

# 乳タンパク質とコレステロール胆石形成に関する基礎的研究

国立健康・栄養研究所応用食品部 室長 辻 啓 介

## 抄録

20～25%乳カゼイン飼料群を対照に、乳ホエー分離（以下ホエー）たんぱく質と大豆分離（以下大豆）たんぱく質の飼料組成を段階的に置換して、ICR系マウスのコレステロール（Chl）胆石形成や血清、肝臓、胆嚢のコレステロールや胆汁酸、あるいはその他の脂質含量に及ぼす影響を調べた。

その結果、①20～25%カゼイン群では高率にChl胆石を生じた。②大豆たんぱく質では、20%含有飼料のみで動脈硬化指数と肝Chlの低下が認められたが、胆石形成には影響がなかった。③ホエーたんぱく質では10～25%の飼料組成で肝臓Chlの上昇抑制、ならびに胆石形成が有意に抑制され、糞胆汁酸排泄量の増加が認められた。④たんぱく質加水分解酵素による処理でもホエーたんぱく質の胆石形成阻止の活性には差異が生じなかったが、ホエーたんぱく質を構成するアミノ酸混合物では若干の同活性低下が認められた。⑤酵素分解ホエーたんぱく質の限界濾過による分子篩いによって分画すると、高分子画分により強い活性が認められた。

以上、たんぱく質の種類と量はChl胆石形成に影響を及ぼした。ホエーたんぱく質の胆石形成阻止効果は難消化性のペプチドに有効性があることが判明した。ホエーたんぱく質のコレステロール胆石形成阻止は著しいことから、カゼインとホエーを共に含む全乳摂取の意義が認められた。

## 目的

従来高コレステロール(Chl)血症の治療や予防には、種々の薬物や食品成分が有効とみなされてきたが、一部の薬物では副作用としてChl胆石が高率に生じることが知られている。とくに消化管内で胆汁酸と結合して血中Chl低下作用を発揮するコレステラミン<sup>1)</sup>などの物質ではよく知られている。慢性的な動脈硬化性疾患の予防上、薬物よりも食事による対策が重要視されるが、長期にわたる食事療養や予防食摂取の期間に胆石形成をみないためには、Chlと胆汁酸の両面から両者の代謝関係を明らかにしておく必要がある。

これまでに、既に種々の動物を用いて実験的にChl胆石を形成させる研究が行われているが、人と同様の濃縮機能を有する胆嚢を持つ点でマウスはモデル動物とし

ての利点を有している<sup>2)</sup>。Teppermanら<sup>3)</sup>はマウスにChlと胆汁酸を負荷する飼料でChl胆石を高率に形成する方法を見出した。この方法は特殊な薬物が用いられており、飼料条件が多々改良されてきたが、栄養実験に不可欠な純化飼料での報告例はなかった。辻ら<sup>4)</sup>はラットにChlとコール酸を負荷して高Chl血症を惹起するのとはほぼ同条件で、マウスに胆石を高率に誘発する飼料を開発し、詳細な栄養条件の検討を可能にした。この実験方法で、マウスの系統差<sup>5)</sup>、飼料中の油脂の重要性<sup>6)</sup>、あるいはメチオニン<sup>5)</sup>やタウリン<sup>6-9)</sup>の抗胆石作用が見出され、人胆石生成との栄養的類似性が高いことも明らかとなってきた。

一方、食事たんぱく質の種類の影響に関する研究は既に多数あり、概して動物性たんぱく質より植物性たんぱく質の血清Chl値低下作用が強いことがよく知られている<sup>10)</sup>が、Chl胆石への影響についての研究はハムスターでの研究<sup>11)</sup>以外にはほとんど報告されていない。

そこで本研究では、乳カゼインを唯一のたんぱく質源として、その一部あるいは全量を乳ホエータンぱく質と大豆分離たんぱく質で置換したときの、マウスの血清、肝臓、胆嚢のChl含量や胆石形成に及ぼす影響を調べた結果を報告する。

