

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：30117

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01625

研究課題名(和文) 虚血再還流を併用した筋力トレーニングによる疲労耐性および他臓器保護効果の検証

研究課題名(英文) Effects of skeletal muscle ischemic preconditioning for fatigability and damage protection

研究代表者

沖田 孝一 (OKITA, KOICHI)

北翔大学・生涯スポーツ学部・教授

研究者番号：80382539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、直接および間接的preconditioningが下肢最大筋力と筋疲労に与える効果と必要回数を検証したが、回数によらず明らかなパフォーマンス向上効果は得られなかった。成果のpreliminaryデータを、国内学会(日本体力医学会2016, 2017年)にて発表した。問題点を考察し、実践的な運動(連続跳躍)での検証、機序に関わる一酸化窒素発生を助長する食餌性硝酸塩の併用も試みたが、統計学的に有意なパフォーマンス向上、筋保護効果は認められなかった(臨床運動療法学会, 日本心臓リハビリテーション学会2017年)。最終データは本年の国内学会で発表予定であり、国際論文として投稿準備中である。

研究成果の概要(英文)： First, we examined the effective repetition numbers (from zero to four) of direct and remote ischemic preconditioning in lower leg on exercise performance and fatigability. Contrary to previous reports, the results showed that any repetition of IPC did not affect the maximum strength and fatigability in knee extension. We reported those preliminary results at annual meeting of the Japanese Society of Physical Fitness and Sports Medicine (2016, 2017). Concerning those negative results, we examined effects of IPC in a practical exercise of repeated-jump and combined IPC with dietary nitrate (donor of nitric oxide). However, we could not demonstrate significant effects of IPC on exercise performance and muscle damage even with dietary nitrate (annual meeting of Japanese Association of Exercise Therapy and Prevention, JACR 2017). We are preparing to present the summaries of those results at annual scientific meetings and to submit them to international journals.

研究分野：応用健康科学

キーワード：骨格筋 虚血再灌流 トレーニング 疲労 運動能力

### 1. 研究開始当初の背景

近年、虚血再還流手技による臓器の保護効果 (*preconditioning*) がトピックとなっている。本来、虚血 *preconditioning* とは、先行する心筋虚血がある患者では、それがない患者に比べて、心筋梗塞が軽症であるという知見のもとに基礎研究によって明らかにされた「長時間の心筋虚血の直前に短時間の虚血再灌流操作を行うことによる虚血耐性の獲得」である (Murry CE. *Circulation* 1986)。その後、*preconditioning* が、対象臓器ではなく、遠隔にある臓器で行われても発現する可能性 (遠隔 *preconditioning*) が報告されたのである (Botker HE. *Lancet* 2010)。我々が行なってきた研究と一見関連のないように思えるこれらの臨床研究報告が本研究の着想に至る契機となった。

我々が系統的に研究してきた血流制限下筋力運動は (基盤研究 C H23-25 年)、まさに虚血再還流を併用した運動トレーニングであり、効率的な筋力・筋量増加のみならず (*J Appl Physiol* 2009, 2010, 2012)、長期的および短期的にも運動パフォーマンスの向上、疲労耐性および臓器保護効果などをもたらす可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) **運動能力における直接的虚血 *preconditioning* 効果**: 単回の虚血再還流による直接的 *preconditioning* が骨格筋の疲労耐性などを誘導し、パフォーマンス向上に寄与する可能性と必要実地回数を検証する。

(2) **運動能力における遠隔 (間接的) 虚血 *preconditioning* 効果**: 虚血肢と対側の下肢筋における疲労耐性の誘導およびパフォーマンス向上効果を検証する。

(3) **虚血 *preconditioning* の実践応用**: 実践的運動である連続跳躍運動における両脚虚血 *preconditioning* 効果を検証する。

(4) **虚血 *warming-up* による *preconditioning* 効果**: 虚血下で無負荷の *warming-up* を行った後の最大筋力への影響を検証する。

(5) **虚血 *preconditioning* と一酸化窒素 (*nitric oxide, NO*) 供与体 (食事性硝酸塩) との併用効果の検証**: *preconditioning* 効果を增强すると考えられる食事性硝酸塩を併用し、同様の検討を行う。

