

●原著

仙骨部への鍼刺激が精子運動率へ及ぼす影響 ——精子無力症患者への臨床応用にむけて——

伊佐治景悠^a 邵 仁哲^b 岡田 岬^c 高羽夏樹^a 角谷英治^c 納谷佳男^a

キーワード：鍼刺激、中髎穴、仙骨部骨膜、精子運動率、精子無力症

acupuncture stimulation, BL33, sacral periosteum, sperm motility, asthenozoospermia

抄録：近年男性不妊症が社会問題となっているが、精巣内精子回収法や精索静脈瘤に対する外科的治療を除いて有効な治療法がない。そこで、泌尿・生殖器系疾患に有効であると臨床報告されている仙骨部（中髎穴）への鍼刺激が精液所見にどのような影響を与えるのか生理学的検討を行った。健常成人男性 32 名を対象として、中髎穴骨膜を刺激する群（骨膜刺激群）と、筋肉を刺激する群（筋中刺激群）に分け精液採取前日に鍼刺激を行った。精液検査は、3 日間の禁欲後に精液量、総精子数、精子濃度、精子運動率を測定した。両群ともに精液所見に有意差を認めなかったが、精子運動率を中央値により低運動と高運動に分けて解析したところ、骨膜刺激群において低運動の精子運動率が有意に上昇した。筋中刺激群では有意差を認めなかった。これらのことより、中髎穴骨膜への鍼刺激は、精子無力症患者の精子運動率を上昇させる新たな治療法となる可能性が考えられる。

（自律神経, 55: 46 ~ 52, 2018）

はじめに

少子高齢化が進行している本邦では出生率の向上が求められている。しかし、不妊症カップルが増加しており、5.5 組に 1 組は不妊治療の経験を有している¹²⁾。不妊症は、これまで女性の問題と捉えられていたが、約半数は男性に原因がある。男性不妊症は、造精機能障害、精路通過障害、性機能障害、副性器障害に分類され、精液所見が不良であり精索静脈瘤が認められた場合は、精索静脈瘤手術が有効である¹¹⁾。また、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症には内分泌療法も有効である¹⁶⁾。しかし、この他の原因に対しては有効な治療法が確立されていないため、多くの男性不妊症患者は人工授精や精巣内精子回収法²⁾により採精し高度生殖補助医療を行う。人工授精や高度生殖補助医療は、患者の経済的負担や侵襲性が高いため新たな治療法が求められている。

一方、中髎穴（第 3 後仙骨孔部、BL33）への鍼刺激が、勃起障害や排尿障害に対して有効であると報告されている^{9)10)24)~26)}。我々はラットを用いてその作用機序を検討し

たところ、仙骨部への鍼刺激は中枢神経系に作用することで勃起機能を亢進させることが分かった⁵⁾。また、体外受精を行う女性不妊症患者に対しての鍼治療が、臨床妊娠率を上昇させるとも報告されている²⁰⁾。これらのことより、鍼治療は、生殖器疾患に対して有効である可能性が考えられる。

しかし、生殖器と支配神経領域が類似する膀胱機能の基礎研究では、会陰部への体性刺激は膀胱内圧が低圧時には亢進反応を、高圧時には抑制反応を生じさせることが報告されている²²⁾。この結果は、効果器の状態や自律神経のトーンスにより鍼刺激の効果が変化することを示唆している。

そこで今回我々は、中髎穴への鍼刺激が成人男性の精液所見にどのような影響を与えるのか生理学的に検討した。また、精子の運動性による鍼刺激の効果の違いについて詳細な解析を行った。

対象・方法

対象

32 名の健常成人男性（平均年齢 22.4 ± 1.7 歳）を対象とした。なお、本研究は明治国際医療大学研究倫理委員会の承認を得て（承認番号 28-8）、同学附属病院および附属鍼灸センターにて施行した。研究の主旨、内容および被験者の自由意志によりいつでも研究を中止できる旨などにつ

