

Porphyromonas gingivalis を
口腔感染させたコラーゲン誘発
関節炎モデルマウスの脊椎に
およぼす影響

さとう　たくみ
佐藤　匠

本論文の要旨は，第226回朝日大学歯学研究科発表会（2019年10月23日，岐阜）において発表した．
本論文の一部は，日本歯科保存学会春季学術大会（2017年6月9日，青森），第14回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会（2019年11月10日，愛知）において発表した．

緒 言

歯周病は、主に歯周病原細菌の感染による炎症性疾患で、炎症が歯肉に局限している歯肉炎と、歯周組織におよぶ歯周炎に大別される^{1, 2)}。近年歯周病が全身疾患に影響をおよぼすことが明らかになりつつあり、歯周病と全身疾患との関連性を解明する学問が生まれた。これを **Offenbacher**³⁾ がペリオドンタルメディシン（歯周医学）と名付けた。その中で歯周病は糖尿病や心臓血管疾患、早期低体重児出産、呼吸器感染症といった様々な疾患と相互に影響をおよぼしていることが知られている⁴⁻⁷⁾。これらの研究成果から全身疾患が歯周組織に影響を与えるという考えだけでなく、歯周病が全身に対し影響をおよぼす二方向性⁸⁾を持っていることが明らかになりつつある。

その中で、歯周病と関節リウマチ（RA）の相互的關係が報告されている⁹⁻¹²⁾。RAは関節を構成する滑膜部分への炎症、軟骨の破壊、さらに進行によって骨吸収による関節破壊を特徴とする自己免疫疾患である¹³⁾。RAの進行に伴い機能的、構造的変化が現れる関節部位として主に手、足および膝があげられる。しかしながら、RAに罹患するとすべての関節に影響が及ぶが、手、足および膝への影響は数多く報告されているのに対し、同じ関節の

集合体である脊椎のRA症状を見たものは少ない。一方で、歯周病原細菌の感染が脊椎のRAにおよぼす研究も少ない。RAの原因物質はいまだ特定されておらず遺伝的要因や環境的要因による相互作用が関係しているという研究が多く存在する¹⁴⁾。RAの臨床マーカーとしてリウマトイド因子(RF)やマトリックスメタロプロテアーゼ3(MMP-3)などがあげられるが、その他の臨床マーカーとして、環状シトルリン化タンパク(Cyclic Citrullinated Peptide:CCP)に対する抗体である抗環状シトルリン化ペプチド抗体(Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody:ACPA)がある。CCPは体内の組織中に分布している内因性のペプチジルアルギニン・デイミナーゼ(Peptidylarginine Deirninase:PAD)だけでなく、*Porphyromonas gingivalis*(*P. g*)が産生するPADによっても生成される。*P. g*はヒトの重度慢性歯周炎との関連性が高いとされているRed complexの歯周病原細菌として*Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*とともに挙げられており¹⁵⁻¹⁷⁾、このうち*P. g*はPADを産生する唯一の口腔内細菌として、歯周組織中のCCPがACPAを産生させ、自己免疫応答が誘発され関節炎を惹起すると考えられている¹⁸⁻²²⁾。*P. g*に感染すると本菌に対する血清IgG抗体価が上昇とすることや^{23,24)}、DNAがRA患者の血清や髄液か

ら高頻度に検出されるという報告がある^{25,26)}。しかしながらその詳細なメカニズムは明らかでなく、歯周病とRAの関係を解明するうえで重要である。そこで本研究では、RAモデルマウスとしてコラーゲン誘発関節炎モデルマウスに*P. g*を口腔感染させて歯周病を惹起させ、それによりRAに与える影響を確認するため左下肢の軟X線写真、脊椎のマイクロCT像、および組織像を検討した。

材料および方法

1. 実験動物

本研究は DBA/1J (日本エスエルシー, 浜松) マウス 36 匹を本研究に供した。本マウスのうち 12 匹は Control 群とし, 残り 24 匹にはウシ II 型コラーゲンからなる抗原を 0.01M 酢酸リン酸緩衝液にて 8 mg/ml に調整したものとフロイント不完全アジュバンドで *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra を 4 mg/mL に調整したフロイント完全アジュバンドを等量で合わせたエマルジョンを投与し RA モデルマウスを作製した²⁷⁾。エマルジョンの投与は 8 週齢時に 1 回目として耳介基部皮内に, 11 週齢時に 2 回目として尾根部皮内に 0.025 ml/animal ずつ, 合計コラーゲン量として 0.2 mg/animal 投与し関節炎を惹起させた。そのため本 RA モデルマウスはコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) と呼ばれている。本研究に供した CIA マウスのうち 12 匹を実験群, 12 匹を対照群として振り分けた。

恒温恒湿 (23 ± 2 °C, 55 ± 5 % RH), 午前 6 時点灯, 12 時間明暗サイクルにて飼育した。なお, 飼育期間中ラット・マウス用 MF 固形飼料 (オリエンタル酵母工業, 東京) と水道水を自由に摂取させた。本実験は, 朝日大学歯学部動物実験倫理委員会の承認 (承認番号: 16-006, 17-013) の下で動物

