

ENDOCRINE DISRUPTER NEWS LETTER

February 2024

Vol. 26 No. 3.4合同号

Japan Society of Endocrine Disrupter Research

日本内分泌攪乱物質学会(旧 環境ホルモン学会)

目次

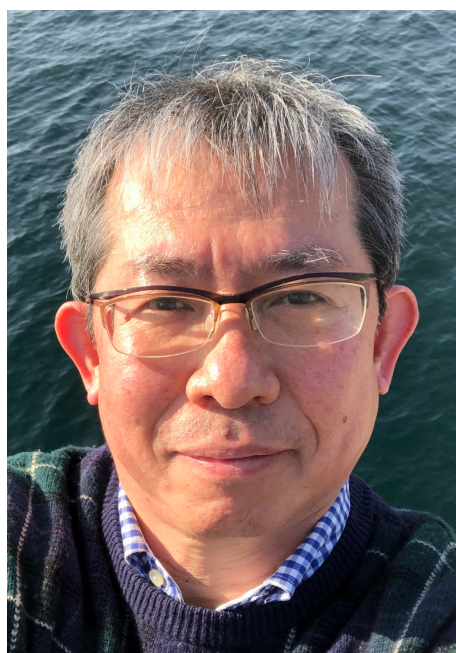
巻頭言..... 1

INFORMATION.....7

研究最前線..... 2

第3・4号

巻頭言



長崎大学

海洋未来イノベーション機構環
東シナ海環境資源研究センター

征矢野 清

私たちの生活に必要とされる医薬品や化粧品などの Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs)は、下水処理施設を通して天然水域に流入することから、水生生物への影響が強く懸念される。これまでもPPCPsが新たな水質汚染因子として取り上げられたこともあるが、その多くが人の健康の維持に関わる重要な物質であることから、積極的な調査研究がなされてこなかった。しかし、高齢化社会およびストレス社会によって医薬品の使用量は増加し、中でも抗うつ薬や抗神経病薬などの神経系に作用する医薬品の使用量が増加している。これら医薬品の種類は多く、それらの原料や使用後の代謝物質まで考えると、環境影響が懸念される化学物質は膨大な数にのぼる。それらすべてについて、環境水中の動態を知るとは難しいが、処方医薬品量から推定すると、相当量の医薬品由来の化学物質が環境水中に存在すると考えられる。我々はこれらの物質を「環境医薬品」と呼んでいるが、それらには神経細胞のGタンパク質連結型（あるいは共役型）受容体やモノアミン

トランスポーターを標的とし、情報伝達系を制御する物質が多く含まれる。私たちは、これら神経系作用性の環境医薬品を標的とし、生態影響を総合的に明らかにするための研究グループを立ち上げた（環境研究総合推進費5-2204）。この研究グループでは、環境医薬品の生態系への影響を総合的に理解するために必要な課題、1) 環境医薬品の機器分析による環境水中濃度、2) その薬理活性、3) 魚類の体内における分子応答、4) 環境医薬品に曝された魚類の個体応答（表現型）を関連づけてながら研究を進めている。ここではそれぞれの研究について最新の情報を提供する。

環境医薬品の薬としての特性に着目した環境モニタリング

中田 典秀

神奈川大学化学生命学部応用化学科

本稿では神経系やGタンパク質共役型受容体（GPCR）に作用する薬として、抗うつ薬とGPCR阻害薬の成分に関する水環境モニタリングについて概説する。なお、これらの薬理活性、作用機序、使用量、生物影響については、本特集号の他の記事にて解説されている。

国内の水環境における抗うつ薬成分の存在実態は、淀川水系での報告^{1,2)}があり、複数回の調査において検出種、濃度域、頻度が類似している。特定の抗うつ薬成分（duloxetine）の濃度が特定の地点で高い（1 µg/Lを超過）ことも一致している。処方される抗うつ薬だけでなく、服用後の代謝産物についても検出されている。現行の下水処理過程においてほぼ除去されないことが数カ所の下水処理場の調査で確認されているが、オゾン処理による高い除去率が確認されている³⁾。抗うつ薬の下水処理過程における代謝もしくは分解産物（transformation products: TP）の明確な増減は、現時点では確認されておらず、これはGPCR阻害薬成分であるアンジオテンシンIIタイプ1受容体拮抗薬のサルタン類や、β遮断薬であるatenololやpropranololとは異なる結果⁴⁾であった（それぞれvalsartan acidやatenolol acidの生成を確認）。下水中の抗うつ薬・GPCR阻害薬成分の濃度は、各抗うつ薬の処方量、排泄率、日本国内の人口と下水発生量から予測した濃度（予測濃度）と高い正の相関関係が確認された²⁾。以上の結果は、今後さらに抗うつ薬・GPCR阻害薬の使用量が増えた場合、下水処理における処理レベルの向上がなければ、環境流出量が増加することを示唆している。