^a 明治国際医療大学泌尿器科学教室

〒 629-0392 京都府南丹市日吉町保野田ノ谷 6 番地 1

^b 京都第二赤十字病院泌尿器科

^c 明治国際医療大学はり・きゅう学講座

（受付日：平成 29 年 9 月 13 日／受理日：平成 29 年 12 月 26 日）

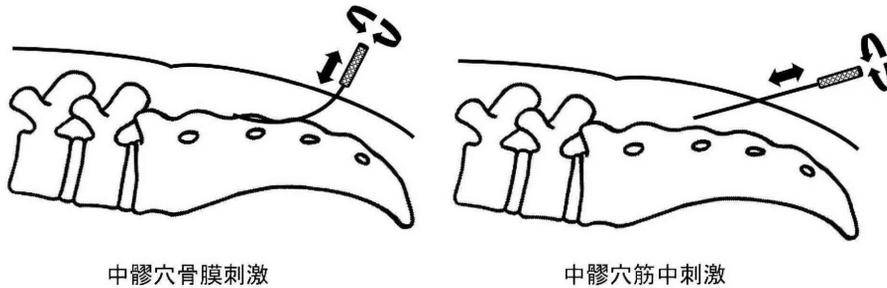


図1 鍼刺激の方法。中髎穴骨膜刺激は、第3後仙骨孔部直上から吻側方向へ鍼を仙骨に沿わせるように刺入する。中髎穴筋中刺激は、第3後仙骨孔部直上から吻側方向へ鍼が筋中（仙骨に接しない深度）に留まるよう刺入する。両群ともに、刺鍼による得気感覚（深部の重い感覚）が得られた後、雀啄（刺入した鍼を進退させる手技）旋撚（刺入した鍼を左右交互に半回旋させる手技）刺激を10分間行った。

いて十分に説明し文書にて同意を得た。

精液検査

全ての被験者が3日間の禁欲後、禁欲4日目に病院の個室にて精液を採取した。精液所見は世界保健機関の基準に則り³⁰⁾、精液を室温で30-60分置き液化したのを確認後、精液量およびsp-ace（北里コーポレーション、静岡）を用いて総精子数、精子濃度、精子運動率を測定した。

鍼刺激

被験者を中髎穴（第3後仙骨孔部、BL33）の骨膜刺激群（n=16）と筋中刺激群（n=16）の2群に分けた。骨膜刺激群は、鍼を左右の中髎穴から骨膜に沿わせるように吻側方向へ刺入し、得気感覚（深部の重い感覚）が得られた後、雀啄（刺入した鍼を約10mm進退させる手技）旋撚（刺入した鍼を左右交互に180度ずつ半回旋させる手技）刺激を左右交互に10分間行った。筋中刺激群は、鍼を左右の中髎穴から骨膜に達しない深度で吻側方向へ刺入し、得気感覚が得られた後、雀啄旋撚刺激を左右交互に10分間行った（図1）。なお、骨膜刺激群は皮膚、筋肉、骨膜を刺激し、筋中刺激群は皮膚、筋肉のみを刺激した。鍼は長さ60mm、直径0.30mmのセイリン社製ステンレス鍼を用いた。全ての被験者に、鍼刺激中と鍼刺激後の得気感覚の有無を聴取した。

プロトコール

精液検査を行う3日前に射精し翌日より禁欲期間とした。禁欲4日目に精液を採取して精液検査を行い、これをコントロールとした。その後、再び射精した後に禁欲期間を設け、禁欲3日目に鍼刺激を行い、翌日に精液を検査した（図2）。なお、精液測定者は盲検化した。

無刺激 (n=32)



鍼刺激 (骨膜刺激群n=16、筋中刺激群n=16)



禁欲3日目に中髎穴の骨膜または筋肉へ鍼刺激

図2 プロトコール。精液検査を行う3日前に射精し、翌日より禁欲期間とした。禁欲4日目に精液を採取して精液検査を行い、これをコントロール（n=32）とした。その後、再び射精した後に禁欲期間を設け、禁欲3日目に鍼刺激（骨膜刺激群 n=16、筋中刺激群 n=16）を行い、翌日に精液を検査した。

データ処理・統計解析

中髎穴骨膜刺激群と筋中刺激群の刺激前後の精液量、総精子数、精子濃度、精子運動率を算出した。また、精子運動率については中央値により低運動と高運動に分けた解析も行った。データは全て平均±標準偏差で表記した。統計解析は統計ソフト JMP11.20 (SAS Institute Japan) を用い、対応のある t 検定を行った。有意水準は5%とした。