## 実験方法

実験動物としては日本クレア㈱から購入したICR系の5週齢の雄性マウスを1群10頭として用いた。基本飼料<sup>2)</sup>としては、カゼイン20~25%、コーン油を10%、AIN-76™組成のミネラル混合3.5%、同じくビタミン混合1%、酒石酸コリン0.2%とし、これにChl0.5%とコール酸ナトリウム(CA)0.25%を添加したものを対照のChl飼料とした。被験試料の各たんぱく質源は、表1に示したようにたんぱく質レベルが86.5~90.0%の範囲であった。これらのたんぱく質で5~25%カゼインを置換し、残りは糖質源としてショ糖で100%に調整した(表2,8)。

飼料および飲料水は自由摂取とし、4週間飼育した。飼料摂取量は週3回、体重は週3回測定した。飼育終了前2日間は糞を採取した。解剖時に胆石の有無を肉眼で観察し塩尻の指標<sup>2)</sup>で分類後、胆嚢を摘出しChlと胆汁酸分析に供した。

血清、肝臓および胆嚢の脂質と胆汁酸の定量は酵素法で定量した。

## 実験結果

実験1：大豆分離たんぱく質と乳ホエータンぱく質の摂取がマウスのChl胆石率に及ぼす影響

ICR系の雄マウス60頭を6群に分け、Ch10.5%、CA0.25%、コーン油10%、ショ糖61.55%のものに、カゼインと大豆分離たんぱく質（SPI）の組成を合計20%になるように構成した飼料あるいは10%カゼイン+10%ホエー分離たんぱく質（以下ホエー）飼料を与え、4週間飼育した。1ケージ5頭、1群10頭とした。

Table 3に示したように、飼料摂取量は、20%群SPI群が最高値を示し、対照の20%カゼイン群がもっとも低値を示した。しかし、体重増加量はホエー群が最高値を示し、もっとも飼料を多く摂取した20%SPI群が有意に低値を示した。

Table 4では肝臓の湿重量や肝脂質含量を示した。肝臓は明らかに腫大し、色調も白色を呈していた。対体重肝臓重量比は、対照群がもっとも高値を示し、ホエー群が有意に低値を示した。肝臓のChI量はカゼイン群がもっとも高値を示し、SPIが増すにつれて低値となり、20%群で有意差がみられ、またホエー群も有意に増加が抑制された。しかし、肝中性脂質とリン脂質とはまったく逆の傾向を示した。

血清脂質の結果はTable 5に掲げた。血清総ChI値は15%SPI群が222mg/dlともっとも高値を示し、対照のカゼイン群に対して有意差がみられた。一方、10%SPI群とホエー群は対照群に対して有意に低値を示した。また(VLDL+LDL)-ChI値もほぼ同様の傾向を示した。血清HDL-ChI値では、15%SPI群がもっとも高値で、対照群に対して有意に高値を示した。動脈硬化指数(A.I.)では、対照群がもっとも高値を示し、10%SPI以外は有意に低値を示し、とくにホエー群に改善がみられた。中性脂肪値は、SPI群で飼料へのSPI添加量が増すにつれて低下がもたらされたが、ホエー群では有意に高値を示した。リン脂質値は各群でとくにおおきな傾向はなかった。

胆石の形成率やステロール含量ならびにその比をTable 6に示した。白色のChI胆石を形成したマウスはカゼインとSPIの5群で高率で50~60%であった。しかしホエー群は0%であり、SPIには胆石を抑制する効果がみられなかったが、ホエーには抑制効果がみられた。全胆嚢のChI量はほぼ胆石形成率と比例し、ホエー群のみが有意に低値を示した。また、その量と胆嚢中に胆石が占める割合を示す胆石形成指数との関連を示したのがFig. 1であり、ChI量の多い個体は胆石形成指数が高くなった。しかし、胆嚢胆汁酸量はChIと比例しなかった。両者の比率は20%SPI群で高値であった。