(6) **虚血を併用した運動トレーニング効果のメカニズムの解明**: 低酸素条件との併用

(7) **臓器保護効果の有無を検討**

### 3. 研究の方法

#### (1) 運動能力における直接的虚血 *preconditioning* 効果の検証

一般健常者 (男子大学生 12 名) を対象として、筋力測定前に、右側大腿にカフを装着し、直接的虚血 *preconditioning* 施行した。虚血 *preconditioning* は、虚血 5 分 (200mmHg で加圧)、再灌流 5 分を 1 セットとし、コントロール (0 回)、1~4 回施行の 5 プロトコールを 1 週間の間隔を空けてランダムに行い (図 1)、最大筋力 (膝伸展・屈曲) および筋持久力を筋機能評価運動装置 (Biodex, NY, Shirley, USA) にて評価した。

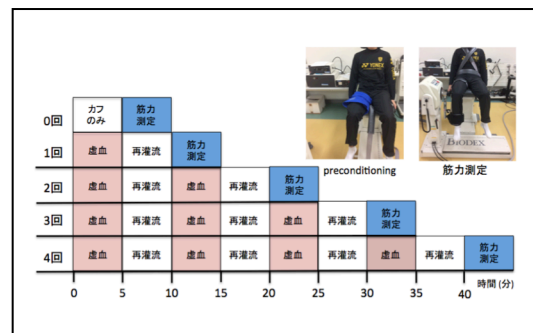


図1. 虚血 *preconditioning* の効果と必要回数を検証するプロトコール

#### (2) 運動能力における遠隔 (間接的) 虚血 *preconditioning* 効果の検証

虚血 *preconditioning* 対象肢 (右) と対側の左肢にて同様の測定を施行した。

#### (3) 虚血 *preconditioning* の実践応用

被験者は男子大学生 19 名。連続跳躍運動前に両下肢に虚血 *preconditioning* を施行する条件 (IPC 条件) と、施術しない対照条件 (CON 条件) を設定した。運動は、大腿部を床と平行になるように 2 秒間スクワットを行い、1 秒間隔で最大垂直ジャンプを 50 回繰り返す連続スクワットジャンプとした。 *preconditioning* は両大腿部にカフを巻き、200mmHg の圧で虚血 5 分、再灌流 5 分を 2 セット行った。跳躍高は、マルチジャンプテスター (DKH 社製) により測定した。持久性能力 (疲労性) は、ジャンプ 50 回における跳躍高低下曲線の傾き、総跳躍高、前半 5 回 (1~5 回目) と後半 5 回 (46~50 回目) の跳躍高平均の差を用いて検討した。

#### (4) 虚血 *warming-up* による *preconditioning* 効果の検証

実験 (1)(2) と同一被験者 12 名に、対照条件 (カフのみ装着) および虚血 *warming-up* 条件における同様の測定をランダムに施行した。虚血 *warming-up* は、虚血を継続しつつ無負荷で 1

収縮2~3秒の速さで1分間の膝伸展屈曲動作を繰り返した。対照はカフ装着のみで施行した。

### (5)虚血 preconditioning と一酸化窒素 (nitric oxide, NO) 供与体 (食餌性硝酸塩) との併用効果の検証

実験(1)(2)(4)と同一被験者 12 名に、多量の硝酸塩を含む食品としてビートルートジュース (BJ) を用い、対照条件 (BJ 摂取のみ)、BJ+虚血 preconditioning を 2 セットの条件で同様の測定を行い比較検討した (図 2)。

