されている。そこに引用されたヘテロ芳香族ケトンはインドールアセトンだけである。ケトン基がヘテロ環の一部であるケトンはヨーロッパ特許0,927,766号に包含されていない。

【0008】

ケトン基がヘテロ環の構成員であるヘテロ環ケトン、例えば7－オキサビシクロ[2,2.1]ヘプテン－2誘導体からのシアンヒドリンは、Helv. Chim. Acta(1984)、67(6)、1612－1615に記載されている様に、従来には例えばZnI₂触媒作用によるフランおよびアセトキシシアシルニトリルのデールスアルダー付加反応によって製造されてきた。光学活性シアンヒドリンはシアンヒドリン－ブルシン錯塩を経るラセミ体分離を用いるこの方法において得ることができた。他の可能な方法は米国特許第4,208,338号明細書によって説明される通り、シアノフラノン類、例えばMeCH(OH)CO₂EtおよびクロトノニトリルからTHF中でNaHの存在下に製造するものである。

40

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

50

本発明の課題は、相応するヘテロ環式ケトン類からエナンチオマーの豊富なヘテロ環式（R）－および（S）－シアンヒドリンを簡単な方法で、高収率および高エナンチオマー純度で製造することを可能とする方法を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

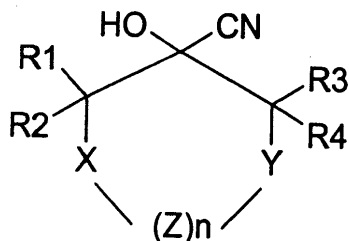
予期できなかったことにこの課題はヘテロ環式ケトンの（R）－または（S）－HNLの触媒作用による反応によって達成できた。

【0011】

それ故に本発明は、エナンチオマーの豊富な式（I）

【0012】

【化3】



【0013】

〔式中、R1、R2、R3およびR4は互いに無関係にH、反応条件のもとで不活性の置換基でモノ置換またはポリ置換されたまたは非置換の直鎖状の、分岐したまたは環状のC₁～C₂₄－アルキル、アルケニルまたはアルキニル基（ただしその鎖中の1つ以上の炭素原子が酸素原子、窒素原子、硫黄原子、SOまたはSO₂基に交換されていてもよい）；反応条件のもとで不活性の置換基でモノ置換またはポリ置換されていてもよいまたは非置換のアリールまたはヘテロアリールまたはヘテロ環式基；またはハロゲン、水酸基、NR₅R₆、アセチル、オキソ、C₁～C₆－カルバルコキシ、C₁～C₆－カルバルコシアミノ、COOR₇、シアノ、アミド、ベンゾイルアミノまたはNO₂であり、R5およびR6は互いに無関係にH、直鎖状の、分岐したまたは環状のC₁～C₆－アルキル基、フェニル基、ベンジル基、COOR₇、または一緒にC₂～C₈－アルキレンまたはヘテロアルキレン基であり、R7はHまたはC₁～C₆－アルキルであり、XおよびYは互いに無関係に、反応条件のもとで不活性の置換基でモノ置換されたまたはジ置換されたまたは非置換の炭素原子、またはN、O、SまたはNR₅R₆よりなる群から選択される基であり、その際にR5およびR6は上記の通り、SOまたはSO₂であり、

nは0、1、2または3であり、

Zは反応条件のもとで不活性の置換基でモノ置換されたまたはジ置換されたまたは非置換の炭素原子、またはN、O、SまたはNR₅R₆よりなる群から選択される基であり、その際にR5およびR6は上記の通り、SOまたはSO₂であり、そして基X、YおよびZの少なくとも1つは炭素原子でない。〕

で表されるヘテロ環式（R）－および（S）－シアンヒドリンであって、式（I）の化合物が、5員環では二重結合が－C（OH）CN－基と共役二重結合していないという前提条件のもとで、環の大きさに依存して環中に1つ以上の二重結合を有していてもよく、および／または0～3個のヘテロ原子を持つ5員－、6員－または7員環によってモノ縮合またはポリ縮合されていてもよく、および／またはアルキル鎖において1つ以上のヘテロ原子で中断されていてもよくおよび／または二重結合を有していてもよい直鎖状のまたは分岐したC₁～C₆－アルキレン基で橋架けされていてもよい

上記ヘテロ環式（R）－および（S）－シアンヒドリンを製造する方法において、式（II

10

20

30

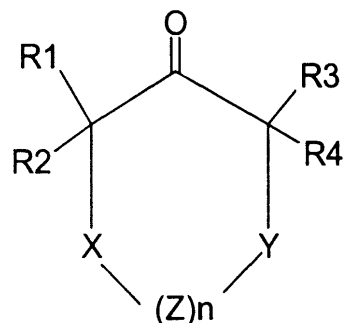
40

50

)

【0014】

【化4】



10

【0015】

〔式中、R1、R2、R3、R4、X、Y、Zおよびnが上述の意味を有する。〕

【0016】

]

で表されるケトン類を(R)ーおよび(S)ーヒドロキシニトリルーリアーゼと、有機ー、水性ーまたは二相系においてまたはエマルジョン状態でシアニド基供与体の存在下で反応させ、所望の(R)ーおよび(S)ーシアンヒドリンを得ることを特徴とする、上記方法に関する。

