

# MICROTOX™ 試験における針葉樹樹皮抽出物による 生物発光阻害

澁谷 栄\*・鮫島正浩\*・佐分義正\*・鱈迫典久\*\*

## Anti-Bioluminescent Activity of Coniferous Bark Extracts on MICROTOX™ Test

Sakae SHIBUTANI\*, Masahiro SAMEJIMA\*, Yoshimasa SABURI\*  
and Norihisa TATARAZAKO\*\*

### I. 緒 言

木材工業やパルプ工業では多量の針葉樹材が利用されているが、その過程で多くの樹皮が副産される。これらの樹皮は現時点ではあまり有効に利用されることなく廃棄されており、しばしば環境中に放置される場合もある。針葉樹の樹皮中には脂肪酸、ワックス、樹脂酸、タンニンなどの抽出成分が多量に含有されている。これら抽出成分は多くの生理活性を持ち、樹木の生体防御のために生産されていると考えられるため<sup>1)</sup>、これらが土壌や河川などに多量に浸出すると天然物といえども環境に大きなインパクトを与える可能性も指摘されている<sup>2)</sup>。

MICROTOX™ 試験は感度が高く、またその簡便性から急性毒性の試験法として広く用いられている<sup>3, 4, 5)</sup>。この方法はバクテリア *Photobacterium phosphoreum* の生物発光に対する阻害活性を利用したものである。細菌の生物発光過程では呼吸代謝により生成した還元型フラビンモノヌクレオチド (FMNH<sub>2</sub>) が O<sub>2</sub> により酸化され、その際に電子受容体である長鎖飽和アルデヒド存在下で過酸化フラビンモノヌクレオチド (FMN) を形成する。過酸化 FMN は FMN と H<sub>2</sub>O に分解されるが、これに伴い蛍光が生じる<sup>6, 7, 8)</sup>。蛍光の強度は FMNH<sub>2</sub> の量に依存しているため、何らかの毒物が存在すると呼吸代謝の阻害が生じ、その結果として FMNH<sub>2</sub> の減少を引き起こし、これが発光減少として検出される。

このような背景から、本研究では日本産針葉樹の樹皮抽出物について MICROTOX™ 法による生物発光阻害試験を行い、その環境毒性を評価し、さらに阻害原因物質の同定を行った。

### II. 実 験

#### 1. 樹皮試料の調製

以下に示す産業的に重要な日本産針葉樹 6 種の樹皮を実験に供した。スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don), ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.), トドマツ (*Abies sachalinensis* Fr. Schm.), アカエゾマツ (*Picea glehnii* Fr. Schm.), カラマツ (*Larix leptolepis* Sieb. et Zucc.), ア

\* 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻

Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo.

\*\* 日本紙パルプ研究所

Japan Paper and Pulp Research Institute.

カマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)。これらの樹皮のうちスギ、ヒノキ、アカマツは東京大学農学部附属千葉演習林から、トドマツ、アカエゾマツ、カラマツは東京大学農学部附属北海道演習林から、それぞれ提供を受けた。採集した樹皮は、風乾させた後、ウィリーミルによって粉碎し、1 mm 篩いを通過した樹皮粉を抽出用試料として用いた。

## 2. 抽出

50 g の樹皮粉試料を 500 mL の *n*-ヘキサンを用いて室温下で 24 時間、浸せき抽出した。得られた抽出物をろ別し、残った樹皮粉を同量の *n*-ヘキサンを用いて再度同様に抽出した。これら 2 回の抽出によって得られた抽出液は一つにまとめ、溶媒を溜去させたのち、乾固物の重量を測定した。酢酸エチル抽出物は *n*-ヘキサン抽出後の残った樹皮粉を酢酸エチルを用い同様の手順に従って 2 回抽出を行うことにより得た。