結果

本研究における被験者は全て健常成人男性で、精液所見も世界保健機関が定める正常範囲内であった³⁰⁾。また、骨膜刺激群と筋中刺激群の群間（精液量：p=0.69、総精子数：p=0.25、精子濃度：p=0.09、精子運動率：p=0.12）およびサブグループ間（精液量：高運動 p=0.97、低運動 p=0.56、総精子数：高運動 p=0.22、低運動 p=0.76、精子濃度：高運動 p=0.12、低運動 p=0.33、精子運動率：高運

動 $p=0.14$, 低運動 $p=0.06$) の基準値には有意差を認めなかった。なお、脱落者はいなかった。

各刺激群における鍼刺激時の感覚

骨膜刺激群および筋中刺激群の 32 名全ての被験者において、中髎穴雀啄旋撚刺激中に得気感覚が生じた。しかし、骨膜刺激群では鍼刺激後も 16 名全ての被験者で得気感覚の持続が認められたが、筋中刺激群では 16 名中 1 名のみであり、得気感覚は筋中刺激群と比較して骨膜刺激群の方が持続する者が多かった。

骨膜刺激群の精液所見

骨膜刺激前後により、精液量 2.4 ± 1.2 ml から 2.6 ± 0.9 ml ($p=0.66$)、総精子数 $141.4 \pm 81.8 \times 10^6$ 個から $146.8 \pm 71.9 \times 10^6$ 個 ($p=0.84$)、精子濃度 $60.8 \pm 25.4 \times 10^6$ 個/ml から $64.3 \pm 42.8 \times 10^6$ 個/ml ($p=0.78$)、精子運動率 $69.1 \pm 10.3\%$ から $72.9 \pm 6.7\%$ ($p=0.22$) と有意差を認めなかった (図 3, 4)。しかし、精子運動率を中央値 (68%) により低運動 ($n=8$) と高運動 ($n=8$) に分けて解析したところ、低運動では $60.9 \pm 6.6\%$ から $71.5 \pm 7.8\%$ ($p=0.01$) と有意な上昇反応が認められた (図 5)。一方、高運動では、 $77.3 \pm 5.5\%$ から $74.4 \pm 5.6\%$ ($p=0.30$) と有意差を認めなかった (図 6)。

筋中刺激群の精液所見

筋中刺激前後により、精液量 2.6 ± 1.3 ml から 2.8 ± 1.2 ml ($p=0.61$)、総精子数 $110.2 \pm 69.5 \times 10^6$ 個から $115.7 \pm 75.6 \times 10^6$ 個 ($p=0.83$)、精子濃度 $44.7 \pm 26.7 \times 10^6$ 個/ml から $42.1 \pm 23.7 \times 10^6$ 個/ml ($p=0.77$)、精子運動率 $62.9 \pm 11.5\%$ から $62.8 \pm 11.5\%$ ($p=0.96$) と有意差を認めなかった (図 3, 4)。精子運動率を中央値 (64%) により低運動 ($n=8$) と高運動 ($n=8$) に分けて解析したが、低運動 $54.3 \pm 6.4\%$ から $58.6 \pm 12.4\%$ ($p=0.39$)、高運動 $71.6 \pm 8.5\%$ から $66.9 \pm 9.4\%$ ($p=0.31$) とどちらも有意差を認めなかった (図 5, 6)。

考 察

得気感覚は、神経の伝導遮断実験や脊髄損傷患者の検査から深部痛に近い性質であると考えられている⁸⁾。本研究で行った骨膜刺激群は、筋中刺激群と比較して得気感覚が持続する者が多かった。これは、骨膜刺激群の方がより刺激強度が強く生体への入力量も多かったことを示唆している。

鍼刺激は体性-自律神経反射により様々な臓器に影響を及ぼすことが、ラットを用いた基礎研究により明らかとされている¹⁷⁾²³⁾²⁷⁾。鍼刺激に伴う生体変化には賦活される求心性神経の種類が重要であり、Ohsawa ら¹⁸⁾は IV 群神経が鍼刺激の重要な求心路であると報告している。我々の検