20

【0017】

式(I)および式(II)においてR1、R2、R3、R4は互いに無関係にH、反応条件のもとで不活性の置換基でモノ置換またはポリ置換されたまたは非置換の直鎖状の、分岐したまたは環状のC₁～C₂₄ーアルキル、アルケニルまたはアルキニル基でもよい。

【0018】

アルキル、アルケニルまたはアルキニルは飽和のまたはモノーまたはポリ不飽和の直鎖状の、枝分かれしたまたは環状の、第一、第二または第三炭化水素基を意味する。これらはC₁～C₂₄ーアルキル、アルケニルまたはアルキニル基、例えばメチル、エチル、ビニル、エチニル、プロピル、イソプロピル、アリル、プロペニル、1ーメチルシクロプロペニル、ブチル、イソブチル、第三ブチル、1,3ーブタジエニル、2ーメチルー1,3ーブタジエニル、ペンチル、シクロペンチル、イソペンチル、ネオーペンチル、2ーペンチニル、1,3ーペンタジエニル、ヘキシル、イソヘキシル、1,2ーヘキサジエニル、シクロヘキシル、シクロヘキシルメチル、3ーメチルペンチル、2,2ージメチルブチル、2,3ージメチルブチル、オクチル、イソオクチル、シクロオクチル、2,6ージメチルオクタン、デシル、シクロデシル、ドデシル、シクロドデシル、2,6,10ートリメチルドデカニル等がある。

30

【0019】

C₁～C₁₂ーアルキル基およびC₂～C₁₂ーアルケニルまたはアルキニル基が好ましく、C₂～C₈ーアルキル、アルケニルまたはアルキニル基が特に有利である。これらの基中、鎖中の1または複数の炭素原子は酸素原子、窒素原子、硫黄原子またはSOまたはSO₂基に交換されていてもよく、その場合エーテル、アミド、アミン、イミン、チオエーテル、スルホキッドおよびスルホンイルが得られる。

40

【0020】

これらの例には2ーメトキシプロピル、2ーメトキシブチル、オキシラニル、テトラヒドロフリル、ジオキサニル、2ーエトキシメチル、2ープロポキシメチル、N',N'ージメチルヒドラジノ、エチルチオメチル、1,1ージオキソテトラヒドロチオフェニル、メチルスルフィニルメチル、メチルスルホンイルメチル、チイラニル等がある。

【0021】

反応条件の下で不活性である置換基は例えば以下の群が適する：C₁～C₂₀ーアルコキシ

50

またはアルキルアルコキシまたはアリールオキシ基、例えばメトキシ、エトキシ、ブトキシ、ヘキソキシ、メトキシメチル、エトキシメチル、エトキシエチル、フェニルオキシ等；ニトロ、ハロゲン、水酸基、オキソ、 CN 、 $CONH_2$ 、カルボキシ、カルボン酸エステルまたはカルボキシアミド、第一、第二または第三アミノ基、 SO_3H 基；ハロゲン、水酸基、 $C_1 \sim C_4$ -アルキルまたはアルコキシ等でモノ置換またはポリ置換されたまたは非置換のフェニルである。

【0022】

有利な置換基は $C_1 \sim C_6$ -アルコキシ、 $C_1 \sim C_{12}$ -アルキルアルコキシ、 $C_1 \sim C_{20}$ -アリールオキシ、ハロゲン、水酸基、オキソ、カルボキシル、非置換のまたはハロゲン、水酸基または $C_1 \sim C_4$ -アルキルまたは $C_1 \sim C_4$ -アルコキシでモノ置換またはジ置換されたフェニル基であるのが好ましい。

10

【0023】

しかしながら R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 は反応条件の下で不活性の置換基でモノ置換またはポリ置換されたまたは非置換のアリールまたはヘテロアリールまたはヘテロ環式基でもよい。

【0024】

アリールは $C_6 \sim C_{20}$ -アリール基、例えばフェニル、ビフェニル、ナフチル、インデニル、フロオレニル等を意味するのが有利である。

【0025】

アリール基は反応条件の下で不活性の上述の置換基でモノ置換またはポリ置換されていて

20

【0026】

ヘテロアリールまたはヘテロ環式基は環中に少なくとも1つのO、SまたはNを有する環状基を意味する。これらには例えばフリル、チオフェニル、ピリジル、ピリミジル、イミダゾール、テトラゾール、ピラジニル、ベンゾフラニル、キノリル、イソキノリル、イソベンゾフリル、ピラゾリル、インドリル、イソインドリル、ベンゾイミダゾリル、プリニル、カルバゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、ピロリル、キナーゾリニル、ピリダジニル、フタラジニル、モルホリニル等である。官能性OまたはN基はここでは場合によっては保護されていてもよい。

【0027】

ヘテロアリール基またはヘテロ環式基は既に上に挙げた置換基でモノ置換またはポリ置換されているかまたは非置換であってもよい。

30

【0028】

更に R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 はハロゲン、例えばフッ素または塩素、ホウ素、水酸基、 NR_5R_6 、アセチル、オキソ、 $C_1 \sim C_6$ -カルバルコキシ、 $COOR_7$ 、シアノ、 NO_2 、アミドまたはベンゾイルアミノでもよい。

