

食品用機能性素材スピルリナ

第5回 E&C オンライン研修会

2021年2月15日

東洋酵素化学株式会社 学術顧問

女子栄養大学 名誉教授

林 修



女子栄養大学・短大ニュース
1993年7月入試広報

龍宮城は健康王国だった!?

- 東京薬科大学 微生物学研究室（故宮崎利夫教授）～1978年
 - ムコール科真菌の抗原活性物質に関する免疫化学的研究 Purification and partial characterization of the serological active substance from *Absidia cylindrospora*. *J Gen Microbiol* **106**, 289 (1978)
- 順天堂大学 医学部衛生学教室（故菊池正一教授）～1991年
 - 明暗環境（日内リズム）変動のマウス免疫能に及ぼす影響 The effects of the light-dark cycle on humoral and cell-mediated immune responses of mice. *Chronobiologia* **9(3)**, 291 (1982)
- Northwestern 大学医学部病理学研究室（Prof. R. Oyasu）：1985～87年
 - ラット尿中膀胱発がん促進因子の研究 Transferrin as a growth factor for rat bladder carcinoma cells in culture. *Cancer Research* **47**, 4560 (1987)
- 女子栄養大学 栄養学部微生物学研究室（奥脇義行名誉教授）：1991年～
 - Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. *J Nutr Sci Vitaminol* **40**, 431 (1994)



故宮崎利夫教授



故菊池正一教授



Prof. R. Oyasu



奥脇義行名誉教授

スピルリナ

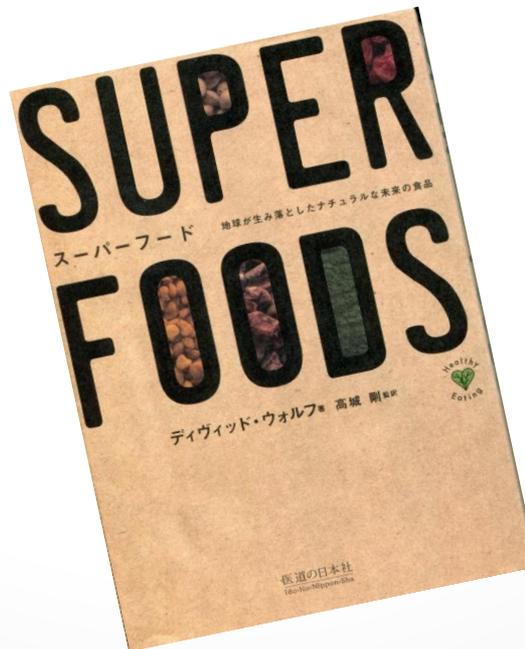
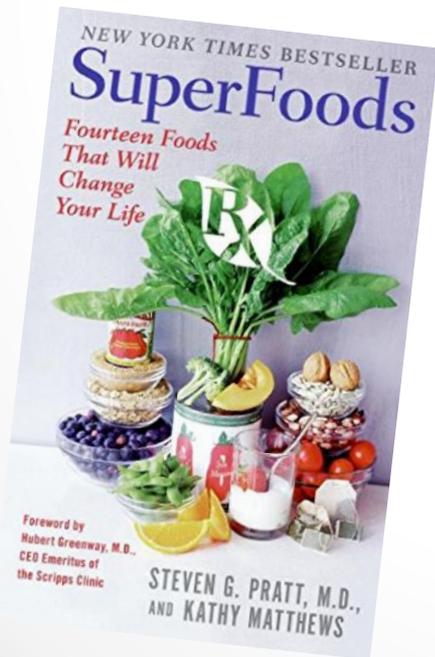
世界で最も多く生産されている藻類

- 健康食品、食品用着色料
- 水産養殖用の色揚げ材
- 宇宙食としての研究

- 「いわゆる健康食品」として一般食品に分類
（公財）日本健康・栄養食品協会JHFA～栄養補助食品
- 「特定保健用食品（トクホ）」や「栄養機能食品」
「機能性表示食品」などと区別される

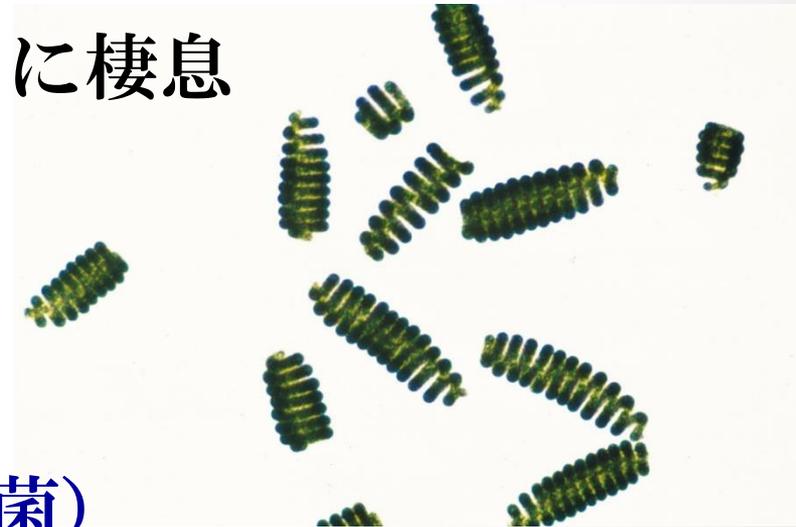
スーパーフード

- 米国では 2000 年頃 抗酸化作用やアンチ・エイジング、生活習慣病予防、がんリスクを下げる栄養成分を豊富に含む「スーパーフード」として紹介（ステイブン・プラット 2006, デイヴィッド・ウォルフ 2009, いとうゆき 2013）
スピルリナはじめアサイー, カカオ, キヌア, チアシードなど



Spirulina/Arthrospira platensis

- 南米アルゼンチン ラ・プラタ河流域にて発見 (Geitler *et al.*, 1925)
- 熱帯・亜熱帯地域
強アルカリ塩湖 (pH 10~10.5) に棲息
- 0.3 ~ 0.5mm、巾6 ~ 12 μ m
浮遊性単細胞微細藻類

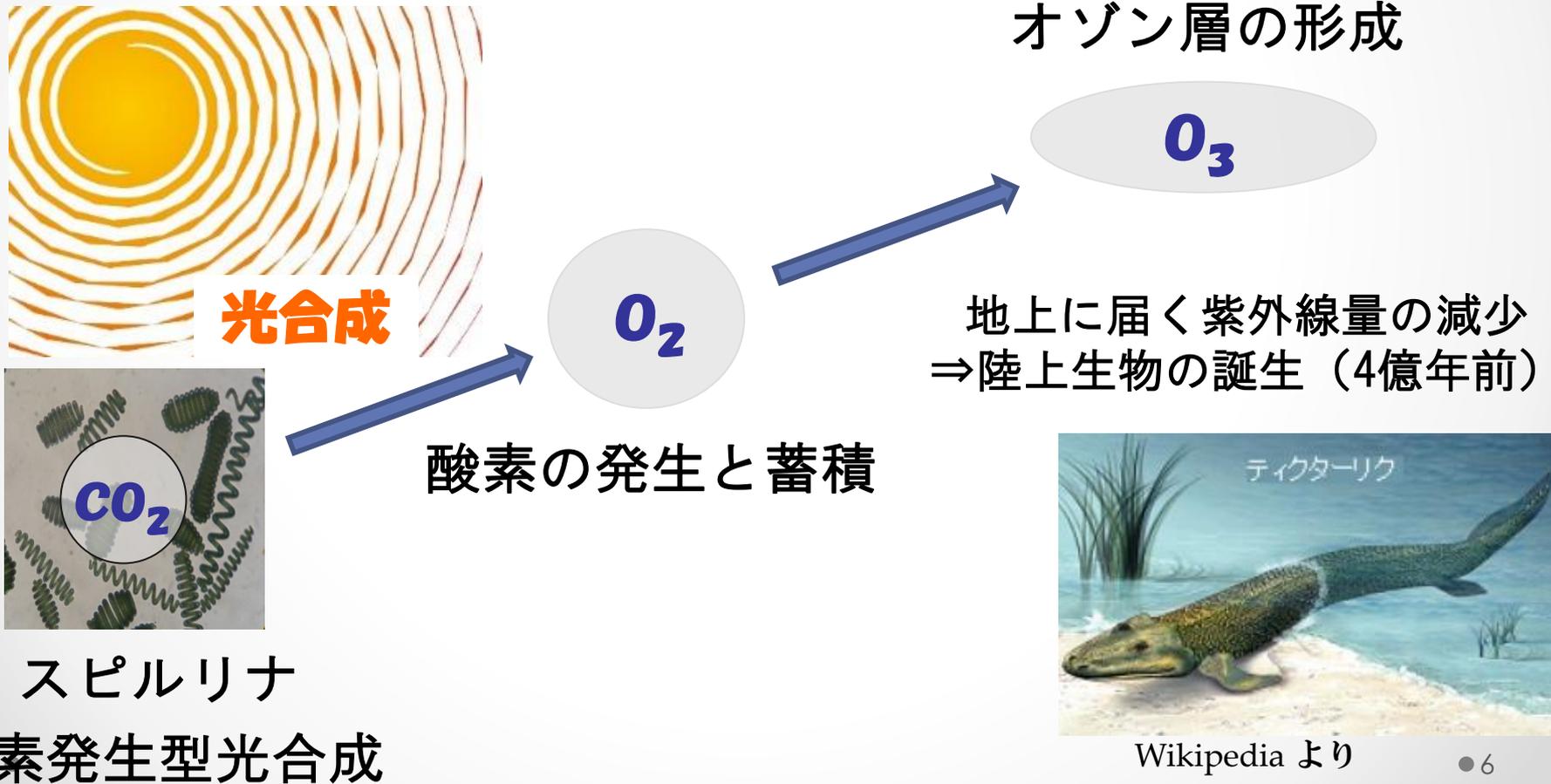


原核生物

シアノバクテリア (藍色細菌)

青色光合成色素フィコシアニン

27億年前に出現 シアノバクテリアの光合成能によって 生命進化の舞台がつくられた



食用としての歴史は古い

メキシコ・アステカ文明（14～16世紀）においても食用されていた（Cifferi, 1983）

“*Tecuitlatl (stone excrement)*”, *dihé*



Drawing in *Human Nature*,
1978 by Peter T. Furst



スピルリナ *dihé* を砂地に広げて吸水・乾燥させる
FAO Report *The Future is an Ancient Lake*, 2004
Photo: Marzio Marzot,

2003年 米国 FDA (食品医薬品局)

Earthrise 社と Cyanotech 社共同申請

GRAS (Generally Recognized as Safe 一般に安全) として承認



2011年 米国薬局方USP

スピルリナ (*S. platensis*と*S. maxima*)

Class A safety として国民医薬品集 栄養サプリメント各条に収載



スピルリナの機能性

1. 高たんぱく質（2.5g/4g中、アミノ酸価 86）
2. 食物繊維を約 9%含有
3. 免疫賦活作用
4. 抗酸化・抗炎症作用～生活習慣病予防
5. その他

抗体応答・免疫賦活作用

- スピルリナ 10～20%添加飼料、7週間摂取、マウス
 - 抗体応答増強
 - 脾臓中抗体産生細胞数、血清中抗体量
 - マクロファージ機能促進
 - ラテックス粒子貪食作用、インターロイキン1 (IL-1) 産生

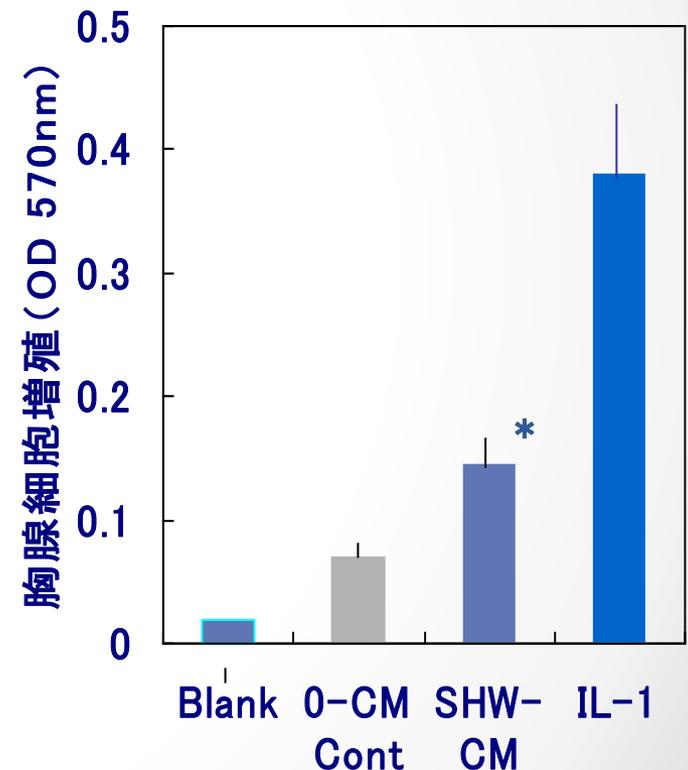
脾臓中抗体産生細胞および 腹腔細胞貪食能

マクロファージ IL-1 産生能

スピルリナ摂取（7週間）マウス

Groups	脾臓中抗体産生細胞数 (x 10 ⁶ cells/mouse)	腹腔貪食細胞数 (%)
Control	13.7 ± 3.6	91.3 ± 6.1
SP-10	18.2 ± 3.95 *	95.9 ± 2.4 *
SP-20	19.5 ± 4.1 **	93.9 ± 5.3

means ± SD of 10 mice.