## 3. MICROTOX™ 試験

1 mg の各抽出物を 1 mL のジメチルスルホキシドに溶解させ試験用原液とした。この原液を適宜希釈して、メーカーのユーザーズマニュアル (AZURU Environmental Co., USA) に従い MICROTOX™ 試験を行った。ここで、*Photobacterium phosphoreum* による生物発光は、試験開始後 15 分間後の発光量で測定し、コントロールに対して発光量を 1/2 に減少させる試料濃度を EC<sub>50</sub> (EC: Effective Concentration) として、これを式  $[TI_{50}] = 100/[EC_{50}]$  に代入して毒性指数 (TI: Toxicity Index) を求めた。

## 4. トドマツ由来の *n*-ヘキサン抽出物の分画

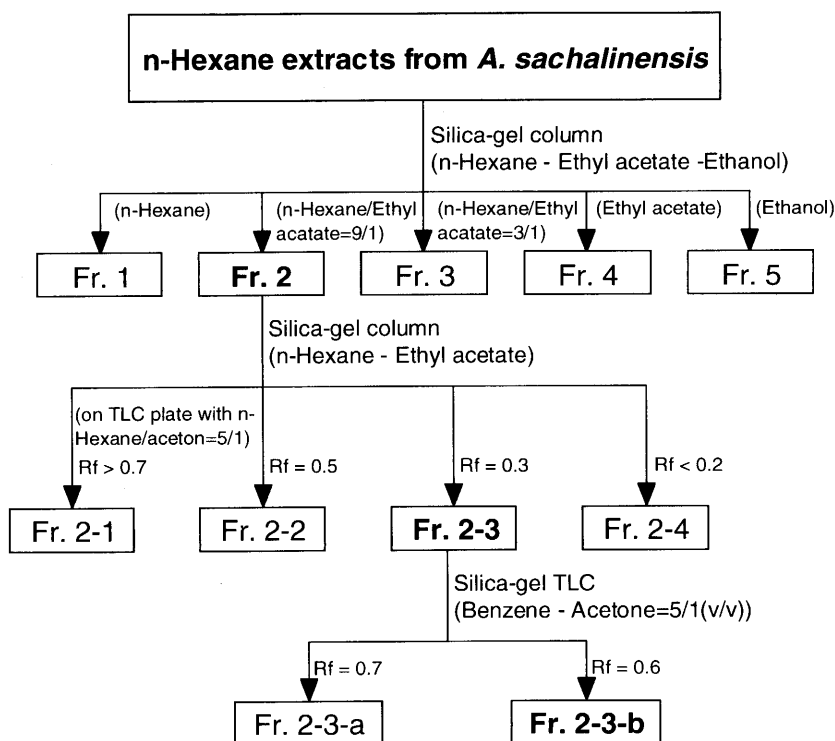
トドマツ樹皮由来の *n*-ヘキサン抽出成分を 3 段階のクロマトグラフィーで分画し、発光阻害の原因物質を精製した。精製過程の概略は図-1 に示した。まず、3.59 g の粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30×300 mm, Wako-gel C-200, 和光純薬(株)) をもちいて以下に示す展開溶媒により分画し、各溶媒毎の溶出物を画分としてまとめた: *n*-ヘキサン, 2.0 L (画分 1); *n*-ヘキサン/酢酸エチル=9/1 (v/v), 1.5 L (画分 2); *n*-ヘキサン/酢酸エチル=3/1 (v/v), 1.0 L (画分 3); 酢酸エチル, 1.0 L (画分 4); エタノール, 1.0 L (画分 5)。各画分に対して MICROTOX™ 試験を行い、ここで最も強い発光阻害活性が認められた画分 2 (1.46 g) に対し

表-1 針葉樹樹皮の抽出物量  
Table 1. Amounts of extracts from coniferous barks tested

	<i>n</i> -Hexane extracts	Ethyl acetate extracts	Total
<i>Picea glehnii</i>	6.40%*	18.6%*	25.0%*
<i>Abies schaliniensis</i>	7.98	4.62	12.6
<i>Larix leptolepis</i>	1.84	7.08	8.92
<i>Cryptomeria japonica</i>	1.52	7.00	8.52
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	2.34	5.06	7.40
<i>Pinus densiflora</i>	3.94	1.94	4.88

\* 乾燥樹皮粉に対する重量パーセント

\* Percentage by the weight of oven-dried bark meals

図-1 トドマツ樹皮の *n*-ヘキサン抽出物の分画Fig. 1. Fractionation of *n*-hexane extracts from the bark of *Abies sachalinensis*.