【0029】

R_5 および R_6 は互いに無関係にH、直鎖状の、分岐したまたは環状の $C_1 \sim C_6$ -アルキル基、フェニル基、ベンジル基または $COOR_7$ 、または一緒になって $C_2 \sim C_8$ -アルキレンまたは $C_2 \sim C_8$ -ヘテロアルキレン基である。

40

【0030】

R_7 はHまたは $C_1 \sim C_6$ -アルキルである。

【0031】

R_1 、 R_2 、 R_3 および R_4 は好ましくは互いに無関係にH；鎖中の一つの炭素原子が酸素原子、窒素原子または硫黄原子で置換されていてもよい飽和またはモノ不飽和の、直鎖状の、分岐したまたは環状の $C_1 \sim C_{12}$ -アルキル；フェニル、ビフェニルまたはナフチル基であるかまたはハロゲン、ヒドロキシ、オキソ、 $C_1 \sim C_6$ -カルバルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ -カルバルコキシアミノ、 NR_5R_6 、アセチル、 $COOR_7$ 、シアノ、アミド、ベンゾイルアミノまたは NO_2 であり、

R_5 および R_6 は互いに無関係にH、直鎖状の、環状のまたは分岐した $C_1 \sim C_6$ -アル

50

キルであるかまたは一緒になって $C_2 \sim C_8$ -アルキレンを形成し、
そして R 7 は H または $C_1 \sim C_6$ -アルキルである。

【0032】

n は 0、1、2 または 3 であり、結果としてその 5 員、6 員環、7 員または 8 員環が得られる。n が 0、1 または 2 であり、特に n が 0 または 1 であるのが好ましい。

【0033】

X、Y および Z は互いに無関係に、反応条件下に不活性の置換基でモノ置換またはジ置換されたまたは非置換の炭素原子かまたは N、O、S または NR 5 R 6 よりなる群から選択される基であり、その際に R 5 および R 6 は上で規定した通り SO または SO₂ であり、基 X、Y または Z の少なくとも 1 つは炭素原子でない。好ましくは基 X、Y または Z の 1 つまたは 2 つ、特に基 X、Y および Z の 1 つは N、O、S、NR 5 R 6、SO および SO₂ よりなる群から選択される基である。反応条件のもとで不活性である適する置換基は既に上述した置換基である。

10

【0034】

X、Y または Z は好ましくは $C_1 \sim C_6$ -アルキル、 $C_1 \sim C_6$ -アルコキシ、 $C_1 \sim C_{12}$ -アルキルアルコキシ、 $C_1 \sim C_{20}$ -アリアルオキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシル、またはハロゲン、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_4$ -アルキルまたは $C_1 \sim C_4$ -アルコキシでモノ置換またはジ置換されたまたは非置換のフェニルによってモノ置換またはジ置換されたまたは非置換の炭素原子、または N、O、S または NR 5 R 6 よりなる群から選択される基であり、その際に X、Y または Z の 1 つまたは 2 つは炭素原子ではない。

20

【0035】

式 (I) および式 (II) の化合物は環の大きさに依存して環中に 1 つ以上の二重結合を有していてもよく、5 員環では二重結合が $-C(OH)CN-$ 基と共役二重結合しているべきでない。

【0036】

好ましくは 5 員環は環に二重結合を含有していない。6 員環は好ましくは二重結合を有していないかまたは最高でも 1 つの二重結合を環中に有しており、他方、7 員環および 8 員環では 0 ~ 2 個の二重結合を有しているのが有利である。

【0037】

式 (I) および式 (II) の化合物は環の大きさに依存して 0 ~ 3 個、好ましくは 0 ~ 1 個のヘテロ原子を有する 5 員、6 員または 7 員環によってモノ縮合またはポリ縮合されていてもよい。式 (I) の化合物は縮合されていないかまたは 5 員または 6 員環によって縮合されているのが好ましい。

30

【0038】

更に式 (I) および式 (II) の化合物は直鎖状のまたは分岐した $C_1 \sim C_6$ -アルキレン基によって橋架けされていてもよい。このアルキレン鎖はこの場合には一つの二重結合を有していてもよいしおよび／または 1 つ以上のヘテロ原子で中断されていてもよい。

【0039】

この鎖がヘテロ原子で中断されていないかまたは最高でも 1 つのヘテロ原子で中断されているのが有利である。

40

【0040】

本発明の方法において式 (II) のケトン類の幾種類かは市販されておりまたは例えば J. Org. Chem. 1970、35、898-902 に従ってまたは文献の Synthesis、1978、368~370 に従って合成することができ、反応してエナンチオマーの豊富なヘテロ環式 (R) - および (S) - シアンヒドリンを生成する。

【0041】

式 (II) の相応するケトン類はここではシアニド基供与体の存在下に (R) - および (S) - ヒドロキシニトリル-リアーゼ (lyase) と反応する。

【0042】

50

適するシアニド基供与体は青酸、シアン化アルカリ金属または一般式(III)

$R_8R_9C(OH)(CN)$

[式中、 R_8 および R_9 は互いに無関係に水素原子または非置換の炭化水素基であり、または R_8 および R_9 は一緒になって炭素原子数4または5のアルキレン基であり、その際に R_8 および R_9 は同時に水素ではない。]

