

原著

## 無肥料・無農薬による自然栽培法, および無化学肥料・減農薬による栽培法で生育させた「ふじ」の果皮に含まれるポリフェノール“フロリジン”の質量分析

小野 幸輝 今井 麻智子 山田 勝也

**抄録** フロリジンはりんごの果皮に高濃度に含まれるポリフェノールで、抗腫作用や血糖低下作用を示す。実際、最新の高血糖治療薬として臨床で用いられている薬剤は、フロリジンの腎特異性を高めた誘導体である。しかし、りんごを果皮ごと食用とする場合、農薬が懸念される。確かにりんご栽培には農薬の使用が不可避とされているが、青森県津軽地方には、無肥料・無農薬によるりんごの自然栽培に成功した圃場がある。そこで今回、この圃場の「ふじ」を5ヶ月間採取し、果皮のフロリジン含量を質量分析により解析した。対照には化学肥料不使用・減農薬栽培の「ふじ」を用いた。その結果、前者のフロリジン含量は後者に比べ、採取時期を問わず有意に大きいことが判明した。自然栽培されたりんごは、果実のみならず果皮のポリフェノールも安心して摂取できることから、今後の発展が期待される。

弘前医学 71 : 31—45, 2020

キーワード：自然栽培；りんご；フロリジン；フロレチン；質量分析。

ORIGINAL ARTICLE

### **A mass spectrometric analysis of a polyphenol “phlorizin” contained in the peel of the Fuji grown with a natural cultivation method that employs neither fertilizers nor pesticides and a method with no chemical fertilizers and reduced pesticide use.**

Koki Ono, Machiko Imai, and Katsuya Yamada

**Abstract** Phlorizin, one of the major apple polyphenols that are highly contained in the peel, shows anticancer effect and lowers the blood sugar level. Indeed, a renal targeted derivative of phlorizin is the latest anti-hyperglycemic drug in clinical settings. However, pesticides used may cause harm when whole apple fruits were consumed. While it was the commonly held belief that apples can't be grown without pesticides, there is an orchard cultivating apples with no pesticides nor fertilizers in Tsugaru district in Japan. Here we compared Phlorizin content by mass spectrometry in the peel of Fuji apples for five months between those grown with a natural cultivation method that employs neither fertilizers nor pesticides, and a method with no chemical fertilizers and reduced pesticide use. Results showed that the phlorizin content of the fruits grown with the former method was significantly larger than that with the latter one for all periods tested. The natural cultivation is a promising method that assures safe intake of polyphenols in not only flesh but also peels.

Hirosaki Med. J. 71 : 31—45, 2020

**Key words:** natural cultivation; apple; phlorizin; phloretin; mass spectrometry.

## 諸 言

果物の適切な摂取と健康の関係については多くの研究があり, 例えば前向きコホート研究のメタアナリシスを行った Wang らは, 果物もしくは果物と野菜の摂取が多いと心臓病やがんなどによる死亡リスクが低下すると報告している<sup>1)</sup>. また Ezzati らは, 果物の摂取不足は, 高血圧, 喫煙に次いで疾病や死に対する危険因子であると述べている<sup>2)</sup>.

果物のうち, りんごはバナナやスイカに次いで生産量が多い<sup>3)</sup>. 一日一個のりんごで医者いらず “An apple a day keeps the doctor away” と言われるように<sup>4)</sup>, りんごの健康増進効果は古くから注目を集めてきたが, その鍵は含有するポリフェノールにあるとされる<sup>4,6)</sup>. 興味深い事に, りんごのポリフェノールは果肉以上に果皮に多く含まれている<sup>7,8)</sup>. 例えば, Tian らは, 高脂肪, 高フルクトース食により高血圧, 高脂血症, 高血糖を起こさせたマウスに対し, りんご果皮のポリフェノールを28日間与えたところ, 果実のポリフェノールを与えた場合と比べて, 血糖低下およびインスリン抵抗性の低下作用が大きかったと述べている<sup>9)</sup>. 果皮をむいて食べるスタイルは, 豊富なポリフェノールを摂取する機会を奪っているのかもしれない.

りんご果皮の主要なポリフェノールのうちで近年特に注目されている分子にフロリジン (図1A) がある<sup>10,11)</sup>. フロリジンは, D-グルコースの一位

炭素にフロレチン (図1B) が結合した配糖体で, 古くから抗がん作用が報告されている他<sup>12,13)</sup>, 小腸および腎尿細管の  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter (それぞれ SGLT1 および SGLT2) を阻害することにより, 血糖低下作用を示す<sup>10,14)</sup>.

Makarova らはフロリジンを高濃度に含むりんごの未熟果は, 健康なボランティアに対する経口ブドウ糖負荷試験後の血糖上昇を押さえ, 尿中排泄を有意に促進したと報告している<sup>15)</sup>. Niederberger らは, ヨーロッパ人は食物やジュース等から1日平均 0.7 - 7.5 mg のフロリジンを摂取すると見積もっており, 食物由来のフロリジンは2型糖尿病のリスク低減に役立っている可能性がある<sup>11)</sup>. 実際, フロリジンの腎臓への選択性を高めた誘導体は, 高血糖治療薬として臨床でも広く使用されている<sup>16)</sup>.

フロリジンとがんの関係に関し, フロリジンが小腸の lactase-phlorizin hydrolase (lactase の別称) により加水分解されて生じたフロレチンおよびその代謝産物ががん抑制的に働く可能性がある<sup>17)</sup>. 実際, フロレチンは種々のがん種に対して抗がん作用を示すことが報告されている<sup>6,18)</sup>. 関連して我々は, 悪性腫瘍細胞がグルコースを取り込む際, 通常のグルコーストランスポーターに加え, グルコース取り込み効率のより高いチャンネル様の未知の機構を用いること, またフロレチンがこのいずれのグルコース輸送路も完全に遮断することを報告した<sup>19,21)</sup>. 従って, フロレチンはがん細胞の糖利用を困難にし, 増殖に必要なエネルギー

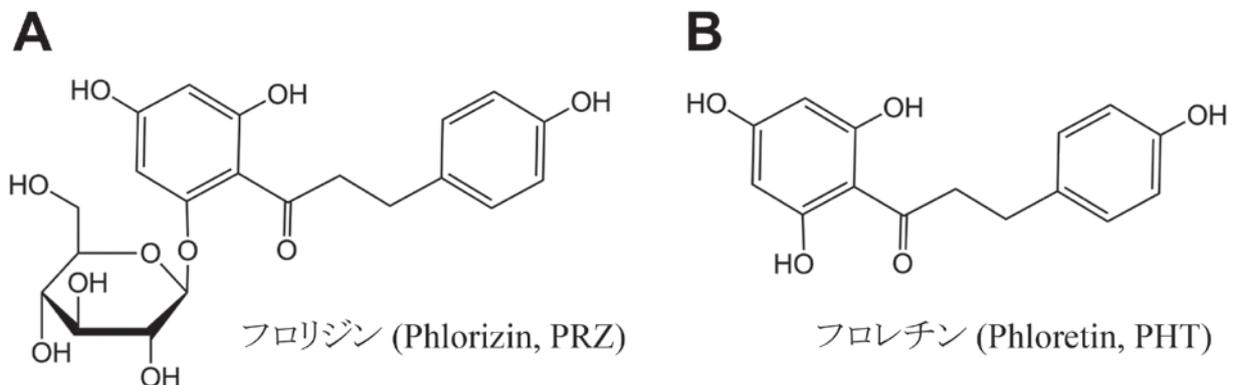


図1 フロリジン (Phlorizin, PRZ) およびフロレチン (Phloretin, PHT) の構造

フロリジンはグルコースの一位炭素にフロレチンが結合した分子で, りんご, 桜, 梨などバラ科植物の代表的なポリフェノールの一つ. 樹皮や根, 葉の他, 果実では果皮と種子に多く含まれる.