て、同様のカラムで展開溶媒 *n*-ヘキサン/酢酸エチル=12/1 (v/v) を用いて、再度精製を行った。2 段目のカラムクロマトグラフィーでは 18 mL 毎にフラクションを分け取った。各フラクションに対して TLC プレート (TLC aluminium sheets, Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck Co. Darmstadt, Germany) を用いて、*n*-hexane/acetone=5/1 (v/v) で展開を行い、その後硫酸処理によりプレート上で発色させ、同じ *R<sub>f</sub>* 値に主要構成成分のスポットを与えるものを一つの画分としてまとめた。各画分を与える *R<sub>f</sub>* 値は次の通りである。画分 2-1: *R<sub>f</sub>* 値>0.7, 画分 2-2: *R<sub>f</sub>* 値=0.5, 画分 2-3: *R<sub>f</sub>* 値=0.3, 画分 2-4: *R<sub>f</sub>* 値<0.2。得られた各画分 2-1~2-4 について MICROTOX™ 試験を行った。その結果、最も活性の強い活性を示した画分 2-3 (102 mg) を、さらにベンゼン/アセトン=5/1 (v/v) の展開溶媒を用いた分取用シリカゲルクロマトグラフィー (TLC plates, Silica gel 60, Merck Co. Darmstadt, Germany) で精製し、画分 2-3-a (*R<sub>f</sub>*=0.7), および画分 2-3-b (*R<sub>f</sub>*=0.6) を得た。ここでも、それぞれについて MICROTOX™ 試験を行った。

## 5. 原因物質の機器分析

MICROTOX™ 試験において最も強力な発光阻害活性を与えた最終精製画分 2-3-b について 5% 塩化水素メタノール溶液 (和光純薬(株)) を用いてメチル化を行い、GC-MS で構成成分の分析を行った。分析条件は以下の通りである。分析機器: GC-MS (M-4100, 日立社製), キャリヤー

ガス: He, 流速: 1.0 mL/min, カラム名: Ultra-1 (0.20 mm i.d. × 25 m, Hewlett Packard Co.), カラム初期温度: 60°C, 昇温速度: 30°C/min (60–200°C) → 5°C/min (200–280°C), 最終温度: 280°C, イオン加速電: 6 kV。さらに, この画分について  $^{13}\text{C}$ -NMR を測定した。分析機種は AC-300 (Bruker 社製), 測定溶媒は  $\text{CDCl}_3$  を用い, また標準物質として TMS を用いた。なお, GC-MS 分析の結果をもとに標品としてオレイン酸 (東京化成(株)) についての  $^{13}\text{C}$ -NMR 分析を行いスペクトルの比較も行った。

#### 6. *n*-ヘキサン抽出物中のオレイン酸量の定量

*n*-ヘキサン抽出物中のオレイン酸の定量は各樹皮の抽出物を *N,O*-ビス-TMS-トリフルオロアセトアミド (東京化成(株)) を用いて TMS 化した後, ガスクロマトグラフィー分析し, 相当ピーク面積と標品のそれとの比較により行った。分析条件は以下の通り。分析機器: ガスクロマトグラフィー: GC-6A (島津製作所(株)), カラム名: TC-1 (0.25 mm i.d. × 30 m, GL サイエンス社製), カラム初期温度: 150 °C, 昇温速度: 5.0°C/min, 最終温度: 280°C, キャリアーガス:  $\text{N}_2$ , 流速: 1.0 mL/min。

### III. 結 果

#### 1. 針葉樹樹皮抽出物の生物発光阻害

MICROTOX<sup>TM</sup> 試験を用いて樹皮抽出物の生物発光阻害活性を調べた結果を図-2 に示す。いずれの樹種においても, 酢酸エチル抽出物よりも *n*-ヘキサン抽出物の方が強い生物発光阻害活性を示している。さらに供試した樹種中では, トドマツとアカマツ樹皮から得た *n*-ヘキサン抽出物