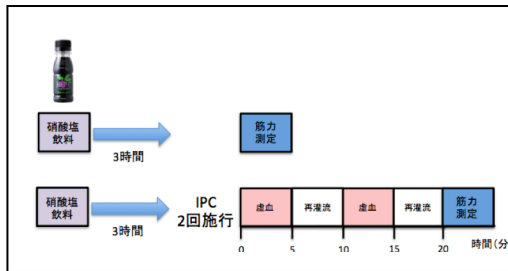


図 2. 虚血 preconditioning と食餌性硝酸塩 (ビートルートジュース) 併用のプロトコル。

### (6)虚血を併用した運動トレーニング効果のメカニズムの解明

男子学生 35 名を対象に、常酸素群 (Nor-Con)、常酸素・虚血併用群 (Nor-BFR)、低酸素群 (Hyp-Con)、低酸素虚血併用群 (Hyp-BFR) の 4 群を設定し、運動トレーニングを行った。常酸素環境の酸素濃度は約 20.8%、低酸素室における低酸素環境は約 12.8% とした。運動は仰臥位右足関節底屈運動を 30 回 / 分で 2 分間を 1 セットとし、1 分間の休息をはさみ 2 セット行った。負荷量は、最大挙上重量 (1RM) の 20% とし、1 日 2 回、週 3 日を 4 週間継続してトレーニングを行った。虚血は前述と同様の方法で施行した。採血は安静時と運動 20 分後に行い、GH (成長ホルモン)、クレアチンホスホキナーゼ (CPK)、乳酸脱水素酵素 (LDH) 等を測定した。トレーニング前後で最大筋力 (1RM) および筋量の評価 (超音波装置による腓腹筋厚と筋腹周囲径) を行った。

### (7)臓器保護効果の検討

- ① 前述 3 の連続スクワットジャンプ施行直後、実験 24 時間後および 48 時間後に主観的運動強度 (rating of perceived exhaustion, RPE)、筋痛指標 (visual analog scale, VAS) を記録した。
- ② 前述 6 の実験において筋損傷マーカーである LDH と CPK について虚血再灌流施行による影響の有無を調べた。

## 4. 研究成果

### (1)直接的虚血 preconditioning 効果について

図 1 に示したプロトコルを用いて、長期間にわたり膨大な測定を行ったが、予測した結果と異なり、いずれの施行回数においても有意な最大筋力増加 (図 3)、疲労 (図 4) および自覚的疲労度 (図 5) の改善は認められなかった。

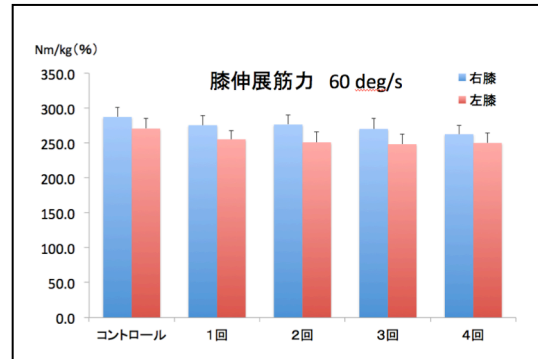


図 3. 虚血 preconditioning 施行回数と最大筋力への影響。

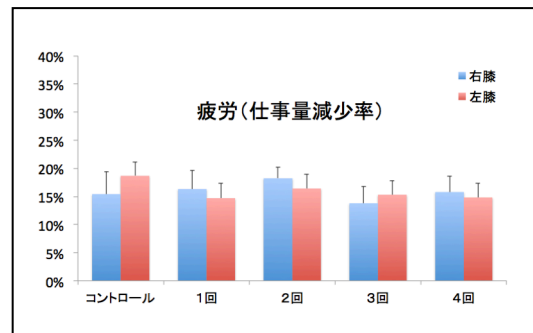


図 4. 虚血 preconditioning 施行回数と疲労への影響。

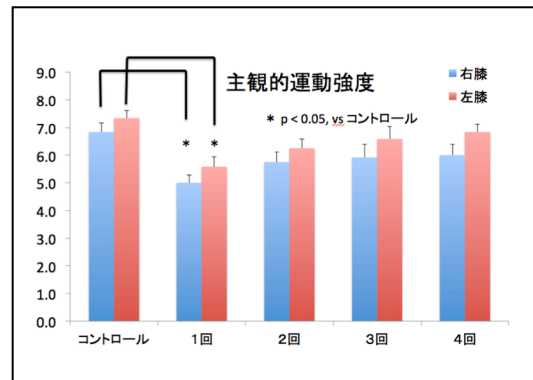


図 5. 虚血 preconditioning 施行回数と主観的運動強度。虚血 preconditioning 1 回施行のみにおいて対照条件より有意に軽減されているが、多重比較では統計学的有意差は認められなかった。

### (2)運動能力における遠隔 (間接的) 虚血 preconditioning 効果

直接的 preconditioning と同様に施行回数によらず非虚血肢の明らかな運動パフォーマンスの向上効果は認められなかった (図 3-5 左膝)。

### (3)虚血 preconditioning の実践応用

実験的な運動ではなく、実際のスポーツにお

ける運動に近い 50 回の連続跳躍運動(スクワットジャンプ)において、さらに両側の下肢筋に *preconditioning* を施行して運動パフォーマンスを評価したが、跳躍高および疲労性のいずれにおいても有意な向上効果は得られなかった(図 6)。(日本体力医学会 2018 年発表予定)

