

INH-MIC低濃度耐性結核菌株での耐性遺伝子変異の検討

阿野 裕美 松本 智成 永井 崇之 田村 嘉孝
 吉多 仁子 河原 邦光 高松 勇 露口 泉夫
 高嶋 哲也

要旨:〔目的〕INHの最小発育阻止濃度(MIC)が判定保留域にある結核菌の薬剤耐性化遺伝子変異の有無を検討する。〔対象と方法〕2000年1月～2005年5月に培養陽性となったINH-MIC判定保留域(MIC 1～2 $\mu\text{g/ml}$)の全47菌株と、同期間内で任意に選出したMIC 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の感受性菌31株およびMIC 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌41株を対象とした。MIC測定は微量液体希釈法(プロスミックMTB-1, 極東製薬), 薬剤耐性遺伝子の検出はDNAマイクロアレイ法(OligoArray™, 日清紡)を用いた。〔結果〕感受性菌はすべてwild typeで, 判定保留域菌と耐性菌に7種類のINH耐性遺伝子変異が認められた。判定保留域菌47株のうち, *inhA*転写開始点の上流-15番のCからTへの置換が23株(48.9%), -8番のTからAへの置換が2株(4.3%), *katG* 1778番のGからAへの置換が6株(12.8%)に認められ, さらに3株(6.4%)は*katG* 1778番のGからAへの置換と*katG* 982番のTからGへの置換を二重にもっていた。〔まとめ〕われわれは, 大阪の場合には, 判定保留域にある結核菌の7割がINH耐性遺伝子変異をもち, その半数以上が*inhA*調節領域の遺伝子変異であることを明らかにした。
 キーワーズ: 結核菌, MIC, DNAマイクロアレイ, INH耐性化遺伝子変異

目 的

当院では2000年から新結核菌検査指針¹⁾に従って, 結核菌薬剤感受性試験は小川比率法を採用してきたが, より迅速な報告を目指して, 2003年から最小発育阻止濃度(MIC)測定法をスクリーニングテストとして採用した。MIC測定法で1剤以上に耐性または判定保留域であった菌株は, さらに小川比率法を用いて再検査している。しかし, Isoniazid (INH)のMICが判定保留域にある菌株は, 小川比率法では耐性もしくは感受性と判定され, 一定した結果が得られない。そこでわれわれは, 判定保留域にある菌株のINH耐性遺伝子保有状況を明らかにしようと試みた。

対 象

2000年1月から2005年5月の間に当院で結核菌培養

陽性となり, 実験に十分な菌量を得ることができたINH-MIC判定保留域の1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性菌38株と, 2 $\mu\text{g/ml}$ 耐性菌9株を対象とした。さらに対象期間内で任意に選出したMIC 0.06 $\mu\text{g/ml}$ ～0.25 $\mu\text{g/ml}$ の感受性菌31株と, 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌41株を比較対照群としてINH耐性遺伝子変異の有無を検討した。なお, 菌株から抽出したDNAを遺伝子解析に使用することについては当院の研究委員会の承認を得て, あらかじめ文書にて患者全員の同意を得ている。

方 法

(1) 薬剤感受性試験

MIC測定には, 微量液体希釈法に基づくプロスミックMTB-1(極東製薬)を使用した。使用説明書に従いMcFarland #1濃度の菌懸濁液を接種用培地に210 μl 加え, 薬剤乾燥固着プレートに各200 μl 分注後, 38度

5%CO₂条件下で7日間培養した後に発育の有無を判定した。小川比率法は新結核菌検査指針に準じ、OD=0.2に調整した菌懸濁液を100倍希釈したものを、結核菌感受性用一濃度培地(極東製薬)に100 μ l接種した。38度で4週間培養後、薬剤含有培地のコロニー数が対照培地より多いものを耐性と判定した。

(2) INH耐性遺伝子変異の検出

小川培地に発育した結核菌を0.1 mmガラスビーズで破碎した後、フェノール・クロロフォルム法でゲノムを抽出した。このゲノムを10 ng/mlに調整したものをサンプルとして、OligoArray™(日清紡)の使用説明書に準じてPCR、ハイブリダイゼーション、発色反応を実施した。発色したスポットを目視判定し、事務用OAスキャナーを用いてデータを保存した。INH感受性対照はH37Rv株から抽出したDNAを用いた。