神奈川県を流れ東京湾に流出する鶴見川において抗うつ薬・GPCR阻害薬成分の存在実態調査が実施された⁵⁾。鶴見川流域と淀川流域の下水処理場の放流水中の抗うつ薬・GPCR阻害薬成分の濃度を比較したところ、両者にも高い正の相関関係が確認された⁵⁾。この結果は、日本国内の広い地域でこれらの成分による環境汚染が進行していることを示唆している。

以上は主にターゲット分析による結果を中心に述べているが、近年の四重極飛行時間型質量分析計（QToF/MS）などの高分解能質量分析計の発展・普及により、新たな

TPsも検出されている。フェノチアジン系の抗精神病薬 chlorpromazine をメダカへ曝露（本特集号）した際には、フェノチアジン骨格の硫黄に酸素が付加したケト体の chlorpromazine sulfoxide が曝露水およびメダカの脳と肝臓中から検出され、標準物質との照合をもとに同定・定量されている⁶⁾。また、下水試料からはセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬である venlafaxine の窒素と酸素に結合したメチル基が一つずつ脱離した N,O-didesmethyl venlafaxine が同様に同定・定量されている⁷⁾。TPs については、使用量からの環境中濃度の予測は困難で、実測による同定・定量が必要である。今後さらに薬理活性の残存の有無の確認も必要である。

本稿で紹介した調査において検出された抗うつ薬・GPCR阻害薬成分の濃度は、水生生物に対して報告されている毒性値（最小影響濃度等）を単独で超過する成分は現時点では確認されなかった。しかし、各成分が有する活性値から例えば fluoxetine 等量濃度に換算すると、ある下水処理場の放流水中の濃度は数 µg-fluoxetine/L 濃度となり、ファットヘッドミノーについて報告された捕食回避行動への影響の閾値（1 µg/L）⁸⁾ を超過していた。

実際の水環境において、魚など水生生物は、抗うつ薬・GPCR阻害薬成分のみならず、多くの化学物質の曝露を、例え個々の濃度が低濃度であっても長期間受けている。そのため、医薬品のようにヒトに有益な化学物質を水生生物への影響が発現しない範囲で今後も使用するためには、化学計測のみならず、生物試験や処理技術開発、認可における新しい視点の追加など、学際的な取り組みが必要であると考えられる。

- 1) 大方ら、第23回日本水環境学会シンポジウム要旨集、2020
- 2) 中田ら、第29回環境化学討論会要旨集、2021
- 3) 韓ら、第57回日本水環境学会年会要旨集、2023
- 4) 中田ら、第28回環境化学討論会要旨集、2019
- 5) 岩田ら、第57回日本水環境学会年会要旨集、2023
- 6) 岩田ら、第2回環境化学物質3学会合同大会要旨集、2019
- 7) 永岡ら、第58回日本水環境学会年会要旨集、2024
- 8) Weinberger, et al., *Aquat. Toxicol.*, 2014.

環境医薬品の水生生物への薬理活性

井原 賢

高知大学農林海洋科学部

水環境中から下水由来の医薬品類が多種類検出されている。医薬品は元々生理活性を持つようにデザインされていることから、水中濃度が極低濃度(ng/L~ μ g/L)であっても水生生物への影響が懸念される。医薬品の中でも特に神経系に作用する医薬品、Gタンパク質共役受容体(GPCR)を標的としたGPCR標的薬およびモノアミントランスポーターの阻害薬は、水生生物の発生や行動、繁殖に影響を与える可能性が懸念される。