代謝ケージに収容して採取した糞の重量、ChI量、胆汁酸量をTable 7に掲げた。一日あたりの乾燥糞重量は、0.36~0.30gの範囲であった。一日あたりの糞中総ChI排泄量と摂取量に対する排泄率は、20%SPI群がもっとも高値を示した。一日あたりの糞中胆汁酸の排泄量と率は、ホエー群と20%SPI群とが他群から有意に高値であった。

## 実験2 飼料カゼインを乳ホエータンぱく質で段階的に置換することによる影響

ICR系の雄マウス60頭を6群に分けた。0.5% Chl, 0.25% CA, 10% コーン油, 56.55% ショ糖, カゼイン25%の組成の対照飼料とし、カゼインの一部を飼料%で5%ずつホエーで置換した計6種類の飼料 (Table 8) を各々マウスに与え、4週間飼育した。1ケージ5頭、1群10頭とし、飼料摂取量、体重変化、肝臓重量、各組織のChl量、胆嚢胆汁酸量、胆石形成の有無について調べた。

Table 9に飼料摂取量と体重の増加量を記載した。1日1頭あたりの飼料摂取量は、対照の25%カゼイン群に対して、ホエー群では15%群がほぼ同等の飼料摂取量となり、ホエー量が少なくなると摂取量が多くなる傾向を示した。体重増加量はホエー飼料群で低値となる傾向を示した。

Table 10に肝臓の重量と各脂質量を記した。全群のマウス肝臓は明らかに腫大し、色調も帯白色を呈していた。対体重肝臓重量比は、対照群がもっとも高値を示した。肝臓Chl値は対照群がもっとも高値を示し、ホエー摂取量に比例して減少し、25%ホエー群では対照群より3割低値を示した。肝中性脂肪は逆にホエー群で高値を示した。肝リン脂質はコレステロール量とやや似た変化を示した。

血清脂質レベルをTable 11に示した。血清総Chl値は対照群に比べてホエー群中5%レベル群のみが有意に低値を示した。(VLDL+LDL)-Chl, HDL-Chl, 動脈硬化指数(A.I.), TGはいずれも対照群との間に明瞭な改善は認められなかった。リン脂質のレベルは、対照群に比べて10%以外のホエー群で有意に低下効果を示した。

胆石形成率と全胆嚢ステロール量をTable 12に示した。白色のChl胆石を形成したマウスは対照群(10頭中6頭)がもっとも高率で60%、次いで5%と15%の両ホエー群で20%であった。その他のホエー群では形成がゼロであり、いずれのホエー群でも胆石形成を抑制する効果がみられた。このChl量と胆石形成指数との関連をマウスの個体ごとにFig. 2に示した。一方、全胆嚢中総Chl量が対照群よりも低値を示したのは10%以上のホエー各群であった。胆嚢Chl/胆汁酸比は15%以外のホエー群で有意に低値であった。

糞の乾燥重量とステロール排泄量と率とをTable 13に示した。バランス試験期間中における飼料摂取量は5-15%ホエー群において高値で、これらの群の一日あたりの乾燥糞重量も高値を示した。一日あたりの糞へのChlと胆汁酸の総排泄量と率とは、前者ではほとんどのホエー群で若干低下したが、それ以上に胆汁酸の排泄量と率とが顕著に上昇した。

### 実験3 ホエーたんぱく質の構成アミノ酸と難消化性ペプチドによる影響

ICR系の雄マウス40頭を4群に分けた。0.5% Chl、0.25% CA、10%コーン油、59.55%ショ糖、カゼイン22%の組成の対照飼料とし、カゼインの一部を飼料%で10%当量ずつホエーたんぱく質、酵素処理ペプチドあるいはアミノ酸混合物で置換した計4種類の飼料 (Table 14) を各々マウスに与え、4週間飼育した。1ケージ5頭、1群10頭とし、飼料摂取量、体重変化、肝臓重量、各組織のChl量、胆嚢胆汁酸量、胆石形成の有無について調べた。