ギーを限定する可能性がある。このように、りんごを果皮も併せて摂取することにより、フロリジンのみならずその分解産物であるフロレチンの健康への寄与が期待される<sup>20)</sup>。

しかし、一般にりんごの栽培には農薬の使用が不可避と言われており、りんごを丸ごと食用に供すれば、果皮に残留する農薬の身体への影響が心配される<sup>22)</sup>。これに対して青森県津軽地方には、りんごの無肥料・無農薬栽培（以後、自然栽培 Natural Cultivation）に成功し、30年以上継続している圃場がある<sup>23)</sup>。自然栽培されたりんごを果皮をむかずに食べれば、果実と果皮のポリフェノールを加工品や薬に頼らず摂取できるが、実際に自然栽培されたりんごの果皮がどの程度ポリフェノールを含むかは明らかでない。

そこで本研究では、日本における品種別収穫量の半数を占め<sup>24)</sup>、世界でも広く流通している「ふじ」<sup>25)</sup>に焦点を絞り、果皮の代表的なポリフェノールであるフロリジンの含量を質量分析で計測した。対照には、同じ津軽地方で、無化学肥料・減農薬によるりんごの栽培を20年以上続け、青森県特別栽培農産物の認証を受けている圃場の「ふじ」を用いた。果実の成長に伴う含量の変化を調べる為、7月の未熟果から11月の熟果まで同一の樹から毎月同一日に採取を行い、二つの圃場で比較した。本研究は著者らが調べ得た限り、自然栽培されたりんごの果皮が含むポリフェノールに関する初めての報告である。

## 材料及び方法

### (1) 使用したりんご果実

青森県津軽地方で30年以上継続して自然栽培を行う圃場において、樹勢が良好な「ふじ」の樹（普通台木、通称「マルバ」）を3本（#K1, #K2, #K3）選定し（図2A-2C および 2G-2I）、2019年7月9日、8月7日、9月9日、10月16日、および11月13日の計5回、同一の樹から果実を採取した（表1）。対照には、自然栽培圃場から10.3 km 離れた場所で20年以上にわたり化学肥料を一切使用せずりんご栽培を続け、節減対象農薬の使用も通常の5割以下に減らし青森県特別栽培農産物「節農5・化不」の認証を受ける圃場（以後、特別栽培 Special

Cultivation）の「ふじ」（マルバ）3本（#81, #31, #62, 図2D-2F および 2J-2L）から同一日に採取した果実を用いた（表1）。なお最終収穫月の11月は、全果実を採取した関係で特別栽培圃場の収穫を11月12日に実施した。果実採取は幹に対し特定の方角に偏らないよう配慮した。採取果実には幹に対する方角を含む識別番号を付し、総計106個を質量分析に付した。採取後の果実は翌日の果皮分離まで24℃の恒温実験室で保管した。なお、自然栽培圃場の8月と9月採取分は果実に二重袋がけがなされた。特別栽培圃場は袋がけはおこなわれなかったが、2019年10月採取分に限り、果樹の下にアルミ反射シートが敷かれた。

### (2) 果皮の分離および凍結乾燥

果皮の分離、凍結乾燥、及び次項に記す抽出操作は、庄司の方法を参考にした<sup>26)</sup>。果皮の分離は果実採取日の翌日、果実の最大高さ（縦径）及び赤道方向の長径、果実重量を計測した後、ピーラー（アップルピーラーC-140, パール金属）を用いて一検体30秒以内に終了させた。果皮は分離と同時に切断し、液体窒素を満したトレーに落下させて酸化を防ぎ、約1 cm 角に細切した上、-80℃で凍結乾燥まで保管した。なお7月及び8月収穫分は小型果実用ピーラー（CP61WJ, ムロコーポレーション）を用いて果皮を分離した。果皮分離後の果実湿重量を計測し、分離前の果実重量との差を果皮湿重量（Peel Wet Weight）とした。

果皮の凍結乾燥は、真空凍結乾燥機（FDU-2100, EYELA）を用いて-84℃で3日間（一部は4日間）、3 Pa 以下で十分に乾燥させた。凍結乾燥終了後、容器ごと重量を測定し、風袋を引いて果皮の乾燥重量（Peel Dry Weight）とした。次いで、乾燥果皮を一度に6検体ずつ、粉碎時の高温による変性を防ぐためドライアイスで冷却したステンレス製専用容器に移し、同時に6台の小型グラインダー（CHULUX GRINDER QF-3006SD, CHLUX）を用いて20秒間粉碎し、酸素吸収剤（A-500HS, アズワン）と共にガラス密閉容器（200 mL, No. 3-6073-05, アズワン）に移し、容器ごと液体窒素に浸漬してすみやかに温度を下げた後、-30℃で質量分析まで保管した。

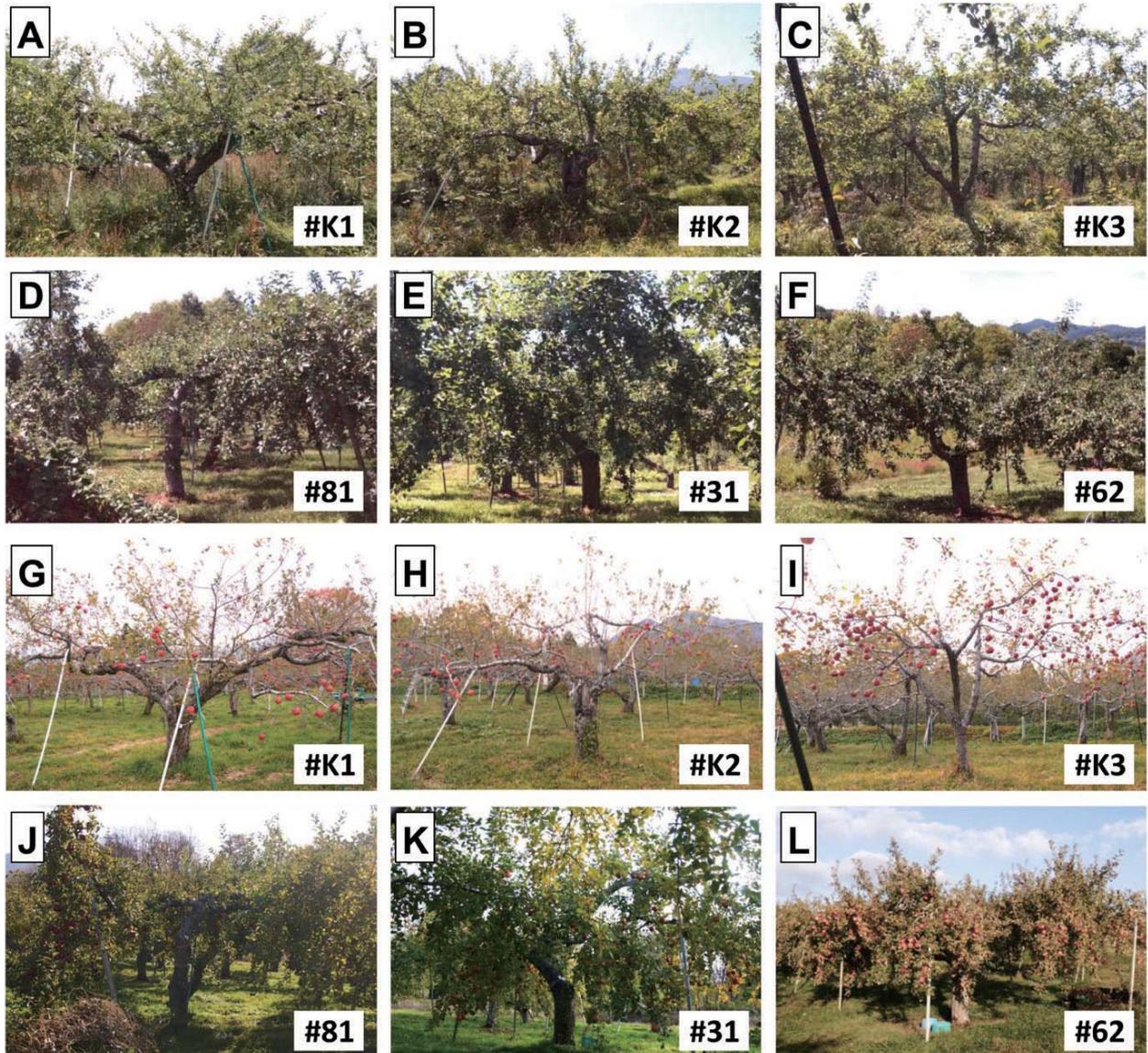


図2 自然栽培を行う圃場ならびに特別栽培を行う圃場から選定し、本解析で使用した「ふじ」の未熟果採取時 (A-F)、及び熟果採取時 (G-L) の果樹全景

解析に使用した果実を最初に採取した2019年7月9日における自然栽培を行う圃場 (A-C) ならびに特別栽培を行う圃場 (D-F) の「ふじ」の樹の全景。同様に、最終の果実採取を行った2019年11月13日における自然栽培を行う圃場 (G-I)、および11月12日における特別栽培を行う圃場 (J-L) の「ふじ」。自然栽培では果実の採取時を除き、下草を刈らない様子がわかる。右下の記号は毎月1回ずつ継続して果実を採取した樹の識別番号。