セロトニントランスポーター(SERT)の阻害薬(SSRI等)の多くは抗うつ薬として処方される。我々はこれまでに、ヒトSERTの蛍光基質を利用したin vitroアッセイを開発し、多くの抗うつ薬の薬理活性を測定するとともに、下水処理場の放流水から抗うつ薬の薬理活性を検出することに成功している¹⁾。魚を実験室環境下で抗うつ薬に曝露すると行動に異常が観察されることを報告した論文は多くある。共同研究を行っている長崎大のグループもメダカやアユでの行動、繁殖の異常を見出している。神経細胞に作用する抗うつ薬によってこれらの異常が見いだされることは作用機序的に想像しやすい。しかしながら抗うつ薬によって魚のSERTが阻害されるかどうかを調べた例はこれまでなかった。そこで我々はゼブラフィッシュのSERTが抗うつ薬によって阻害されるかどうかをin vitroアッセイによって調べた。その結果、抗うつ薬はヒトよりもゼブラフィッシュSERTを強く阻害すること、そして下水中の抗うつ薬の薬理活性もゼブラフィッシュSERTに対してより強く検出されることがわかった²⁾。また、メダカやアユのSERTも強く阻害する結果が得られている。抗うつ薬の代謝物にもSERTの阻害活性を示すものが多い。例えばvenlafaxineやclomipramineの代謝物である。我々のin vitroアッセイでは、これらはゼブラフィッシュなど魚のSERTをヒトSERTよりも数十倍強く阻害する結果が得られている。

GPCRには様々な種類があるが、特にアンジオテンシン受容体AT1、ドーパミン受容体D2、ヒスタミン受容体H1、ムスカリン性アセチルコリン受容体M1、アドレナリン受容体 β 1を標的とする医薬品が多い。GPCR標的薬の薬理活性を検出できるin vitroアッセイを用いて下水処理場

放流水中を調べた結果、これらの受容体に対する阻害活性が検出された³⁾。GPCR標的薬についても、魚のGPCRを阻害するかどうかを検証した。共同研究を行っている長崎大、東京理科大のグループがクローニングしたメダカやアユのH1、D2、M1、 β 1受容体をin vitroアッセイで調べると、GPCR標的薬が魚のGPCRも強く阻害することが分かった。

以上のように、GPCR標的薬やモノアミントランスポーターの阻害薬はヒトだけでなく魚の受容体も阻害する。水生生物への影響を考える上で注意すべき点は、これらの医薬品の多くは複数の受容体に阻害作用を示すことである。例えばamitriptylineはH1受容体とM1受容体の両方を強く阻害するし、それだけでなくSERTも阻害する。つまりamitriptylineはヒスタミン、アセチルコリン、およびセロトニン作動性の神経全てに作用して複合的な異常をもたらす可能性がある。さらには、体内で代謝を受けることによって標的が変わるGPCR標的薬もある。例えばquetiapineはD2受容体やH1受容体、M1受容体のアンタゴニストであるが、代謝されてnorquetiapineになるとノルエピネフリンのトランスポーター(NET)を強く阻害する。水生生物がGPCR標的薬や抗うつ薬に曝露された際の行動や繁殖異常に関わるsignal pathwayは複数あると考えられる。

我々のこれまでの調査で下水・河川水中から検出されたGPCR標的薬および抗うつ薬の薬理活性をまとめると、次のようになる。①セロトニンで作動する神経系は活性化される(SERTの阻害)。②ノルエピネフリン、ドーパミン、ヒスタミン、アセチルコリンで作動する神経系は阻害される(β 1、D2、H1、M1受容体の阻害)。水生生物の体内・脳内でこのようなことが起こった場合、毒性としてどのような表現型が考えられるのであろうか?神経系に作用する医薬品の水生生物への影響を、メカニズムも含めて理解しようとするためには、セロトニン、ノルエピネフリン、ドーパミン、ヒスタミン、アセチルコリン等で作動する神経系が魚の体内でそもそもどのような機能をもっているのかを理解することが不可欠である。

1) Ihara et al., Sci. Total Environ., 2021, 770, 144665.

2) Zhang et al., Environ. Sci. Technol., 2023, 57, 6444-6454.

3) Ihara et al., Environ. Sci. Technol., 2015, 49, 1903-1911.