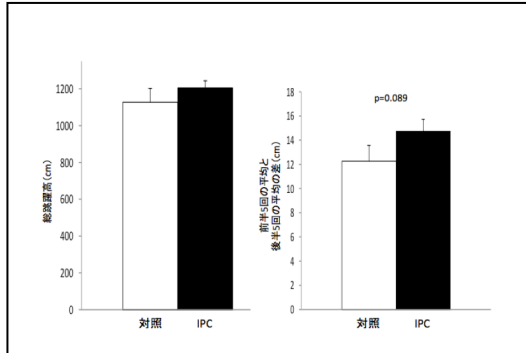


図 6. 連続跳躍運動への影響. 左は総跳躍高、右は前半 5 回と後半 5 回の跳躍高平均の差. IPC: 虚血 *preconditioning*

#### (4) 虚血 *warming-up* による *preconditioning*

先行実験の結果を踏まえ、虚血 *warming-up* により、さらに強い虚血を誘発し、*preconditioning* 効果の増強により有効性を得ることができるか追加実験を試みたが、同運動における最大筋力(図 7)、疲労性および自宅的運動強度においても有意な向上効果は認められなかった。

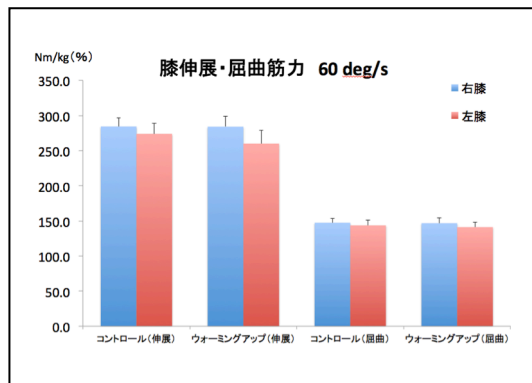


図 7. 虚血 *warming-up* の効果

#### (5) 虚血 *preconditioning* と一酸化窒素 (NO) 供与体(食事性硝酸塩)との併用効果の検証

虚血 *preconditioning* 単独での有意な効果が得られないため、メカニズムとして考えられている NO の発生を増強するために、食事性硝酸塩との併用効果を調べた。しかしながら、有意な効果は認められなかった。

#### (6) 虚血を併用した運動トレーニング効果のメカニズムの解明

トレーニング開始前の単回の運動前後における成長ホルモン(GH)上昇反応は、各条件でほぼ同等であった。一方、4 週間のトレーニング後の GH の基礎値は、虚血条件(Nor-BFF,

Hyp-BFR) でやや高値である傾向があったが、統計学的有意差はみられなかった。また、低酸素(Hyp)の効果はみられないように思われた。

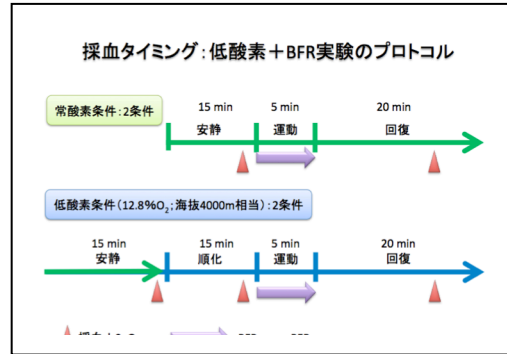


図 8. 低酸素と虚血(BFR)の組み合わせと採血

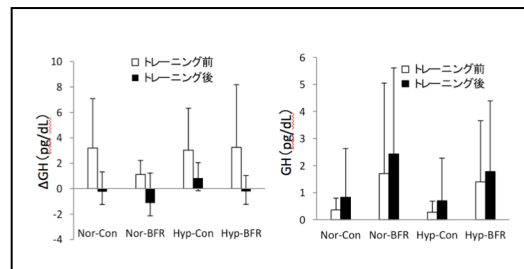


図 9 成長ホルモン(GH)への影響. 左に運動前後の GH 変化量 ( $\Delta$ GH) を示した. 単回の運動前後では、群間の差は見られなかった. 右は、4 週間のトレーニング前後の安静時 GH レベルであるが、同様に群間に有意な差は見られなかった. 常酸素群(Nor-Con), 常酸素血流制限群(Nor-BFR), 低酸素群(Hyp-Con), 低酸素血流制限群(Hyp-BFR).