● 全身免疫

- 脾臓・リンパ節

体内に侵入した細菌
などを排除する
治療的はたらき

- マクロファージ、
リンパ球、IgG 抗体

● 粘膜局所免疫

- 腸管・鼻腔・気道
粘膜・唾液腺・乳
腺・涙腺

微生物やアレルゲンの
侵入を防ぐ
予防的はたらき

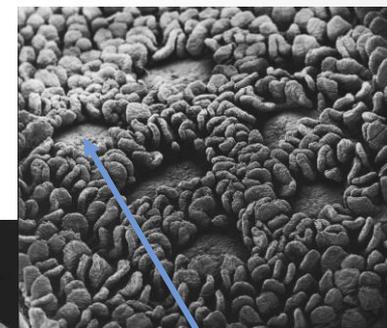
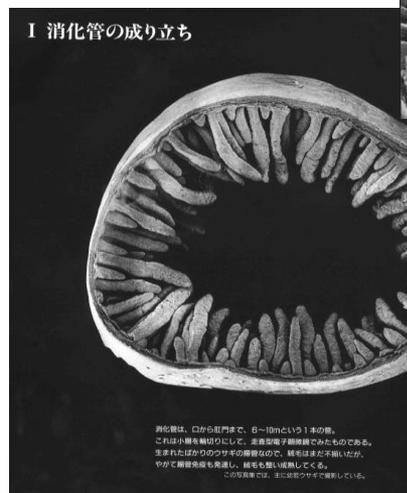
- 分泌型 IgA 抗体

腸管は、人体最大の免疫器官

マウス腸管粘膜 分泌型IgA抗体応答

- エビ抽出物可溶性抗原 経口投与
- スピルリナ熱水抽出物 (15、60倍希釈液 SPC, SPD)

- 抗原投与と同時に 5週間摂取
 - 腸管粘膜 分泌型 IgA抗体量
 - 血清 IgE抗体量



ドーム上皮
(パイエル板)

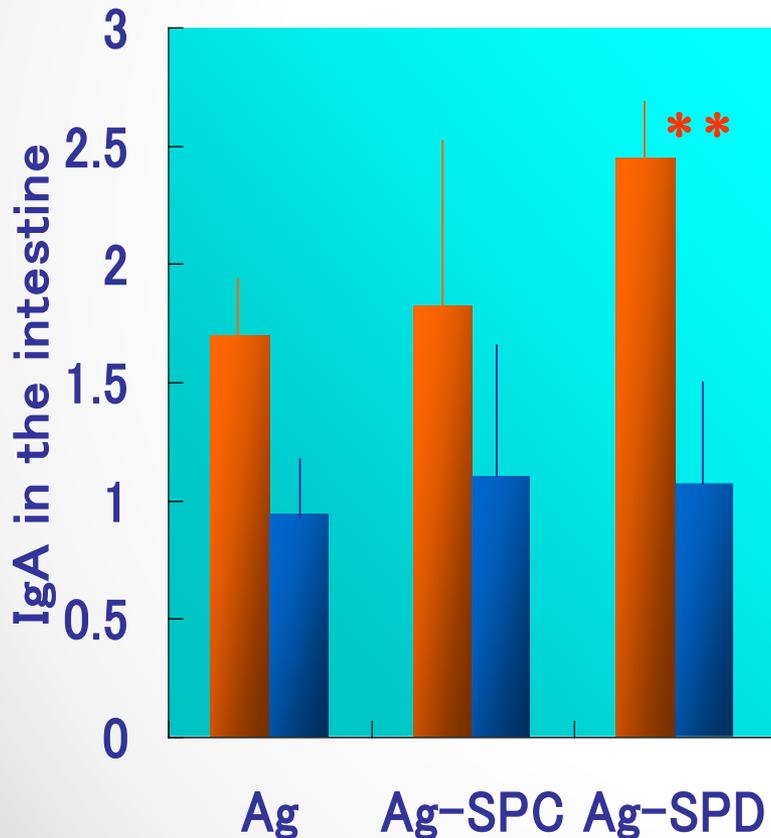
腸管粘膜 IgA抗体応答

抗原投与と同時に 5 週間摂取

A. 腸管粘膜 IgA

■ Total IgA mg/ml

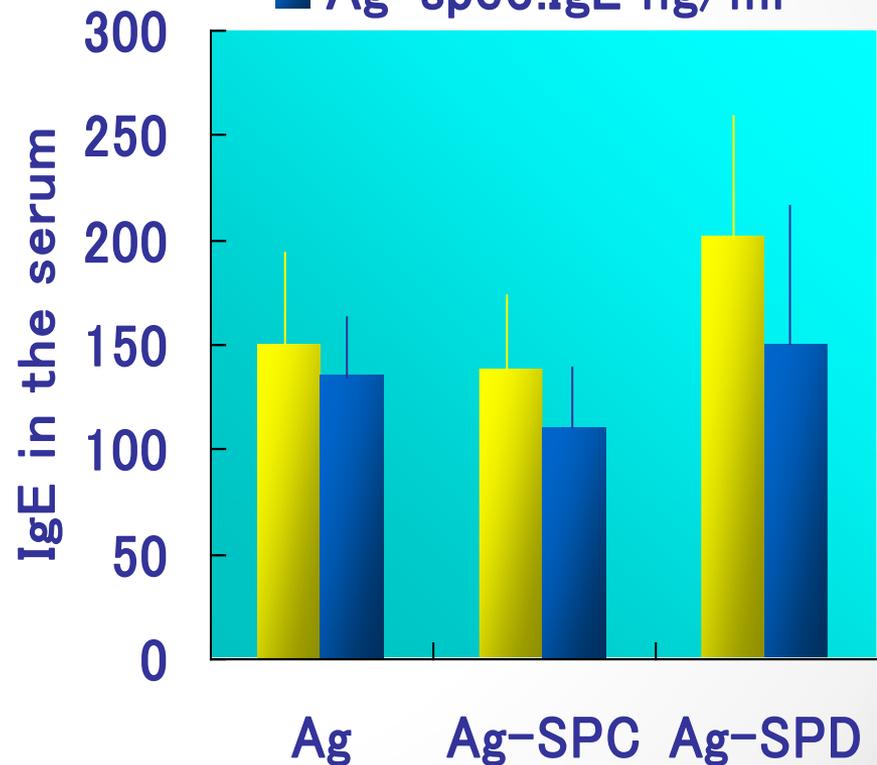
■ Ag-spec.IgA μ g/ml



B. 血清中 IgE

■ Total IgE ng/ml

■ Ag-spec.IgE ng/ml



抗原特異的 IgAおよびIgE 抗体応答

- 水溶液（エビ抽出物）抗原：弱い抗体応答

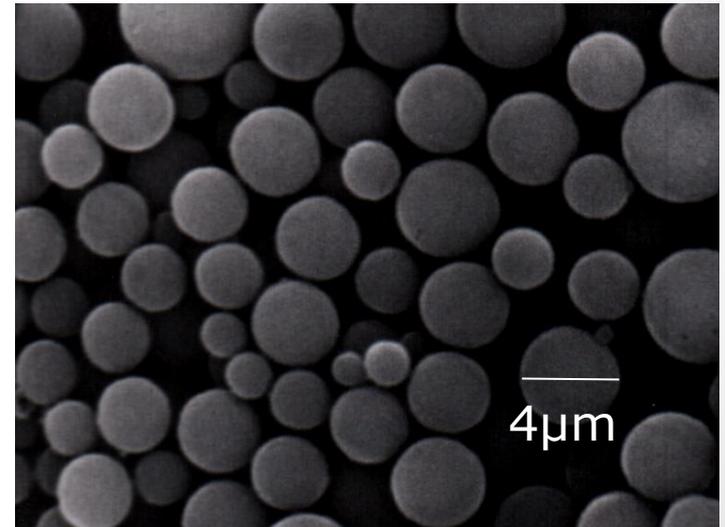
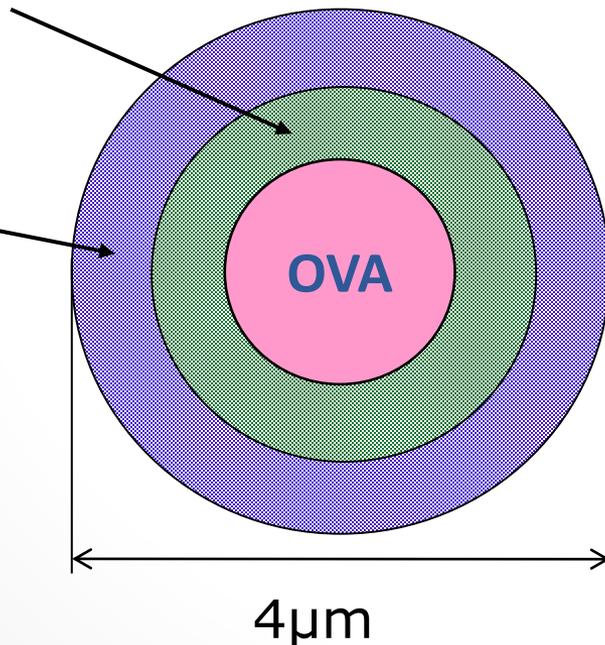


- 卵白アルブミンOVA 抗原内包微粒子と不活化百日咳菌アジュバント ： 強い抗体応答
 - 腸管粘膜 OVA特異的 IgA および血清 IgE 抗体産生
 - 腸管アレルギー性炎症

OVA抗原内包微粒子 (W/O/Wエマルジョン) 生体内分解性高分子化合物

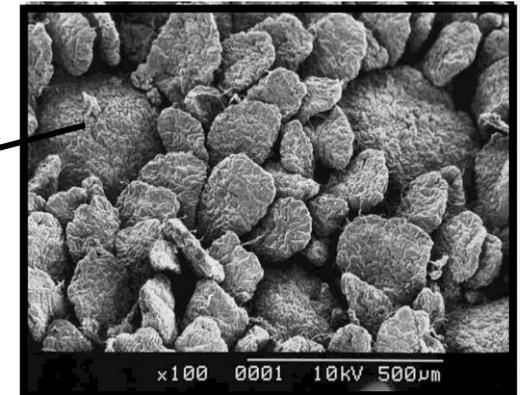
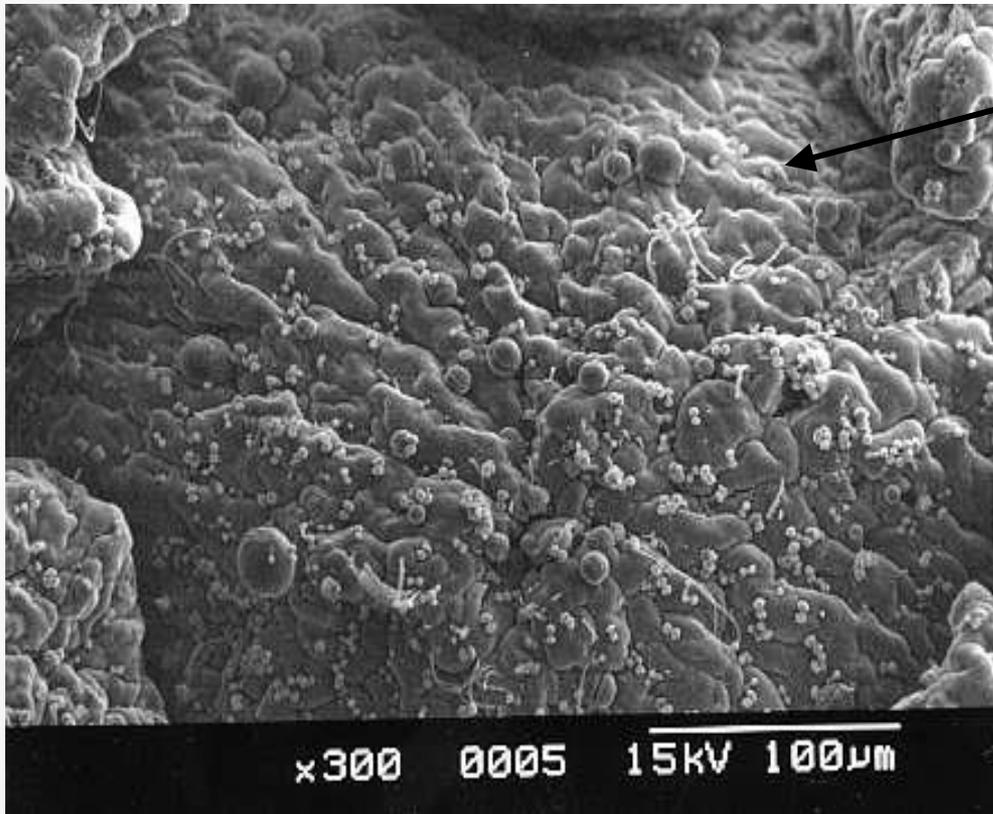
PLG; poly (DL-lactide-co-glycolide)