### (3) 乾燥果皮からのフロリジンの抽出

質量分析当日、各果実に由来する乾燥果皮粉末を15 mL遠沈管中に0.50 g計り取り、アセトニトリル (FUJIFILM Wako LC/MS用、以下同様) : メタノール (FUJIFILM Wako LC/MS用) = 1 : 1 混合溶液 (抽出用溶媒) 9 mLを加え、振盪機 (ASCM-1, AS ONE) を用いて10 min間、1800

rpm (室温) で振盪することにより抽出を行った。次いで15 min間、1000 rpm (10℃) で遠心し (KUBOTA 5700)、上清を25 mLフラスコ (SHIBATA 020060-25A スーパーグレード) に移し入れた。同様の操作を更に2回繰り返して残存成分を回収後、25 mLに定容、転倒混和後、濾過し (0.2 μm, Millex SLLGH25NS, Millipore)、果皮抽出原液とした。

表1 無肥料・無農薬による自然栽培 (Natural Cultivation) を実施する圃場, および無化学肥料・減農薬による特別栽培 (Special Cultivation, 青森県特別栽培農作物認証) を実施する圃場から選定したふじの樹識別番号と各月の採取果実数

Cultivation Method Tree Identification No.	Natural Cultivation			Special Cultivation		
	#K1	#K2	#K3	#81	#31	#62
July	3	3	3	3	3	3
August	2*	3	3	3	3	3
September	3*	4	4	4	4	4
October	4	4	4	4	4	4
November	4	4	4	4	4	4

\* 採取後, 果皮の分離に失敗した果実 1 例ずつを解析から除外した.

#### (4) 果皮に含まれるフロリジン含量の質量分析

質量分析には, QTRAP 方式トリプル四重極タンデム質量分析装置 (QTRAP 6500+, SCIEX) に高速液体クロマトグラフィ (UHPLC) システム (ExionLC AD, SCIEX) を結合したシステム (以後, LC-MS/MS) を用いた. 計測当日, フロリジン二水和物 (HPLC 用, P3449, Sigma) をアセトニトリル:メタノール=1:1の抽出用溶媒で濃度0.2, 1, 5, 10, 100, 1000 ng/mlとした標準液, ならびに果皮抽出原液を抽出用溶媒で希釈倍率10倍および100倍に段階希釈したものを作製し, 測定検体とした. Guard カラムは KrudKatcher Ultra In-Line Filter 0.5  $\mu$ m, Porosity x0.004 in. ID (No. AF0-8497, Phenomenex), 分析カラムは Luna 3  $\mu$ m Phenyl-Hexyl 100Å, LC Column 150 x 2 mm (No. 00D-4256-B0, Phenomenex) を使用した. 移動相 (A) に1%ギ酸水 (v/v, ギ酸は FUJIFILM Wako LC/MS 用, 水は FUJIFILM Wako 超純水 LC/MS 用), (B) にギ酸:アセトニトリル=1:99 (v/v) を用い, 送液速度0.2 mL/min にて (A) 60% - (B) 40% でカラムを平衡化した後, 測定検体 5  $\mu$ L をインジェクションした. グラディエントは, (B) 濃度がインジェクションから0.20分まで40%, 2.50分に90%, 4.00分に95%, 4.10分に40%とし, 1検体につき5.00分で測定を終了するよう設定した.

質量分析装置の設定は, Collision Gas 9 L/min, Gas 1 (ネブライザガス) 50.0 psi, Gas 2 (ターボガス) 80 psi, 温度300  $^{\circ}$ C, イオンスプレイ電圧4500 V, Curtain gas (カーテンガス) 25 psi とし, Q1

(プリカーサーイオン) を質量電荷比 (m/z) 435.113に設定し, ネガティブモードのイオン化条件による Multiple Reaction Monitoring (MRM) 解析から Q3 (フラグメントイオン) として得られた m/z 166.900 と m/z 272.900 (以後 m/z 273 と略す) のうち, より感度の高かった m/z 273 をフロリジンの定量に用いた. MultiQuant Software (ver 3.0.2, SCIEX) でフロリジン標準液の濃度を横軸に, m/z 273 のピーク下面積 (溶出時間2.38分) を縦軸にとる検量線を作製し, 果皮の抽出原液のピーク下面積を本検量線に内挿して得た濃度を, 果皮の抽出原液のフロリジン濃度 (ng/mL) とした. ついで庄司の方法<sup>26)</sup>に従い, 式 (1) より単位果皮湿重量あたりのフロリジン含量を算出した.

式 (1) フロリジン含量 ( $\mu$ g / g 果皮湿重量) = フロリジン濃度 (ng / mL)  $\times$  希釈倍率  $\times$  (25 mL / 0.50 g)  $\times$  [果皮の乾燥重量 (g) / 果皮の湿重量 (g)]  $\times$  [1/1000]

なお, 統計解析は StatView-J5.0 を使用して分散分析 (ANOVA) もしくは多重比較 (multiple comparison) により行い, 対照群と比較する場合は Dunnett's test を, それ以外は Tukey-Kramer's test を用いた. 平均値は mean  $\pm$  SD で表記した.

## 結 果

(1) 自然栽培を行う圃場および特別栽培を行う圃場で生育した「ふじ」から採取した果実のサイズおよび重量並びに果皮重量の月毎の変化  
自然栽培あるいは特別栽培のいずれの圃場で生

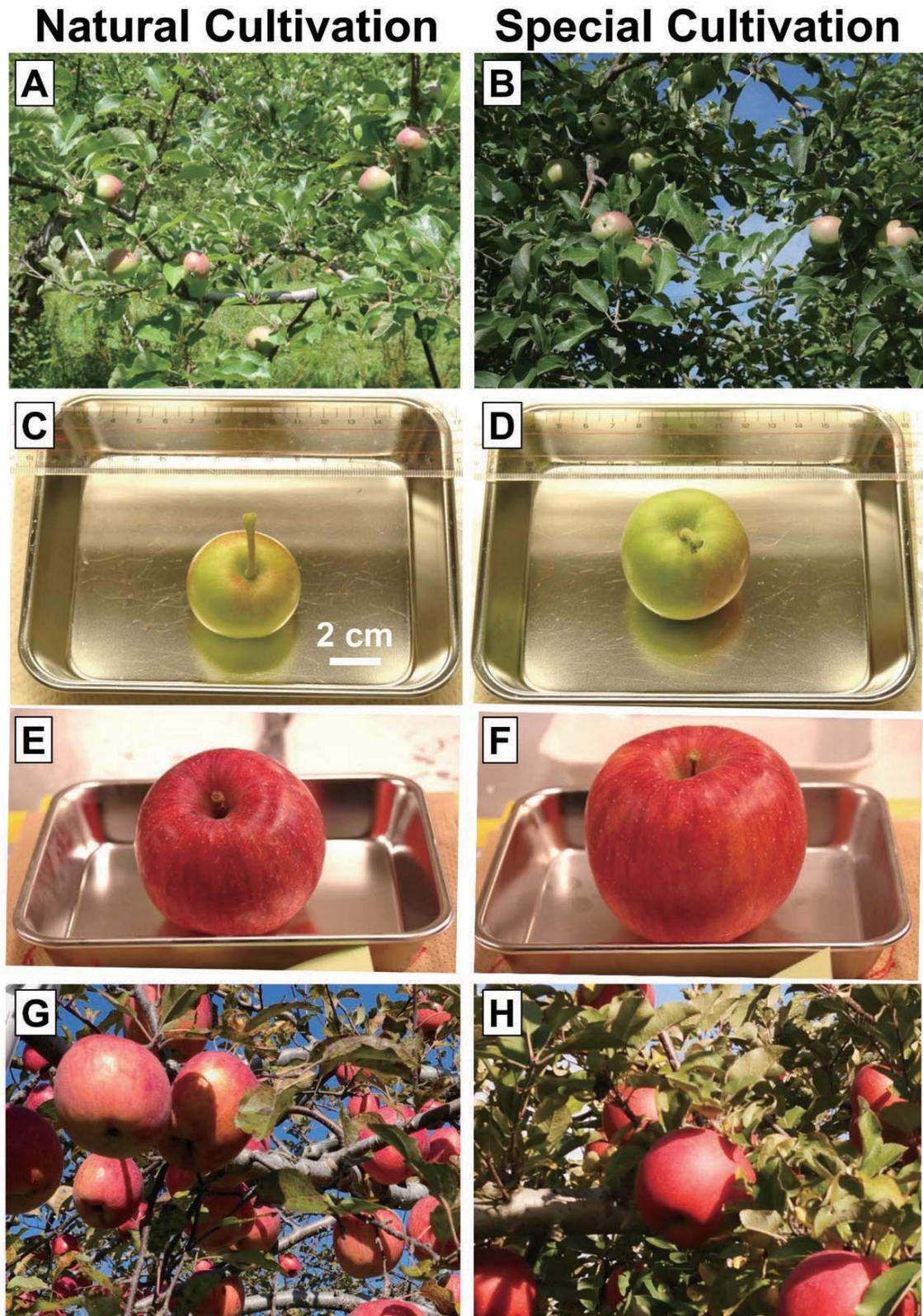


図3 7月採取時および11月採取時の自然栽培 (Natural Cultivation) ならびに特別栽培 (Special Cultivation) された「ふじ」の樹の拡大, 及び採取果実の例