環境医薬品に応答する遺伝子

宮川信一

東京理科大学 先進工学部生命システム工学科

自然界に存在する医薬品（環境医薬品）が、魚類をはじめとする水生動物に作用し、悪影響をおよぼすことが懸念されている。特に私たちが注目しているのが、近年処方量が急激に増加している抗うつ薬や脳神経系に作用する医薬品類である。魚類にこれらの医薬品成分がはたらくと、中枢神経に作用してさまざまな行動異常が引き起こされる可能性がある。実際に、共同研究を行っている長崎大学の研究グループにより、環境中に実際に検出される医薬品成分を実験的にメダカやアユに曝露すると、通常ではみられない行動がみられるようになる（長江や筵平らの項を参照）。そこで私たちは、水生動物に対する環境医薬品の作用機序の解明に向け、医薬品曝露によって脳内で発現変動する遺伝子を調べている。本研究で対象とした魚種は主にミナミメダカ (*Oryzias latipes*) とアユ (*Plecoglossus altivelis*) である。

医薬品成分（本研究ではNaSSA (Noradrenergic and specific serotonergic antidepressant) であるMirtazapine、三環系抗うつ薬であるAmitriptylineあるいは抗精神病薬であるChlorpromazineを使用した) を一定期間曝露したメダカの脳からRNAを抽出し、RNAシークエンス解析をおこなった。アユでは、Mirtazapineを曝露した個体の脳を使用した。これらの解析は、メダカ、アユともに行動異常が顕著にみられる曝露条件でおこなった。

メダカでは、医薬品曝露による発現変動遺伝子のうち、発現が上昇した遺伝子数は、Mirtazapine曝露群では383個、Amitriptyline曝露群では187個、Chlorpromazine曝露群では205個であり、3つの医薬品で共通して発現変動する遺伝子は12個であった。一方、発現が減少する遺伝子は、Mirtazapine曝露群では344個、Amitriptyline曝露群では279個、Chlorpromazine曝露群では367個であり、3つの医薬品で共通して発現変動している遺伝子は6個であった。

以上より、3種類の医薬品で共通して発現が有意に変動した遺伝子として合計18遺伝子を見出した。このうち、シナプス形成や維持に関与しているPPFIA1/LIPRIN-alpha、樹状突起の密度維持に関与するTANC1b、中枢神経系の発達に関与するTAL1、概日リズムに関与しているCRY3aなどが見出された。特に、概日リズムに関連する遺伝子は、CRY3aのほかにそれぞれの医薬品曝露群でも発現変動するものが複数あった。マウスの実験でも向精神薬（抗うつ薬や精神刺激薬）を投与すると時計遺伝子

の発現が変化することが報告されており、メダカでも医薬品曝露によって概日リズムが変化して、その結果行動異常が誘起される可能性がある。また、光周期を変化させるとメダカの産卵周期が変わることから、概日リズムは繁殖に大きな影響を及ぼす。本実験で使用している医薬品を曝露したメダカでは、産卵数の低下も確認されていることから、医薬品曝露による時計遺伝子の変動は繁殖機能の低下にも影響している可能性がある。

一方、アユでは、ミルタザピン曝露群で発現が上昇した遺伝子数は、オスとメスそれぞれ306個と976個（そのうち共通する遺伝子は155個）、減少した遺伝子数は、232個と3147個（そのうち共通する遺伝子は167個）であった。メスのアユは、解剖時の卵巣の観察から、排卵前、排卵前後、産卵後と、卵巣の状態がことなる個体であることが判明し、繁殖段階の異なる個体を使用したことによってメスで発現変動遺伝子が多いのは可能性がある。アユでも概日リズムに関連する遺伝子としてARNTL1a/BMAL1aなどの発現変動が確認された。

以上のように私たちは、環境医薬品によって発現が変動する遺伝子という面から解析をおこなっている。このような環境医薬品応答遺伝子や代謝物を解析することで、環境医薬品が水生動物に作用したときに、環境医薬品の生体影響だけでなく、どのような経路によって影響が顕れるのかという作用機序を明らかにすることができる。