さらに、筋力(図 10)および筋量の増加効果は、各条件間に差はなく有意に認められた。ゆえに、筋力トレーニングに虚血あるいは低酸素を併用するメリットは、この実験系では示されなかった。

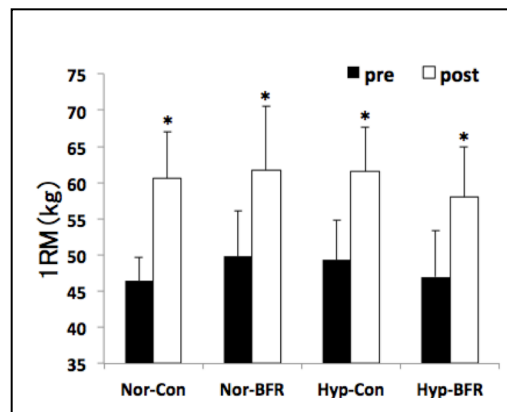


図 10. トレーニング後の筋力増強. 常酸素群(Nor-Con), 常酸素血流制限群(Nor-BFR), 低酸素群(Hyp-Con), 低酸素血流制限群(Hyp-BFR). 1RM:(最大挙上重量), \* $p < 0.05$  vs pre(トレーニング前).

#### (7) 臓器保護効果

筋力トレーニング後の筋痛(VAS)、自覚的疲労度(RPE)は、運動直後、24 時間後、48 時間後も条件間の差を認めなかった。また運動前後

の血液生化学的筋損傷マーカー (CPK、LDH) の上昇にも差を認めなかった。

## 総括

「直接のおよび間接的 *preconditioning*」については、綿密な実験であったにも関わらず当初の予想と異なり、施行回数・プロトコールによらず先行研究で示唆されているような有効性は得られない可能性が示された。この理由の一つとして、今回用いた大腿筋の筋量が先行研究で多く用いられている上肢筋より遥かに大きいことが考えられた。そこで、骨格筋の *preconditioning* 機序として考えられている虚血による NO 増加に注目し、虚血下の *warming-up* 運動と、さらには、食事性 NO 供与体の併用も追加実験として行なったが、同様に有効性は認められなかった。

我々の研究と同様に、効果があることを前提に世界中で多数の研究が行われてきた骨格筋に対する *preconditioning* であるが、実際のスポーツ現場で応用するには、効果が不確定であるばかりか、逆に競技者に不快感を与える手技であり、今後のあり方を見直す契機となる複数の知見が得られたことになる。

海外における関連研究の動向としては、医療領域における *preconditioning* に関しても、メタ解析は効果を疑問する論文も公表されてきている (Sukkar L. *BMJ* 2016)。スポーツ科学・運動生理学領域においても、*preconditioning* に関する主要な研究報告の質、方法論の問題点を問う総説 (Marocolo M. *Int J Sports Med* 2016) が刊行され、今回の我々の研究結果と同様に、*preconditioning* の有用性を根本的に見直す必要性が生じていると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 26 件中 21 件記載)