Table 15に飼料摂取量と体重の増加量を記載した。1日1頭あたりの飼料摂取量は、対照の22%カゼイン群に対して、ペプチド群とアミノ酸群では減少し、体重増加量も有意に低値となった。

Table 16に肝臓の重量と各脂質量を記した。全群のマウス肝臓は明らかに腫大し、色調も帯白色を呈していた。対体重肝臓重量比は対照群がもっとも高値を示したが各群との有意差はなかった。肝臓脂質値は対照群と比べて10%ホエー群がもっとも高値を示した。

血清脂質レベルをTable 17に示した。血清総Chl値は対照群に比べて全試験群とくにアミノ酸群で有意に低値を示した。(VLDL+LDL)-Chl、動脈硬化指数(A.I.)、リン脂質は総Chlレベルと同様の傾向を示した。

胆石形成率と全胆嚢ステロール量をTable 18に示した。Chl胆石を認めたマウスは対照群(10頭中6頭)がもっとも高率で60%、次いで10%ホエー群とペプチド群で20%で、有意に低率であった。アミノ酸群では30%であったが、全胆嚢Chl量が多く、またChl/BA比も高く、その効力はペプチド群よりも弱かった。このChl量と胆石形成指数との関連をマウスの個体ごとにFig. 3に示した。

糞の乾燥重量とステロール排泄量と率とをTable 19に示した。バランス試験期間中における飼料摂取量は10%ホエー群において高値であった。一日あたりの糞へのChlと胆汁酸の総排泄量と率とは、アミノ酸群がいずれも最高値を示し、ホエー群とペプチド両群では胆汁酸の排泄量と率が今までの実験同様に高値を示した。GLC法でも各ステロールを種類毎に分画定量したが、若干酵素法の値よりも高値であったが、ほぼ同様の傾向を示した。胆石形成の阻止活性の強いホエーとペプチド群ではコプロスタノールとCDCA系胆汁酸の排泄量と率とが高く、腸内微生物の関与と胆汁酸代謝の変動が推察された。

#### 実験4 ホエーたんぱく質の難消化性ペプチドの分子量による影響

ICR系の雄マウス60頭を6群に分けた。0.5% Chl、0.25% CA、10%コーン油、59.55%ショ糖、カゼイン22%の組成の対照飼料とし、カゼインの一部を飼料%で10%当量ずつホエーたんぱく質、限外濾過で分画する前の酵素処理ペプチド(H)、限外濾過した高分子(R)と低分子(P)の酵素処理ペプチドで置換した計6種類の飼料(Table 20)を各々マウスに与え、4週間飼育した。1ケージ5頭、1群10頭とし、飼料摂取量、体重変化、肝臓重量、各組織のChl量、胆嚢胆汁酸量、胆石形成の有無について調べた。

Table 21に飼料摂取量と体重の増加量を記した。1日1頭あたりの飼料摂取量は、対照の22%カゼイン群がもっとも高値で、全試験群は有意に低値を示し、体重増加量は難消化性の高分子ペプチドを含むホエー、H、R3群で有意に高値となった。

Table 22に肝臓の重量と各脂質量を記した。全群のマウス肝臓は明らかに腫大し、色調も帯白色を呈していた。対体重肝臓重量比は対照群が高値を示した。肝臓Chlとリン脂質量は対照群と比べてP群がもっとも高値を示し、TGはホエー群が高値を示した。

血清脂質レベルをTable 23に示した。血清総Chl値は対照群に比べて全試験群とくにH群で有意に高値を示した。TGとリン脂質はHとP3群でほぼ同様の低下傾向を示した。

胆石形成率と全胆嚢ステロール量をTable 24に示した。Chl胆石を認めたマウスは対照群(10頭中8頭)がもっとも高率で80%、次いでP両群が20-40%でやや高値、他は10%以下であった。全胆嚢Chl量もほぼその順であった。このChl量と胆石形成指数との関連をマウスの個体ごとにFig. 4に示した。