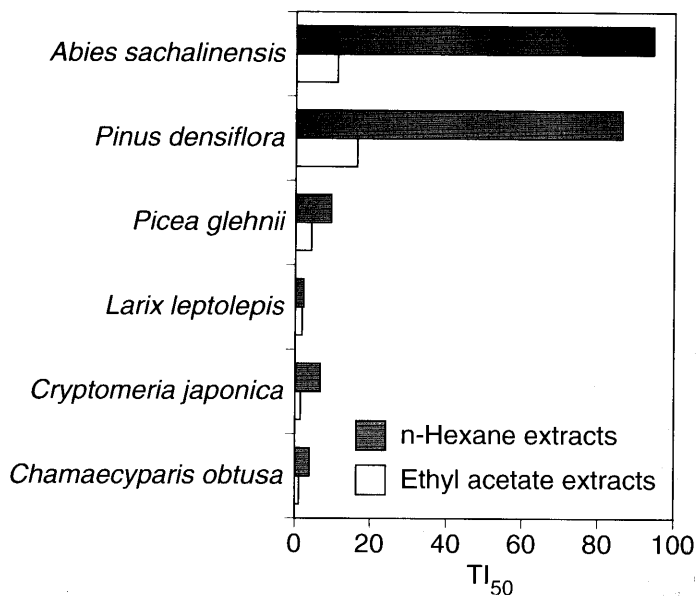


図-2 針葉樹樹皮抽出物の生物発光阻害活性

Fig. 2. Anti-bioluminescent activity of extracts from coniferous barks.

の  $TI_{50}$  値が、それぞれ 94.3, 86.2 と高い値を示している。従って、これらの抽出物の中には非常に強力な生物発光の阻害活性物質が存在することが明らかとなった。

## 2. トドマツ樹皮 *n*-ヘキサン抽出物中の生物発光阻害物質

トドマツ樹皮 *n*-ヘキサン抽出物に対して、3 段階のクロマトグラフィーを行い生物発光阻害の原因物質を精製した。また、得られた各画分の  $TI_{50}$  値を図-3 に示した。粗抽出物をシリカゲルカラムで精製した 1 段階目の分画では、展開溶媒 *n*-ヘキサン/酢酸エチル=9/1 (v/v) で溶出された画分である画分 2 に  $TI_{50}$  値が 45.5 と他のものに比べ強い活性が認められた。さらに、画分 2 を同様のシリカゲルカラムで展開溶媒組成を変えて精製すると、TLC 分析で *R<sub>f</sub>* 値 0.3 に主要成分を与え、また MICROTOX™ 試験で  $TI_{50}$ =76.9 を与える画分 2-3 が得られた。さらに、これを分取用 TLC で精製することによって、分取用 TLC 上で *R<sub>f</sub>* 値 0.6 の物質を主要成分とする  $TI_{50}$ =286 を持つ画分 2-3-b を得た。この画分についてメチル化を行ったのち、その構成成分をガスクロマトグラフィーを用いて分析したところ、図-4 に示すように主成分はクロマトグラム上で保持時間 13.95 分に主要成分のピークを与え、さらに MS 分析ではメチル化物の分子イオンピークを 296 (M/Z) に与える物質であることがわかった。この画分について  $^{13}C$ -NMR を用いてその化学構造を調べると、そのスペクトルはオレイン酸標品のものとほぼ完全に一致することが明らかとなった。以上のことから、トドマツ樹皮抽出物に含まれる主要な発光阻害物質はオレイン酸であると同定された。