で表されるシアンヒドリン類である。上記炭化水素基は脂肪族または芳香族、特に脂肪族基である。 R_8 および R_9 は好ましくは炭素原子数1～6のアルキル基、特に好ましくはアセトシアノヒドリンは式(III)のシアニド基供与体である。

【0043】

シアニド基供与体は公知の方法で製造することができる。シアンヒドリン、特にアセトシアンヒドリンは市販されてもいる。青酸、 KCN 、 $NaCN$ またはアセトシアノヒドリン、特に青酸をシアニド基供与体として使用するのが有利である。

10

【0044】

青酸は塩の1種、例えば $NaCN$ または KCN から反応直前に遊離させてもよいし、反応混合物に溶剤なしでまたは溶解した状態で添加する。

【0045】

シアニド基供与体は式(II)の化合物と0.5:1～7:1、好ましくは0.8:1～6:1、特に好ましくは1:1～5:1のモル比で使用する。

【0046】

反応は有機性、水性または二相系でまたはエマルジョンの状態で行う。

20

【0047】

使用可能な有機系希釈剤は水非混和性であるかまたは僅かにしか水と混和しないハロゲン化されていてもよい脂肪族または芳香族炭化水素、アルコール類、エーテル類またはエステル類またはそれらの混合物である。第三ブチルメチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテルおよびエチルアセテートまたはそれらの混合物を使用するのが有利である。

【0048】

エナンチオ選択性反応において使用する水性系は適当なHNLを含有する水溶液または緩衝液である。これらの例にはアセテート緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、フタレート緩衝液、クエン酸塩緩衝液またはリン酸塩緩衝液またはこれらの緩衝液の混合物がある。

30

【0049】

HNLは有機系希釈剤中にそのまままたは固定化されて存在していてもよいが、反応は二相系でまたは未固定化HNLを含有するエマルジョン状態で行うことができる。

【0050】

適するHNLは天然のものだけでなく、組替え物の(R)ーおよび(L)ーHNLでもよい。

【0051】

適する(S)ーヒドロキシニトリルーリアーゼは天然の(S)ーヒドロキシニトリルーリアーゼ、例えばカサバ(*manioc*)またはパラゴムノキ-ブラジリエンス(*brasiliensis*)からの天然の(S)ーヒドロキシニトリルーリアーゼおよび組替え(S)ーHNLである。適する天然のHNLはパラゴムノキ-ブラジリエンス(*brasiliensis*)からのものである。適する組替え(S)ーHNLは例えば遺伝的に修飾された微生物、例えばピヒア・パストリス(*Pichia pastoris*)、E. コリ (*E. coli*)またはサッカロミセス・セレビシア(*Saccharomyces cerevisiae*)から得られる。ピヒア・パストリス(*Pichia pastoris*)またはコリ (*E. coli*)からの組替え(S)ーHNLを使用するのが有利である。

40

【0052】

適する(R)ーHNLは例えばプルナス・アミグダルス(*Prunus amygdalus*)、プルナス・ラウロセラス(*Prunus laurocerasus*)またはプルナス・セロチナ(*Prunus serotina*)からの(R)ーヒドロキシニトリルーリアーゼ、または組替え(R)ーHNLである。

【0053】

50

プルヌス・アミグダルスからの (R) -ヒドロキシニトリル-リアーゼ、または組替え (R) -HNL を使用するのが有利である。

【0054】

適する (R) -および (S) -HNL は例えば国際特許第 97/03204 号明細書、ヨーロッパ特許第 0,969,095 号明細書、同第 0,951,561 号明細書、同第 0,927,766 号明細書、同第 0,632,130 号明細書、同第 0,547,655 号明細書、同第 0,326,063 号明細書、国際特許第 01/44487 号明細書等に開示されている。

【0055】

1 g のケトンあたり約 0.1 ~ 20 g の希釈剤および 10 ~ 50,000 IU、好ましくは 1000 ~ 40,000 IU の活性のヒドロキシニトリル-リアーゼを添加する。

10

【0056】

反応混合物を約 -10 °C からヒドロキシニトリル-リアーゼの失活温度までの温度、好ましくは -5 °C ~ +30 °C で震盪または攪拌するか、反応をエマルジョン状態で行う場合には 0 °C ~ 約 +30 °C の温度で攪拌してエマルジョンを生成する。反応をエマルジョン状態で実施した場合には、反応混合物を後処理するためにおよび生じたシアンヒドリンを単離するために、最初にエマルジョンを解乳化する慣用の技術、例えば濾過、遠心分離または合体 (coalescence) を使用する。次いで生じる相を場合によっては解乳化剤を添加して分離しそして生成物含有相を後処理する。

【0057】

20

最終生成物に依存して相応するシアンヒドリンを生成するために、公知の技術、例えば蒸留、抽出または結晶化を使用する。こうして生成されるシアノヒドリンは、場合によっては更に加工する前に酸の添加によって安定化させることができる。