実験倫理委員針に従って行うとともに，動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた．

2. *P. g* の培養

P. g ATCC33277株 (ATCC, VA, USA) 株は10%ウマ血液添加ブルセラHK寒天培地 (極東製薬工業, 東京) で37℃, 嫌氣的 (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) 条件下で培養した．細菌を対数増殖期に集菌し, リン酸緩衝食塩水で3回洗浄後, 2.5% カルボキシメチルセルロース (CMC, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) に懸濁した．細菌数は, 分光光度計 (Spectrophotometer UV-3600, 島津, 東京) を用い, 波長650 nm で測定し, 菌懸濁液の濁度と, 同菌液を前述の寒天培地に塗抹, 培養して得られた形成コロニー数とで作製した検量線を用いて算定した²⁸⁾．

3. *P. g* の感作および口腔内への接種

P. g を含むCMCを投与し口腔内感染をさせた *P. g* 感染群 (CIA + *P. g*, n=12) ならびにCMCのみを投与した *P. g* 非感染群として (CIA, n=12) の2群を設定した．CMCは1日おきに5%イソフルラン麻酔を吸入させたのちマウスの口腔内に直接 1×10^9 CFU/ml の濃度でCMC溶液を0.1ml投与した．投与開始後45日目にイソフルランによる麻酔

後，灌流固定を行い，10% 中性緩衝ホルマリン液（和光純薬工業，大阪）を用いて脊椎を切除し，試料とした．

4．軟 X 線写真による RA 臨床症状発現の評価

固定後，水洗した試料は X 線フィルム（富士フィルム，東京）を使用し，軟 X 線装置（ソフテックス，東京）を用いて撮影した．撮影条件は，管電圧 24 kV，管電流 5 mA，撮影時間は 0.4 秒とした．観察は本条件下で左下肢の観察を行った．

5．マイクロ CT による脊椎の椎体間距離の計測

Micro computed tomography（ScanXrate-RB O90SS，コムスキャンテクノ，横浜，以下，マイクロ CT）を用いて脊椎の撮影を行った．撮影条件は voxel size $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$ ，管電圧 75 kV，管電流 $76 \mu\text{A}$ とした．得られたデータは，コーンビーム再構成ソフトウェア（ConeCTexpress，コムスキャンテクノ）により再構成を行い，画像解析ソフトウェア（TRIBon，ラトックシステムエンジニアリング，東京，ならびに Osirix，ニュートン・グラフィックス，札幌）を用いて計測を行った．

6. 脊椎の組織学的観察

灌流後の各マウスから脊椎を含む領域を No.15 メスを用いて切除し、組織切片作製のために 4% パラホルムアルデヒド（和光純薬工業，大阪）液中に 12 時間浸漬固定し、0.5 M EDTA（和光純薬工業，大阪）にて脱灰させた後、通法に従いパラフィン包埋した。脊椎を中心に矢状方向に 5 μ m の厚さに薄切し、軟骨組織の変化を確認するためにサフランin-O / ファストグリーン染色と、II 型コラーゲン、軟骨の主なプロテオグリカンであるアグリカンを確認するため抗マトリックスメタロプロテアーゼ 13 ポリクローナル抗体 (Anti-MMP-13 Polyclonal Antibody, Abcam, CA, USA) を使用し免疫染色を施した後、光学顕微鏡 (BX60, オリンパス，東京) を用いて観察した。

7. 統計学的分析

測定値は平均 \pm 標準偏差 (SD) で表し、CIA 群と CIA + P. g 群間の有意差の検定には、student's *t*-test を行った。Control 群、CIA 群、CIA + P. g 群の 3 群間の有意差の検定には一元配置分散分析および Tukey-Kramer method を用いた。p 値が 0.05 未満で有意差ありと判定した。

結 果

1. 左下肢の軟 X 線写真像

RAの臨床状態悪化を確認するため各群の代表的な左下肢の軟 X 線写真像を示す(図1)。黄色矢印はCIA群, CIA + P. g 群における足根中足関節部を示す。CIA + P. g 群はCIA群と比較しアンキローシスを認めた。それにより足根中足関節部を構成する各骨の境目に不明瞭化が認められる。赤矢印はCIA群, CIA + P. g 群における中足趾節間関節部を示す。CIA + P. g 群はCIA群と比較し骨の粗造感, 足の甲側への変形を認めた。