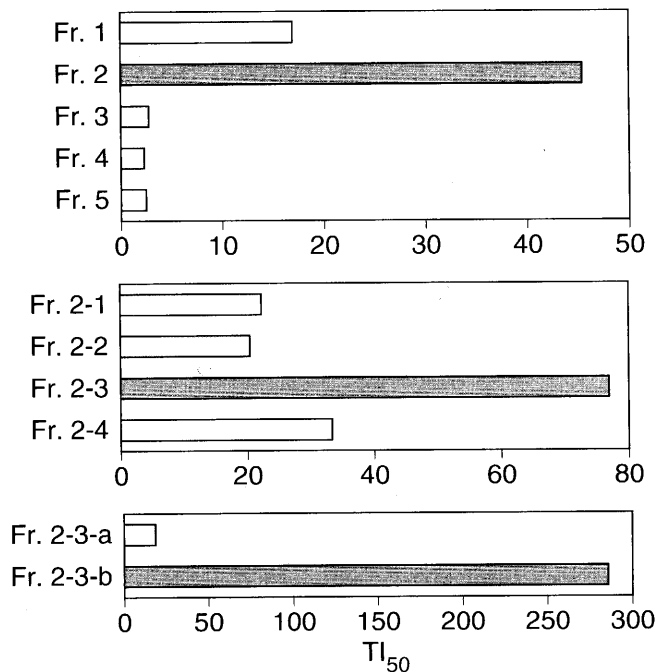


図-3 トドマツ樹皮の *n*-ヘキサン抽出物の分画による生物発光阻害活性

Fig. 3. Anti-bioluminescent activity of each fraction of *n*-hexane extracts from the bark of *A. sachalinensis*.

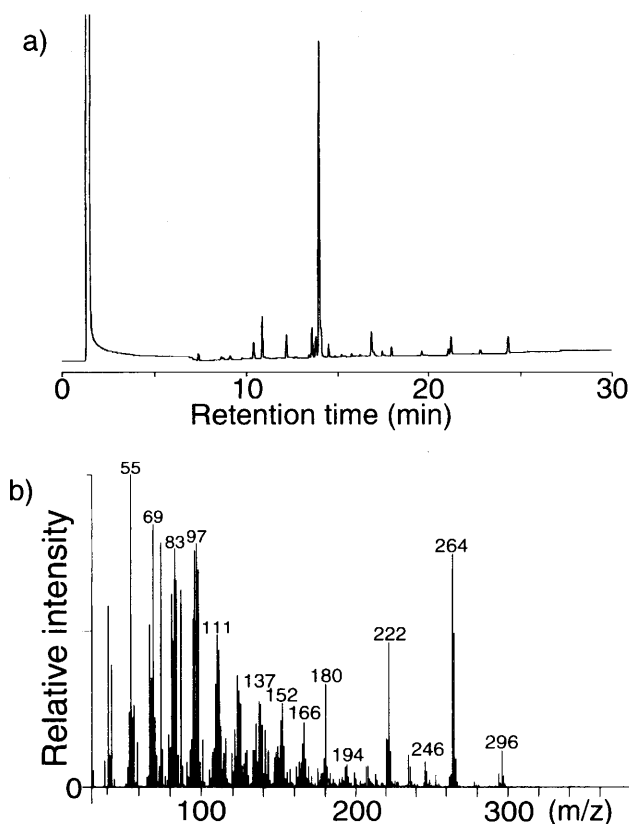


図-4 トドマツ樹皮の*n*-ヘキサン抽出物から精製した分画 2-3-b (メチル化物) の a) ガスクロマトグラムと b) その主要構成成分 (r.t. 13.95 min) のマススペクトル

Fig. 4. a) Gas chromatogram and b) mass spectrum of the major component (r.t. 13.95 min) in Fr. 2-3-b from the *n*-hexane extracts of *A. sachalinensis* bark.

### 3. オレイン酸関連化合物による生物発光活性の阻害

オレイン酸およびその関連化合物による *P. phosphoreum* の生物発光の阻害活性を調べた結果を表-2 に示す。オレイン酸と同様に非常に強力な阻害活性を示したのは炭素数 18 の脂肪酸の中で *Z* 型の不飽和二重結合を 9 位に有する脂肪酸類であった。対照的に炭素数 18 の飽和脂肪酸でも飽和脂肪酸であるステアリン酸や、オレイン酸と同様に 9 位に不飽和二重結合を持つがカルボキシル基を有さないオレイルアルコールでは非常に阻害効果が低かった。また、バクセン酸、ペトロセリン酸といった 9 位以外の箇所に不飽和二重結合を有する炭素数 18 の他の脂肪酸や、9 位に不飽和二重結合を有するが *E* 型であるエライジン酸でも、オレイン酸の場合に比べると活性は非常に弱いものであった。これらの結果から、脂肪酸における不飽和二重結合の存在、その位置ならびに立体配置の違い、ならびにカルボキシル基の存在が *P. phosphoreum* に対する発光阻害に非常に影響を与えることが判明した。