自然栽培を行う圃場(A)及び特別栽培を行う圃場(B)において, 7月採取時に撮影した「ふじ」の樹の拡大, 及びそれぞれの樹から採取した果実の例(C, D). 同様に自然栽培(G), および特別栽培(H)の11月採取時の「ふじ」の拡大, ならびに採取果実の例(E, F). スケールはC-Fに共通.

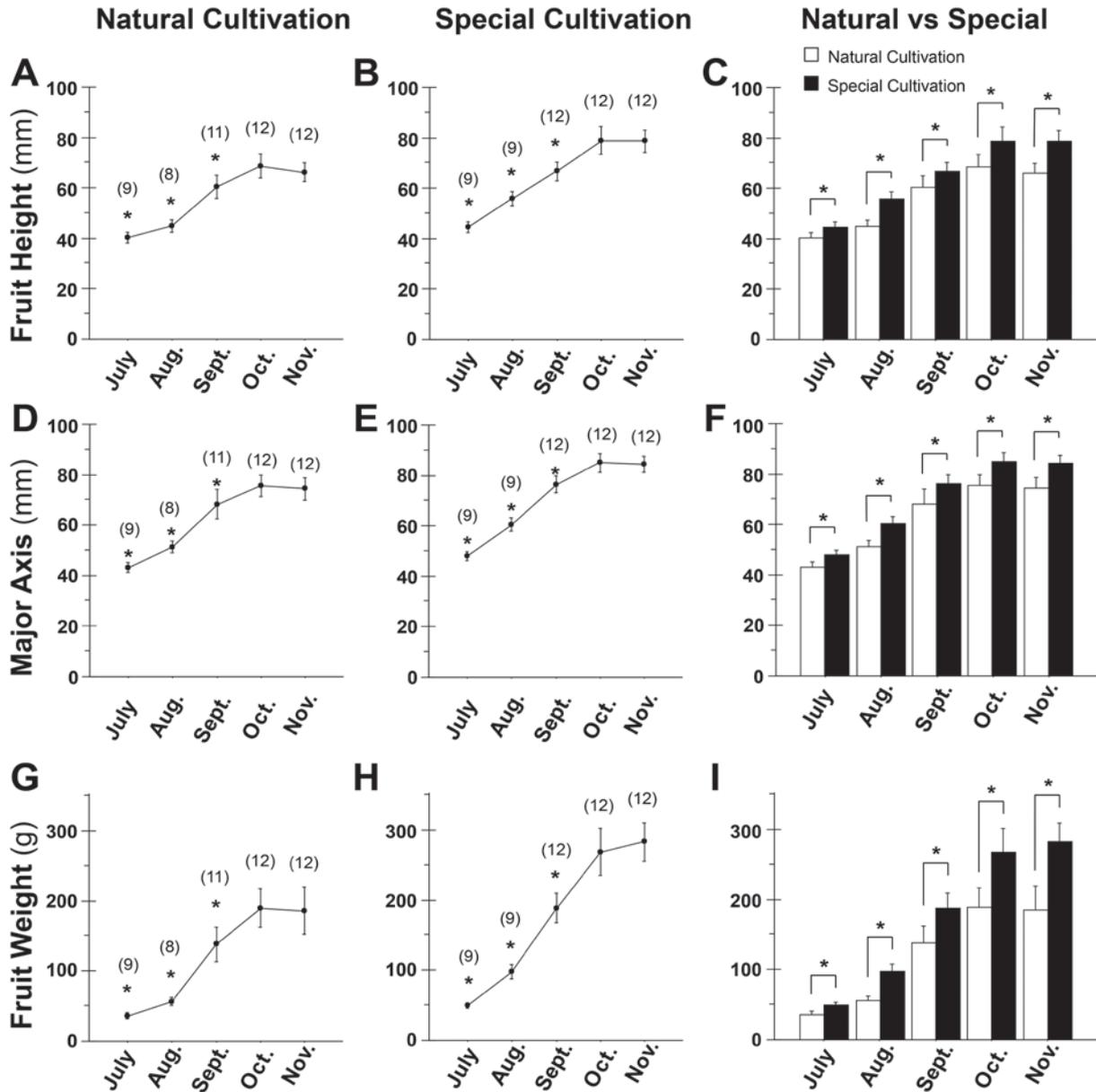


図4 りんごの自然栽培を行う圃場ならびに特別栽培を行う圃場から毎月採取し、本解析で使用した「ふじ」果実のサイズ及び重量の月毎の変化

A, D, Gは自然栽培(Natural Cultivation)を, B, E, Hは特別栽培(Special Cultivation)を行う圃場において, それぞれ3本の樹から毎月1回採取して本解析で使用した「ふじ」果実の縦径(底部からヘタを除く頂部までの最大高さ)(A, B), 赤道まわりの長径(D, E), ならびに重量(G, H)の平均値の採取月による推移を示す。( )内は測定した果実の個数を示す。C, F, Iは, 各月における縦径(C), 長径(F), 重量(I)の平均値が, 自然栽培(白棒)と特別栽培(黒棒)の間で違いがある様子を示す。A, B, D, E, G, Hのアスタリスクは最終採取月である11月の平均値に対し有意差のあること( $p < 0.05$ , Dunnett's test)を, C, F, Iのアスタリスクは栽培法間で有意差のあること( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test)を示す。エラーバーはSDを示す。

育した果実も, 7月の未熟果(図3C, 3D)から11月の熟果(図3E, 3F)に至るまでに, 縦径(図4A, 4B), 長径(図4D, 4E), 重量(図4G, 4H)の平均値が有意に増加した( $p < 0.05$ , Dunnett's test)。但し, 自然栽培果実は, 長径を除いて7月

から8月にかけて値の増加に有意差がなく( $p > 0.05$ , Tukey-Kramer's test), その後8月から10月にかけて急速かつ月毎に有意に増加した後( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test), 10月から11月は再び互いに有意差がないS字型の成長を示した