【0058】

抽出する場合には、水非混和性の有機溶剤、例えば脂肪族または芳香族の非ハロゲン化またはハロゲン化炭化水素、例えばペンタン、ヘキサン、ベンゼン、トルエン、メチレンクロライド、クロロホルム、クロロベンゼン類、エーテル、例えば第三ブチルメチルエーテル、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテルまたはエステル類、例えば酢酸エチルまたはかかる溶剤の混合物を使用する。

【0059】

30

抽出された生成物の純度が十分でない場合には、精製操作を次に行う。この精製は公知の方法で行うことができ、クロマトグラフィーで行うのが十分であり最も好ましい。

【0060】

本発明に従って製造される式 (I) の (R) -または (S) -シアノヒドリンは高収率で得られかつ非常に高い純度を有している。

【0061】

式 (I) のシアンヒドリンは所望の場合には更に加工してもよく、結果として相応するヒドロキシカルボン酸、そのエステルおよび相応するエーテルまたはアミドを得ることができる。

【0062】

40

式 (I) の相応する (R) -または (S) -シアノヒドリンは例えば抽出後にまたは場合によっては酵素を濾去しそして溶剤を留去した後に、従来技術、例えば Angew. Chem. 1994, 106, 1615 または Tetrahedron Letters 1990, 第 31 巻, No. 9, 1249-1252 に記載されているのと同様にして、更に精製することなしに濃硫酸で加水分解することができる。加水分解のためには他の適当な酸、例えば H_2SO_4 を使用することもできるが、HCl を使用するのが有利である。

【0063】

得られる (R) -および (S) - α -ヒドロキシカルボン酸を次いで場合によってはヨーロッパ特許第 1,148,042 号明細書に記載されている様に再結晶化することによって精製することができる。

50

【0064】

(R)－および(S)－ α －ヒドロキシカルボン酸はBull. Chem. Soc. Jpn., 1967, 40, 373-378に記載されている様にAg塩の存在下にアルキル沃化化合物、例えば沃化メチルと反応させることによって相応するエーテルに転化することができる。

【0065】

相応するアミドは例えば、例えばTetrahedron Asymmetry, 1997, 8, 3503-3511に記載されている様に CH_2Cl_2 中で 0°C で HBF_4 で部分加水分解することによって式(I)のシアンヒドリンから製造することができる。

【0066】

相応するエステルは例えば、例えばTetrahedron, 1998, 54, 1447-1448に記載されている様に CH_2Cl_2 中でアセチルクロライドおよびピリジンでアシル化することによって製造される。

【0067】

それ故に本発明は本発明に従って製造された式(I)の(R)－または(S)－シアンヒドリンを相応するヒドロキシカルボン酸、エーテル、エステルおよびアミドを製造するために使用することにも関する。

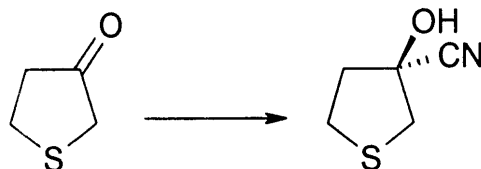
【0068】

【実施例】

実施例1：(S)－3－シアノテトラヒドロチオフエン－3－オールの合成

【0069】

【化5】



【0070】

10.2gの(0.1モル)の4,5-ジヒドロ-3(2H)-チオフエノン(35mLの第三ブチルメチルエーテルに溶解しそして 0°C に冷却する。

【0071】

6,500IU/mLの活性を有するパラゴムノキ(Hevea)-ブラジリエンシス(brasilien sis)からの31mLの(S)－HNLをpH4.00の24mLの50ミリモル濃度 K_2HPO_4 /クエン酸塩緩衝液と混合しそして10%濃度クエン酸を用いてpH4.50とする。水性酵素溶液を有機溶液に添加しそして 0°C で5分攪拌してエマルジョンとする。13.5g(0.5モル)のHCNをこの反応溶液に激しい攪拌下に40分の間に添加する。75分後に、反応させるために100mLの第三ブチルメチルエーテルを滴加しそしてこの混合物を更に30分攪拌する。

【0072】

相分離が完了した後に水性相を再び100mLの第三ブチルメチルエーテルで抽出処理しそして一緒にした有機相を Na_2SO_4 で乾燥し、濾過しそして溶剤を除く。

【0073】

収量：10.26gの黄色の油(79.4%の収率、91.3%ee)

実施例2：(S)－3－ヒドロキシテトラヒドロチオフエン－3－カルボン酸の合成

【0074】

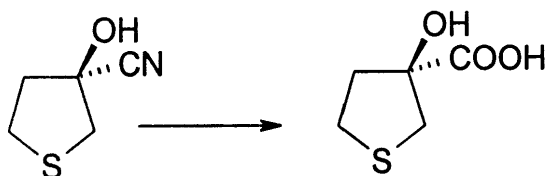
【化6】

10

20

30

40



【0075】

実施例1における様にして製造した6.0g (0.046モル)の(S)-3-シアノテトラヒドロチオフェン-3-オールを15.4mLの濃厚なHClに懸濁させそして70℃に加熱する。70℃で15時間攪拌した後に、この溶液を冷却し、水性NaOHを用いて塩基性にしそして第三ブチルメチルエーテルで2度抽出処理する。黄色の水相をHClでpH1に調整し、第三ブチルメチルエーテルで抽出処理する。一緒にした第三ブチルメチルエーテル相をNaCl溶液で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、濾過しそして溶剤を除く。