1. Horiuchi M., Okita K. (4 名中 4 番目) Jump training with blood flow restriction has no effect on jump performance. *Biology of Sport* (in press). 【査読有】
2. Tsuda M., Kinugawa S., Yokota T., Okita K. (10 名中 3,8,9 番目) Protein Acetylation in Skeletal Muscle Mitochondria Is Involved in Impaired Fatty Acid Oxidation and Exercise Intolerance in Heart Failure. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2018. (in press) 【査読有】
3. Ishihara T., Okita K. (6 名中 4 番目) Modeling relationships of achievement motivation and physical fitness with academic performance in Japanese schoolchildren: Moderation by gender. *Physiol Behav.* 2018 Apr 25. pii: S0031-9384(18)30212-9. 【査読有】
4. Ishihara T., Okita K. (6 名中 4 番目) Direct and indirect relationships of physical fitness, weight status, and learning duration to academic performance in Japanese schoolchildren. *Eur J Sport Sci.* 2018 Mar;18(2):286-294. doi: 10.1016/j.physbeh.2018.04.031. 【査読有】
5. Kadoguchi T., Yokota T., Okita K., Kinugawa S. (10 名中 3,9,10 番目) Deletion of NAD(P)H Oxidase 2 Prevents Angiotensin II-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *Biomed Res Int.* 2018 Jan 2;2018:3194917. doi: 10.1155/2018/3194917. 【査読有】
6. Horiuchi M., Okita K. Arm-cranking Exercise Training Reduces Plasminogen Activator Inhibitor 1 in People with Spinal Cord Injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2017 Nov;98(11):2174-2180. doi: 10.1016/j.apmr.2017.02.007. 【査読有】
7. Yokota T., Kinugawa S., Okita K. (12 名中 1,2,11 番目) Pioglitazone improves whole-body aerobic capacity and skeletal muscle energy metabolism in patients with metabolic syndrome. *J Diabetes Investig.* 2017 Jul;8(4):535-541. doi: 10.1111/jdi.12606. 【査読有】
8. Morita N., Okita K. (9 名中 9 番目) Inverse Relationship between Sleep Duration and Cardio-Ankle Vascular Index in Children. *J Atheroscler Thromb.* 2017 Aug 1;24(8):819-826. doi: 10.5551/jat.36517. 【査読有】
9. Morita N., Okita K. (6 名中 3 番目) Relationships among fitness, obesity, screen time and academic achievement in Japanese adolescents. *Physiol Behav.* 2016 Sep 1;163:161-6. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.04.055. 【査読有】
10. Takada S., Kinugawa S., Yokota T., Okita K. (16 名中 3,13,15 番目) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improved exercise capacity and mitochondrial biogenesis in mice with heart failure via activation of GLP-1 receptor signaling. *Cardiovasc Res.* 2016 Sep;111(4):338-47. doi: 10.1093/cvr/cvw182. 【査読有】
11. Furihata T., Kinugawa S., Yokota T., Okita K. (11 名中 2,8,10 番目) Serum myostatin levels are independently associated with skeletal muscle wasting in patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 2016 Oct 1;220:483-7. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.06.231. 【査読有】
12. Fukushima A., Kinugawa S., Yokota T., Okita K. (11 名中 2,8,10 番目) Direct renin inhibitor ameliorates insulin resistance by improving insulin signaling and oxidative stress in the skeletal muscle from post-infarct heart failure in mice. *Eur J Pharmacol.* 2016 May 15;779:147-56. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.03.022. 【査読有】
13. Takahashi M., Kinugawa S., Yokota T., Okita K. (9 名中 2,5,8 番目) Low-intensity exercise under ischemic conditions enhances metabolic stress in patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 2015 Dec 15;201:142-4. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.022. 【査読有】
14. Kinugawa S., Okita K. (5 名中 1,4 番目) Skeletal Muscle Abnormalities in Heart

- Failure. *Int Heart J.* 2015 Sep 29;56(5):475-84. doi: 10.1536/ihj.15-108. 【査読有】
15. Fukushima A, Kinugawa S., Yokota T., Okita K. (15名中2,6,14番目) Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Level Predicts Adverse Clinical Outcomes in Patients with Heart Failure. *J Card Fail.* 2015;21(4):300-6. doi: 10.1016/j.cardfail.2015.01.003. 【査読有】
  16. 沖田孝一:運動機能とリハビリにおけるグアニジノ化合物. 特集—尿毒症とグアニジノ化合物—機能性小分子研究の歴史と新たな展開—腎と透析 2017年Vol.83 尿毒症とグアニジノ化合物. 2017-09-30, p85-90. 【査読無】
  17. 沖田孝一:骨格筋:as a master regulator for health and disease—各種疾患にみる骨格筋障害・萎縮—. 臨床スポーツ医学OPINION 2017年6月号 (34巻6号)p632-633. 【査読無】
  18. 沖田孝一, 高田真吾, 横田 卓, 絹川真太郎:心不全における骨格筋萎縮予防. 日本心臓リハビリテーション学会誌第22巻第2・3号132-135 (2016) 【査読有】
  19. 沖田孝一, 高田真吾, 阿部隆宏, 米澤一也:知りたい!フレイル患者さんの運動療法. HEART nursing Vol. 29 No.4, 99-103 (2016) 【査読無】
  20. 沖田孝一, 高田真吾:運動による筋肉の酸素摂取量利用効率の改善—CKDにおける運動耐容能低下との関連—. 腎と透析 Vol. 80. No. 5. p636-640 (2016年4月). 【査読無】
  21. 沖田孝一:巨大な内分泌器官としての骨格筋、そして中枢神経系との関連:日本心臓リハビリテーション学会誌第 20 巻第 1 号 151-155 (2015) 【査読有】