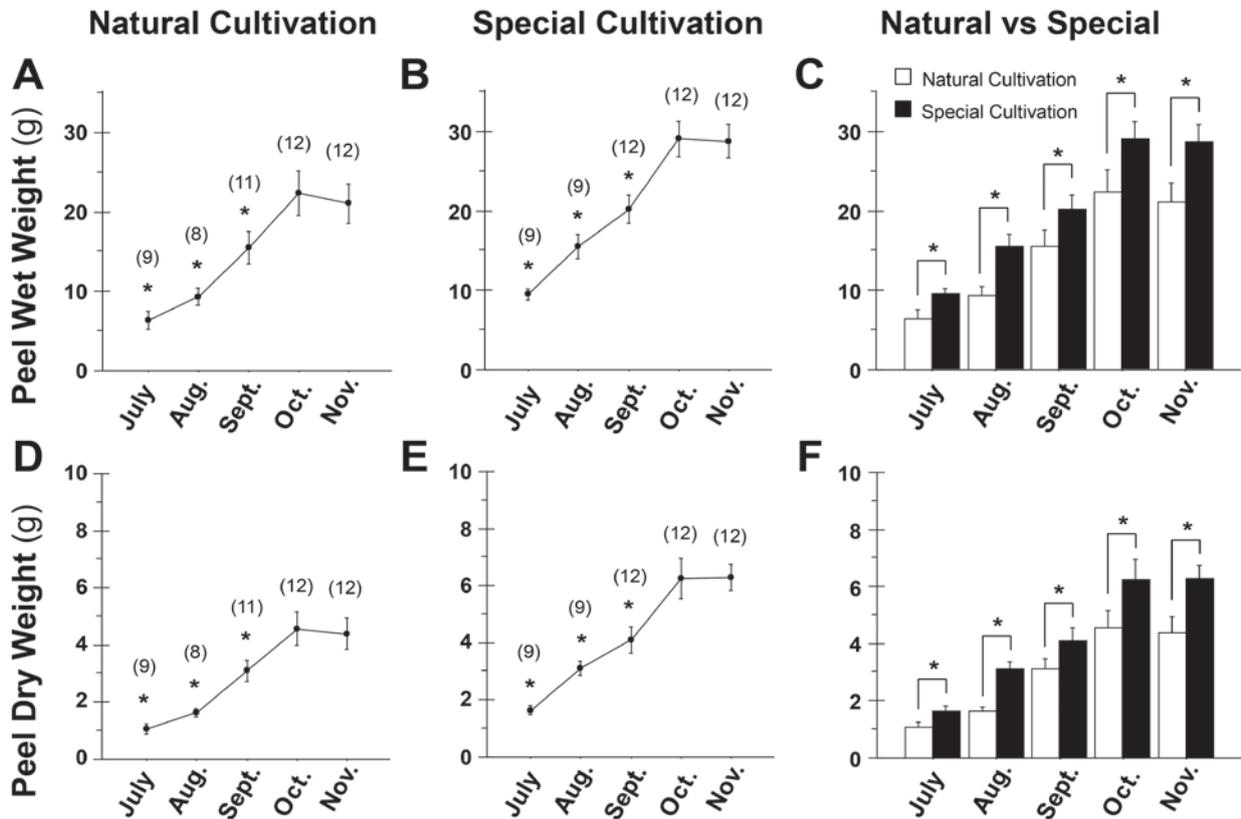


図5 自然栽培を行う圃場ならびに特別栽培を行う圃場から毎月採取し、本解析で使用した「ふじ」果実の果皮湿重量及び果皮乾燥重量の月毎の変化

A及びBは、自然栽培(Natural Cultivation)及び特別栽培(Special Cultivation)を行う圃場でそれぞれ3本ずつ選定した「ふじ」の樹から毎月果実を採取し、果実から果皮を分離した直後の果皮湿重量(Peel Wet Weight)の平均値の採取月による推移を示す。( )内は測定した果実の個数を、エラーバーはSDを、アスタリスクは最終採取月である11月の平均値に対し有意差のあることを示す( $p < 0.05$ , Dunnett's test). Cは、各月毎に、自然栽培(白棒)と特別栽培(黒棒)の果実の果皮湿重量の平均値に違いがある様子を、アスタリスクは両者の間に有意差のあること( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test)を示す。D及びEは同様に果皮乾燥重量(Peel Dry Weight)について示したもの。Fは、同様に各月毎に、自然栽培と特別栽培の果皮乾燥重量の平均値に有意差がある様子を示す。

(図4A, 4D, 4G). これに対して、特別栽培果実は7月から10月にかけて全指標が月毎に有意差を示す直線的な増加曲線を辿ったのち( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test, 図4B, 4E, 4H), 10月から11月にかけて変化に有意差がなくなった( $p > 0.05$ , Tukey-Kramer's test).

一方、同一月で比較すると、自然栽培果実(図3Cあるいは3E)は、特別栽培果実(図3Dあるいは3F)に比べて、縦径、長径、重量とも有意に小さかった(図4C, 4F, 4I,  $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test). 11月の最終収穫時で比べると、自然栽培「ふじ」果実の平均値は、縦径 $66.3 \pm 3.6$  mm (59.0–71.0 mm), 長径 $74.5 \pm 4.4$  mm (67.0–81.0 mm), 重量 $186.3 \pm 34.2$  g (143.6–247.1 g)で、

特別栽培の「ふじ」果実の平均、縦径 $78.7 \pm 4.4$  mm (72.0–86.0 mm), 長径 $84.6 \pm 3.2$  mm (79.0–90.0 mm), 重量 $283.5 \pm 27.5$  g (252.3–332.4 g)に対してサイズは約12–16%小さく、重量は約2/3であった。なお、採取した果実の縦径、長径、重量ともに、各樹の幹に対する果実の方角の違いによる統計学的な差は認められなかった( $p > 0.05$ , Tukey-Kramer's test).

質量分析用に果実から分離した「ふじ」の果皮は、果実の成長(図4)に呼応して、その湿重量(図5A, 5B), および乾燥重量(図5D, 5E)のいずれも、7月から10月にかけて採取月を追って有意に増加したが( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test), 10月から11月にかけては有意な増加を認めなかつ

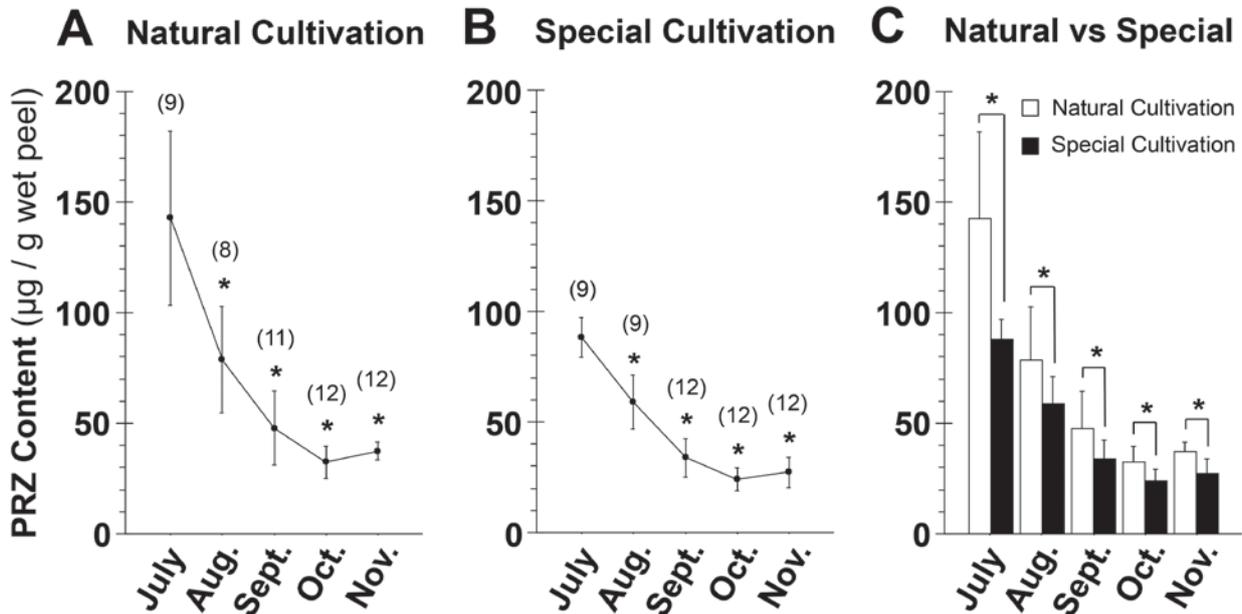


図6 自然栽培を行う圃場ならびに特別栽培を行う圃場から毎月採取し、本解析で使用した「ふじ」果実の果皮単位湿重量あたりのフロリジン含量の月毎の変化

A及びBは、それぞれ自然栽培及び特別栽培された「ふじ」果実から分離した果皮の質量分析により得た単位湿重量あたりのフロリジン含量(µg/g wet peel)の月毎の推移を示す。アスタリスクは最初に採取を行った7月の平均値に対して有意差のあることを( $p < 0.05$ , Dunnett's test), ( )内は測定した果実の個数を示す。Cは果皮のフロリジン含量の平均値が自然栽培(白棒)と特別栽培(黒棒)の間で異なる様子を月毎に示したもので、アスタリスクは栽培法間で有意差のあることを( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test), エラーバーはSDを示す。

た(Dunnett's test)。

また、「ふじ」の果皮の重量を両圃場で各月ごとに比較すると、自然栽培では果皮の湿重量(図5C)および乾燥重量(図5F)のいずれも、特別栽培に比べて全ての月で有意に小さく( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test), 果実全体に認められた傾向と一致した。熟果収穫月の11月で比べると、自然栽培された果実の果皮湿重量  $21.1 \pm 2.5$  g ならびに乾燥重量  $4.4 \pm 0.5$  g に対して、特別栽培された果実は果皮湿重量  $28.8 \pm 2.1$  g ならびに乾燥重量  $6.3 \pm 0.5$  g であった。