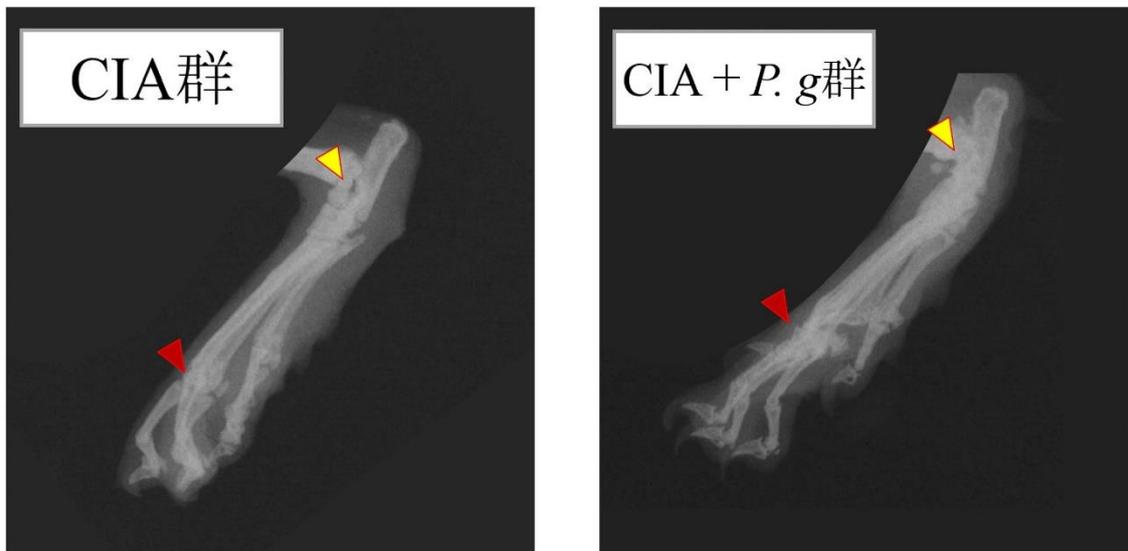


図 1 代表的な左下肢の軟 X 線写真像

2. 脊椎のマイクロCT像を用いた椎体間距離の計測

各群における脊椎の代表的なマイクロCT像を示す(図2)。A, B, Cは脊椎の全体像を示し, D, E, Fは各群の拡大像を示す($\times 2$)。椎体間の距離を定量するため椎体の上縁, 中央, 下縁, 上縁と中央の中間地点, 中央と下縁の中間地点の計5か所を計測し平均値を算出した。計測した部分を各色の太線で示す。測定距離はControl群のマイクロCT像では緑線で示し, CIA群では黄線で示し, CIA + P. g 群では赤線で示す。CIA + P. g 群はControl群やCIA群に比べて椎体間距離の減少や骨表面における粗造感がみられた。椎体間距離はControl群において $18.6 \pm 8.35 \mu\text{m}$, CIA群では $8.2 \pm 5.33 \mu\text{m}$, CIA + P. g 群においては $4.3 \pm 3.07 \mu\text{m}$ であった。Control群とCIA群では約2.3倍の有意な差を認めた ($p < 0.01$)。CIA群とCIA + P. g 群とでは約1.9倍の有意な差を認めた ($p < 0.05$) (図3)。