10

【0076】

収量：3.85gのベージュ色の固体(55.9%の収率、91.3% ee)。

【0077】

酸のキラリティーを測定するために、(S)-フェニルエチルアミンとの塩を製造しそしてこの酸を絶対立体配置をそのx-線構造解析により測定する。

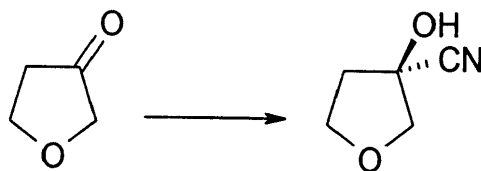
【0078】

20

実施例3：(S)-3-シアノテトラヒドロフラン-3-オールの合成

【0079】

【化7】



【0080】

30

0.52g (6.05ミリモル)の4,5-ジヒドロ-3(2H)-フランオンを3.5mLの第三ブチルメチルエーテルに溶解しそして0℃に冷却する。

【0081】

2,100IU/mLの活性を有するプルナス・アミグダルス (*Prunus amygdalus*)からの3.10mLの(S)-HNLをpH4.00の2.4mLの50ミリモル濃度K₂HPO₄/クエン酸塩緩衝液と混合しそして10%濃度クエン酸を用いてpH4.50とする。この水相を有機相に添加しそして0℃で5分攪拌する。次いで0.76g (28ミリモル)のHCNを一度に全部添加しそして1時間攪拌する。この反応溶液を第三ブチルメチルエーテルで三度抽出処理しそして一緒にした有機相から溶剤を除く。

【0082】

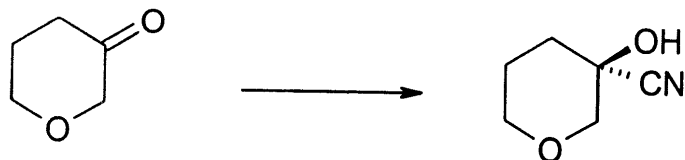
40

収量：24% eeで92%の転化率(明るい黄色の油)

実施例4：(S)-3-シアノテトラヒドロピラン-3-オールの合成

【0083】

【化8】



50

【0084】

0.200 g (2ミリモル) のテトラヒドロ-4H-ピラン-3-オンを3 mLの第三ブチルメチルエーテルに溶解しそして0℃に冷却する。

【0085】

5, 100 IU/mLの活性を有するパラゴムノキ(Hevea)-ブラジリエンシス(brasilien sis)からの0.3 mLの(S)-HNLを3 mLの蒸留水と混合しそして10%のクエン酸でpH 4.70に調整する。この酵素水溶液を有機性溶液に添加しそして0℃で15分攪拌してエマルジョンを得る。次いで0.3 mL (8.8ミリモル) のHCNを反応溶液に添加する。0℃で60分攪拌した後に、3 mLの第三ブチルメチルエーテルを、反応させるために添加し、そして0.5 gのCelite^(R) 545、水および酵素と結合させる。次いでこの混合物をNa₂SO₄で乾燥し、濾過しそして溶剤を除く。

10

【0086】

収量：(転化率98%) 44% eeの(S)-3-シアノテトラヒドロピラン-3-オールは無色の油状物。

【0087】

分析の目的でシアニドリンを相応する酢酸塩に転化する。以下の特徴を示す：

44% ee; ¹H NMR: δ (ppm) 4.05 (d, J = 12.1 Hz, 1H; H-2), 3.51 (d, 1H, H-2'), 3.87-3.61 (m, 2H; H-6, H-6'), 2.38 (m, 1H; H-4), 2.15 (m, 1H; H-4'), 2.13 (s, 3H; Ac-CH₃), 1.85 (m, 2H; H-5, H-5'); ¹³C NMR: δ (ppm), 168.99 (Ac-C=O), 117.39 (CN), 68.93, 68.09 (C-2, C-6), 32.83, 30.52 (C-4, C-5), 22.03 (Ac-CH₃)。

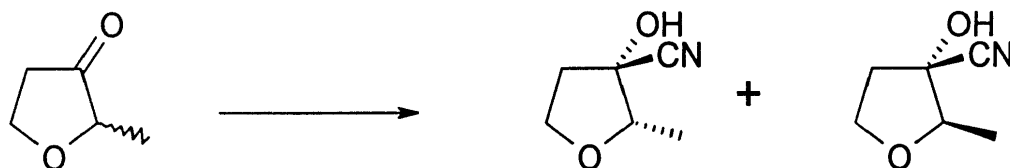
20

【0088】

実施例5: rac-2-メチルテトラヒドロフラン-3-オンの反応

【0089】

【化9】



30

【0090】

0.200 g (2ミリモル) の2-メチルテトラヒドロフラン-3-オンを3 mLの第三ブチルメチルエーテルに溶解しそして0℃に冷却する。

【0091】

5, 100 IU/mLの活性を有するパラゴムノキ(Hevea)-ブラジリエンシス(brasilien sis)からの1.5 mLの(S)-HNLを1.5 mLの蒸留水で希釈し、そして10%のクエン酸でpH 5.20に調整する。この酵素水溶液を有機性溶液に添加しそして0℃で15分攪拌してエマルジョンを得る。次いで0.3 mL (8.8ミリモル) のHCNを反応溶液に添加する。0℃で60分攪拌した後に、3 mLの第三ブチルメチルエーテルを、反応させるために添加しそして0.5 gのCelite^(R) 545、水および酵素と結合させる。次いでこの混合物をNa₂SO₄で乾燥し、濾過しそして溶剤を除く。