結 果

(1) 微量液体希釈法によるINH-MIC分布と、小川比率法によるINH耐性率

2002年1月~2005年12月の4年間に薬剤感受性試験を実施した1365株中、MIC 0.03 μ g/mlの菌は全体の0.6%、0.06 μ g/mlは26.3%、0.125 μ g/mlは48.6%、0.25 μ g/ml

は3.0%、0.5 μ g/mlは1.8%、1 μ g/mlは4.0%、2 μ g/mlは2.1%、4 μ g/mlは4.0%、8 μ g/mlは3.7%、16 μ g/mlは1.5%、32 μ g/ml以上は4.4%を占めていた。次に、今回対象とした119株のMIC分布と小川比率法の結果をTable 1に示した。小川比率法1 μ g/mlの菌はMIC測定法でもすべて4 μ g/ml以上の耐性領域に分布していた。小川比率法0.2 μ g/mlの菌はMIC 1~4 μ g/mlに分布し、中央値は1 μ g/ml(平均値1.68 μ g/ml)でMIC判定保留域(1~2 μ g/ml)を中心に分布していた。一方、小川比率法0.2 μ g/mlで感受性の菌は、対象菌株を判定保留域近傍のMICの菌を中心に選出しているために一般のMIC分布とは異なる傾向を示し、MIC 0.06 μ g/mlと0.125 μ g/mlに比較してMIC 1 μ g/mlと2 μ g/mlの割合が高い偏った分布を示していた。

(2) INH耐性遺伝子変異をもつ菌株のMIC分布

今回の検討では、wild type以外に7種類の遺伝子置換が認められ、さらにこれらの遺伝子置換を二重にもつ菌株が5種類認められた(Table 2)。wild typeの遺伝子はMIC 0.06~2 μ g/mlに分布し、0.06~0.25 μ g/mlを示した31菌株中31株(100%)、1 μ g/mlの38株中11株(28.9%)、2 μ g/mlの9株中2株(22.2%)に認められた。一方、*inhA* 遺伝子転写開始点の上流-15番(*inhA*-15)のCから

Table 1 The Distribution of MIC detected by BrothMIC MTB-1 and category interpretation by proportion test method on egg-based Ogawa media

Interpretation Ogawa media	MIC μ g/ml									
	0.06	0.125	0.25	1	2	4	8	16	32	32<
Susceptible	10	20	1	24	1	0	0	0	0	0
0.2 resistant	0	0	0	14	8	3	0	0	0	0
1.0 resistant	0	0	0	0	0	9	13	7	3	6
Total isolates	10	20	1	38	9	12	13	7	3	6

Table 2 The Distribution of MIC of the INH resistance-conferring mutations detected by OligoArray™

Gene Nucleotide no.	MIC μ g/ml									
	0.06	0.125	0.25	1	2	4	8	16	32	32<
Wild type	10	20	1	11	2	0	0	0	0	0
<i>inhA</i> -15 C/T	0	0	0	18	5	2	0	1	0	0
<i>inhA</i> -8 T/A	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>katG</i> 1778 G/A	0	0	0	5	1	0	0	0	1	1
<i>katG</i> 982 T/G	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>katG</i> 419 G/A	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
<i>katG</i> 944 G/A	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>karG</i> 944 G/C	0	0	0	0	0	5	11	3	1	1
<i>katG</i> 1778 G/A + <i>katG</i> 982 T/G	0	0	0	3	0	1	0	0	0	1
<i>katG</i> 1778 G/A + <i>inhA</i> -15 C/T	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>katG</i> 944 G/C + <i>katG</i> 1778 G/A	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>katG</i> 944 G/C + <i>inhA</i> -15 C/T	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
<i>katG</i> 944 G/C + <i>inhA</i> -8 T/A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Total isolates	10	20	1	38	9	12	13	7	3	6