謝辞

本研究は環境再生保全機構環境研究総合推進費、日本学術振興会科学研究費（科研費）、東京理科大学国際共同研究支援費などのサポートで行われた。

抗うつ薬および抗精神病薬のメダカへの行動影響

長江 真樹

長崎大学大学院 水産・環境科学総合研究科

近年、膨大な種類と量の医薬品が使用されている。表1は日本における内服薬薬剤料の薬効分類別ランキングを示している（厚生労働省、2019）。中枢神経系用薬は第2位を占めており、これには抗うつ薬や抗精神病薬が含まれる。

表1. 日本の内服薬薬剤料ランキング（2019年）

順位	薬効分類	薬剤料 (十億円)
1	循環器官用薬	827
2	中枢神経系用薬	799
3	その他の代謝性医薬品	744
4	腫瘍用薬	426
5	消化器官用薬	412
6	血液・体液用薬	353
7	アレルギー用薬	216
8	化学療法剤	190
9	泌尿生殖器官および肛門用薬	126
10	漢方製剤	125

抗うつ薬や抗精神病薬は、中枢神経系シナプスに作用し、シナプス間の神経伝達物質（モノアミン）の活性を調節することで精神疾患症状の改善を図る。中枢神経系シナプスの仕組み自体は、広く動物種に共通であるため、環境中に放出されたこれら医薬品の野生生物への影響が懸念されている。ここでは、抗うつ薬と抗精神病薬に焦点を絞り、ミナミメダカ (*Oryzias latipes*) の遊泳行動に及ぼす影響について紹介する。

曝露水槽に雌雄それぞれ3匹を収容し、各医薬品を4日間半止水式曝露した（図1）。水槽の撮影側面に、上層1/3と中下層2/3を識別可能なマーキングを施した。午前と午後の2回（4日間計8回）に動画撮影し、上層1/3に偏在する遊泳行動（表層遊泳性）について統計検定し、曝露によりそれが常態化するかを検討した。なお、コントロール個体では表層遊泳性はほぼ検出されない。

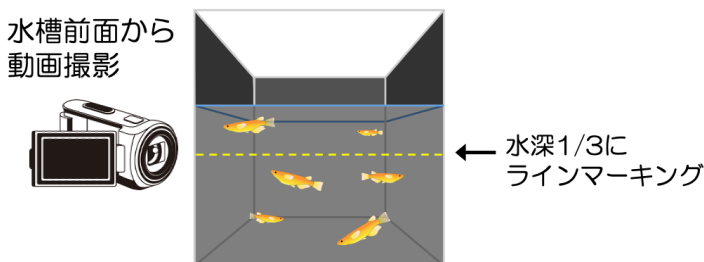


図1. 行動影響観察曝露水槽と撮影概要

曝露対象として、異なる薬効を持つ18種医薬品（表2）をメダカ表層遊泳性が誘起されるか調査した。その結果、抗うつ薬および抗精神病薬に特化して、表層遊泳性の誘起が認められた。

表2. 曝露医薬品のメダカ表層遊泳性誘起の有無および

医薬品名	主な薬効	表層遊泳性 誘起の有無	表層遊泳 LOEC値 ($\mu\text{g/L}$)
アミトリプチリン塩酸塩	抗うつ薬	○	53
ミルタザピン		○	356
ベンラファキシン塩酸塩		○	630
デュロキセチン塩酸塩		○	37
フルオキサセチン塩酸塩		○	37
トラゾドン塩酸塩		○	450
クロルプロマジン塩酸塩	抗精神病薬	○	36
オランザピン		○	390
クエチアピソフマル酸塩		○	593
フェキソフェナジン塩酸塩	抗アレルギー薬	×	-
ベボタスチンベシル酸塩		×	-
セチリジン塩酸塩		×	-
オロパタジン塩酸塩		×	-
シンナリジン		×	-
エピナスチン塩酸塩		×	-
ドンペリドン	消化管機能改善 ・治療薬	×	-
スルピリド	心臓疾患治療薬	×	-
ピソプロロール fumarate		×	-

表層遊泳性を誘起した医薬品には共通して、SERT阻害活性が認められた（*本号井原賢先生記事参照）。このSERT阻害活性の強さとメダカ表層遊泳LOEC（表2）が良く相関したことから、これら医薬品による脳内神経シナプス間でのセロトニン伝達量の増加が行動影響（表層遊泳）の一因と示唆された。また、SERT阻害活性と表層遊泳LOECの関係を左右する要因として、各医薬品のlogKowが介在していたことから、曝露医薬品の脳蓄積性も重要な要素であると考えられた。