## (2) 自然栽培で生育した「ふじ」、および特別栽培で生育した「ふじ」から分離した果皮に含まれるフロリジン含量の質量分析

各圃場の「ふじ」の乾燥果皮検体を質量分析した結果、自然栽培(図6A)および特別栽培(図6B)のいずれも、フロリジン含量は7月に比べてその他の月で有意に低かった( $p < 0.05$ , Dunnett's test)。しかし、詳細に見ると、自然栽培果皮のフロリジン含量は7月から9月にかけて月毎に有意

に低下した後( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test), 9月から11月までは月ごとの有意差を示さなかったのに対して( $p > 0.05$ , Tukey-Kramer's test), 特別栽培果皮のフロリジン含量は7月から10月まで常に有意差を示しながら値が減少し( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test), 10月と11月の間で有意差がなくなった。

更に各月毎に比較すると、全ての月で自然栽培果皮のフロリジン含量は、特別栽培果皮のフロリジン含量より有意に大きな値を示した( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test, 図6C)。11月の最終収穫時で比べると、自然栽培果皮の単位湿重量あたりのフロリジン含量が平均  $37.4 \pm 4.0$  µg / g wet weight (30.2 - 43.1 µg / g wet weight) であつたのに対し、特別栽培果皮のフロリジン含量は平均  $27.2 \pm 6.7$  µg / g wet weight (20.2 - 42.4 µg / g wet weight) で、自然栽培が特別栽培の約1.4倍であった。また7月の未熟果では、自然栽培のフロリジン含量の平均が  $142.8 \pm 39.4$  µg / g wet weight (91.5 - 212.6 µg / g wet weight) と平均値, SD共に大きい値を示したのに対し、特別栽培「ふじ」

の果皮では平均 $88.4 \pm 8.9 \mu\text{g} / \text{g wet weight}$  (77.4 - 105.9  $\mu\text{g} / \text{g wet weight}$ ) と小さく, 自然栽培が特別栽培の約1.6倍であった。

果皮単位湿重量あたりのフロリジン含量のばらつき程度には自然栽培と特別栽培の間で有意差があり ( $p < 0.05$ , ANOVA), 特に7月から9月の未熟果の自然栽培で大きなばらつきが認められた (図6)。なお, いずれの圃場においても, 樹による違いや, 果実の幹に対する方角によるフロリジン含量の違いは認められなかった ( $p > 0.05$ , Tukey-Kramer's test)。

## 考 察

肥料および農薬をいずれも使用しないりんごの「自然栽培」を行う圃場, ならびに化学肥料不使用, 節減対象農薬の使用を通常の5割以下に減らし, 青森県特別栽培農産物「節農5・化不」認証をうける圃場で採取した「ふじ」を対象に, 2019年7月から11月にかけて果皮に含まれるフロリジンの含量の変化を質量分析により計測した。その結果, いずれの圃場の果実も月を追う毎にサイズと重量が有意に増加したが, 月毎に比較すると全ての月で自然栽培果実は特別栽培果実よりサイズ・重量共に有意に小さかった (図4)。また, 「ふじ」の果皮単位湿重量に含まれるフロリジン含量は, 自然栽培, 特別栽培のいずれも7月の未熟果から11月の熟果に向かうにつれ有意な減少を示した ( $p < 0.05$ , Dunnett's test, 図6A, 6B)。フロリジン含量を月毎に比較すると, 自然栽培果実の方が特別栽培果実より全ての月で有意に大きく ( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer's test, 図6C), 含量のばらつき程度も自然栽培と特別栽培の間には有意な差が認められた ( $p < 0.05$ , ANOVA, 図6)。

### (1) 成長に伴う果実のサイズ, 重量, および果皮の変化と栽培法による違い

化学肥料及び農薬を使用するいわゆる「慣行栽培」のふじの重量は, 我が国では300-400gとされることから<sup>27)</sup>, 今回測定に用いた特別栽培の「ふじ」はやや小さく, 自然栽培の「ふじ」は更に小さいと言える。一方, 欧州最大のりんご供給国ポーランドのワルシャワ大学のLataらが, ふ

じを含む19品種の果皮のポリフェノール含量を調べた際に用いた果実の重量範囲139-276gと比較するとおおよそ重なる範囲にある<sup>8)</sup>。

11月採取分の果実のサイズ及び重量には10月採取分と有意な差が認められなかったことから (図4), 今回解析に使用した果実はいずれの栽培法でも11月採取時点で十分熟した状態にあったと推定される。しかし, 成長曲線を見ると, 自然栽培果実が7月から8月にかけて果実成長の立ち上がりが遅く (図4A, 4D, 4G,  $p > 0.05$ , Tukey-Kramer's test), その後急速に成長し, 10月に成長が止まるS字型の成長曲線を示した ( $p < 0.05$ ) のに対して, 特別栽培果実は10月まで比較的直線的な成長の様子を示した (図4B, 4E, 4H)。慣行栽培と思われる平均400g近くに達する「ふじ」の成長曲線について, Zheng<sup>28)</sup>らは11月に入っても果実重量が直線的に増加し続ける様子を報告しており, 自然栽培とは対照的で, 肥料や農薬の使用が関係している可能性がある。全く下草を刈らず, 農薬も肥料も投入しない自然栽培では, 土壌や気温等の物理・化学的な環境の違いに止まらず, 周辺の生態系との関係についても併せて解析していく必要がある<sup>23)</sup>。

果皮も果実とよく似た成長経過を示し, また自然栽培された果実の果皮は特別栽培された果皮に比べ, 全ての月で重量が有意に小さかった (図5)。しかし, 果実総重量に対する果皮湿重量の割合は, 自然栽培が $11.4 \pm 0.8\%$ , 特別栽培が $10.2 \pm 0.4\%$ 。同様に, 果皮乾燥重量の割合は, 自然栽培が $2.4 \pm 0.2\%$ , 特別栽培が $2.2 \pm 0.1\%$ で, サイズの差を考えるとほぼ同等であった。以上の結果は, 乾燥果皮検体の調製が, 果実全体とよく対応する形で行われたことを示唆する。

### (2) 果実の成長に伴う果皮のフロリジン含量の変化, 及び栽培法による違い

りんご果実が熟すに従い, ポリフェノール含量がどのように変化するかについては多くの研究がある<sup>29, 30)</sup>。果皮の色づきと関係するアントシアニン類など特徴的な変化を示すものもあるが<sup>29, 31)</sup>, 総フェノール含量や総フラボノイド含量を見る限り, 一般に未熟果で大きく, 熟すに従い急激に減少し, 収穫期に近づくと変化が小さくなることに

については広いコンセンサスがある<sup>28,30)</sup>。フロリジンは、このような変化を示す代表的なポリフェノールで<sup>28, 29)</sup>、果皮においても同様の変化が報告されている<sup>29)</sup>。実際、今回計測対象とした「ふじ」の果皮に含まれるフロリジンの含量は未熟果で大きく、7月採取期のフロリジン含量を最終収穫期と比べると、自然栽培圃場で平均約3.82倍、特別栽培圃場では平均約3.25倍であった。また、熟すに従い含量は減少し、収穫前の1ヶ月はいずれの圃場でも有意な変化を示さなかった(図6)。従って、少なくとも「ふじ」に見る限り、自然栽培された果実の成長に伴うフロリジン含量の変化は、通常のりんごポリフェノールの変化と類似した時間経過を辿るようである。

フロリジンに代表される果皮のポリフェノールがこのような時間的変化を示す理由は十分明らかでないが、その強力な抗菌作用<sup>6)</sup>により、病害虫や病害真菌等の侵入から未成熟な果実内部を保護する繁殖戦略上の意義が議論されている<sup>32,34)</sup>。慣行栽培果実では、合成酵素や遺伝子、細胞のサイズや数の変化に注目した研究も進められているが<sup>31, 35)</sup>、共生微生物や周辺環境との関係が重要になる自然栽培に焦点を当てた研究はほとんどなく<sup>23)</sup>、今後の重要な課題である。