40

【0092】

収量：(転化率99%) 3-シアノ-2-メチルテトラヒドロフラン-3-オールの無色の油状物。

【0093】

分析の目的でシアニドリンを相応する酢酸塩に転化する。以下の特徴を示す：

(+)-シス-異性体: 27% de; ¹H NMR: δ (ppm) 4.13-4.04

50

(m, 1H; H-5)、4.04 (qu, J=6.3 Hz, 1H; H-2)、3.85 (ddd, J=18.0、8.8、6.9 Hz, 1H; H-5'), 2.71 (ddd, J=14.0、8.8、8.2 Hz, 1H; H-4)、2.43 (ddd, J=14.0、6.9、3.5 Hz, 1H; H-4'), 2.15 (s, 3H; Ac-CH₃)、1.50 (d, J=6.3 Hz, 3H; CH₃) ; ¹³C NMR: δ (ppm)、169.23 (Ac-C=O)、116.35 (CN)、81.98 (C-5)、78.78 (C-3)、65.87 (C-2)、38.66 (C-4)、20.79 (Ac-CH₃)、17.32 (CH₃)。

【0094】

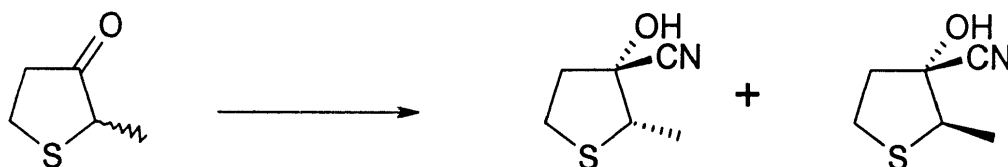
(+) -トランス-異性体: 50% de ; ¹H NMR: δ (ppm) 4.13-4.02 (m, 1H; H-5)、4.11 (qu, J=6.3 Hz, 1H, H-2)、3.88 (ddd, J=17.6、8.5、7.3 Hz, 1H, H-5'), 2.78 (ddd, J=14.6、8.3、5.4 Hz, 1H; H-4)、2.51 (ddd, J=14.6、8.5、7.3 Hz, 1H; H-4')、2.16 (s, 3H; Ac-CH₃)、1.40 (d, J=6.3 Hz, 3H; CH₃) ; ¹³C NMR: δ (ppm)、169.12 (Ac-C=O)、117.05 (CN)、82.09 (C-5)、75.20 (C-3)、65.84 (C-2)、38.70 (C-4)、20.70 (Ac-CH₃)、13.32 (CH₃)。

【0095】

実施例 6: rac-2-メチルテトラヒドロチオフエン-3-オンの反応

【0096】

【化10】



【0097】

0.232 g (2ミリモル)の2-メチルテトラヒドロチオフエン-3-オンを3 mLの第三ブチルメチルエーテルに溶解しそして0℃に冷却する。

【0098】

5, 100 IU/mLの活性を有するパラゴムノキ(Hevea)-ブラジリエンシス(brasilien sis)からの1 mLの(S)-HNLを2 mLの蒸留水で希釈し、そして10%のクエン酸でpH 4.40に調整する。この酵素水溶液を有機性溶液に添加しそして0℃で15分攪拌してエマルジョンを得る。次いで0.3 mL (8.8ミリモル)のHCNを反応溶液に添加する。0℃で60分攪拌した後に、3 mLの第三ブチルメチルエーテルを、反応させるために添加しそして0.5 gのCellite^(R) 545、水および酵素と結合させる。次いでこの混合物をNa₂SO₄で乾燥し、濾過しそして溶剤を除く。

【0099】

収量: (転化率90%) 3-シアノ-2-メチルテトラヒドロチオフエン-3-オールの黄色の油状物。

【0100】

分析の目的でシアンヒドリンを相応する酢酸塩に転化する。以下の特徴を示す:

(+) -シス-異性体: 10% de ; ¹H NMR: δ (ppm) 3.65 (qu, J=6.9 Hz, 1H; H-2)、3.12-2.70 (m, 3H; H-4、H-5、H-5')、2.58-2.37 (m, 1H; H-4')、2.10 (s, 3H; Ac-CH₃)、1.47 (d, J=6.9 Hz, 3H; CH₃) ; ¹³C NMR: δ (ppm)、169.02 (Ac-C=O)、115.54 (CN)、81.38 (C-3)、48.06 (C-2)、38.70 (C-4)、26.95 (C-5)、20.98 (Ac-CH