PVA;
polyvinyl
alcohol



走査型電子顕微鏡像

マウスパイエル板における OVA抗原内包微粒子の付着



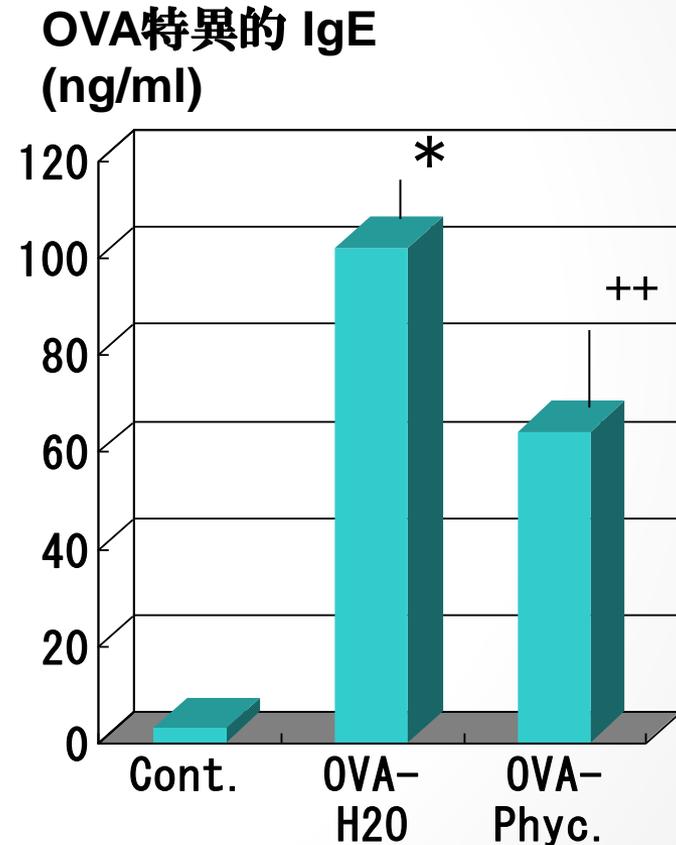
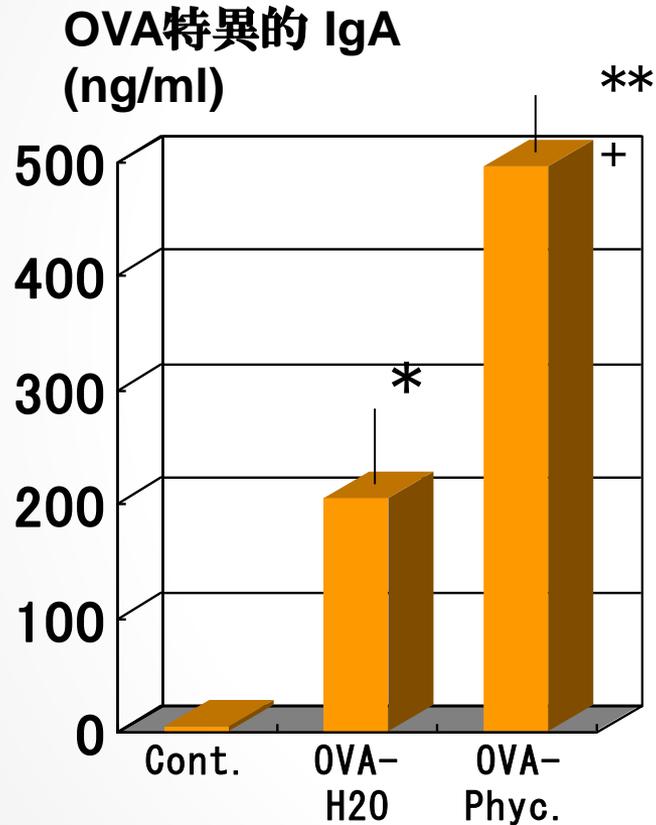
24時間絶食後、OVA抗原内包微粒子25 mg/0.5 ml PBSを胃ゾンデにて経口投与。45～60分後、腸管後半部のパイエル板部位をそれぞれ採取して試料とした。

JCL:ICRマウス(雌 5週齢)腸管パイエル板(×300)

- 寧ら: 体力・栄養・免疫学雑誌 13, 90 (2003)

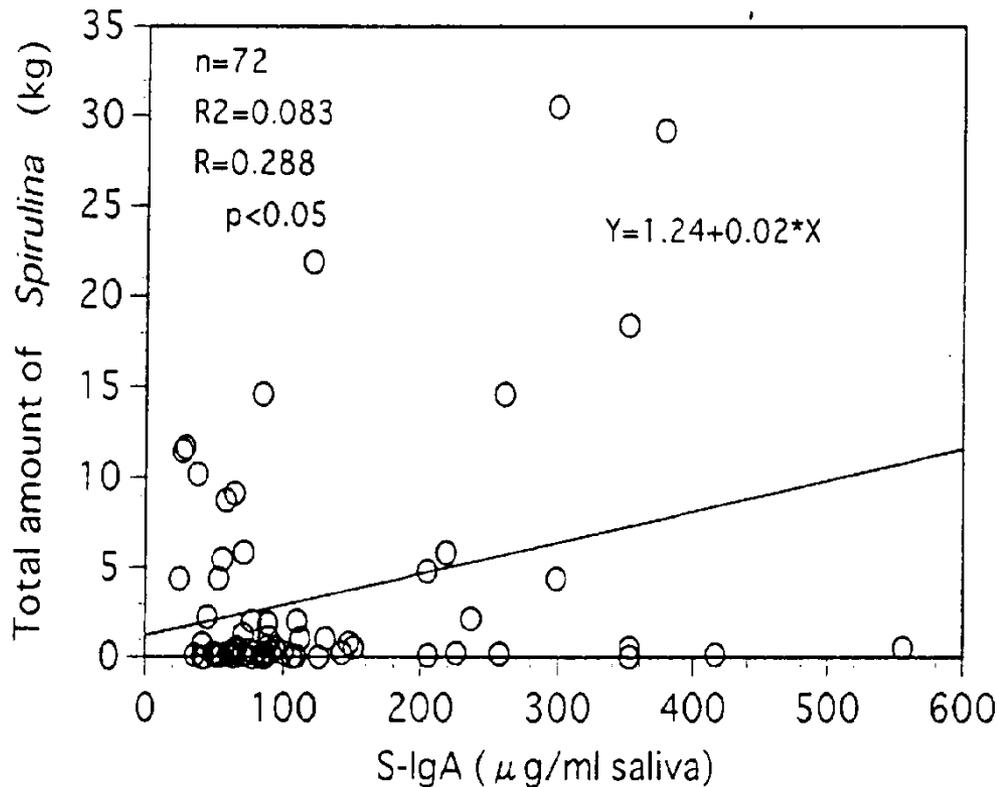
フィコシアニンの粘膜免疫増強作用

分泌型IgA抗体産生促進、血清IgE抗体抑制



*; $p < 0.05$ compared to Cont., ++; $p < 0.01$ compared to OVA H₂O

スピルリナ摂取とヒト唾液中IgA量との相関性



スピルリナ摂取総量
が多ければ総IgA抗
体量も高い
正相関

老化にともなう免疫能の衰えを軽減

腸管粘膜局所

高齢マウス

- CD8⁺細胞： 有意に減少
- CD4⁺CD8⁺細胞： 有意に増加

スピルリナ（SP）摂取高齢マウス

- CD8⁺細胞と $\gamma\delta$ TCR⁺細胞を有意に上昇
- 免疫能の回復、維持

CD8⁺細胞とTCR γ δ ⁺T細胞を維持

高齢 (43-week) マウス、スピルリナ熱水抽出物SP 5週間摂取

	Gate A		CD45 ⁺	CD45陽性細胞中各抗原陽性細胞 ^(b)					
				CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻	TCR $\alpha\beta$ ⁺	TCR $\gamma\delta$ ⁺
成熟 マウス (n=4)	%	1.6 ±0.4	59.0 ±24.8	10.0 ±1.66	81.4 ±4.4	6.9 ±2.4	15.5 ±3.0	52.2 ±11.4	52.7 ±14.4
	個	400 ±102	222 ±68	22 ±8	182 ±62	16 ±8	33 ±7	111 ±15	112 ±21
高齢 マウス (n=2)	%	1.6 ±0.4	92.7 ±2.4	13.5 ±0.57*	63.3 ±5.9**	5.41 ±1.4	28.7 ±6.7*	74.8 ±4.0*	31.0 ±4.8
	個	388 ±88	358 ±73*	49 ±9*	224 ±11	20 ±8	106 ±39**	270 ±53**	108 ±1
高齢 マウス +SP (n=4)	%	2.9 ±1.3	95.2 ±2.9	10.1 ±3.77	77.6 ±4.0 [#]	6.7 ±3.9	19.0 ±3.9	60.8 ±10.8	52.0 ±10.1 [#]
	個	712 ±329	684 ±333*	77 ±68* [#]	540 ±287	54 ±58	122 ±37**	430 ±281*	337 ±109* [#]