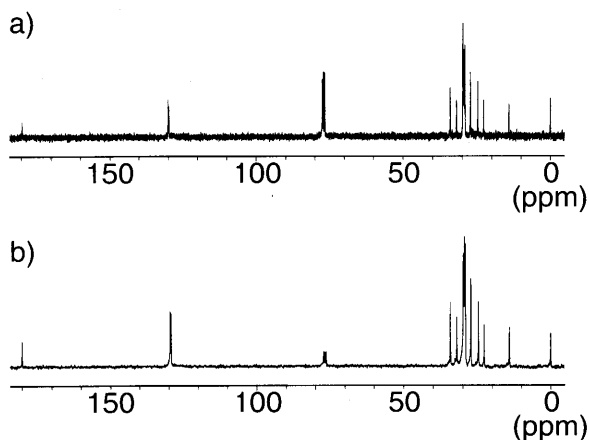


図-5  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル. a) Fr. 2-3-b, b) オレイン酸標品  
Fig. 5.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum. a) Fr. 2-3-b, b) Authentic oleic acid.

表-2 脂肪酸類ならびに関連化合物の生物発光阻害

Table 2. Anti-bioluminescent activity of fatty acids and related compounds

Compounds	No. of carbon: double bonds	Position of double bonds	TI <sub>50</sub>
stearic acid	18:00	—	< 1
petroselinic acid	18:01	6cis	14.2
oleic acid	18:01	9cis	684
elaidic acid	18:01	9trans	12.8
vaccenic acid	18:01	11cis	9.26
linoleic acid	18:02	9, 12cis	461
linoleinic acid	18:03	9, 12, 15cis	487
oleyl alcohol	18:01	9cis	< 1

表-3 針葉樹樹皮中のオレイン酸量

Table 3. Amounts of oleic acid in the coniferous barks

<i>Pinus densiflora</i>	4.0%*
<i>Abies schalinensis</i>	2.4
<i>Picea glehnii</i>	ND**
<i>Larix leptolepis</i>	ND
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	ND
<i>Cryptomeria japonica</i>	ND

\* 乾燥重量に対する重量パーセント

\* Percentage by the weight of oven-dried bark meals

\*\* ND: not detected

#### 4. 針葉樹樹皮中のオレイン酸量の定量

試供した 6 種の日本産針葉樹について、その樹皮から得た *n*-ヘキサン抽出物中のオレイン酸量を GC 分析により測定した。表-3 に示すようにトドマツ及びアカマツ樹皮の *n*-ヘキサン抽出物

中にはそれぞれ乾燥樹皮重量に対してに 2.4%, 4.0% のオレイン酸を含有していることが判明した。対照的に他の樹種の *n*-ヘキサン抽出物の GC 分析ではオレイン酸は検出されなかった。

#### IV. 考 察

本研究で対象としたすべての針葉樹樹皮の *n*-ヘキサン抽出物が MICROTOX™ 試験において発光阻害性を示した。しかし、中でもトドマツおよびアカマツ樹皮から得られた *n*-ヘキサン抽出物は非常に著しく強い発光阻害を示しており、これらの樹皮抽出物中に強力な代謝毒性物質が存在している可能性が示唆された。すでに、針葉樹樹皮中に主要成分として存在するアビエチン酸は魚毒性物質として知られており<sup>9)</sup>、MICROTOX™ 試験においても発光阻害活性を示すことが知られている<sup>3, 5)</sup>。しかしながら、これらの樹皮抽出物の阻害活性はアビエチン酸の阻害活性に比べてはるかに強いものであった。そこで、最も発光阻害の強かった画分から原因物質を精製したところ、オレイン酸が発光阻害物質として同定された。オレイン酸は植物に広く分布する不飽和脂肪酸である。したがって、オレイン酸をただちに代謝毒性物質と見なすことは困難であることから、何らかの別の理由により生物発光過程そのものを直接的に阻害した可能性も考えられる。脂肪酸における不飽和二重結合は活性酸素種と反応することが知られているが<sup>7)</sup>、Z 型のものに選択性が高いことから生物発光阻害は抗酸化作用の場合に類似した機構を考えることができる。すなわち、*P. phosphoreum* の光化学反応系において不飽和脂肪酸により酸素が消費され過酸化 FMN が生成されない可能性も存在する。