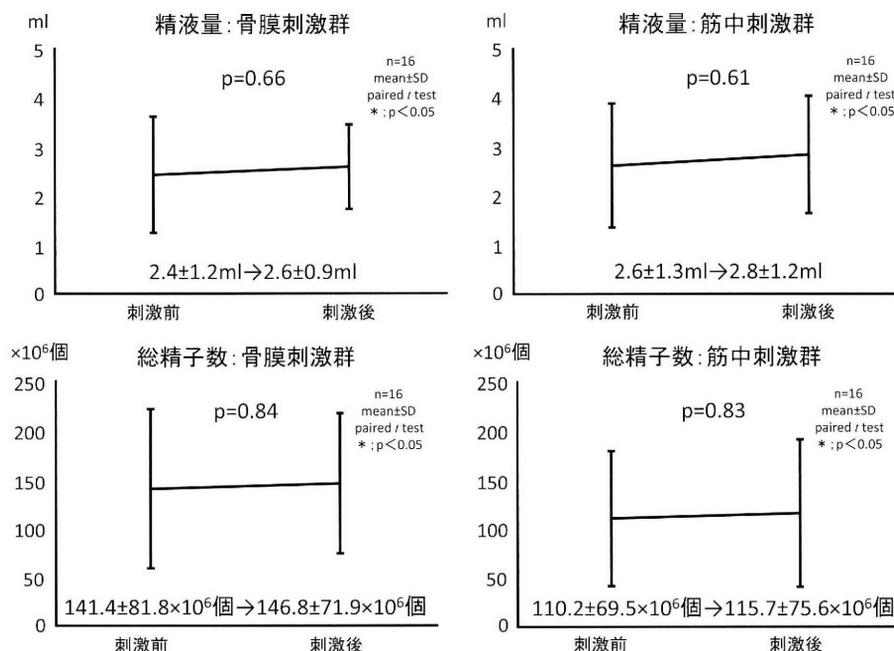


図 3 鍼刺激前後の精液量と総精子数。骨膜刺激群と筋中刺激群ともに、精液量 (対応のある t 検定; 骨膜刺激群 $p=0.66$, 筋中刺激群 $p=0.61$) と総精子数 (対応のある t 検定; 骨膜刺激群 $p=0.84$, 筋中刺激群 $p=0.83$) に有意差を認めなかった。