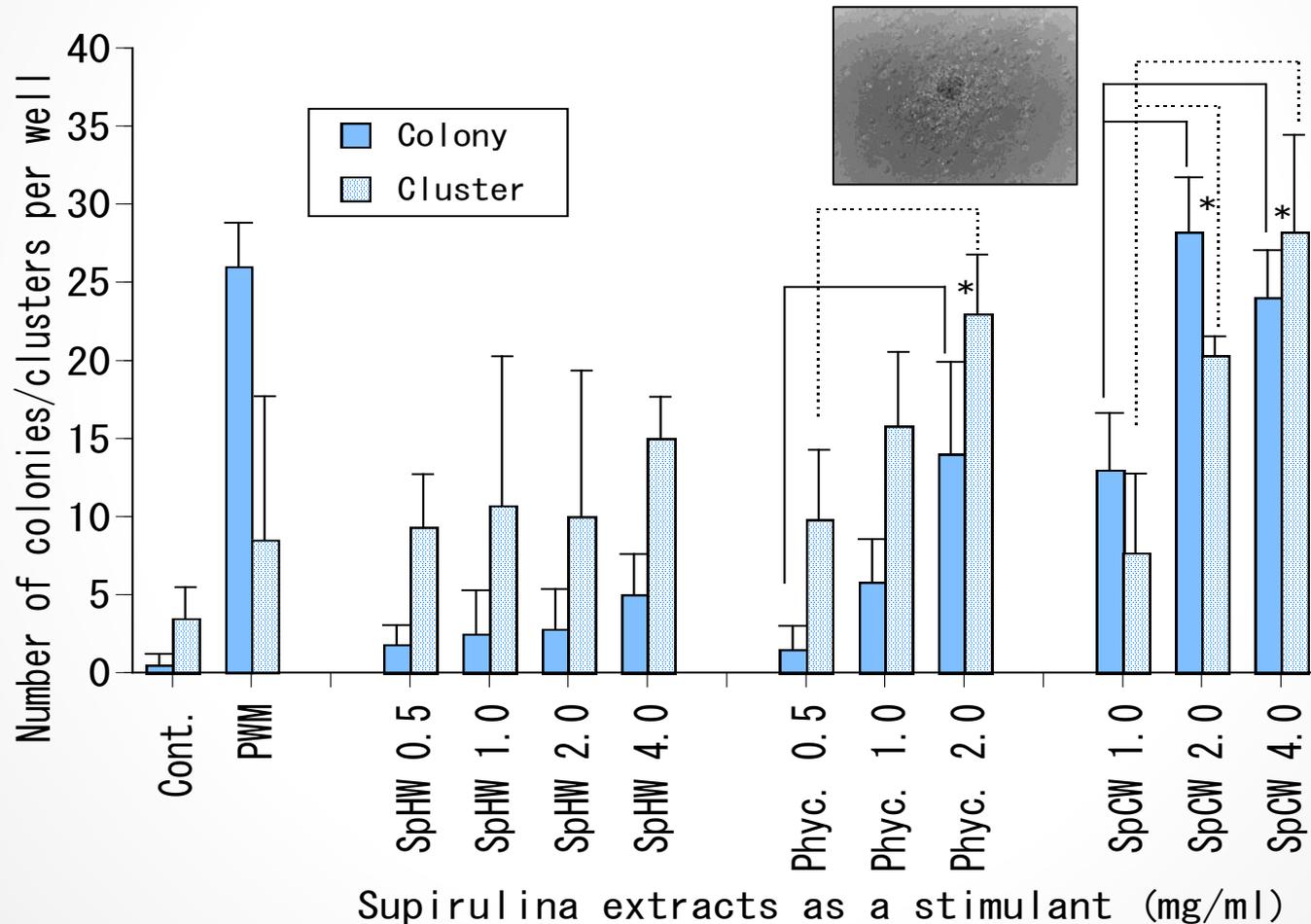
CD45⁺% (a): Gate A通過細胞中のCD45陽性細胞率

CD45陽性細胞中各抗原陽性細胞率^(b): Gate A通過細胞中CD45陽性細胞に占める各抗原陽性細胞

*: p<0.05 to 成熟、**: p<0.01 to 成熟、#: p<0.05 to 高齢

分化・増殖促進

マウス骨髄細胞コロニー形成能促進 *in vitro* 実験

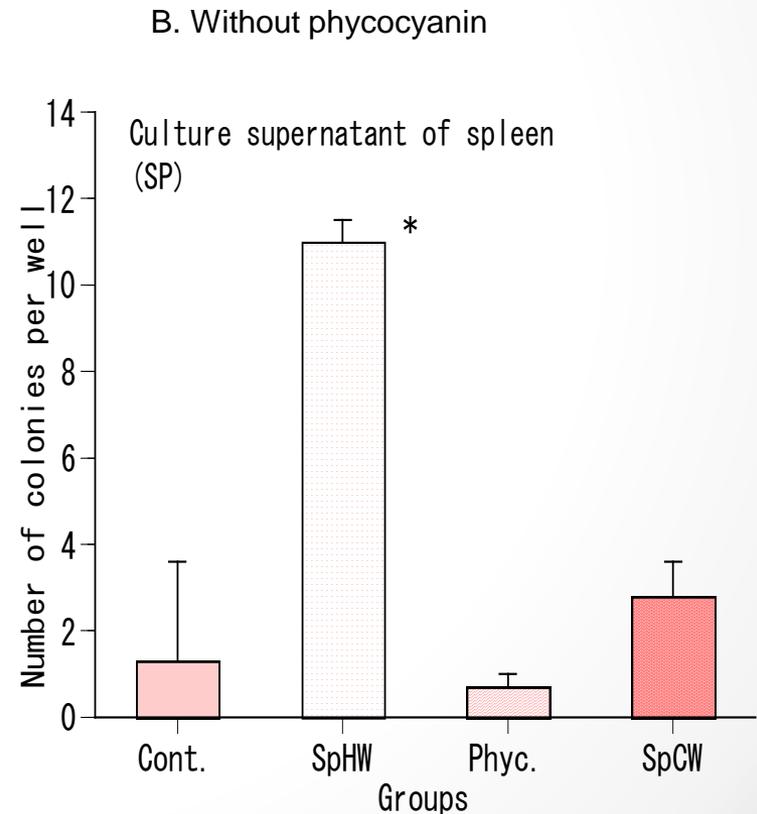
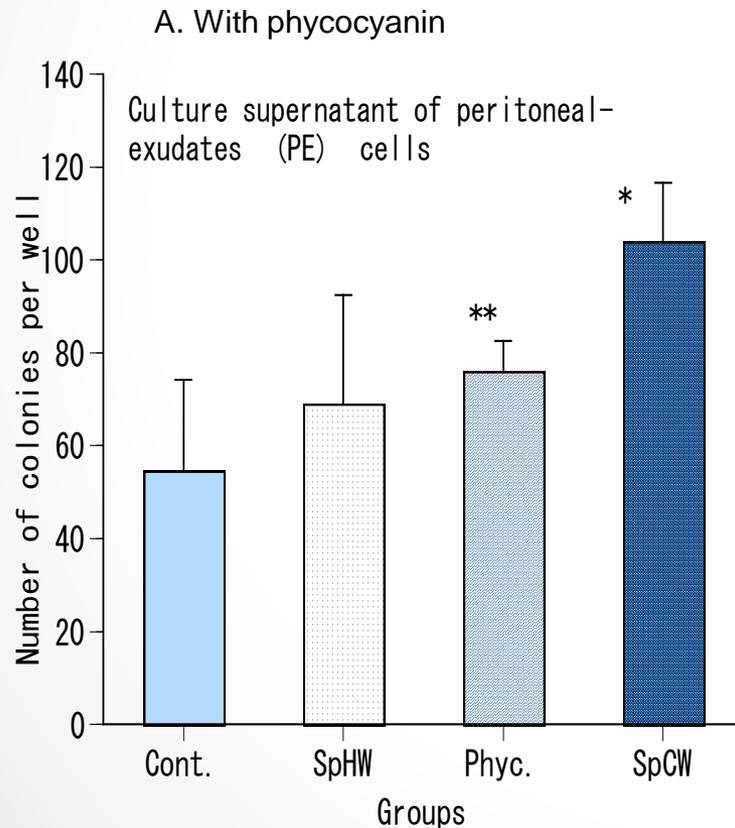


分化・増殖因子産生

in vivo 実験

スピルリナ各成分5週間摂取マウス

腹腔浸出細胞・脾臓細胞における分化増殖因子産生

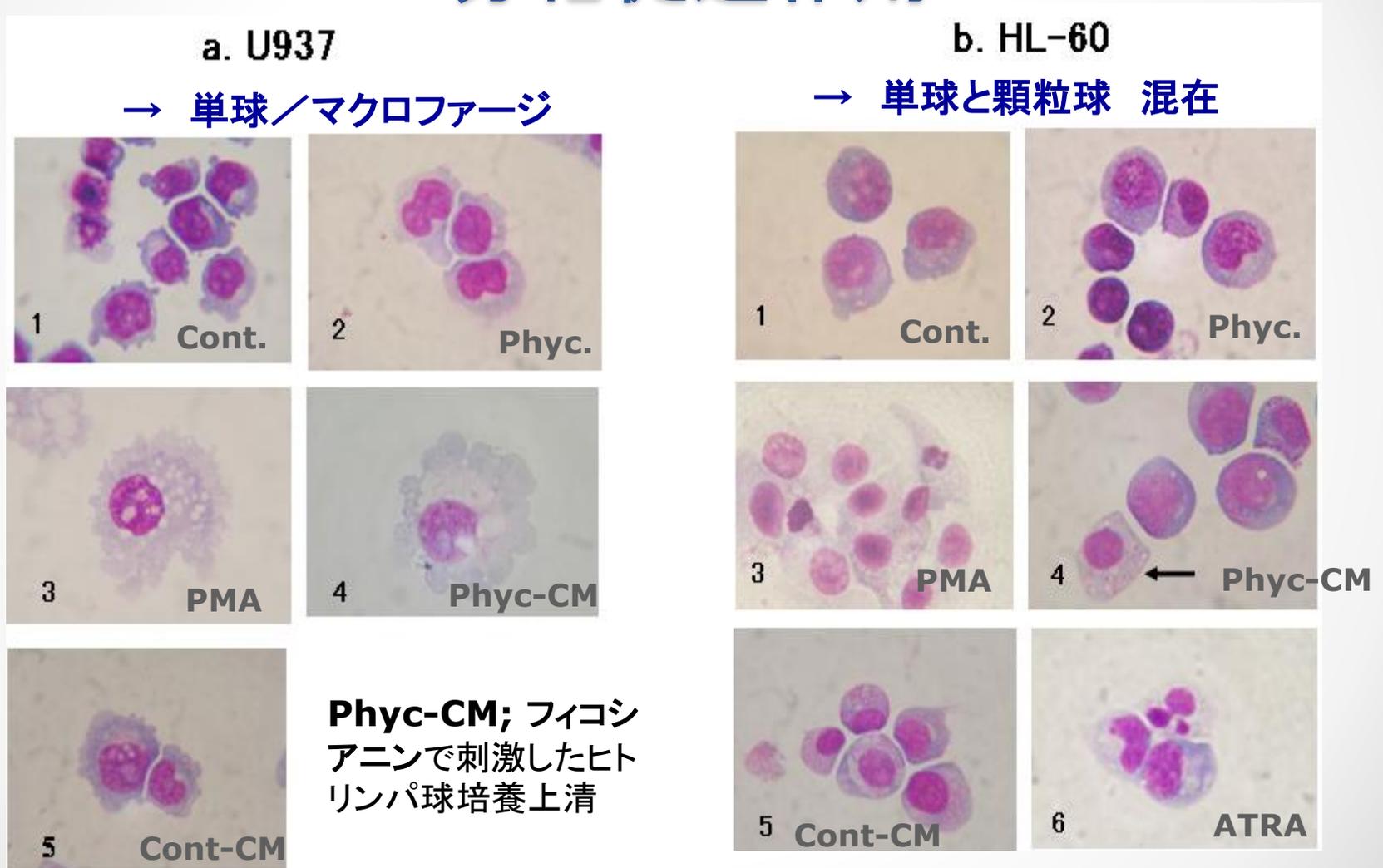


スピリリナ刺激脾臓細胞培養上清中 分化増殖因子 GM-CSF、IL-3 産生促進

ELISA 測定

stimulated with	Colonies/well	GM-CSF pg/ml of CS	IL-3 pg/ml of CS
Control	0.5 ± 0.7	<4	47.3 ± 4.0
SpHW	2.8 ± 2.6	<4	76.7 ± 8.0
Phycocyanin	14.0 ± 5.9	9.2 ± 0.7	94.7 ± 10.8
SpCW	28.2 ± 5.5	1,206 ± 333	481.7 ± 144.4