一方、オレイン酸は細胞膜中における主要構成成分としても知られることから、オレイン酸の添加により、細胞膜上におけるタンパク質複合体が影響を受け、その結果として発光阻害が生じた可能性も考えられる。

従来、MICROTOX™ 試験の結果と他の生物毒性試験の結果との間には相関性が認められる場合が多い<sup>4)</sup>。しかしながら、オレイン酸は強い発光阻害活性を示すにもかかわらず、*P. phosphoreum* の生育を阻害しない（データ未記載）。したがって、このことは MICROTOX™ 試験の結果を直ちに生物毒性と見なすことが困難であることを示している。本研究では MICROTOX™ 試験における発光阻害活性を指標に分画を行い原因物質について検索を行った。その結果、非常に発光阻害活性の強いオレイン酸が検出されたが、その一方でオレイン酸よりも MICROTOX™ 試験では発光阻害活性が弱くともアビエチン酸のように生物毒性を示す物質が樹皮抽出物中に存在しているので、樹皮抽出物の毒性については更に検討が必要である。

トドマツおよびアカマツの樹皮 *n*-ヘキサン抽出物では他の樹種に比べて著しく高いオレイン酸の含有が認められた。したがって、このことがトドマツ、およびアカマツ樹皮の *n*-ヘキサン抽出物の非常に強い発光阻害活性に対する理由であると判断した。

#### 謝 辞

本研究で用いた針葉樹樹皮を提供していただきました東京大学北海道演習林、ならびに千葉演習林の方々に深謝いたします。



## 要 旨

発光バクテリアにおける生物発光阻害に基づく MICROTOX™ 試験は、簡便な環境毒性試験として広く利用されている。本研究では、産業的に重要な 6 種の針葉樹の樹皮抽出物について、MICROTOX™ 試験における発光阻害活性を調べた。各樹皮から得た *n*-ヘキサン抽出物と酢酸エチル抽出物のうち、特に強い活性を示したのはアカマツとトドマツ樹皮の *n*-ヘキサン抽出物であった。トドマツ樹皮の *n*-ヘキサン抽出物から、その原因物質をカラムクロマトグラフィーなどで精製した。GC-MS 及び <sup>13</sup>C-NMR を用いてその化学構造を分析した結果、原因物質はオレイン酸であると同定した。そこで、MICROTOX™ 試験を用いてオレイン酸に関連するいくつかの化合物について、その発光阻害活性を調べたところ、炭素数 18 の脂肪酸で 9 位に Z 型の不飽和二重結合を持つものが非常に強い阻害活性を有することが明らかとなった。さらに、6 樹種の樹皮について *n*-ヘキサン抽出物中のオレイン酸量を定量したところ、アカマツとトドマツ樹皮にオレイン酸の含有率が特異的に高いことが認められた。以上のことから、針葉樹の樹皮抽出物の MICROTOX™ 試験における発光阻害の主要原因はオレイン酸の存在によると結論した。