仙骨部への鍼刺激が精子運動率へ及ぼす影響

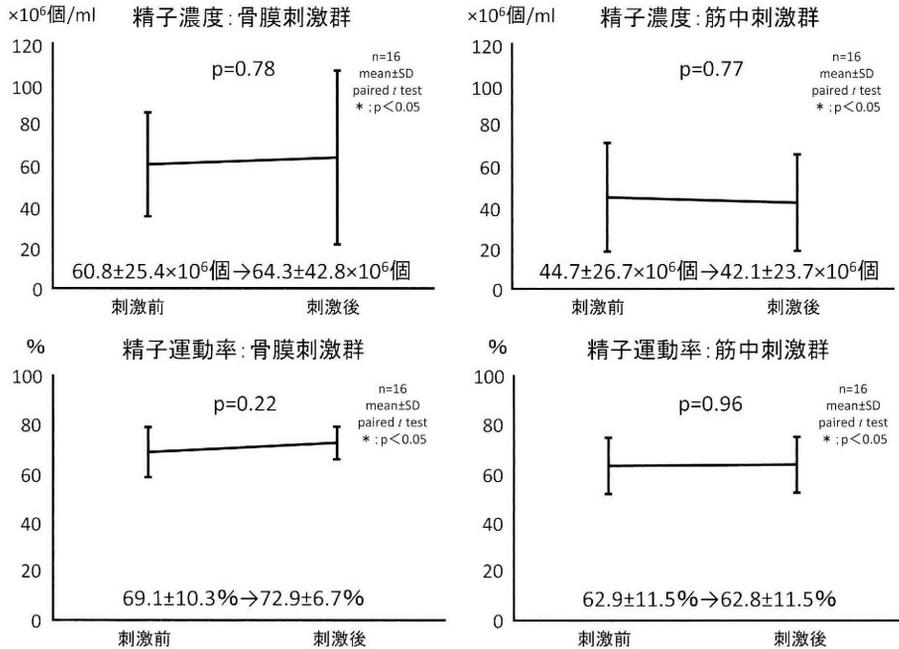


図4 鍼刺激前後の精子濃度と精子運動率。骨膜刺激群と筋中刺激群ともに、精子濃度（対応のある *t* 検定：骨膜刺激群 $p=0.78$ 、筋中刺激群 $p=0.77$ ）と精子運動率（対応のある *t* 検定：骨膜刺激群 $p=0.22$ 、筋中刺激群 $p=0.96$ ）に有意差を認めなかった。

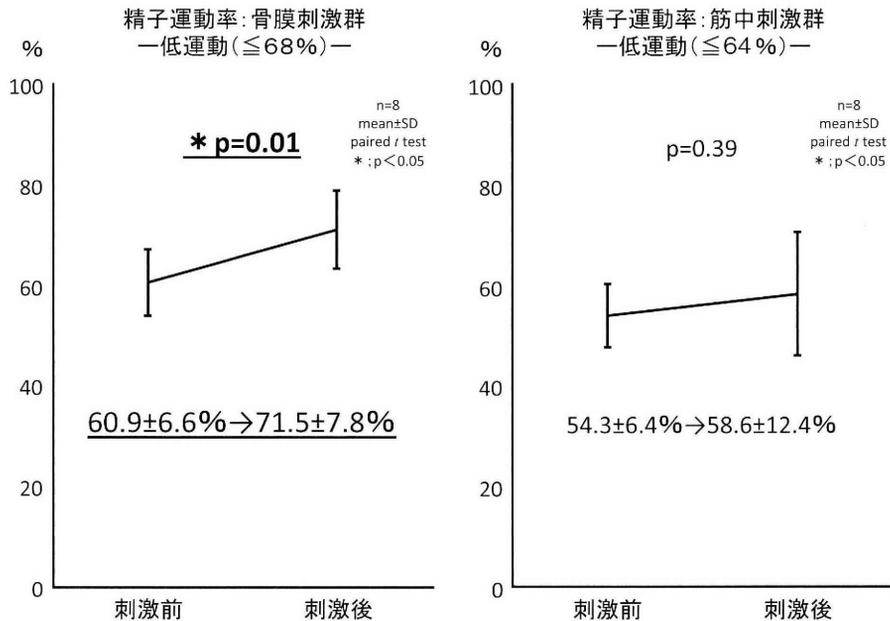


図5 低運動精子に対する鍼刺激の影響。骨膜刺激群で低運動の精子運動率が有意に上昇した（対応のある *t* 検定； $p=0.01$ ）。筋中刺激群では有意差は認められなかった（対応のある *t* 検定； $p=0.39$ ）。

討においても、IV群神経を賦活させる鍼刺激でのみ勃起機能が亢進した⁵⁾。これらのことより、IV群神経をより多く賦活させる鍼刺激を行うことが効果を高める要因と考えら

れる。生体内に刺入された鍼刺激を受容してIV群神経を賦活させるのはポリモーダル受容器であり、皮膚や筋および筋膜、深部組織に分布している¹³⁾⁻¹⁵⁾。本研究で行った骨