また、抗アレルギー薬であるオロパタジン塩酸塩とシンナリジンは、ある程度のSERT阻害活性を持つが、表層遊泳性を誘起しなかった。これら医薬品の脳移行性が殆ど無いか、極めて低い可能性が示唆された。前述の脳蓄積性も含めて、曝露医薬品の脳中濃度の把握は重要なポイントである。

これら個々の医薬品のメダカ行動影響（表層遊泳）LOECは、現在の環境水中濃度よりも相当高いが、SERT阻害活性を持つ医薬品が数多く使用され、環境中で検出されていることから、現在、これらの複合影響を調査している。

環境医薬品の魚類の行動に及ぼす影響～アユを用いた曝露試験～

菟平 裕次¹・征矢野 清²¹高知大学農林海洋科学部²長崎大学海洋未来イノベーション機構環東シナ海環境資源研究センター

我々の研究グループはミナミメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて医薬品が魚類の行動へ及ぼす影響を調査しており、抗うつ薬や抗精神病薬では共通して表層遊泳性の誘起が認められた(長江の項を参照)。しかし、生物種間の違いが大きい魚類では、同じ医薬品でも異なる行動影響を示す可能性があり、単一種で魚類への行動影響を判断することは一定のリスクを伴うと考えられる。

アユ (*Plecoglossus altivelis*) は我が国において重要な内水面資源であり、ミナミメダカとは生息環境が異なる。また、アユは1年で一生を終えることから、アユの生活史に問題が発生した場合、個体数に甚大な影響を及ぼすことが予測される。これまでに、アユの産卵環境を模した水槽を用いてミルタザピン1000 µg/Lを成熟したアユに曝露した結果、曝露群では「底に横たわる」、「水流に流される」といった遊泳行動への影響が観察され、繁殖への影響が示唆された¹⁾。今回はアユをミナミメダカと同様の条件で曝露試験を行うことで、両者の行動への影響に違いがみられるのかどうか報告する。

10 L水槽に未成熟のアユを3匹入れ、ミルタザピン50、100、250、500 及び1000 µg/L の濃度を4日間半止水式にて曝露試験を実施した。溶媒のDMSOのみ添加した群を対照群とし、各曝露試験は2反復で実施した。午前と午後の2回動画を撮影し、1分間における行動を解析した。

ミナミメダカとアユの対照群における遊泳行動を比較した場合、アユでは中下層の滞在時間が長く、アユではミルタザピン曝露によってミナミメダカほど顕著な表層遊泳は観察されなかった。一方、アユでは「底での停滞」や「縦泳ぎ」など、ミナミメダカで観察されなかった遊泳行動異常が観察された(図1)。

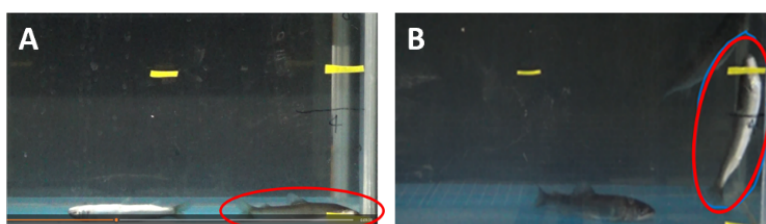


図1. ミルタザピン曝露で観察された遊泳行動異常 (A: 底での停滞、B: 縦泳ぎ)