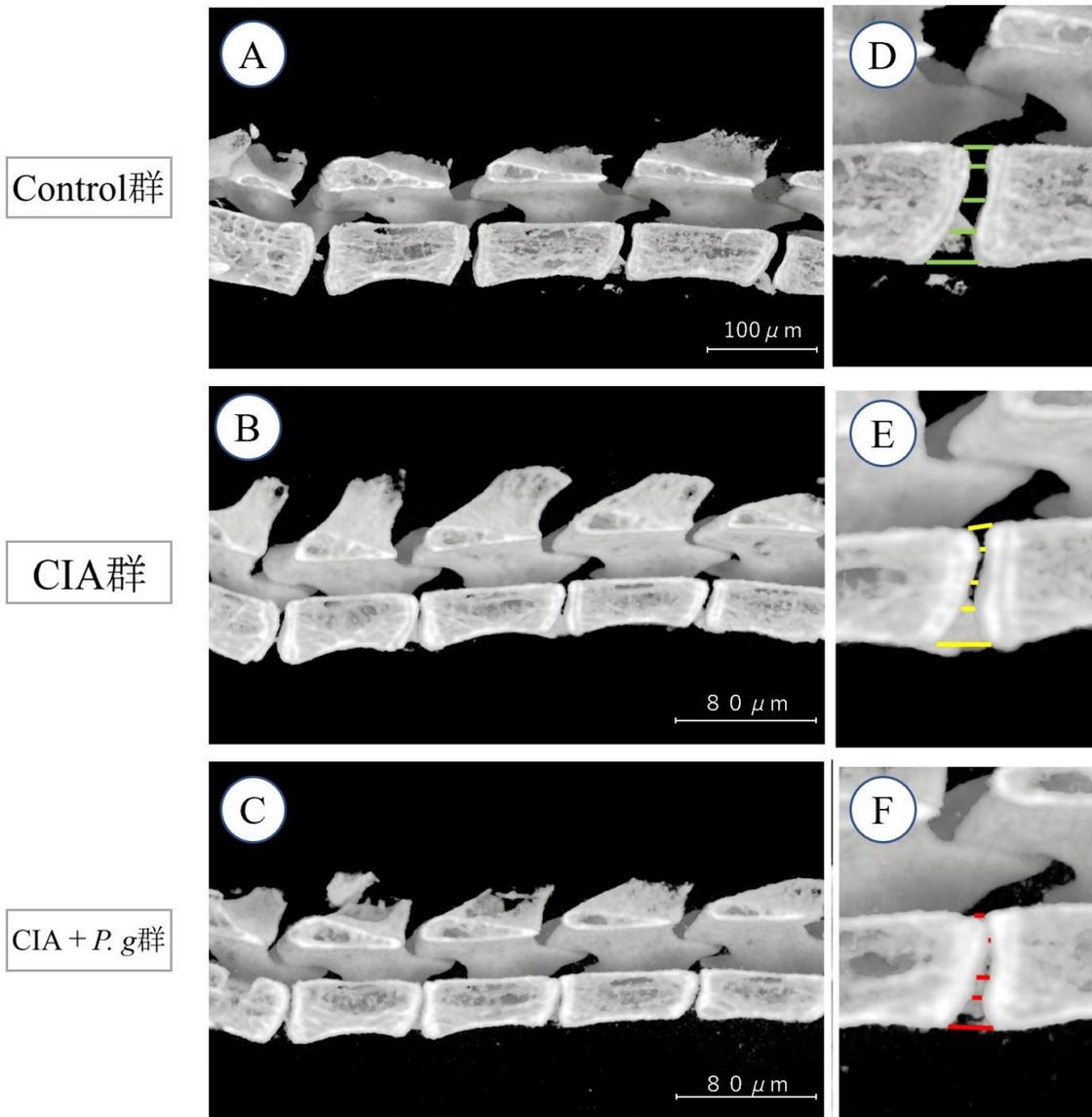


図 2 脊椎のマイクロCT像

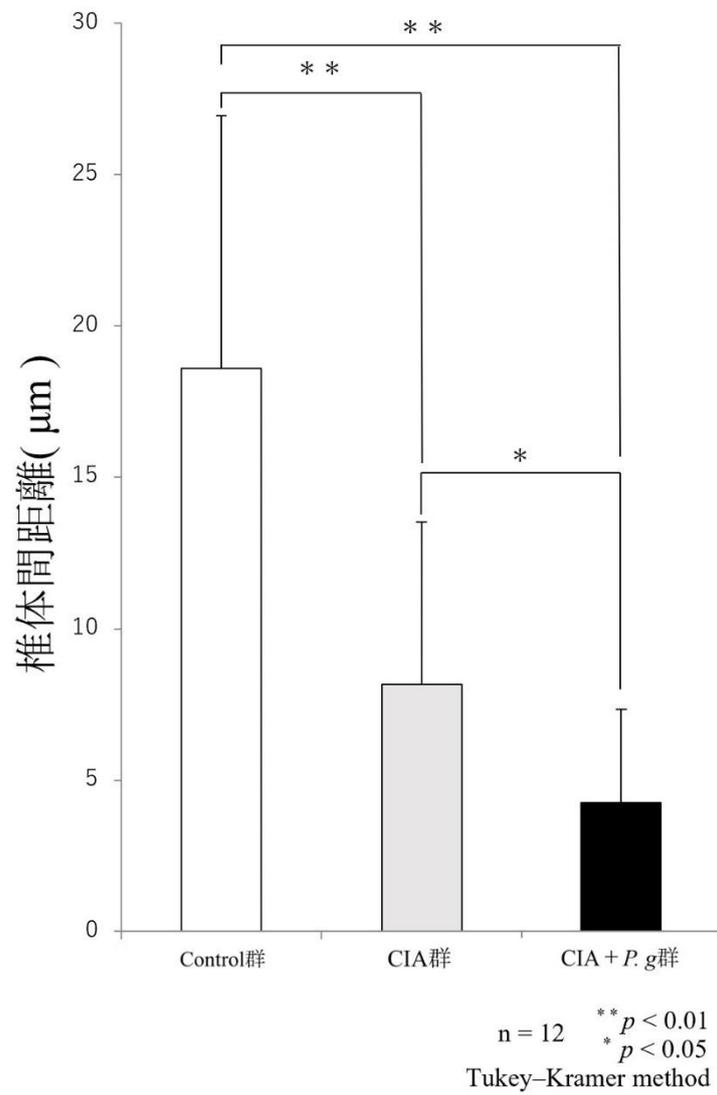


図 3 椎体間距離の比較

3. 脊椎の組織学的所見(図4)

CIA + P. g 群はCIA群と比較すると髄核, 軟骨終板および硝子軟骨部分において軟骨基質の減少がみられる. これによりCIA + P. g 群のグリコサミノグリカンの顕著な減少がみられた.