自然栽培圃場の「ふじ」は、袋がけを行った有袋果であったのに対し、特別栽培圃場の「ふじ」は袋がけをおこなわない無袋果で、さらに色づきをよくするため、10月に限り果樹の下にアルミ反射シートが敷かれた。このような違いが果皮のフロリジン含量に何らかの影響をもたらした可能性は排除できない。しかし、「ふじ」の果皮におけるフロリジンの含量を、無袋果と有袋果で比較したYuriらは、袋がけの有無は果皮のフロリジン含量に影響しなかったと報告している<sup>36)</sup>。また、「ふじ」以外のりんご3品種を対象に、果皮のフロリジン含量に対する袋がけの影響を調べたChenらは、袋がけによりフロリジン含量が低下したと述べている<sup>37)</sup>。従って、これらの報告をみる限り、今回袋がけを行った自然栽培圃場のりんごのフロリジン含量が、袋がけをおこなわなかった特別栽培圃場のりんごのフロリジン含量より有意に大きかったことを、袋がけの有無により説明することは困難である。

りんご11品種の果皮のフロリジン含量を質量分析により比較したZelinskaらは、果皮単位乾燥重量あたり16.4 - 84.1  $\mu\text{g} / \text{g dry weight}$ のフロリジン含量を報告している<sup>38)</sup>。一方、りんご4品種について質量分析を行ったSavikinらは、果皮単位乾燥重量あたりのフロリジン含量として32.6 - 496  $\mu\text{g} / \text{g dry weight}$ を報告しており、こちらは品種により10倍以上の開きがある<sup>39)</sup>。これらの報告に「ふじ」は含まれていないが、別途りんご22品種についてHPLCによりフロリジン含量を計測したVebericは、「ふじ」のフロリジン含量を $111 \pm 4.0 \mu\text{g} / \text{g wet weight}$ と見積もっており、りんご22品種中下から6番目で、りんごの中ではフロリジン含量が低い品種の一つであると報告している<sup>40)</sup>。これらの報告と比較する為、本研究で得られた「ふじ」の果皮単位湿重量あたりのフロリジン含量を単位乾燥重量あたりの含量に換算すると、11月の最終収穫時の単位乾燥重量あたりのフロリジン含量として、自然栽培で約180  $\mu\text{g} / \text{g dry weight}$ 、特別栽培で約124  $\mu\text{g} / \text{g dry weight}$ の値が得られ、Vebericの報告した値や、Zielinskaらの報告した11品種の値をいずれも上回った。従って、自然栽培された「ふじ」果皮のフロリジン含量は、特別栽培された「ふじ」のみならず、慣行栽培された「ふじ」果皮のフロリジン含量と比べても多い可能性がある。

既に述べたように、フロリジンは、病害虫や病害真菌等の果実内部への侵入を防ぐファイトアレキシン機能をもつ代表的なポリフェノールであることから<sup>32)</sup>、農薬を全く使用しない自然栽培においては、病害虫を含む周辺の環境が、減農薬の特別栽培と比べて、フロリジン含量のよりダイナミックな変動を引き起こす可能性がある<sup>32, 41)</sup>。実際、果皮のフロリジン含量は、そのばらつきの程度も自然栽培果実の方が特別栽培より有意に大きかった ( $p < 0.05$ , ANOVA, 図6)。従来から、りんごの有機栽培は、慣行栽培より果実のポリフェノール量を増加させると報告されてきたが<sup>6, 42)</sup>、自然栽培されたりんごと比較した例はみられない。弘前大学の杉山らは、今回取り上げた自然栽培圃場で解析を実施した結果、りんごの葉の抵抗性は、葉に内生する真菌類の量と有意に相関したと最近報告しており<sup>23)</sup>、無農薬・無肥料栽

培の理解を進める上でも、周辺環境とポリフェノールのよりいっそうの関係解明が待たれる。

果物の疫学的な効能は明らかとも言えるにも関わらず<sup>1,2)</sup>、日本では過去四半世紀、果物の摂取量が減っている代わりにデザートや飲料の支出割合が増加している<sup>43)</sup>。果物を毎日摂取しない理由として、農水省の調査によれば高価格で日持ちしないことに次いで、皮を剥く手間がかかるという理由が約30%をも占める<sup>43)</sup>。もしもりんごの自然栽培が一般化し、農薬の心配をせずに<sup>22)</sup>、りんごの果皮を剥かずに丸ごと食べられるようになれば、果皮に多く含まれる多様なポリフェノールを自然な形で摂取することが可能となる<sup>4,9)</sup>。自然栽培や特別栽培の果実のサイズは小さいかもしれないが、毎日食べるにはむしろ良いかもしれない。

Shojiらは、境界型糖尿病の被検者に対して「ふじ」の未熟果から抽出した高濃度のポリフェノール混合物を3ヶ月間与え、経口ブドウ糖負荷試験への影響を調べるランダム化二重盲検試験を実施したところ、ポリフェノール投与群では、ブドウ糖負荷後30分の血糖値がプラセボ群と比較して有意に低下したと報告している<sup>44)</sup>。ポリフェノール混合物中のフロリジンの正確な濃度は示されていないが、今回我々の計測した熟果収穫期の「ふじ」の果皮に含まれるフロリジン含量から計算した果実（食用部分）一個あたりのフロリジン量がおおよそ1 mg程度であるのと比べると、10倍を超える量と推定される。ただし、フロリジンはりんごのみならず、なし、もも、梅、いちご、桜、びわなどバラ科の植物に広く含まれており、またより長期的な効果を含めて総合的に考えていく必要があるかもしれない。実際Guoらは、2016年までにおこなわれたりんご及びなしの摂取量と2型糖尿病のリスクに関する5つの前向きコホート研究のメタアナリシスを行い、総計22万8315人中14120人の2型糖尿病患者について分析した結果、りんご及びなしの摂取は2型糖尿病のリスクを18%減少させ、摂取量が週に1個増えるに従い3%リスクが減少すると報告している<sup>45)</sup>。自然栽培されたりんごの健康への直接的な影響に関する詳細な研究が待たれる。

今回質量分析により計測した自然栽培の「ふじ」果皮に含まれるフロリジン含量は、りんごを丸ご

と摂取した時に体内に取り込まれるフロリジンの量<sup>11)</sup>を考える際の一つの材料を提供する。ただし、Belvisoらは、種々のりんごポリフェノールのうち、フロリジンは特に栽培年による影響が顕著であることを指摘している<sup>46)</sup>。本研究は、2019年度の同一日に二つの圃場から採取した同一種りんご同士を比べ、収穫日によらず一貫したフロリジン含量の違いを検出したが、一年のみで比較解析を行ったため、今後研究を継続的に、より大系におこなっていくことが必要である。

## 利益相反

本研究は平成28-30年度弘前大学機関研究、平成29-30年度弘前大学グロウカルファンドならびに平成28-29年度JSPS科研費16K15186の助成により実施した（いずれも代表者は山田勝也）。全ての著者に、本研究内容に関する利益相反はありません。