[学会発表] (計 67 件中 14 件記載)

1. Tsuda M., Yokota T., Okita K., Kinugawa S. (16名中 5,15,16番目) Acetylation of Mitochondrial Proteins Alters Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation in Skeletal Muscle and Limits Exercise Capacity in Post-Infarct Heart Failure in Mice. American Heart Association Scientific Session 2017.11.14. (Nov. 11-15, Anaheim, California, USA) 【査読有】
2. Tao K, Okita K., (5名中2番目) Effects of 6-month aerobic training in smokers with multiple cardiovascular risk factors. ACSM's 63rd Annual Meeting. 31 May-04 Jun, 2016, Boston, Massachusetts. 【査読有】
3. Tanaka H., Okita K. (4名中4番目) Potential protocols in resistance exercise with BFR for muscular adaptation. World Confederation for Physical Therapy Congress 2015, May, Singapore. 【査読有】
4. 沖田孝一:虚血プレコンディショニングは骨格筋機能を改善するか? シンポジウム 3 サルコペニア/フレイルを予防する. 第 23 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 2017年7月15,16日, 岐阜県岐阜市.
5. 沖田孝一ら:骨格筋機能改善薬 シンポジウム 14 心リハをあきらめない. 第 23 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 2017年7月15,16日., 岐阜県岐阜市.

6. 沖田孝一:会長講演. 病態解明のための NIRS 利用とその問題点:the debate continue. 第 23 回医用近赤外線分光法研究会. 平成 28年10月29日(土)持田製薬株式会社本社ルークホール(東京).
7. 田尾賢吾, 沖田孝一ら:「骨格筋における直接的虚血プレコンディショニングが最大筋力へ与える影響」第 71 回日本体力医学会大会 2016年9月23-25日, 岩手
8. 沖田孝一ら:招待講演. 糖代謝異常にみられる運動耐容能低下と骨格筋障害について 第 35 回日本臨床運動療法学会学術集会. 慶應義塾大学日吉キャンパス 2016年9月3,4日
9. 沖田孝一:骨格筋機能改善薬と心臓リハビリテーション. 特別企画1「循環器学のトピックスと心臓リハビリテーション」. 第 22 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 2016年7月16,17日, 東京フォーラム, 東京.
10. 沖田孝一ら:骨格筋萎縮予防. シンポジウム 9「基礎研究を予防心臓病学の未来に活かす」. 第 22 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 2016年7月16,17日, 東京フォーラム, 東京.
11. 沖田孝一:招待講演. 心不全における骨格筋障害の考え方と対策. 第 51 回日本心臓血管理学療法学会. 2016年5月28日, 札幌
12. 沖田孝一ら:招待講演. 糖尿病における筋機能異常. 日本糖尿病理学療法学会. 2016年5月27日, 札幌.
13. 沖田孝一:招待講演. Why 心リハ in 冠疾患? 第29回日本冠疾患学会学術集会. シンポジウム 心臓リハビリテーション:すべてわかるWhy~Howから最先端. ロイトン札幌, 2015年11月20日
14. 沖田孝一:招待講演. 心疾患における運動の意義. 第34回未病システム学会シンポジウム5(運動の臓器連関と未病対策). 北海道大学学術交流会館, 2015年10月12日

[図書] (計 4 件中 2 件記載)

1. 沖田孝一:心不全の骨格筋機能障害-循環生理の要点と運動療法の盲点-(単著) 文光堂2018年7月14日発刊予定.
2. 沖田孝一, 米澤一也(分担):第II章トレーニング法の適応p(99-106)-実践EBM 心臓リハビリテーション(エビデンス, 診療ギャップとその対応) 文光堂2016年5月14日発刊.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沖田 孝一 (OKITA, Koichi)  
北翔大学・生涯スポーツ学部・教授  
研究者番号: 8 0 3 8 2 5 3 9

### (2) 研究分担者

絹川 真太郎 (KINUGAWA, Shintaro)  
北海道大学・医学(系)研究科・講師  
研究者番号: 6 0 3 9 9 8 7 1

横田 卓 (YOKOTA, Takashi)  
北海道大学・医学(系)研究科・助教  
研究者番号: 9 0 3 7 4 3 2 1