Tへの遺伝子置換は、1 $\mu\text{g/ml}$ の38株中18株 (47.4%)、2 $\mu\text{g/ml}$ の9株中5株 (55.6%)、4 $\mu\text{g/ml}$ の12株中2株 (16.7%)、16 $\mu\text{g/ml}$ の7株中1株 (14.3%) に認められた。また、*katG* 944番のGからCへの遺伝子置換はすべてMIC 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌に分布していた。この遺伝子置換を単独でもつ菌株は、MIC 4 $\mu\text{g/ml}$ の12株中5株 (41.7%)、8 $\mu\text{g/ml}$ の13株中11株 (84.6%)、16 $\mu\text{g/ml}$ の7株中3株 (42.9%)、32 $\mu\text{g/ml}$ の3株中1株 (33.3%)、32 $\mu\text{g/ml}$ 以上の6株中1株 (16.7%) であった。さらに、*inhA*-15のCからTへの遺伝子置換と*katG* 944番のGからCへの遺伝子置換を併せもつ菌株が⁸、MIC 32 $\mu\text{g/ml}$ の3株中1株 (33.3%)と32 $\mu\text{g/ml}$ 以上の6株中2株 (33.3%) に認められ、*inhA*-8のTからAへの遺伝子置換と*katG* 944番のGからCへの遺伝子置換を併せもつ菌株が⁸、MIC 16 $\mu\text{g/ml}$ の7株中1株 (14.3%) に認められた。

(3) 小川比率法感受性でINH耐性遺伝子変異を有していた菌株

今回の検討では、小川比率法感受性菌の中にINH耐性遺伝子変異を有する菌株が認められたので、その詳細をTable 3に示した。MIC 1 $\mu\text{g/ml}$ で小川比率法感受性を示した菌株は24株あり、このうちの18株 (75.0%) がINH耐性遺伝子変異を有していた。これらの遺伝子変異のうち11株 (61.1%) が*inhA*-15のCからTへの遺伝子置換、7株 (38.9%) が*katG* 1778のGからAへの遺伝子置換であった。また、2剤以上に耐性遺伝子変異をもつ菌株が11株 (61.1%) に認められた。

考 察

当院では、結核菌薬剤感受性のスクリーニングテストとしてMIC測定法を採用してから3年が経過した。その間の菌株の約6%がINH-MIC判定保留域を示し、小川比率法による再検査 (INH 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の基準値) では一定した結果は得られなかった。今回われわれは、これらMIC判定保留域の菌株を中心に選定し、DNAマイクロアレイ法を用いて当該地域における結核菌のINH耐性遺伝子の保有状況を調査した。その結果、MIC 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の菌は、すべて wild type であった。一方、判定保留域にある菌株では、MIC 1 $\mu\text{g/ml}$ の36.8%、MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ の88.9%が小川比率法0.2 $\mu\text{g/ml}$ 耐性であり、これらの菌株の7割以上に何らかのINH耐性遺伝子変異が認められた。特に*inhA*-15のCからTへの遺伝子置換はMIC 1 $\mu\text{g/ml}$ の47.4%、2 $\mu\text{g/ml}$ の55.6%に認められ、この遺伝子置換がINH判定保留域菌の耐性化に大きく関与していることが示された。一方、*katG* 944のGからCへの遺伝子置換が⁸、4 $\mu\text{g/ml}$ 耐性菌の41.7%、8 $\mu\text{g/ml}$ 耐性菌の84.6%、16 $\mu\text{g/ml}$ 耐性菌の42.9%に認められ、MIC 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の結核菌の耐性化に強く関与している事実が示された。また、*inhA*調節領域と*katG*遺伝子置換を二重にもつ4菌株はすべてMIC 16 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌に認められ、これらの遺伝子置換を二重にもつ菌株はINH高度耐性を獲得するのではないかという以前からの報告²⁾³⁾⁸⁾と一致した。

次に、今回耐性菌に多く認められた*katG* 944遺伝子

Table 3 Characteristics of 18 *Mycobacterium tuberculosis* strains that have nucleic acid mutation in *inhA* regulatory region or *katG* gene and that be interpreted as susceptible by proportion test method on egg-based Ogawa media

No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	INH resistant mutation	Other drugs resistant mutation
1.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	<i>rspL</i> 134 A/G
2.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	<i>rspL</i> 134 A/G
3.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	<i>rspL</i> 134 A/G
4.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	<i>rspL</i> 134 A/G
5.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	<i>rspL</i> 134 A/G + <i>rrs</i> 505 C/T
6.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	<i>rspL</i> 134 A/G + <i>rrs</i> 505 C/T
7.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	<i>rspL</i> 134 A/G + <i>rrs</i> 505 C/T
8.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	
9.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	
10.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	
11.	1	<i>inhA</i> -15 C/T	
12.	1	<i>katG</i> 1778 G/A	
13.	1	<i>katG</i> 1778 G/A	
14.	1	<i>katG</i> 1778 G/A	<i>rpoB</i> 234 C/G + <i>rrs</i> 537 A/C + <i>rrs</i> 1423 A/G
15.	1	<i>katG</i> 1778 G/A	<i>rpoB</i> 234 C/T
16.	1	<i>katG</i> 1778 G/A + <i>katG</i> 982 T/G	<i>rpoB</i> 234 C/T
17.	1	<i>katG</i> 1778 G/A + <i>katG</i> 982 T/G	<i>rpoB</i> 234 C/T
18.	1	<i>katG</i> 1778 G/A + <i>katG</i> 982 T/G	