## 謝辞

果実の採取にご協力を頂いた平井秀樹氏（有限会社ゆめりんご）および木村秋則氏、山根英明氏（木村興農社）、多くのご教授をいただいた杉山修一弘前大学農学生命学部教授、研究の推進に多大なご協力をいただいた石川正伸氏、対馬武夫氏（東和電機工業株式会社）、ポリフェノール抽出技術をご教授頂いた庄司俊彦博士（国立農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所）、貴重なご助言を頂戴した田中和明農学生命科学部准教授、萱場広之臨床検査医学講座教授、研究室研修の弘前大学医学部学生片倉祐希、葉袋真帆、木村研太郎、小林祐紀さん、質量分析にご協力をいただいた宮崎美佑氏（COI研究推進機構）、凍結乾燥装置に関しお世話になった土岐安希子氏（弘前大学臨床中央研究室）に深謝致します。なお第一著者の小野は、石津俊記念奨学基金からの奨学金を得て本研究を実施しました。ご支援に対し深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Wang X, Ouyang Y, Liu J, Zhu M, Zhao G, Bao W, Hu FB. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ*. 2014;349:g4490.
- 2) Ezzati M, Riboli E. Behavioral and Dietary Risk Factors for Noncommunicable Diseases. *N Engl J Med*. 2013;369:954-64.
- 3) Freshfel European Fresh Produce Association. World production of fruits and vegetables. 2015. [https://www.freshfel.org/docs/FAQ/Fact\\_Sheet\\_-\\_world\\_production\\_2009\\_-\\_2013.pdf](https://www.freshfel.org/docs/FAQ/Fact_Sheet_-_world_production_2009_-_2013.pdf).
- 4) Bondonno NP, Bondonno CP, Ward NC, Hodgson JM, Croft KD. The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends Food Sci Technol*. 2017;69:243-56.
- 5) Shoji T, Akazome Y, Kanda T, Ikeda M. The toxicology and safety of apple polyphenol extract. *Food Chem Toxicol*. 2004;42:959-67.
- 6) Kalinowska M, Bielawska A, Lewandowska-Siwkiewicz H, Priebe W, Lewandowski W. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiol Biochem*. 2014;84:169-88.
- 7) Escarpa A, González MC. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J Chromatogr A*. 1998;823:331-7.
- 8) Łata B, Trampczyńska A, Paczesna J. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae*. 2009;121:176-81.
- 9) Tian J, Wu X, Zhang M, Zhou Z, Liu Y. Comparative study on the effects of apple peel polyphenols and apple flesh polyphenols on cardiovascular risk factors in mice. *Clin Exp Hypertens*. 2018;40:65-72.
- 10) Ehrenkranz JRL, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005;21:31-8.
- 11) Niederberger KE, Tennant DR, Bellion P. Dietary intake of phloridzin from natural occurrence in foods. *Br J Nutr*. 2020;123:942-50.
- 12) Wu C-H, Ho Y-S, Tsai C-Y, Wang Y-J, Tseng H, Wei P-L, Lee C-H, et al. In vitro and in vivo study of phloretin-induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter. *Int J Cancer*. 2009;124:2210-9.
- 13) Nair SVG, Ziaullah, Rupasinghe HPV. Fatty acid esters of phloridzin induce apoptosis of human liver cancer cells through altered gene expression. *PLoS One*. 2014;9:e107149.
- 14) Wright EM, Loo DDF, Hirayama BA. Biology of Human Sodium Glucose Transporters. *Physiol Rev*. 2011;91:733-94.
- 15) Makarova E, Górnaś P, Konrade I, Tirzite D, Cirule H, Gulbe A, Pugajeva I, et al. Acute anti-hyperglycaemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: a preliminary study. *J Sci Food Agric*. 2015;95:560-8.
- 16) Mather A, Pollock C. Renal glucose transporters: novel targets for hyperglycemia management. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:307-11.
- 17) de Oliveira MR. Phloretin-induced cytoprotective effects on mammalian cells: A mechanistic view and future directions. *Biofactors*. 2016;42:13-40.
- 18) Nelson JA, Falk RE. Phloridzin and phloretin inhibition of 2-deoxy-D-glucose uptake by tumor cells in vitro and in vivo. *Anticancer Res*. 1993;13:2293-9.
- 19) Sasaki A, Nagatomo K, Ono K, Yamamoto T, Otsuka Y, Teshima T, Yamada K. Uptake of a fluorescent L-glucose derivative 2-NBDLG into three-dimensionally accumulating insulinoma cells in a phloretin-sensitive manner. *Hum Cell*. 2016;29:37-45.
- 20) Ono K, Takigawa S, Yamada K. L-Glucose: Another Path to Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2020;12:850.
- 21) Yokoyama H, Sasaki A, Yoshizawa T, Kijima H, Hakamada K, Yamada K. Imaging hamster model of bile duct cancer in vivo using fluorescent L-glucose derivatives. *Hum Cell*. 2016;29:111-21.

- 22) Łozowicka B, Kaczyński P, Mojsak P, Rusiłowska J, Beknazarova Z, Ilyasova G, Absatarova D. Systemic and non-systemic pesticides in apples from Kazakhstan and their impact on human health. *J Food Compost Anal.* 2020;90:103494.
- 23) Hirakue A, Sugiyama S. Relationship between foliar endophytes and apple cultivar disease resistance in an organic orchard. *Biol Control.* 2018;127:139-44.
- 24) 農林水産省大臣官房統計部農林水産統計. 令和元年産りんごの結果樹面積、収穫量及び出荷量. 2020. [https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_kazyu/attach/pdf/index-36.pdf](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kazyu/attach/pdf/index-36.pdf).
- 25) 東京税関. 貿易統計特集りんごの輸出. 2017. <https://www.customs.go.jp/tokyo/content/toku2910.pdf>.
- 26) Obara M, Masumoto S, Ono Y, Ozaki Y, Shoji T. Procyanidin Concentrations and H-ORAC of Apples Cultivated in Japan. *Food Sci Technol Res.* 2016;22:563-8.
- 27) 全国農業協同組合連合会青森県本部 青森りんご品種紹介 [http://www.am.zennoh.or.jp/apple\\_breed.html](http://www.am.zennoh.or.jp/apple_breed.html).
- 28) Zheng H-Z, Kim Y-I, Chung S-K. A profile of physicochemical and antioxidant changes during fruit growth for the utilisation of unripe apples. *Food Chem.* 2012;131:106-10.
- 29) Awad MA, de Jager A, van der Plas LHW, van der Krol AR. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of 'Elstar' and 'Jonagold' apples during development and ripening. *Scientia Horticulturae.* 2001;90:69-83.
- 30) Mehrabani LV, Hassanpouraghdam MB. Developmental variation of phenolic compounds in fruit tissue of two apple cultivars. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2012;11:259-64.
- 31) Takos AM, Ubi BE, Robinson SP, Walker AR. Condensed tannin biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. *Plant Sci.* 2006;170:487-99.
- 32) Gosch C, Halbwirth H, Stich K. Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry.* 2010;71:838-43.
- 33) Holderbaum DF, Kon T, Guerra MP. Dynamics of total phenolic content in different apple tissues and genotypes: impacts and relevance for breeding programs. *Scientia Horticulturae.* 2014;168:58-63.
- 34) Ana S, Maja MP, Haidrun H, Franci S, Karl S, Robert V. Response of the phenylpropanoid pathway to *Venturia inaequalis* infection in maturing fruit of 'Braeburn' apple. *J Hortic Sci Biotechnol.* 2010;85:465-72.
- 35) Zhou K, Hu L, Li Y, Chen X, Zhang Z, Liu B, Li P, et al. MdUGT88F1-mediated phloridzin biosynthesis regulates apple development and Valsa canker resistance. *Plant Physiol.* 2019;180:2290-305.
- 36) Yuri JA, Neira A, Fuentes M, Razmilic I, Lepe V, González MF. Bagging cv. Fuji, Raku Raku Apple Fruit Affects Their Phenolic Profile and Antioxidant Capacity. *Erwerbs-Obstbau.* 2020;62:221-9.
- 37) Chen C-S, Zhang D, Wang Y-Q, Li P-M, Ma F-W. Effects of fruit bagging on the contents of phenolic compounds in the peel and flesh of 'Golden Delicious', 'Red Delicious', and 'Royal Gala' apples. *Scientia Horticulturae.* 2012;142:68-73.
- 38) Zielinska D, Laparra-Llopis JM, Zielinski H, Szawara-Nowak D, Giménez-Bastida JA. Role of Apple Phytochemicals, Phloretin and Phloridzin, in Modulating Processes Related to Intestinal Inflammation. *Nutrients.* 2019;11:1173.
- 39) Šavikin K, Živković J, Zdunić G, Gođevac D, Đorđević B, Dojčinović B, Đorđević N. Phenolic and mineral profiles of four Balkan indigenous apple cultivars monitored at two different maturity stages. *J Food Compost Anal.* 2014;35:101-11.
- 40) Veberic R, Trobec M, Herbinger K, Hofer M, Grill D, Stampar F. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *J Sci Food Agric.* 2005;85:1687-94.
- 41) Kusznierevicz B, Lewandowska A, Martysiak-Żurowska D, Bartoszek A. The influence of plant protection by effective microorganisms on the content of bioactive phytochemicals in apples. *J Sci Food Agric.* 2017;97:3937-47.
- 42) Petkovsek MM, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a

- 2-year period. *J Sci Food Agric.* 2010;90:2366-78.
- 43) 農林水産省. 果樹をめぐる情勢 令和元年5月版. 2019. <https://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/fruits/attach/pdf/meguzi1905130.pdf>
- 44) Shoji T, Yamada M, Miura T, Nagashima K, Ogura K, Inagaki N, Maeda-Yamamoto M. Chronic administration of apple polyphenols ameliorates hyperglycaemia in high-normal and borderline subjects: A randomised, placebo-controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;129:43-51.
- 45) Guo X-F, Yang B, Tang J, Jiang J-J, Li D. Apple and pear consumption and type 2 diabetes mellitus risk: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Food Funct.* 2017;8:927-34.
- 46) Belviso S, Scursatone B, Re G, Zeppa G. Novel Data on the Polyphenol Composition of Italian Ancient Apple Cultivars. *Int J Food Prop.* 2013;16:1507-15.