ヒト白血病細胞株U937, HL-60に対する 分化促進作用



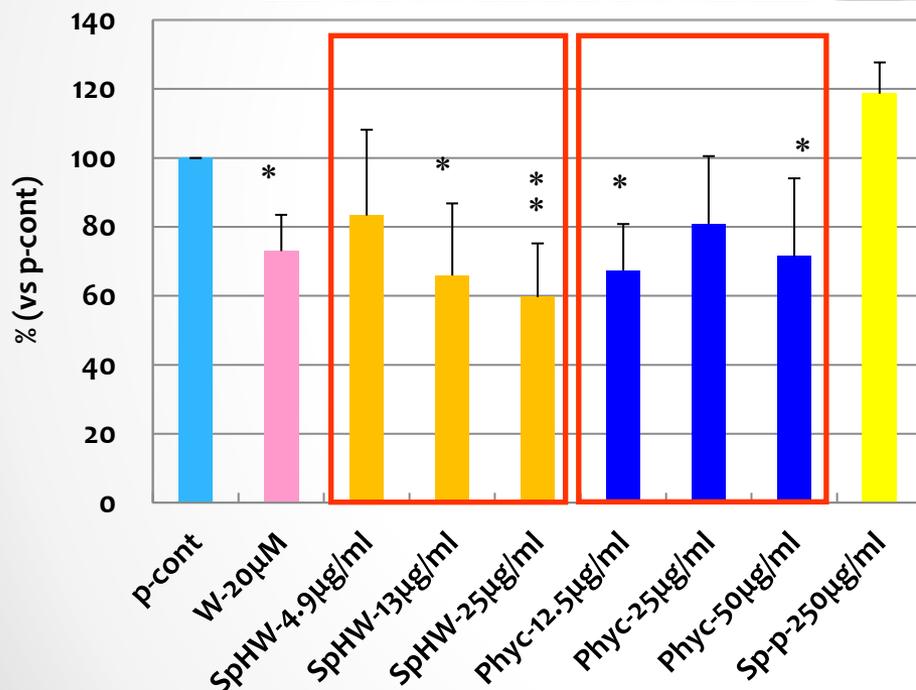
ラット好塩基球様細胞株RBL-2H3 培養系 における抗アレルギー作用

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

phospho-ERK

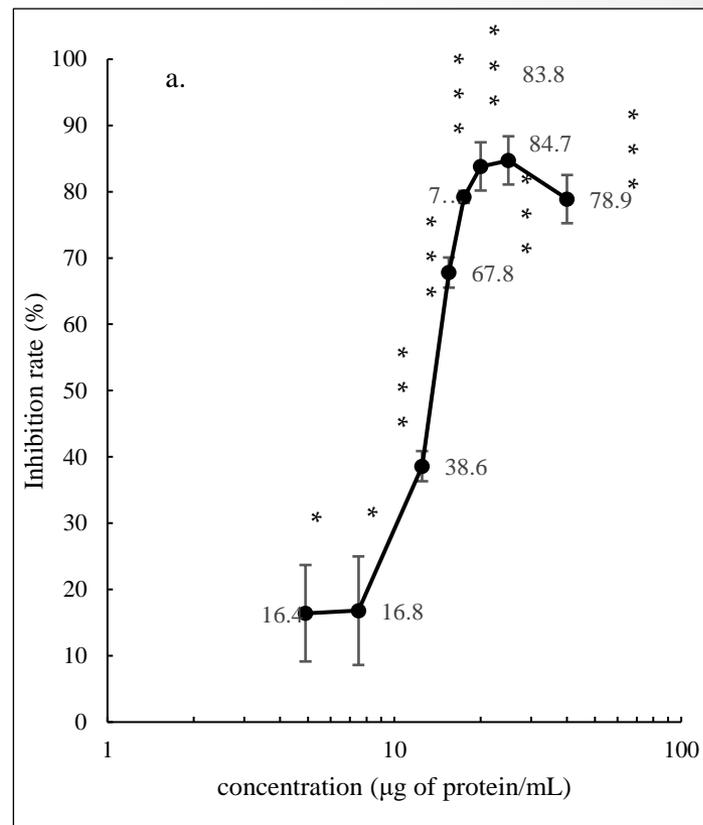


ERK



*; P<0.05, **; P<0.01 to p-cont

ERKリン酸化に及ぼすスピルリナ成分の影響

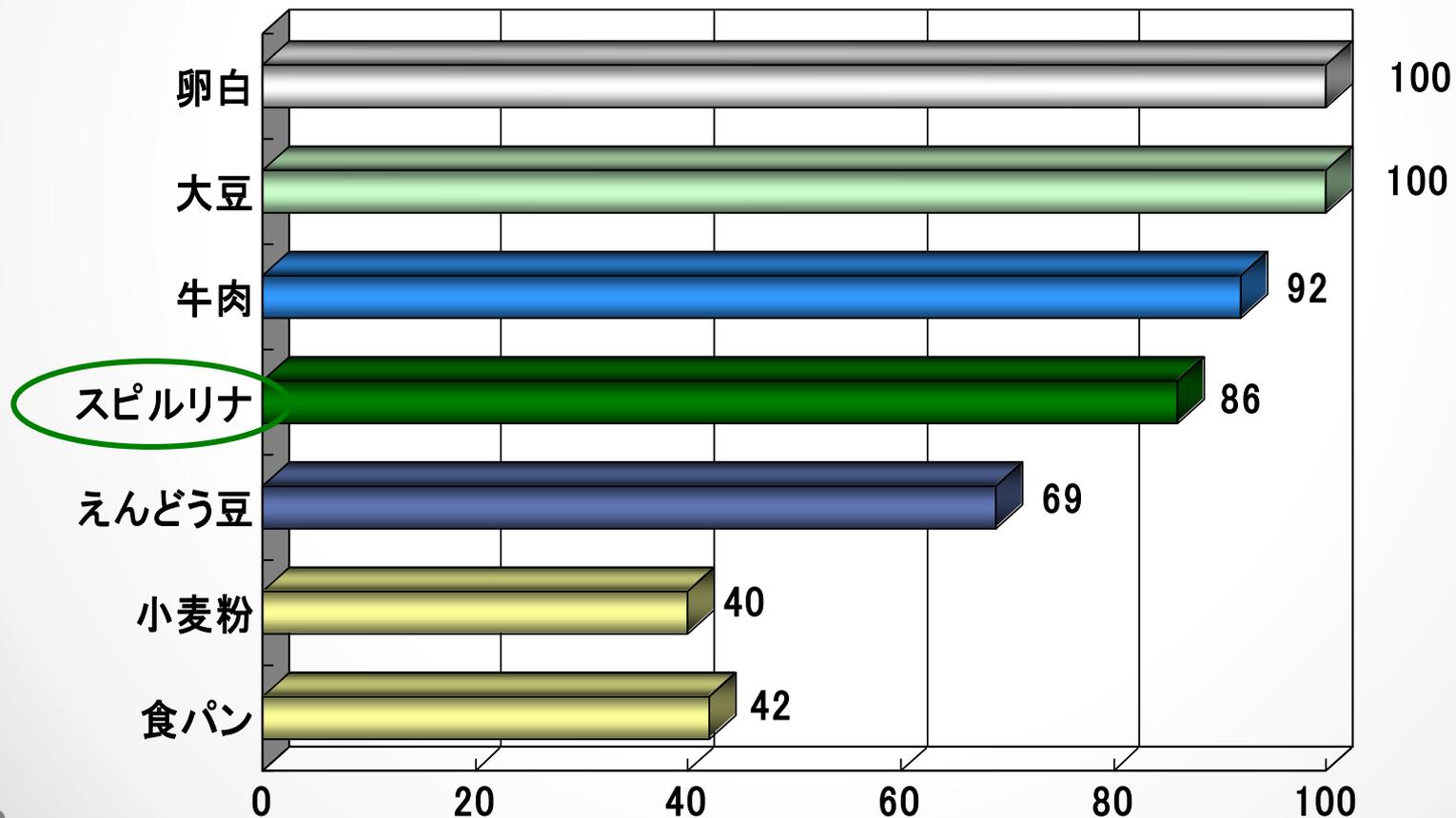


Inhibitory effects of various concentrations of SpHW on activity of β -Hexosaminidase

バランスのとれたたんぱく質

高いたんぱく含量； 2.5g/4g中 (スピルリナ一日摂取量)

高いアミノ酸価



スピルリナ摂取～高齢男性血清 中総タンパク質値上昇

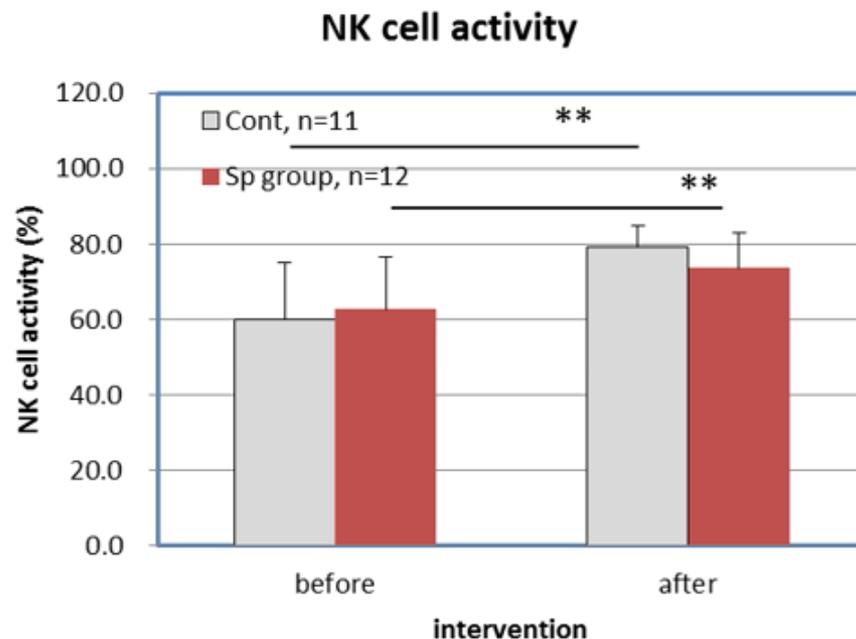
SP群 : 65歳以上中国男性 13人 通常食 + Sp 4.2 g/日
 Cont 群 : 同 14人 通常食 12週間

Sp群 : 血清中総タンパク質値の有意な増加

	群	Sp 摂取前	Sp 摂取後
総タンパク質	Sp	70.6 ± 6.9	74.5 ± 2.8 ^{a, b}
	Cont	74.1 ± 3.6	72.5 ± 3.7

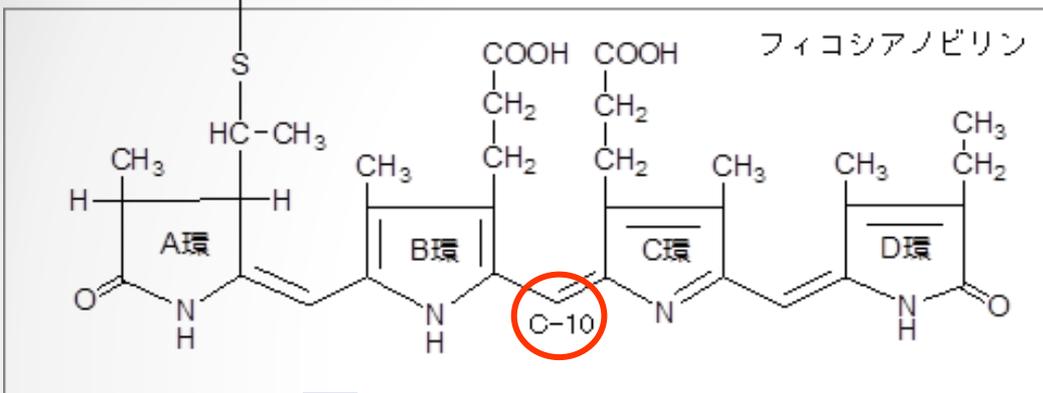
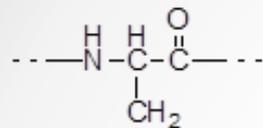
a; p<0.05 Sp群とCont群での比較