底で停滞する時間は100~500 µg/Lで有意に増加したのに対して、縦泳ぎをする時間は250~1000 µg/Lで有意に増加した(図2)。

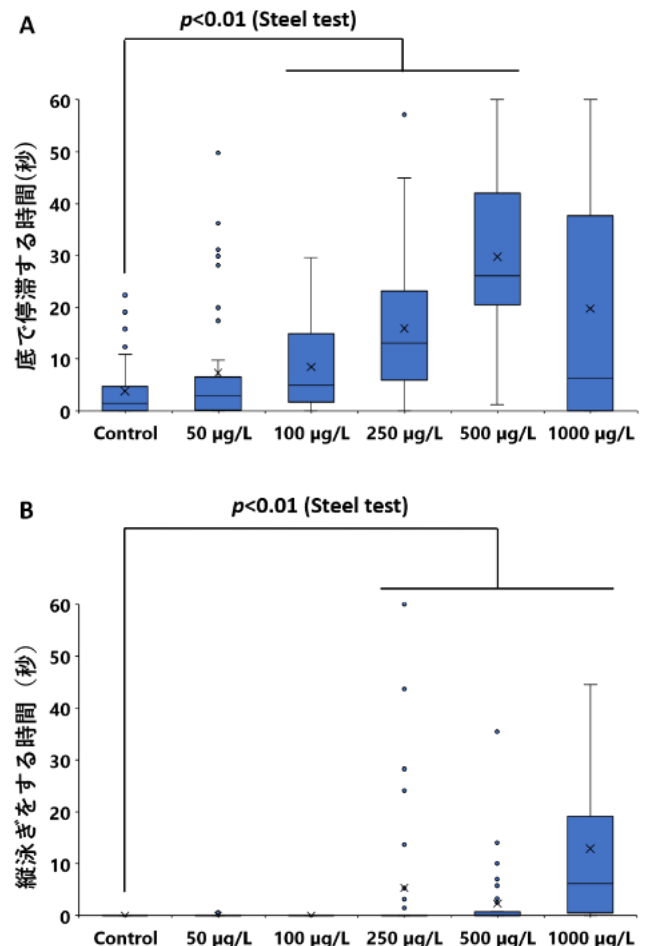


図2. ミルタザピン曝露によるアユの遊泳行動異常変化 (A: 底での停滞、B: 縦泳ぎ)

アユでは、ミルタザピンの曝露濃度によって異なる遊泳行動異常を示すことが明らかになった。また、アユとミナミメダカでは異なる遊泳行動異常を示したことから、医薬品によって誘発される遊泳行動異常の表現型は魚種によって異なることが示唆された。

参考文献

- 1) 菟平、日本内分泌攪乱化学物質学会ニュースレター、24 (1)、7、2021

Information

■第26回日本内分泌攪乱物質学会研究発表会

開催日時：2024年12月6日(金)・7日(土)

開催会場：東京大学 弥生キャンパス
フードサイエンス棟 中島ホール

大会実行委員長：鑓迫 典久 (愛媛大学)

開催形態：本会単独開催

開催方法：オンサイトおよび一部オンライン(予定)

■第32回環境化学討論会

(2024年環境化学物質2学会合同大会)

会期：2024年7月2日(火)～5日(金) 予定

会場：JMSアステールプラザ
(〒730-0812 広島市中区加古町4番17号)

主催：一般社団法人日本環境化学会 (JEC)、
日本環境毒性学会 (JSET)

第51回日本毒性学会学術年会

主催：一般社団法人日本毒性学会

年会長 上原 孝 (岡山大学学術研究院医歯薬学
域)

副年会長 西田 基宏 (九州大学大学院薬学研究院)

会期 2024年7月3日(水)～5日(金) (3日間)

会場 福岡国際会議場

<https://www.jsot2024.jp/>

Japan – USA Exposome Symposium

開催日：2024年5月27日(土)～29日(月)

会場：北海道大学

詳細は、こちら

<https://mountsinaixposomics.org/2024sapporo/>

現在、参加およびポスター発表受付中です。

■「■日本内分泌攪乱物質学会『賛助会員』募集

現在、本学会の活動をご支援して下さる賛助会員(企業)を募集しております。
一社当たり年間8万円になります。

自薦、他薦問いません。お心あたりありましたら是非本学会事務局までご一報ください。

編集後記

環境医薬品を含むPPCPsによる生物影響に関する研究は未だ少なく、特に実環境中の化学物質の動体の詳細や、野生生物への影響は明らかにされていません。この分野の研究を進展させるためには、分析、分子・生理応答、生物個体応答を専門とする研究者、特に学生諸君や若手研究者がPPCPs研究に参入していただくことが必要です。石塚先生のご配慮により、本ニュースレターで環境医薬品の研究発信することができましたが、これが会員の皆様がこの分野に目を向けていただくきっかけになればと考えております。

日本内分泌攪乱物質学会事務局：〒141-0022 東京都品川区東五反田1-10-4 エムアイビル4F
Tel: 03-6277-0095 Fax: 03-6277-0118 E-mail: secretariat@jsedr.org