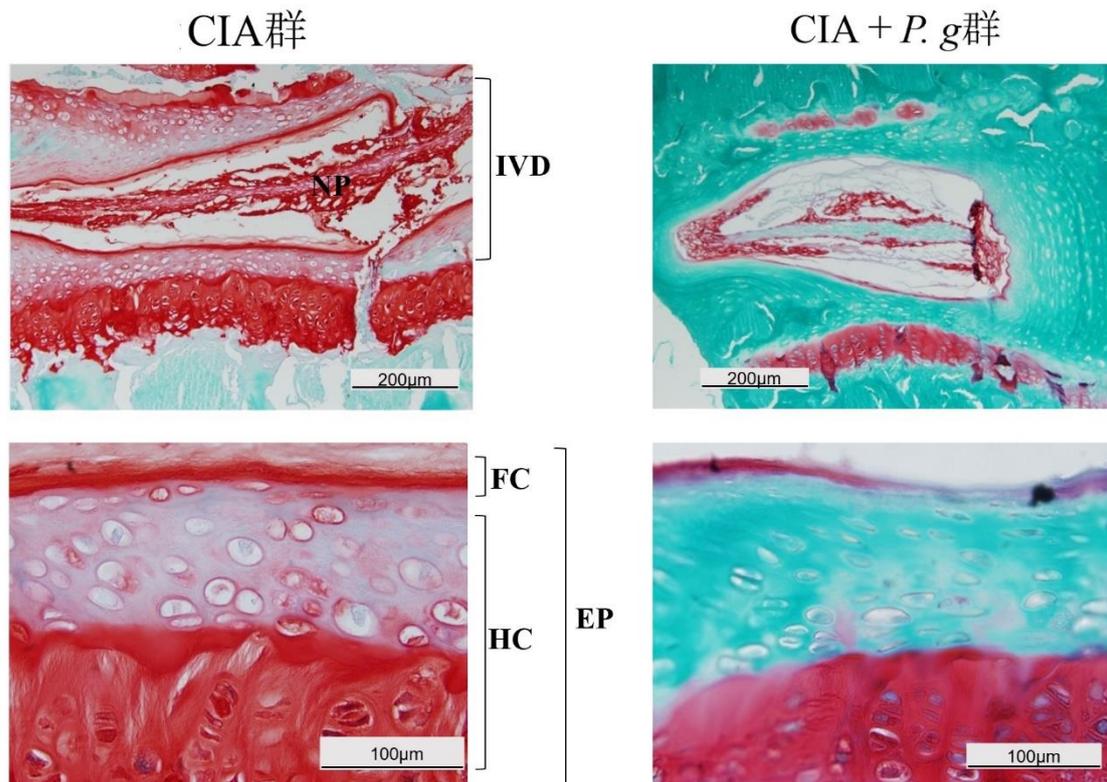


図4 脊椎の組織学的評価

髄核 : Nucleus pulposus (NP), 椎間板 : Intervertebral disc (IVD), 線維軟骨 : Fibro cartilage (FC), 硝子軟骨 : Hyaline cartilage (HC), 軟骨終板 : End plate (EP).

4. 脊椎におけるMMP-13陽性細胞の局在

赤矢印は脊椎におけるMMP-13陽性細胞を示す(図5)。CIA+P.g群はCIA群と比較し軟骨終板周囲にMMP-13陽性細胞の局在を認めた。MMP-13陽性細胞数を比較したところ、CIA+P.g群はCIA群と比較し陽性細胞数が約1.6倍有意に増加した(図6)。