b; p<0.05 摂取前後での比較



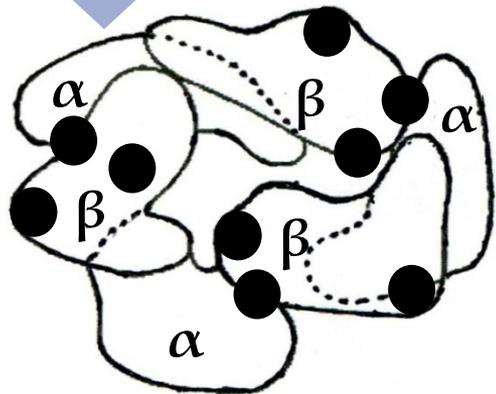
フィコシアニン

水溶性 光合成青色色素タンパク



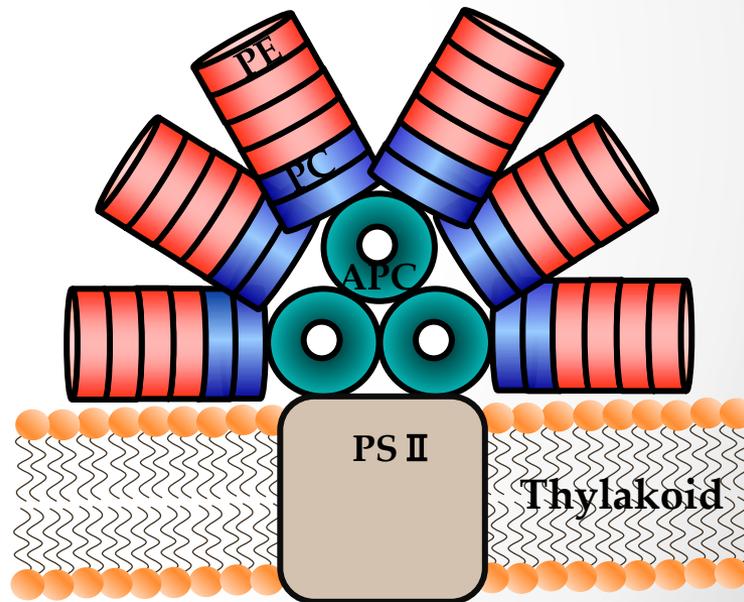
抗酸化・抗炎症作用

抗動脈硬化、DNA損傷阻害、抗腫瘍



フィコシアニン(αβ)₃三量体

- は、α, β-サブユニット中の発色団
- フィコシアノピリンを示している



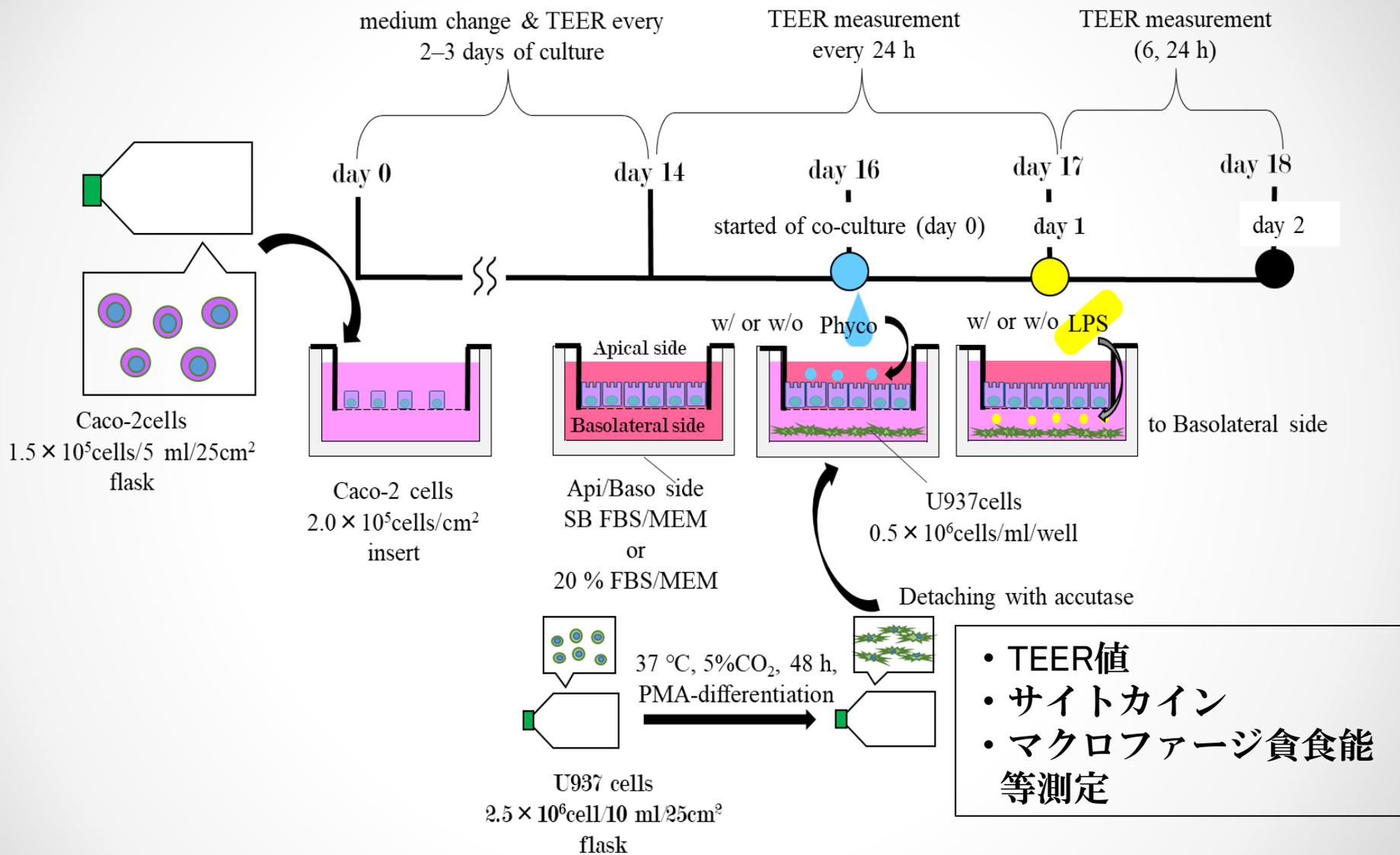
フィコビリソームの模式図

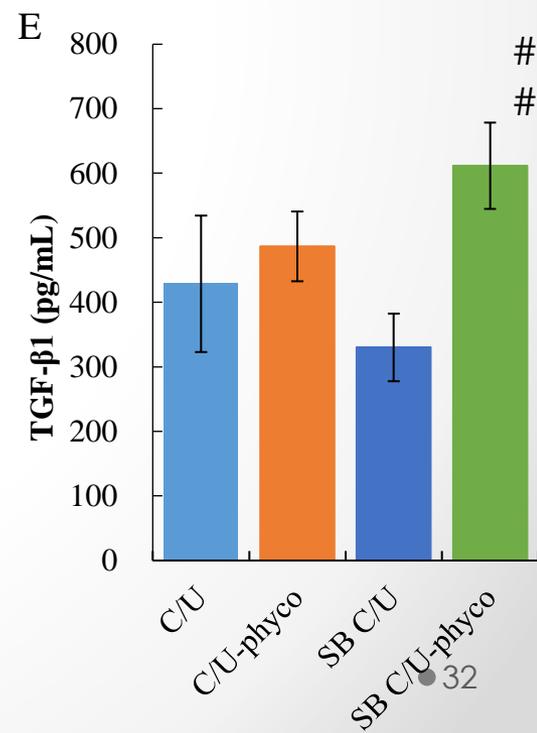
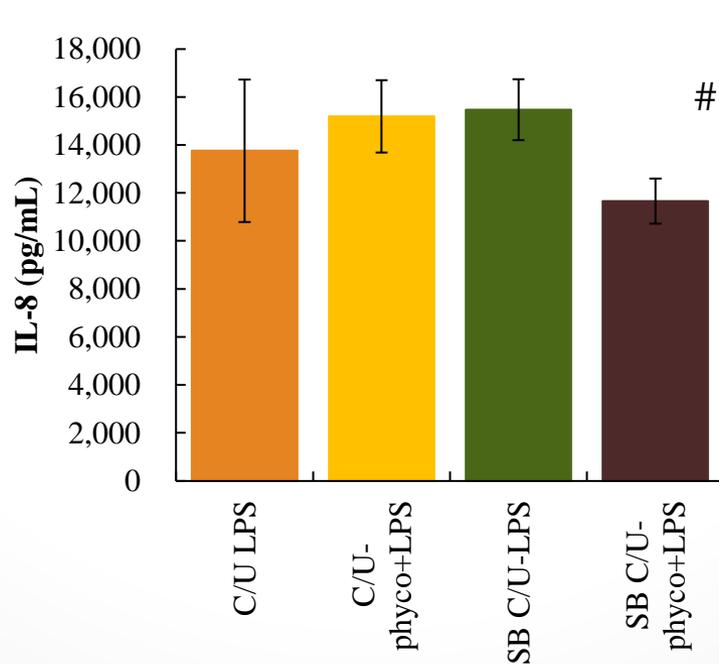
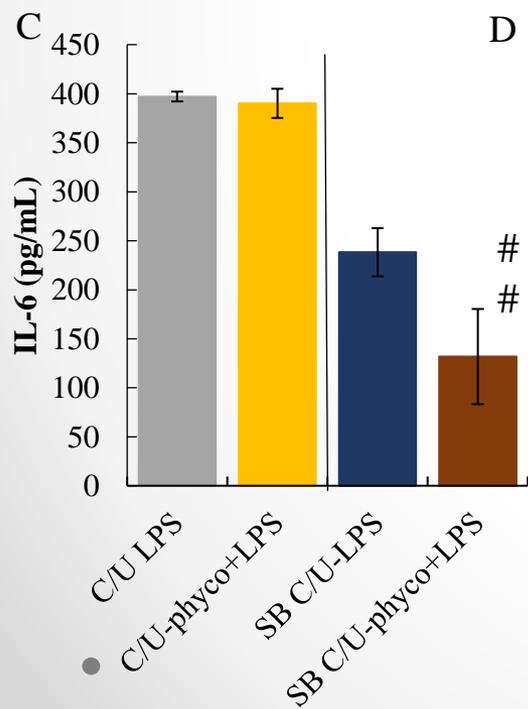
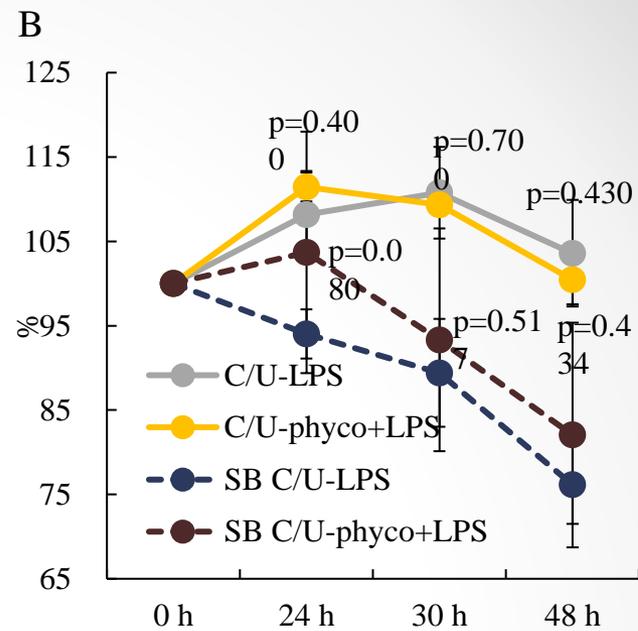
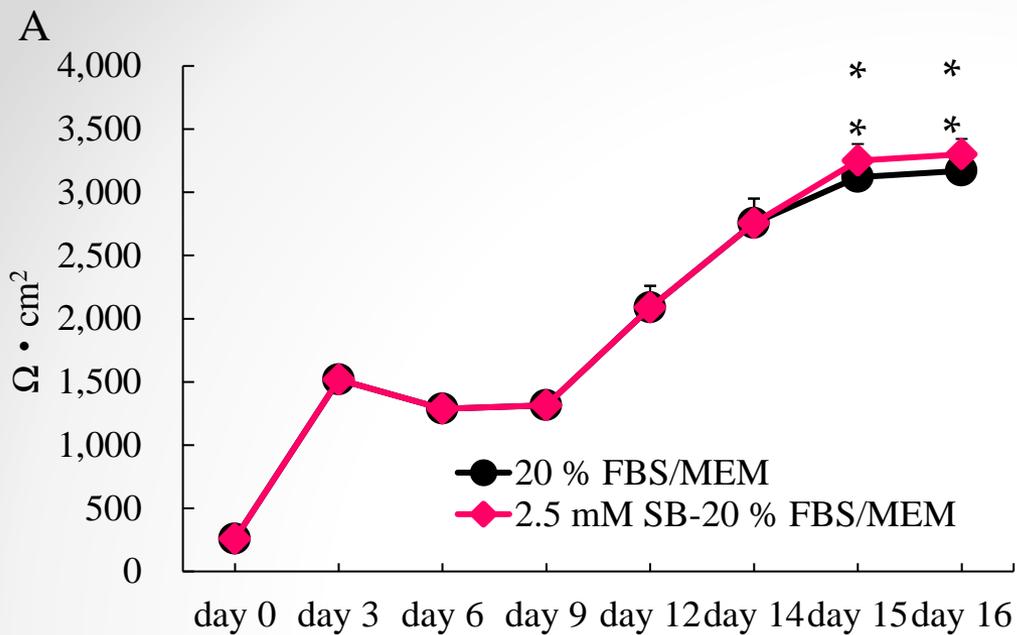
フィコビリソームは、チラコイド膜内光化学系 (PS II) に結合している

Caco-2細胞/U937細胞共培養における フィコシアニンの免疫賦活および抗炎症 作用の検討

- 短鎖脂肪酸存在下でのCaco-2細胞/U937細胞におけるサイトカイン（IL-6、IL-8、TGF- β 1）産生

Yoshimoto S, Okada K *et al.*: *Functional Foods in Health and Disease* **9(7)**, 466 (2019)





スピルリナの有効性～動物実験

対象疾患	研究・結果 概要	文献
脂質異常症・高血圧症	非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウス、5%SP 12週間摂取、肝炎炎症組織改善	Fujimoto ら 2012
高血圧・肥満	高血圧自然発症肥満ラット、フィコシアニン 2.5～10 mg/g 飼料 25 週間摂取、収縮期血圧改善、アディポネクチン増加	Ichimura ら 2013
免疫・抗体産生・アレルギー	マウス、フィコシアニン飲水 3-5週間、腸管粘膜局所IgA抗体増加、血中IgE抗体減少	Hayashi ら 1998 Kawamura ら 2004
NK活性	TLR2/4 を介するNK活性上昇	Akao ら 2009
アルツハイマー病	ラット、0.1%SP添加飼料 30 日間摂取、海馬神経前駆細胞のLPSによる炎症病変を改善	Bachstetter ら 2010
パーキンソン病	α -Syn投与モデルラット、0.1%SP 1～4ヶ月摂取、中脳黒質緻密部チロシン水酸化酵素陽性細胞回復	Pabon ら 2012

スピルリナ・フィコシアニンの抗腫瘍作用 最近の報告

- *S. pacifica* 多糖体のTLR-4 受容体を介する抗腫瘍、抗炎症作用
Tominaga A *et al.*: *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* **9**, 238 (2010)
Kawanishi Y *et al.*: *Microbiol Immunol* **57**, 63 (2013)
- フィコシアニン前処理と低レベルレーザー光照射による量依存的乳がん細胞傷害作用
Bharathiraja S *et al.*: *Molecules* **21**, 1470 (2016)
- フィコシアニン単独あるいは他の化学療法剤との併用による各種腫瘍細胞傷害作用 (総説)
Jiang L *et al.*: *J Cancer* **8**, 3416 (2017)
- フィコシアニンが非小細胞肺がんの増殖を抑制 (*in vitro* 実験)
Hao S *et al.*: *Marine Drugs* **16**, 178 (2018)