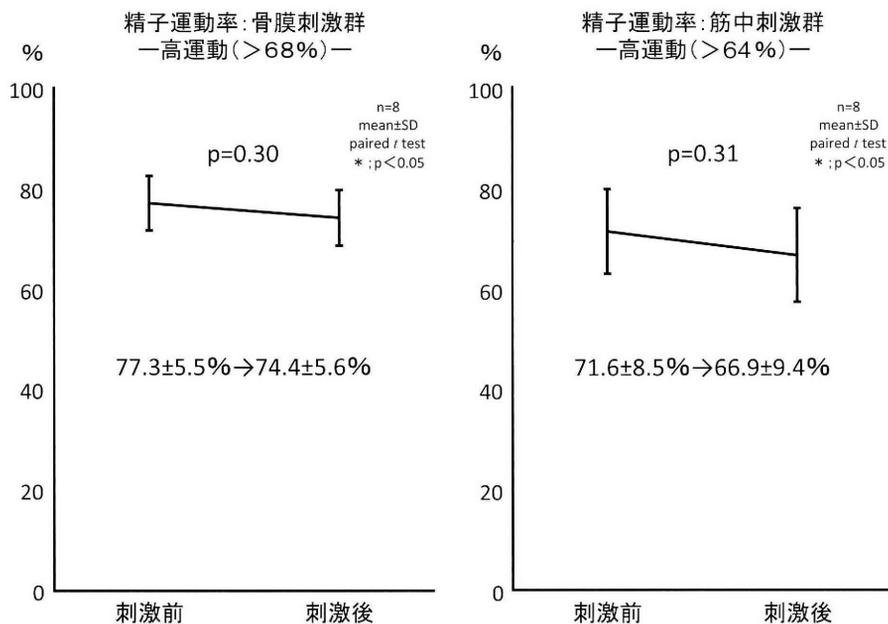


図 6 高運動精子に対する鍼刺激の影響. 骨膜刺激群と筋中刺激群ともに, 高運動の精子運動率に有意差を認めなかった (対応のある *t* 検定; 骨膜刺激群 $p=0.30$, 筋中刺激群 $p=0.31$).

膜刺激は、皮膚や筋および骨膜に存在するポリモーダル受容器を刺激するが、筋中刺激では皮膚と筋のポリモーダル受容器しか刺激されない。骨膜の深部痛覚閾値は筋組織の深部痛覚閾値よりも低いことが報告されているため⁶⁾、骨膜刺激群の方が筋中刺激群よりも多くのポリモーダル受容器、IV群神経を賦活させ中枢神経系への入力量が増加し、関連中枢部位の興奮が強くなった可能性が考えられる。また、骨膜刺激群では得気感覚の持続も認められたことから、鍼刺激による持続効果の可能性も推察される。しかし、仙骨部の骨膜が精子運動率を上昇させる重要な刺激ポイントである可能性も考えられるため、今後詳細な検討をする必要がある。

体性-自律神経反射は、脊髄分節性と上脊髄性の反応を引き起こすことで臓器機能に作用する²¹⁾²⁷⁾。一方、仙骨部(第3後仙骨孔部、中髎穴相当部位)への鍼刺激が勃起機能に及ぼす影響を検討したところ、脊髄分節性の反応は認められず上脊髄性の反応により、勃起機能を亢進させた⁵⁾。また、仙骨部への鍼刺激が上脊髄のGABA作動性神経により調節される膀胱収縮を抑制するとも報告されている²⁸⁾。このことより、仙骨部への鍼刺激は上脊髄に作用することで、泌尿・生殖器に影響を与えることが示唆される。射精には精巣や前立腺および精嚢が関与しており、その機能は主に下腹神経(交感神経)により調節されているが⁴⁾¹⁹⁾²⁹⁾、中髎穴は骨盤神経(副交感神経)領域であり、射精に関与する臓器の支配神経とは領域が異なる。中髎穴から入力された鍼刺激は、上脊髄の中枢に作用して下行性

に交感神経節を興奮させることで下腹神経を介して射精に関与する臓器に影響を与えたと考えられる。

精子は、精細管内で体細胞分裂期、減数分裂期、精子完成期の三段階の過程を経て形成される¹⁾。また、これらの過程には約74日かかるといわれている。このことより、精液採取前日に鍼刺激を行っても、翌日に採取される精子は約3ヵ月前より造られているため、総精子数や精子濃度は変化しなかったと考えられる。今後は、中髎穴への3ヵ月以上の定期的な鍼刺激が、造精機能にどのような影響を与えるのか検討する必要がある。

精細管内で形成された精子には運動能がなく、精巣上体で成熟されることで運動能を獲得する³⁾。精巣上体の通過には約10日間かかる⁷⁾ため、単回の鍼刺激が精巣上体での成熟を高めた可能性は低い。その他の精子運動に関与する因子は、副性器から分泌される精漿である。精漿は、前立腺と精嚢から主に分泌され、精液の粘稠度やpHの調整、精子のエネルギー源となっているため、中髎穴骨膜への鍼刺激は副性器に影響を与えることで精子運動率を上昇させたと示唆される。一方、鍼刺激により副性器の機能が向上した場合、精液量が増加する可能性も考えられるが、本研究では有意差を認めなかった。このことより、中髎穴骨膜への鍼刺激は、精液量を増加させるのではなく副性器の分泌成分に影響を与えることで、精漿中の成分比が変化し精子の運動率を上昇させると考えられる。