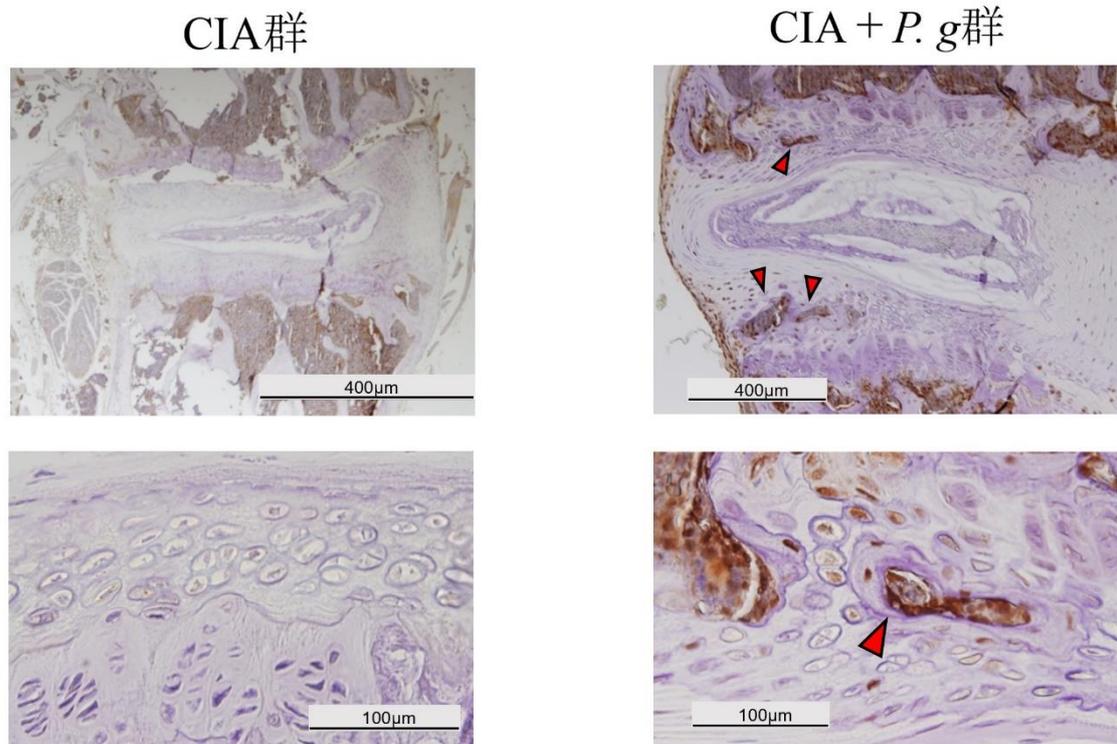


図5 脊椎のMMP-13による組織学的評価

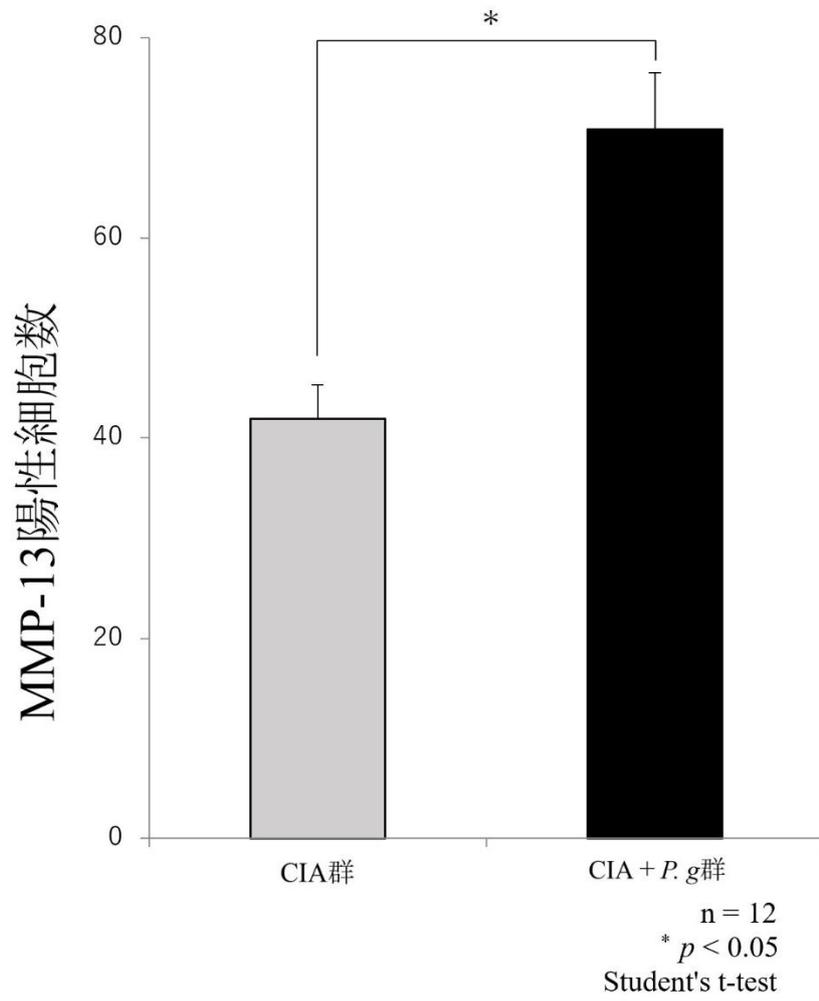


図 6 脊椎のMMP-13陽性細胞数の比較

考 察

近年の報告で佐藤ら²⁹⁾は、本研究と同様にRAモデルマウスであるDBA/1Jマウスを用いて*P. g*を経口投与した場合に対照群と比較し、その結果、実験群で手、足に関節炎の悪化を認めた。本研究では安田らの先行研究²³⁾の結果を踏まえたうえで、脊椎に与える影響について検討している。安田らの研究においても*P. g*をDBA/1Jマウスに経口投与したところ、*P. g*血清抗体価の高値、MMP-3、ACPA値に有意差を認め、高度な下顎歯槽骨の吸収と関節炎の悪化を認めている¹⁸⁾。本研究においても左下肢軟X線写真像も検討に加えた結果、CIA群とCIA+*P. g*群を比較するとCIA+*P. g*群のRA症状の悪化が確認できた。

MMP-3は主に滑膜表層細胞で産生される蛋白分解酵素であり、軟骨のプロテオグリカンを分解し、血清中のMMP-3の高値は増殖性滑膜炎の炎症程度を示す³⁰⁻³³⁾。また軟骨細胞および滑膜細胞から産生されるMMP-13により特に軟骨破壊が引き起こされることが知られている³⁴⁾。これらにより歯周病と関節リウマチが進行している状態において脊椎のMMP-13の局在を免疫組織学的に評価したところ軟骨終板に陽性細胞の集積を認めた。MMP-13の発現は破骨細胞の波状縁直下にみられる³⁵⁾こと