スピルリナの有効性～ヒト介入試験

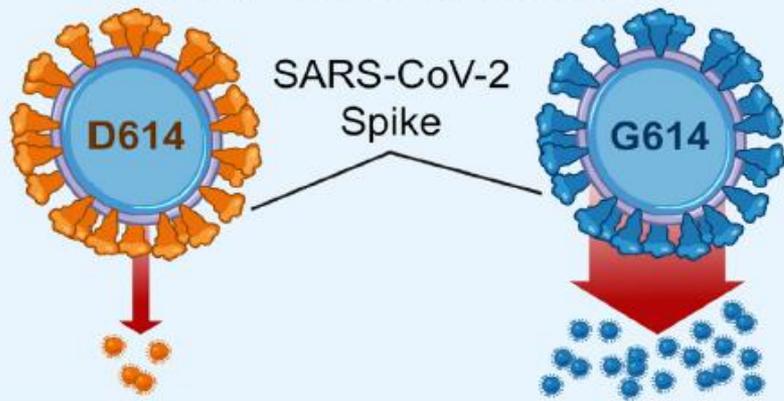
対象疾患	研究・結果 概要	文献
脂質異常症	37-61歳 52名 (男32、女20) SP 1 g/日 3ヶ月間、総コレステロール値など血清脂質量低減改善	Mazokopakis ら 2014
2型糖尿病	患者25名 SP 2g/day, 2ヶ月間、空腹時血糖値、HbA1c、血清脂質レベル改善	Parikh ら 2001
糖尿病における高血圧症	25-60歳糖尿病患者50名 (男女各25) 二重盲検プラセボ試験 通常食+SP 2 g/日 3ヶ月間、キレート作用による過剰鉄排出	Suliburska ら 2016
肥満	40名高血圧症患者 無作為化二重盲検プラセボ試験、SP 2 g/日 3ヶ月間、収縮期血圧、BMI改善	Miczke ら 2016
HIV感染	18-65歳抗ウイルス剤非服用HIV患者169名 (男50、女119)、通常食+SP 10 g/日、6-12ヶ月、CD4T細胞上昇、ウイルス保有低下	Ngo-Matip ら 2015
アレルギー性鼻炎	18-55歳 36名アレルギー性鼻炎患者 無作為化二重盲検プラセボ試験 SP 1-2 g/日 12週間摂取 IgE産生に関わるIL-4 サイトカイン産生低下	Mao ら 2005

新型コロナ変異種流行か「感染しやすさ7割増」

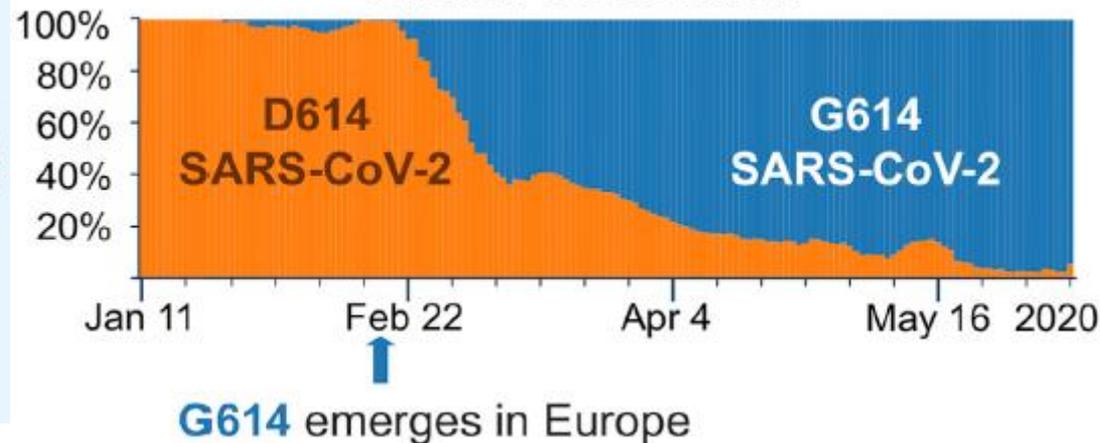
2020年12月21日 朝日新聞

- イギリス、デンマーク、オランダ、イタリア、オーストラリアで拡大：
欧州各国は英国からの入国を規制
重症化度は従来と差がない。またワクチンは変異種に対しても同効果

Magnitude of Infection



Global Transition



「D614G」変異種：RNAの一方所が変異、スパイクタンパク質のアミノ酸D614 (Asp) がG(Gly)に変化。2020年2月ヨーロッパに出現し急速に拡大

- 南アフリカ共和国：新型コロナウイルスの新たな変異種「501.V2」が拡大。若年患者の割合が増加傾向

新型コロナウイルス感染の免疫影響 とスピルリナ

自然免疫と獲得免疫	COVID-19感染患者	スピルリナの働き*
マクロファージ		機能を上昇
NK細胞	数、機能ともに低下	上昇
白血球／リンパ球比	高 白血球数増加、リンパ球数減少	
抗体応答	中和抗体は発症後10～15日で検出、以後残存した ワクチン接種では「悪玉抗体」の存在が懸念される	上昇
T細胞 ヘルパーTh1細胞 ヘルパーTh2細胞 キラーT細胞 (Tc) 調節性T細胞 (Treg)	いずれのT細胞も減少 特にヘルパーT細胞、調節性T細胞の減少は、重症例で顕著	T細胞機能を促進
炎症性サイトカイン	重篤な症例でTNF, IL-6等が顕著に上昇 (サイトカインストーム)	抗炎症作用を有する

* Peter, P.: *Am-Euras. J. Toxicol. Sci.* 12: 08-13 (2020)

Spirulina Extract Enhances T-Cell Responses Targeting Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A Potential Drug Candidate for Treatment of COVID 19

P. Peter

Beside Arts College, Proddatur, India-516360

ヒトおよび動物モデルにおけるスピルリナ免疫調節効果に関する文献レビュー

- ヒトにおけるインターフェロナーガンマ (IFN γ) 産生とナチュラルキラー (NK) 細胞活性による感染細胞傷害を増強
- 細胞性免疫の増強～ヘルパー及びキラーT細胞の活性化において有望
- HIV-I、HCV、インフルエンザ、麻疹などに対して抗ウイルス作用を示す
- ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) 阻害による炎症性サイトカイン抑制

スピルリナ抽出物は安全 (米国FDA 21CFR73.530) で、SARS- CoV-2に立ち向かえる薬剤候補

Spirulina is not approved for the treatment of any disease by the US FDA, and this review does not endorse Spirulina as an alternate therapeutic application to any vaccine or gold standard therapy for COVID 19.

抗体が感染を防ぐとは限らない！

2020年7月19日 文春オンライン

- ネコ・コロナでは「抗体依存性感染増強現象（ADE）」が知られている
- ワクチン接種して症状を悪化させる「悪玉抗体」ができてしまう
- ヒトでも、新型コロナウイルス感染でできる抗体がすべて「善玉抗体」とは限らない
- ADE に対しては、mRNAワクチンは細胞性免疫を比較的強く誘導しうる（東京医科歯科大 位高啓史教授）

新型コロナウイルスに対しては

- ウイルス感染細胞を殺すNK細胞やマクロファージによる自然免疫
- ウイルス感染細胞を殺すキラーT細胞（ヘルパーT細胞も含め）による細胞性免疫
- ウイルスの病原性を直接弱める中和抗体

を高めるはたらきが重要

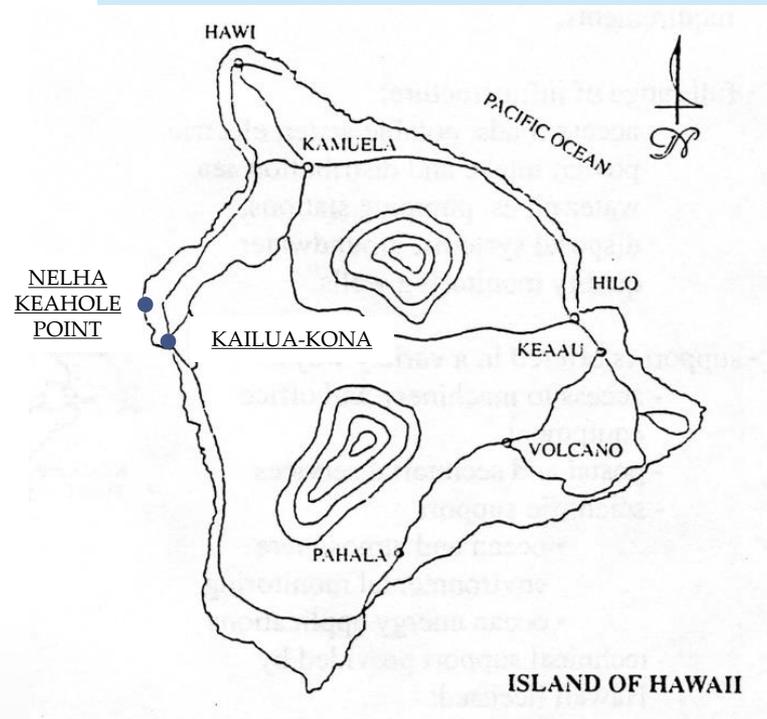
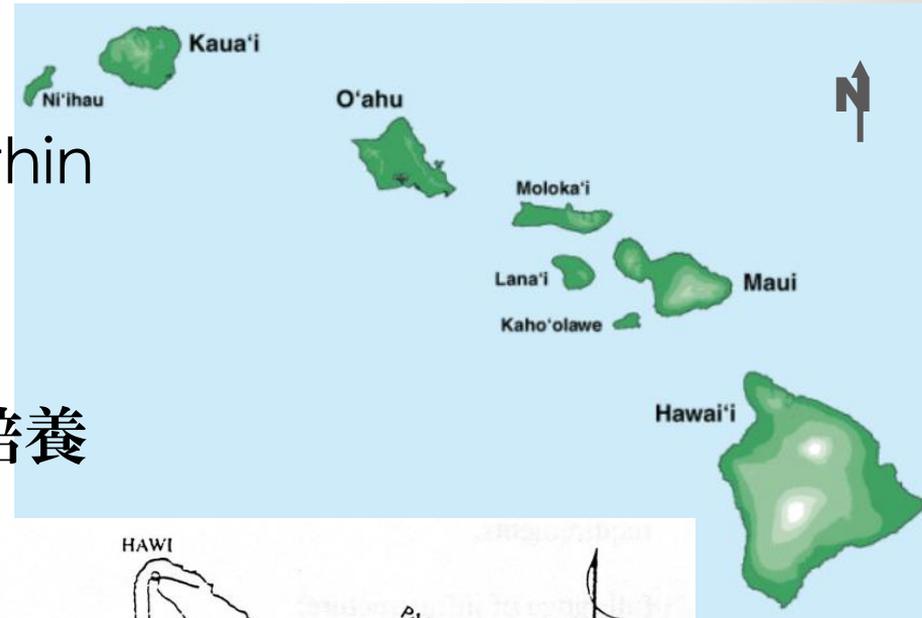
Global Spirulina Market

- Cyanotech Corporation (U.S.) 
- Earthrise Nutritional, LLC (U.S.) 
- DIC Corporation (Japan) 
- Hainan-DIC Microalgae Co.Ltd. (China)]
- Yunnan Green A Bio-engineering Co., Ltd (China) 
- Algene Biotech (India)
- Tianjin Norland Biotech Co. Ltd. (China) 
- E.I.D. Parry (I) Ltd. (India) 
- Far East Bio-Tec Co. Ltd.(China) 
- Fuqing King Dnarmsa Spirulina Co. Ltd. (China) 
- Dongtai City Spirulina Bio-engineering Co. Ltd. (China) 
- Australian Spirulina (Australia) 

<https://www.cyanotech.com/>

- BioAstin® Hawaiian Astaxanthin
- Hawaiian Spirulina®

海洋深層水 利用の培地による培養



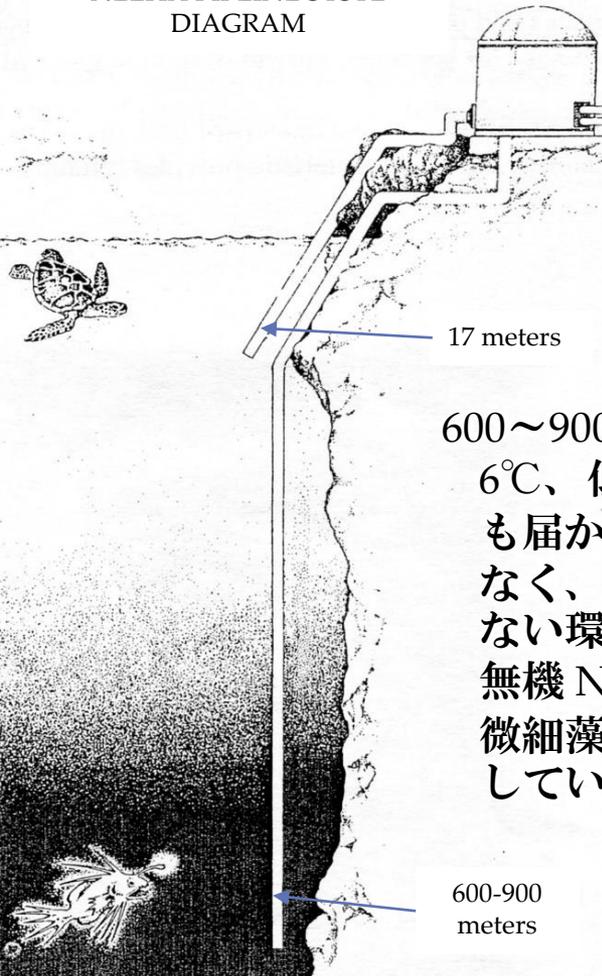


NATURAL ENERGY LABORATORY OF HAWAII AUTHORITY (NELHA)