本研究の被験者は健康成人男性であり、世界保健機関の定める精液検査の基準値³⁰⁾を下回る者はいなかった。今

後は、中髖穴骨膜刺激が男性不妊症患者の精子運動率を上昇させるのか臨床検討していく必要がある。中髖穴骨膜への鍼刺激は、治療法が確立されていない精子運動率を上昇させる新たな治療法に成り得る可能性があるとして示唆された。

利益相反について：本研究において、全ての著者は開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, et al. Spermatogenesis. *Hum Reprod* 1998; 13(Suppl. 1): 1-8.
- 2) Deruyver Y, Vanderschueren D, Van der Aa F. Outcome of microdissection TESE compared with conventional TESE in non-obstructive azoospermia: a systematic review. *Andrology* 2014; 2: 20-24.
- 3) Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol Reprod* 2017; 96: 2-12.
- 4) Hayashi T, Takeya M, Nakamura K, et al. Effects of Silodosin and Tamsulosin on the Seminal Vesicle Contractile Response. *Low Urin Tract Symptoms* 2016; 8: 55-61.
- 5) 伊佐治景悠, 谷口博志, 北小路博司ら. 仙骨部への鍼通電刺激が麻酔下ラットの勃起機能に及ぼす影響—非勃起時の陰茎海綿体内圧を指標とした検討—. *全日本鍼灸学会雑誌* 2016; 66: 14-23.
- 6) 石丸圭荘, 篠原昭二, 岩 昌宏ら. 鍼通電刺激の深部痛覚閾値に及ぼす効果. *明治鍼灸医学* 1991; 8: 27-33.
- 7) Johnson L, Varner DD. Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biol Reprod* 1988; 39: 812-817.
- 8) 川喜田健司. 針灸刺激の末梢受容機序におけるポリモーダル受容器の役割. *明治鍼灸医学* 1990; 6: 23-35.
- 9) 北小路博司, 本城久司, 谷口博志ら. 加齢におけるEDの鍼灸治療. *医道の日本* 2004; 731: 33-39.
- 10) 北小路博司, 本城久司, 辻本考司ら. 前立腺肥大症に伴う排尿障害に対する鍼治療. *全日本鍼灸学会雑誌* 1993; 43: 109-114.
- 11) Kirby EW, Wiener LE, Rajanahally S, et al. Undergoing varicocele repair before assisted reproduction improves pregnancy rate and live birth rate in azoospermic and oligospermic men with a varicocele: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2016; 106: 1338-1343.
- 12) 国立社会保障・人口問題研究所. 第15回出生動向基本調査(結婚と出産に関する全国調査). 2015.
- 13) Kumazawa T, Mizumura K. Thin-fiber receptors responding to mechanical, chemical, and thermal stimulation in the skeletal muscle of the dog. *J Physiol* 1997; 273: 179-194.
- 14) Kumazawa T, Mizumura K. The polymodal receptors in the testis of dog. *Brain Res* 1977; 136: 553-558.
- 15) Kumazawa T, Perl ER. Primate cutaneous sensory units with unmyelinated (C) afferent fibers. *J Neurophysiol* 1977; 40: 1325-1338.
- 16) Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumiya K, et al. Outcome of gonadotropin therapy for male hypogonadotropic hypogonadism at university affiliated male infertility centers: a 30-year retrospective study. *J Urol* 2005; 173: 2072-2075.
- 17) Noguchi E. Mechanism of reflex regulation of the gastrooduodenal function by acupuncture. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 5: 251-256.
- 18) Ohsawa H, Yamaguchi S, Ishimaru H, et al. Neural mechanism of pupillary dilation elicited by electroacupuncture stimulation in anesthetized rats. *J Auton Nerv Syst* 1997; 64: 101-106.
- 19) Oka S, Shiraishi K, Matsuyama H. Microsurgical Anatomy of the Spermatic Cord and Spermatic Fascia: Distribution of Lymphatics, and Sensory and Autonomic Nerves *J Urol* 2016; 195: 1841-1847.
- 20) Qian Y, Xia XR, Ochin H, et al. Therapeutic effect of acupuncture on the outcomes of in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2017; 295: 543-558.
- 21) Sato A, Sato Y, Suzuki A, et al. Neural mechanisms of the reflex inhibition and excitation of gastric motility elicited by acupuncture-like stimulation in anesthetized rats. *Neurosci Res* 1993; 18: 53-62.
- 22) Sato A, Sato Y, Sugimoto H, et al. Reflex changes in the urinary bladder after mechanical and thermal stimulation of the skin at various segmental levels in cats. *Neuroscience* 1977; 2: 111-117.
- 23) Takahashi T. Mechanism of acupuncture on neuromodulation in the gut — a review. *Neuromodulation* 2011; 14: 8-12.
- 24) Taniguchi H, Imai K, Taniguchi S, et al. Acupuncture in the Treatment of Erectile Dysfunction Among a Diabetic Population of Sildenafil Citrate Non-Responder. *JAM* 2014; 10: 14-17.
- 25) 辻本考司, 荻田 卓, 北小路博司ら. 直腸癌手術後のIMPOTENCEに対する鍼治療の一症例. *全日本鍼灸学会雑誌* 1995; 45: 208-213.
- 26) 辻本考司, 荻田 卓, 高橋 登. 鍼治療が有効であった静脈性因子が混在する心因性インポテンスの一症例. *IMPOTENCE* 1998; 13: 19-24.
- 27) Uchida S, Hotta H. Acupuncture affects regional blood flow in various organs. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 5: 145-151.
- 28) Wang H, Tanaka Y, Kawauchi A, et al. Acupuncture of the sacral vertebrae suppresses bladder activity and bladder activity-related neurons in the brainstem micturition center. *Neurosci Res* 2012; 72: 43-49.
- 29) Watanabe H, Shima M, Kojima M, et al. Dynamic study of nervous control on prostatic contraction and fluid excretion in the dog. *J Urol* 1988; 140: 1567-1570.
- 30) World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. 2010.