が示されており MMP-13 の局在部分への破骨細胞の発現も考えられる。このことから破骨細胞による椎体の骨表面の影響など今後さらに詳しく検討する必要がある。関節の集合体である脊椎においても *P. g* の感染により脊椎の椎体間距離の減少、椎体の骨表面の粗造化、髓核と軟骨終板におけるプロテオグリカンの減少、軟骨終板周囲における MMP-13 の局在が確認され、RA の悪化が示唆された。安田ら²³⁾の報告では膝関節部での CIA + *P. g* 群と CIA 群での MMP-13 陽性細胞数は 40 倍の差が確認されているが、脊椎では 1.6 倍と膝関節部における MMP-13 陽性細胞と比較すると少ないものとなった。ヒトにおける RA の関節症状は手、足、膝など全身におよび、RA の脊椎病変の発生頻度は高く特に上位頸椎が好発部位であることが報告されている³⁶⁾。今回の実験より、マウスにおいては RA の症状として身体の中枢部より末端部に出やすい傾向が示唆され、脊椎と比較し膝関節に出やすい傾向があることが確認された。ヒトとマウスでは歩行様式が異なり、今回対象としたマウスが四足歩行のため二足歩行のヒトと比較し荷重の加わり方が分散されると考えられるため、脊椎の RA 症状が膝関節部と比較すると緩慢であるのかもしれない。

ヒトにおいては膝と脊椎の RA 症状を比較、検討をしている報告はない。本研究により *P. g* による

口腔感染がコラーゲン誘発関節炎モデルマウスに対し、さらに全身的に症状を悪化させることが示唆されたが、歯周病がRAの発症に影響をおよぼすメカニズムとしてACPA以外の因子も報告されており、近年では、塚崎ら³⁷⁾が関節リウマチの炎症を起こした滑膜部において、炎症性サイトカインであるIL-6の作用によってpTregがFoxp3の発現を失い、Th17へと変化し、これが関節リウマチ局所での炎症や骨破壊を増悪することを報告した。今回の研究結果から、進行した歯周炎が、関節リウマチの進行を助長するが、その影響は四肢の関節だけでなく、体幹を構成する脊椎においても少なからず出現していることが明らかとなったが、四肢の関節と体幹を構成する脊椎との出現程度の違いについては今後検討が必要である。

結 論

P. g の口腔感染が RA の増悪に与える影響について調べるため RA モデルマウスに *P. g* を口腔感染させ脊椎のマイクロ CT 像，組織学的評価について検討した結果，以下の結論を得た．

1 軟 X 線所見，脊椎のマイクロ CT 所見より CIA + *P. g* 群は CIA 群と比較し椎体間距離の減少，RA の増悪を認めた．

2 脊椎関節の組織所見から CIA + *P. g* 群は CIA 群と比較して髄核および軟骨終板のグリコサミノグリカンの減少による軟骨の消失を認めた．また免疫染色による MMP-13 陽性細胞は軟骨終板周囲に浸潤を認め，CIA + *P. g* 群は CIA 群と比較し約 1.6 倍の MMP-13 陽性細胞数差を認めた．

上記から DBA/1 J マウスに *P. g* を口腔感染させると脊椎の関節炎症状の悪化，周囲に MMP-13 の発現を増加させ RA 病態の増悪することが示唆された．

引用文献

- 1) 和泉 雄一 . 歯周治療の指標 2015. 特定非営利活動法人日本歯周病学会 . 2016 .
- 2) Newman MG, Takaei HH, Carranza FA; 申 基喆 , 河津 寛 , 嶋田 淳 , 安井利一 , 上村恭弘 . CARRANZA'S クリニカルペリオドントロジー上巻 . 第9版 . 東京 :クインテッセンス出版 ;2005:64-72 .
- 3) Offenbacher S. Periodontal disease: pathogenesis. *Ann Periodontol*.1996;1:821-878 .
- 4) Grossi SG and Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus a two-way relationship. *Ann Periodontol*.1998;3:51-61 .
- 5) Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjälä SL, Jungell PS, Isoluoma M, Hietaniemi K and Jokinen MJ. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*.1989;298:779-781 .
- 6) Senba T, Kobayashi Y, Inoue K, Kaneto C, Inoue M, Toyokawa S, Suyama Y, Suzuki T, Miyano Y and Miyoshi Y. The association between self-reported periodontitis and coronary heart disease.-From MY Health Up Study-. *J Occup Health*. 2008;50:283-287 .