置換の保有率について、諸外国の報告と比較検討した。INH耐性結核菌のうちで *katG* 944 の G から C への置換、すなわちコドン 315 の Ser が Thr に変異した株の占める割合は、Hass ら⁴⁾ のアフリカ全土から集めた INH 耐性菌 124 株の 64%、van Soolingen ら⁵⁾ のオランダの INH 耐性菌 278 株の 53%、Mokrousov ら⁶⁾ のロシア北西部の INH 耐性菌 204 株の 94%、Cardoso ら⁷⁾ のブラジルの INH 耐性菌 97 株の 62%、Lavender ら⁸⁾ のオーストラリアの INH 耐性菌 52 株の 65% と報告されている。本邦では、向川らの東京都内から集めた結核菌の報告³⁾ があり、INH 耐性菌 67 株のうち 10 株 (15%) が *katG* 944 の G から C への置換を有していた。これは、諸外国の報告に比べてかなり低い割合である。一方、今回大阪で集められた菌株では、INH-MIC 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌 41 菌株中 21 株 (51.2%) が *katG* 944 の G から C への置換を有していた。この結果は諸外国に比較して低い割合ではなく、大阪においても INH 耐性菌の中には *katG* 944 の G から C への置換をもつものが多いことが判明した。この遺伝子置換を有する菌株は、INH 耐性をもちながら、ある程度のペルオキシダーゼ活性も維持し、動物実験では感受性菌同様の感染性を示したという報告がある⁹⁾¹⁰⁾。近年、多剤耐性結核の集団感染事例が国内外で報告されており^{11)~13)}、また当院での RFLP 分析においても多剤耐性結核は感受性菌とほぼ同等のクラスター形成率を示している¹⁴⁾。多剤耐性結核の場合もこの遺伝子変異をもつ菌株が感染を広げている可能性が考えられる。今後の課題として、遺伝子型別による大クラスターを形成している菌株に、この INH 耐性遺伝子変異をもつ菌株が多いか否かを調査したいと考えている。

最後に、今回対象とした全 119 菌株のうち 18 株 (15.1%) に、MIC 判定保留域 (1 $\mu\text{g/ml}$) で小川比率法 (0.2 $\mu\text{g/ml}$) では感受性を示し、INH 耐性遺伝子変異をもつ菌株が認められた。すべての INH 耐性遺伝子変異が表現型における耐性を意味するとは限らないが、この結果から、現行の小川比率法 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の基準は INH 耐性の過小評価となり、INH 耐性遺伝子変異をもつ菌株を見落とす可能性が示唆された。

今回の検討は OligoArrayTM に載っている遺伝子変異に限られており、それ以外にも INH 耐性に関与する遺伝子変異は多数報告⁷⁾¹⁵⁾¹⁶⁾ されている。それゆえ、今回推定した INH 耐性遺伝子変異の保有率は実際よりも低く見積もられていると考えられる。また、MIC 測定法では 1~2 管のぶれは誤差範囲内であり、小川比率法も多剤耐性菌では発育が遅く耐性菌を感受性菌と誤判定する可能性があり、3 法それぞれに一長一短である。なお、今回任意に抽出した菌株は実際の MIC 分布に比較して判定保留域にある菌の割合が高く、そのため *inhA* 調節領

域の遺伝子変異の占める割合が実際より高いと考えられる。実際の耐性遺伝子分布を検討するためには、一定期間内の全菌株について検討する必要がある。しかし、少なくとも今回の検討から、当該地域の結核菌における INH-MIC 1~2 $\mu\text{g/ml}$ の耐性化には *inhA*-15 の C から T への遺伝子置換が、INH-MIC 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性化には *katG* 944 の G から C への置換が大きく関与している事実が明らかになった。

ま と め

- ① MIC 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の感受性菌はすべて wild type であった。
- ② MIC 1 $\mu\text{g/ml}$ の判定保留域菌の 47.4%、MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ の判定保留域菌の 55.6% に *inhA*-15 の C から T への遺伝子置換が認められた。
- ③ MIC 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌の 92.7% が何らかの *katG* 遺伝子変異をもち、51.2% に *katG* 944 の G から C への置換が認められた。