₃)、19.48 (CH₃)。

【0101】

(+) -トランス-異性体：10% de；¹H NMR：δ (ppm) 3.85 (qu、J=6.9 Hz、1H、H-2)、3.12-2.70 (m、3H；H-4、H-5、H-5')、2.58-2.37 (m、1H、H-4')、2.14 (s、3H；Ac-CH₃) 1.34 (d、J=6.9 Hz；3H；CH₃)；¹³C NMR：δ (ppm)、168.97 (Ac-C=O)、117.00 (CN)、78.48 (C-3)、78.74 (C-2)、38.66 (C-4)、26.34 (C-5)、20.88 (Ac-CH₃)、15.62 (CH₃)。

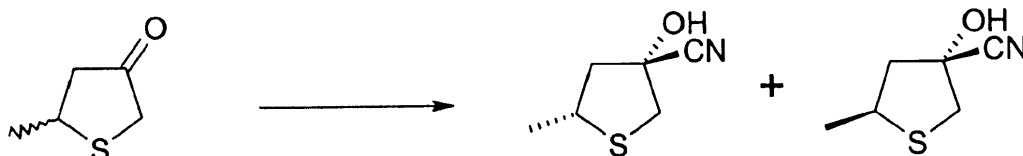
【0102】

10

実施例7：rac-5-メチルテトラヒドロチオフエン-3-オンの反応

【0103】

【化11】



【0104】

20

0.232 g (2ミリモル)の2-メチルテトラヒドロチオフエン-3-オンを3 mLの第三ブチルメチルエーテルに溶解しそして0℃に冷却する。

【0105】

250 IU/mLの活性を有するプルヌス・アミグダルス (Prunus amygdalus) からの3 mLの(R)-HNLを10%濃度クエン酸でpH4.30に調整する。この酵素水溶液を有機性溶液に添加しそして0℃で15分攪拌してエマルジョンを得る。次いで0.3 mL (8.8ミリモル)のHCNを反応溶液に添加する。0℃で60分攪拌した後に、3 mLの第三ブチルメチルエーテルを、反応させるために添加しそして0.5 gのCelite^(R) 545、水および酵素と結合させる。次いでこの混合物をNa₂SO₄で乾燥し、濾過しそして溶剤を除く。

30

【0106】

収量：(転化率95%) 3-シアノ-5-メチルテトラヒドロチオフエン-3-オールの黄色の油状物。

【0107】

分析の目的でシアンヒドリンを相応する酢酸塩に転化する。以下の特徴を示す：

(-) -シス-異性体：86% de；¹H NMR：δ (ppm) 3.75-3.3.6 (m、3H；H-5、H-2、H-2')、2.81 (dd、J=13.2、6.6 Hz、1H、H-4)、2.11 (m、1H；H-4')、2.13 (s、3H；Ac-CH₃)、1.41 (d、J=6.8 Hz、3H；CH₃)；¹³C NMR：δ (ppm)、168.97 (Ac-C=O)、117.02 (CN)、76.67 (C-3)、49.35 (C-2)、41.24 (C-4)、38.51 (C-5)、22.00 (Ac-CH₃)、20.63 (CH₃)。

40

【0108】

(-) -トランス-異性体：95% de；¹H NMR：δ (ppm) 3.70 (m、1H、H-5)、3.62 (d、J=11.9 Hz、1H；H-2)、3.28 (d、J=11.9 Hz、1H；H-2')、2.88 (dd、J=13.2、6.6 Hz、1H；H-4)、2.12 (dd、J=13.2 Hz、1H；H-4')、2.13 (s、3H；Ac-CH₃)、1.40 (d、J=6.8 Hz、3H；CH₃)；¹³C NMR：δ (ppm)、168.99 (Ac-C=O)、117.47 (CN)、77.41 (C-3)、48.47 (C-2)、40.54 (C-4)、38.51 (C-5)、21.9

50

9 (A c - C H₃) 、 2 0 . 8 9 (C H₃) 。

フロントページの続き

- (74)代理人 100111486
弁理士 鍛冶澤 實
- (72)発明者 ペーター・ペヒラウアー
オーストリア国、リンツ、アム・ペストリングベルク、5
- (72)発明者 ヴォルフガング・スクランク
オーストリア国、ウィーン、オーバーフェルトガッセ、23
- (72)発明者 ヘルベルト・マイローファー
オーストリア国、エンガーヴィッツドルフ、フライシュテッターストラーセ、62
- (72)発明者 イルマ・ヴィルト
オーストリア国、エンス、ゼヴェリヌスストラーセ、4
- (72)発明者 ルードルフ・ノイホーファー
オーストリア国、ミッタートレッフリング、ライトナーストラーセ、4
- (72)発明者 ヘアリート・グリーングル
オーストリア国、グラーツ、アルゲノートストラーセ、23
- (72)発明者 マルティン・フェヒター
オーストリア国、グラーツ、フェリンガーストラーセ、11デー

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 特開2001-120289 (JP, A)
特開2000-125886 (JP, A)
特開2001-346595 (JP, A)
特開2001-346596 (JP, A)
特開2001-348356 (JP, A)
特開平5-317065 (JP, A)
特表2001-513625 (JP, A)
特開2001-190275 (JP, A)
特開2000-217590 (JP, A)
Tetrahedron, 1998年11月26日, Vol.54, No.48, p.14477-14486,

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 13/00 -13/24

C12P 17/00 -17/18

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAPLUS(STN)

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)