キーワード：針葉樹樹皮、抽出成分、MICROTOX™ 試験、オレイン酸、環境毒性

## 引 用 文 献

- 1) Peter, E. L.: "Wood and Cellulosic Chemistry", David N.-S., Shiraishi N., ed., Marcel Dekker Inc., N.Y., 1991, pp. 257-330.
- 2) Dwight, B. E., LeRoy, G. B., Bette, A.: *Tappi J.*, **61**(10), 57-60 (1978).
- 3) Patoine, A., Manuel, M. F., Hawari, J. A., Goiot, S. R.: *Wat. Res.*, **31**, 825-831 (1997).
- 4) Barry, K. F., Carl, J. B.: *Tappi J.*, **73**(12), 169-174 (1990).
- 5) Diane, N., Eugene, J., Raymond, W.: *Environ. Tox. Chem.*, **5**, 521-525 (1986).
- 6) Hastings, J. W., Potrikus, C. J., Gupta, S. C., Kurfurst, M., Makemson, J. C.: *Adv. Microb. Physiol.*, **26**, 235-291 (1985).
- 7) Lloyd, L. I., and Damon, L. M.: "酸素の生化学", 学会出版センター, 東京, 1985, pp. 303-311.
- 8) 笠井佐夫, 中村隆雄: "生物発光と化学発光", 今井一洋編, 廣川書店, 東京, 1989, pp. 21-36.
- 9) Leona, M., Aimo, O.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **88C**, 263-268 (1987).

(1999 年 4 月 28 日受付)

(1999 年 9 月 14 日受理)

## Summary

MICROTOX™ tests based on the inhibition of bioluminescence by *Photobacterium* have been widely used for evaluation of environmental toxicity. Anti-bioluminescent activity in MICROTOX™ tests was examined for bark extracts from six coniferous species. The activity was observed for both *n*-hexane and ethyl acetate extracts from all species tested. Among these, *n*-hexane extracts from the barks of *Abies sachalinensis* and of *Pinus densiflora* showed extremely strong activity. The most active compound was purified from the *n*-hexane extracts of *A. sachalinensis* bark and identified as oleic acid by GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR analyses. Several authentic compounds structurally related to oleic acid were also subjected to MICROTOX™ test. The results showed that C18 unsaturated fatty acids with Z-double bond at 9-position have strong activity. Moreover, GC analysis demonstrated that the strong anti-bioluminescent activity of *n*-hexane extracts from *A. sachalinensis* and *P. densiflora* barks could be explained in terms of their higher contents of oleic acid compared

with other species.

**Key words:** Coniferous bark, Extractives, MICROTOX™ test, Oleic acid, Environmental toxicity

## *In vitro* Plantlet Regeneration of *Abies firma* from Germinated Seedlings

L-M. VAARIO, Megumi TANAKA and Yuji IDE

Plant regeneration procedures from seedlings without radicles and from hypocotyl segments through adventitious bud were established. De-rooted seedlings developed the maximum number of new needles on SH medium containing 1.0 mg/l BAP and rooted on hormone-free 1/2SH medium containing 0.3% activated charcoal after immersion in 1,000 ppm NAA solution. The frequency of rooting was 63.6%. Adventitious buds were induced on hypocotyl segments on SH medium with 1.0 mg/l BAP and 0.3 mg/l NAA. They grew into shoots on hormone-free 1/2SH medium. Plantlets were successfully obtained by the procedure used in the rooting of de-rooted seedlings.

## Studies on Yarding and Hauling System of Mobile-yarder, Processor, and Forwarder with Simulation Methods

Rin SAKURAI, Masahiro IWAOKA, Hideo SAKAI and Hiroshi KOBAYASHI

The length of the skidding road to minimize the skidding cost, for mobile-yarder, processor and forwarder systems were studied by simulation models involving the number of operators and other factors. Simulation is based on a model skidding area of 100 m×60 m. If the single-grip type processor is used, distance from site to mobile-yarder should be 0 m–40 m with three operators. For a simple type processor, if the site is close to the forest road, distance from site to mobile-yarder should be 0 m–40 m with three operators. If distance are greater, the profitable length of skidding road should be short as possible with four operators.

## Anti-Bioluminescent Activity of Coniferous Bark Extracts on MICROTOX<sup>TM</sup> Test

Sakae SHIBUTANI, Masahiro SAMEJIMA, Yoshimasa SABURI  
and Norihisa TATARAZOKO

Anti-bioluminescent activity of bark extractives from six coniferous species was examined by MICROTOX<sup>TM</sup> test. The most active compound was purified from the *n*-hexane extracts of *A. sachalinensis* and identified as oleic acid.