Abstract

Effect of acupuncture stimulation at sacral periosteum on sperm motility: a preliminary study estimating the possibility of clinical application to treat asthenozoospermia patients

Keiyu Isaji^a, Jintetsu Soh^c, Misaki Okada^b, Natsuki Takaha^a, Eiji Sumiya^b and Yoshio Naya^a

^aDepartment of Urology, Meiji University of Integrative Medicine, Kyoto 629-0392, Japan

^bDepartment of Urology, Kyoto Second Red Cross Hospital, Kyoto 602-8026, Japan

^cDepartment of Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Integrative Medicine, Kyoto 629-0392, Japan

Recently, male infertility has come to be regarded as an important social problem. However, there are no effective therapeutic approaches other than surgical interventions, including testicular sperm extraction or surgery for varicocele. Therefore, we carried out a physiological investigation to examine whether stimulation of the sacral region (BL33) via acupuncture, which has been reported to be clinically effective for urogenital conditions, has an effect on semen quality. Thirty-two healthy men were divided into either a periosteal stimulation group (n=16) or a muscle stimulation group (n=16). After 3 days of sexual abstinence, the subjects of both groups received acupuncture stimulation at BL33 one day prior to the collection of semen. Seminal fluid volume, total sperm count, sperm concentration, and sperm motility rate were measured. There were no significant changes in semen quality after acupuncture stimulation in both groups. However, when sperm motility rate was analyzed by dividing the participants of each group into low and high motility subgroups based on its median value, a significant increase of sperm motility rate was observed in the low motility subgroup of the periosteal stimulation group. In contrast, no significant changes in sperm motility rate were observed in the muscle stimulation group. These results suggest that acupuncture stimulation of the periosteum at BL33 might be clinically applied as an effective treatment that can increase sperm motility in subjects with asthenozoospermia.

(The Autonomic Nervous System, 55: 46 ~ 52, 2018)