- 7) 野口俊英, 稲垣幸司. 歯周病と全身疾患との関係ペリオドンタルメディスン (Periodontal Medicine) の潮流を読む～いま明らかになっていること(上)～. 日歯衛会誌. 2006;1:14-27.
- 8) Williams RC and Offenbacher S. Periodontal medicine the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol 2000*. 2000;23:9-12.
- 9) De Pablo P, Chapple IL, Buckley CD and Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5:218-224.
- 10) Kaur S, White S and Bartold PM. Periodontal disease and rheumatoid arthritis. A systematic review. *J Dent Res*. 2013;92:399-408.
- 11) Fuggle NR, Smith TO, Kaul A and Sofat N. Hand to mouth: A systematic review and meta-analysis of the association between rheumatoid arthritis and periodontitis. *Front Immunol*. 2016;7:80.
- 12) Araújo VM, Melo IM and Lima V. Relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis: Review of the literature. *MEDIAT INFLAMM*. 2015;ID259074.
- 13) Darrah E and Andrade F. Rheumatoid arthritis and citrullination. *Curr Opin Rheumatol*.

- 2018;30:72-78.
- 14) McInnes IB and Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *NEJM*.2011;365:2205-2219.
- 15) Mayrand D and Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented bacteroides species. *Microbiol Rev*.1988;52:134-152.
- 16) Slots J and Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1988;15:85-93.
- 17) 和泉雄一. ザ・ペリオドントロジー. 第3版. 京都:永末書店;2009:40-43.
- 18) McGraw WT, Potempa J, Farley D and Travis J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infect Immun*. 1999;67:3248-3256.
- 19) Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T and Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6:727-730.
- 20) Hajishengallis G. Periodontitis: From

- microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:30-44.
- 21) 小林哲夫, 吉江弘正. 歯周炎と関節リウマチ 関連性と臨床対応. 日歯周誌. 2012;54:11-17.
- 22) Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ and Weissmann G. Hypothesis: The humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation*. 2004;28:311-318.
- 23) 安田忠司, 松下至宏, 佐藤 匠, 澁谷俊昭. *Porphyromonas gingivalis* を口腔感染させたコラーゲン誘発関節炎モデルマウスの解析. 日歯保存誌. 2018;61,214-224.
- 24) Okada M, Kobayashi T, Ito S, Yokoyama T, Abe A, Murasawa A and Yoshie H. Periodontal treatment decreases levels of antibodies to *Porphyromonas gingivalis* and citrulline in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol*. 2013;84:74-84.
- 25) Témoïn S, Chakaki A, Askari A, El-Halaby A, Fitzgerald S, Marcus RE, Han YW and Bissada NF. Identification of oral bacterial DNA in synovial fluid of patients with arthritis with native and failed prosthetic joints. *J Clin*

- Rheumatol.* 2012;18:117-121.
- 26) Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patiño-Marin N, Rizo-Rodríguez JC, Little JW and Loyola-Rodríguez JP. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol.* 2009;36:1004-1010.
- 27) 今泉和則，樋ノ上ひろみ，上野 誠，高田 功，佐藤忠司，湊良 雄，武下政一，岡庭 梓．II型コラーゲン感作 DBA/1Jマウスの関節病変について．*Exp Anim.* 1990;39:27-34.
- 28) Chae P, Im M, Gibson F, Jiang Y and Graves DT. Mice lacking monocyte chemoattractant protein-1 have enhanced susceptibility to an interstitial polymicrobial infection due to impaired monocyte recruitment. *Infect Immun.* 2002;70:3164-3169.
- 29) 佐藤圭祐，山崎和久．歯周病と関節リウマチの新たな関連メカニズムの可能性．*日歯周誌*．2019;61:142-147.
- 30) Larsen A, Dale K and Eek M. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn.* 1977;8:481-491.

- 31) Ribbens C, Porras MM, Franchimont N, Kaiser MJ, Jasper JM, Damas P, Houssiau FA and Malaise MG. Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment. *Ann Rheum* . 2002;61:161-166.
- 32) Kobayashi A, Naito S, Enomoto H, Shiomi T, Kimura T, Obata K, Inoue K and Okada Y. Serum levels of matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) for monitoring synovitis in rheumatoid arthritis. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:563-570.
- 33) 上村裕子, 林秀俊, 高橋敏夫, 齋藤敏晴, 梅田良祐, 一瀬良英, 千藤 莊, 辻 剛, 熊谷俊一. 関節リウマチの活動性把握における血清 MMP-3 測定の有用性. *臨床病理*. 2015;63:1357-1364.
- 34) Moore BA, Aznavoorian S, Engler JA and Windsor LJ. Induction of collagenase-3 (MMP-13) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1502:307-318.
- 35) Nakamura H, Sato G, Hirata A and Yamamoto T. Immunolocalization of matrix

- metalloproteinase-13 on bone surface under osteoclasts in rat tibia. *Bone*.2004;34:48-56.
- 36) 猿橋康雄, 松末吉隆. リウマチ脊椎病変の診断と治療. *Clin Rheumatol*.2009;21:112-118.
- 37) Tsukasaki M, Komatsu N, Nagashima K, Nitta T, Pluemsakunthai W, Shukunami C, Iwakura Y, Nakashima T, Okamoto K and Takayanagi H. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat. Commun*. 2018;9:701.