謝 辞

今回の検討にあたり、日清紡研究開発センターの平野様、吉川様、市原様にご協力いただいたことに深く感謝いたします。

文 献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：「新結核菌検査指針」。結核予防会，東京，2000。
- 2) Ramaswamy SV, Robert R, Dou S-J, et al.: Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 1241-1250.
- 3) 向川 純，遠藤美智子，柳川義勢，他：薬剤耐性結核菌株の薬剤耐性パターンと遺伝子変異の解析。感染症学雑誌。2005; 79: 388-396。
- 4) Hass WH, Schilke K, Brand J, et al.: Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 1601-1603.
- 5) van Soolingen D, Petra E, Hass WH, et al.: Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis.* 2000; 182: 1788-1790.
- 6) Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, et al.: High prevalence of *katG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001; *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1417-1424.
- 7) Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, et al.: Screening and characterization of mutation in isoniazid-resistant

- Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2004 ; 48 : 3373–3381.
- 8) Lavender C, Globan M, Sievers A, et al.: Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Australia. Antimicrob Agents Chemother. 2005 ; 49 : 4068–4074.
 - 9) Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST: Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. Infect Immunity. 2002 ; 70 : 4955–4960.
 - 10) Rouse DA, Devito JA, Li Z, et al.: Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. Mol Microbiol. 1996 ; 22 : 583–592.
 - 11) 佐々木結花, 山岸文雄, 水谷文雄, 他: 中高年者を中心に生じた多剤耐性結核菌による集団感染事例. 結核. 1999 ; 74 : 549–553.
 - 12) Palmero D, Ritacco V, Ruano S, et al.: Multi-drug resistant tuberculosis outbreak among transvestite sex workers, Buenos Aires, Argentina. Int J Tuberc Lung Dis. 2005 ; 9 : 1168–1170.
 - 13) Phyu S, Lwin T, Ti T, et al.: Drug-resistant tuberculosis in Yangon, Myanmar. Scand J Infect Dis. 2005 ; 37 : 846–851.
 - 14) 松本智成, 阿野裕美, 永井崇之, 他: 大阪における多剤耐性結核の分子疫学. 結核. 2005 ; 80 : 258.
 - 15) Mdluli K, Slayden RA, Zhu Y, et al.: Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl ACP synthase by isoniazid. Science. 1998 ; 280 : 1607–1610.
 - 16) Sreevatsan S, Zhang, XY, Deretic V, et al.: Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in diverse localities. Antimicrob Agents Chemother. 1997 ; 41 : 600–606.

————— Original Article —————

RESISTANCE-CONFERRING MUTATIONS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS WITH LOW LEVEL RESISTANCE TO ISONIAZID

Hiromi ANO, Tomoshige MATSUMOTO, Takayuki NAGAI, Yoshitaka TAMURA,
Hiroko YOSHIDA, Kunimitsu KAWAHARA, Isamu TAKAMATSU, Izuo TSUYUGUCHI,
and Tetsuya TAKASHIMA

Abstract [Objective] We investigated the prevalence of isoniazid (INH) resistance-conferring mutations in the INH-indeterminate *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strains.

[Materials and Methods] We initially selected a sample of 47 clinical isolates of MTB from patients, who visited the Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases from 2000 to 2005. Strains resistant to the concentration of 1–2 $\mu\text{g/ml}$ were defined as “indeterminate”. INH resistance-conferring mutations were determined by DNA microarray.

[Results] Of 47 INH-indeterminate strains, only 13 (27.7%) were found to have no resistance mutations, 23 (48.9%) had mutation within the *inhA* regulatory region at -15 C to T, and 2 (4.3%) had mutation within the *inhA* regulatory region at -8 T to A, 6 (12.8%) had mutation within the *katG* gene at 1778 G to A, and 3 (6.4%) had mutations within the *katG* gene

both at 1778 G to A and at 982 T to G.

[Conclusions] We showed that the majority of INH-indeterminate strains have resistance-conferring mutations, which were mainly detected within the *inhA* regulatory region.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Minimal inhibitory concentration, DNA microarray, INH resistance-conferring mutation

Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases

Correspondence to: Hiromi Ano, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, 3–7–1, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583–8588 Japan.

(E-mail: ano@zeus.eonet.ne.jp)