ハワイ州立自然エネルギー研究機構

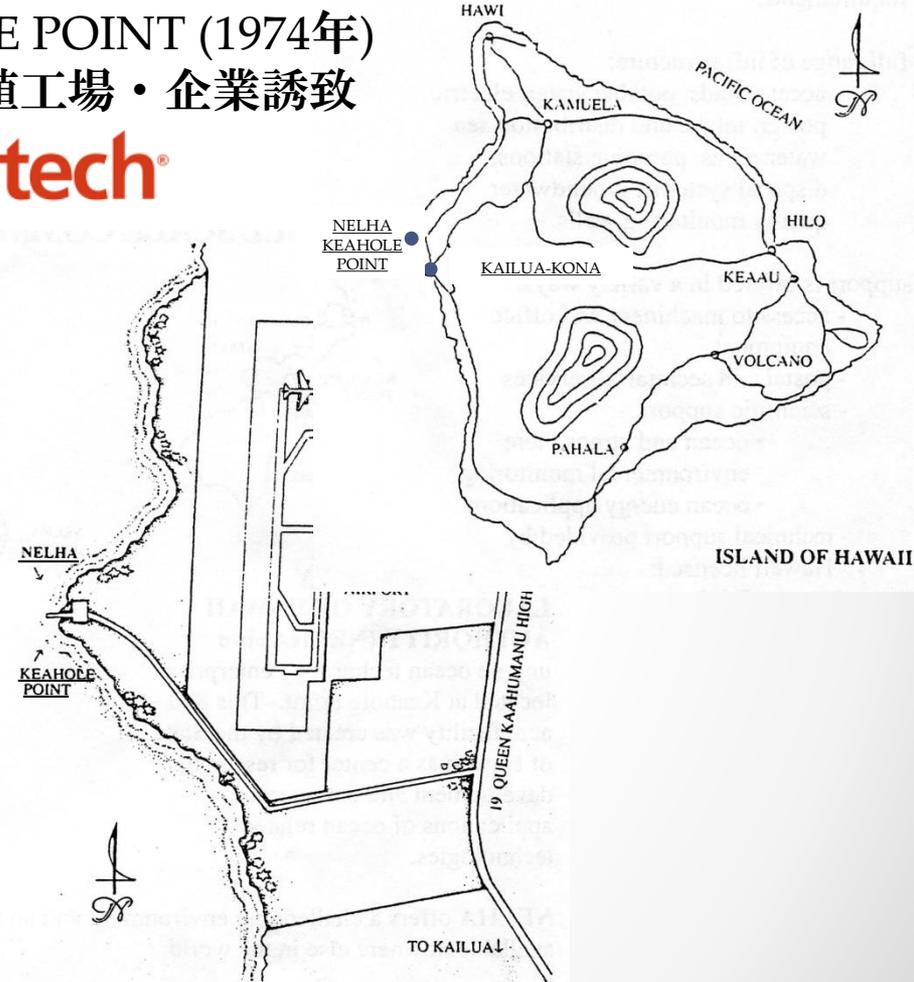
KEAHOLE POINT (1974年)
海洋深層水を利用した温度差発電、魚介養殖工場・企業誘致

NELHA PIPELINE SYSTEM
DIAGRAM

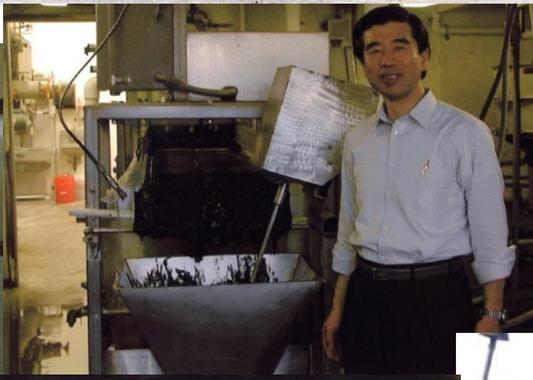
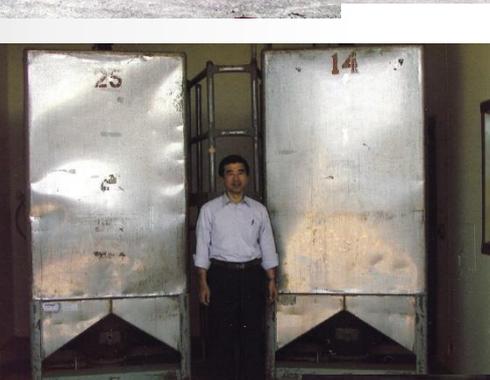


600~900m 海洋深層水
6°C、低温と同時に太陽光も届かず生物が極めて少なく、実質的に病原体のない環境。
無機 N、Si、P が高濃度で、微細藻類などの生育に適している

Cyanotech®



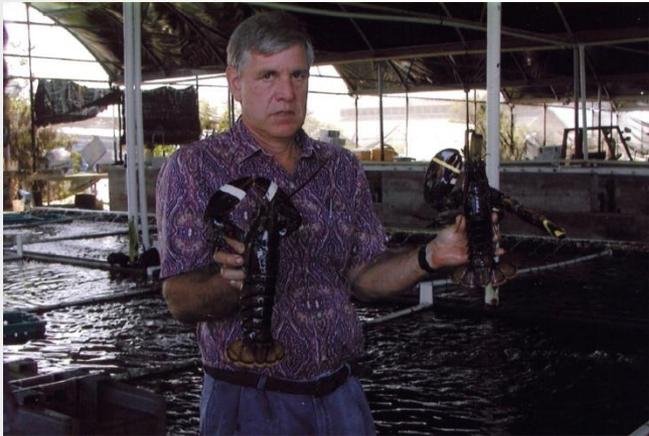
2001年11月 Hawaii Cyanotech 訪問





NELHA

NATURAL ENERGY LABORATORY OF HAWAII AUTHORITY ハワイ州立自然エネルギー研究機構 KEAHOLE POINT



Earthrise Nutritionals LLC.

Carpatria, California

世界最大規模の屋外プラント培養施設



Colorado River Basin



With Dr. Amha Belay, May 2019

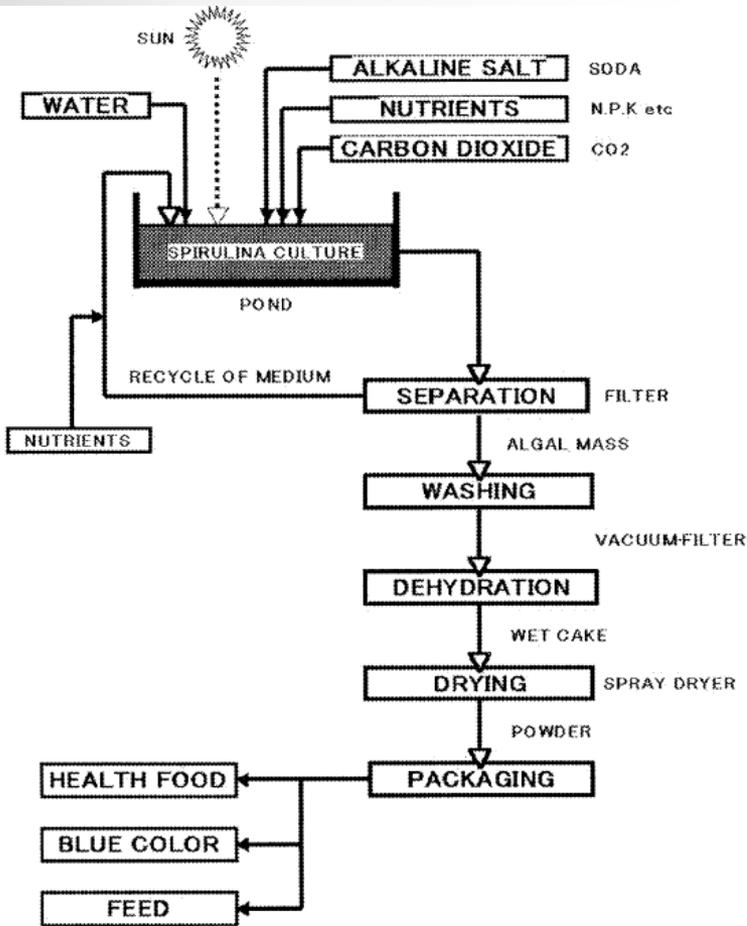
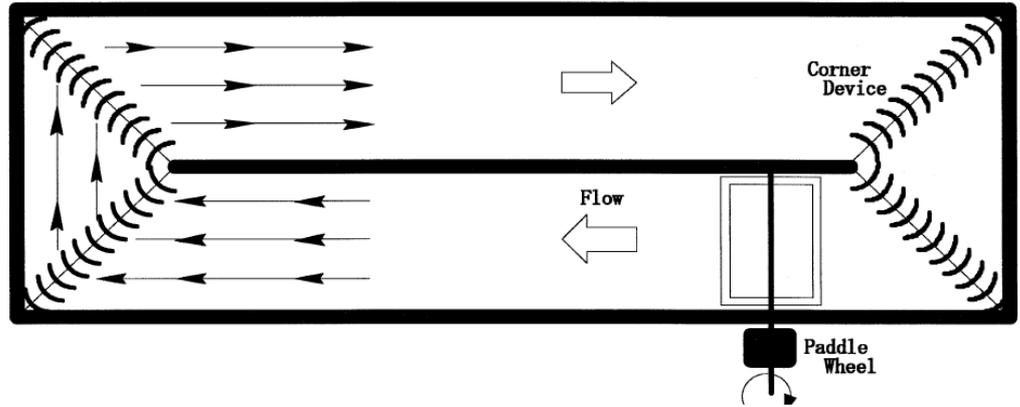


Figure 1. A schematic diagram of production system of *Spirulina*.



Cf. Surface area of an open pond :

Siam Algae : 2,000 m²

Earthrise Farms : 5,000 m²

Figure 2. A pond design for mass culture of *Sp*

L 654 ft(199.3m) x W 89

ft(27.1m)=5,401m²

L 489 ft(149m) x W 117

ft(35.7m)=5,319m²

1985: 10 ponds

2019: 38 ponds

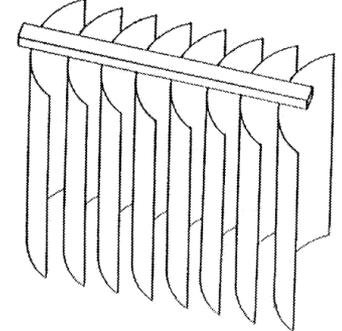


Figure 3. Corner device of the pond (shown in Fig. 2).

Hidenori Shimamatsu: Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia* 512: 39 (2004).



スピルリナと一般食用作物 タンパク質生産量単位面積あたりの比較

作物／藻類	総生産量 (トン/ha/年)	タンパク質含量 (%)	タンパク質生産量 (トン/ha/年)
小麦	6.7	9.5	0.64
トウモロコシ	14.0	7.4	1.04
大豆	4.0	35.0	1.4
スピルリナ	65	65.0	42

タンパク質 1 k g 産生に要する土地面積および水量の比較

タンパク源	面積(m ²)	水量(gal)
トウモロコシ	22	3,280
大豆	16	2,340
穀類飼料牛肉	193	27,500
スピルリナ	0.75	660

スピルリナ 食べるワクチン

- 遺伝子組み換え技術により、スピルリナにマラリア抗原タンパク質を高発現させた経口ワクチンを開発
(2018年11月Lumen Bioscience社 (Seattle, WA))

宇宙でのスピルリナ食糧生産

- スピルリナは宇宙ステーション (ISS) 内の微重力下でも地球上と同じ速度で育ち、酸素を生成する。
(2017年12月 欧州宇宙機関ESA、2018年9月アメリカ航空宇宙局NASA)
- 「食用藻類スピルリナを用いた省資源かつコンパクトなタンパク質生産システムの開発」
(2018年度研究提案採択宇宙航空研究開発機構JAXA)

金属微小コイル作成 「バイオテンプレート」としての利用

螺旋状のスピルリナを鋳型に、直径 $30\sim 40\mu\text{m}$ 、長さ $100\mu\text{m}$ の金属微小コイル

- 微小コイルは テラヘルツ (THz) の高周波数の電波を吸収
- 電波吸収体として電子機器をシールド
- 電波による健康障害を防ぐ

周波数が高いほど情報量が大きい
自動運転用車載レーダーでは周波数 77GHz の電波を使用



ご清聴ありがとうございました
今後ともよろしくお願い致します