糞の乾燥重量とステロール排泄量と率とをTable 25に示した。バランス試験期間中における飼料摂取量はP群において高値であった。一日あたりの糞へのChlと胆汁酸の総排泄量と率とは、全試験群でコレステロールが低値を胆汁酸が高値を示し、ほぼ胆石形成率と逆相関を示した。

#### 考察

Chl系胆石保有率が近年日本人に急増してきたのは、食生活の欧米化、すなわち脂質、とくに動物性脂肪の摂取増加と炭水化物や食物繊維の摂取減少が大きな原因とされている。しかし食餌たんぱく質の量的ならびに質的な変化も随伴しており、血清Chl代謝に変化をもたらすことから、胆石への影響は無視することができない。

植物たんぱく質がハムスターのChl胆石形成において、抑制効果を持つことは既に報告されている<sup>11)</sup>が、この実験条件は肝臓Chl合成の促進による結石であった。マウスのChl吸収促進によるChl胆石は血清Chl代謝との相関が高く、従来の著者らの多数の実験結果ではChl胆石形成への影響に好都合な条件と考えられる。

実験1では、20%レベルでのたんぱく質レベルでカゼインと植物性たんぱく質であるSPIと動物性たんぱく質であるホエーたんぱく質との比較検討を行なった。SPIでは飼料への添加量の違いによって血清Chl値の低下作用はみられなかったが、20%SPI群のみで動脈硬化指数での改善が認められた。また血清総Chl量、(VLDL+LDL)-Chl量はホエーたんぱく質が対照群に対して有意に低値を示したが、HDL-Chl量では有意な高値を示さなかった。肝総Chl量は20%SPI群とホエー群とが低値を示した。これより、ホエーたんぱく質には強い血清Chl改善作用があることが既報<sup>12)</sup>の通り確かめられ、しかも胆石形成にも有意な阻止作用が初めて観察された。その理由の一端として、糞へのステロール排泄促進が期待された。しかし糞中総Chl量と排泄率は20%SPIが高値を示し、ホエーは中間値を示したが、糞中総胆汁酸値と排泄率においてはホエーがもっとも高値を示した。これらの成績からホエーのChl胆石形成抑制作用は、全体的なChl代謝改善によるものであり、そのメカニズムの一部は糞への胆汁酸排泄促進によることが明かとなった。一方、SPIはラットやウサギでの成績とは異なり、マウスでの血清Chl低下作用が明白ではなく、動物種による差異が示唆された。

実験2では、飼料中のカゼインをホエーたんぱく質で、飼料レベルとして0~25%置換してマウスを飼育した。しかし、実験1における血清総コレステロールレベルの減少は再確認できなかった。この理由として、飼料たんぱく質含量が実験1の20%に比べて25%と高値であったためかもしれないが、マウスにおけるラットの成績<sup>12)</sup>と異なった種差の可能性もある。いずれにしろ、胆石形成率は10%以上のホエーたんぱく質群で明白に阻止されており、その理由として再び肝コレステロール量の低値、さらには糞への胆汁酸排泄量の増加がこれら2回の実験を通じて共通に認められた。

実験3では、ホエーたんぱく質のコレステロール胆石形成予防効果のメカニズムの一端を知るために、ホエーたんぱく質のたんぱく質分解酵素での分解によって生じるペプチドと、ホエーたんぱく質を構成するアミノ酸の混合物を作成して、その効果がどう変化するかを調べた。その結果、酵素に抵抗性を有する難消化性ペプチド部分の有効性はたんぱく質とほぼ同等であるが、アミノ酸混合物では若干その効

果が減じることが判明した。

さらに実験4では、難消化性ペプチドを限外濾過によって、分子量の違いによってどう効力に影響が生じるかを調べた。その結果は、低分子よりも高分子画分からのペプチドの効力が強いことが判明した。この部分の糞への胆汁酸排泄量は有意に多く、難消化性ペプチドが胆汁酸排泄を促進している可能性が示唆された。

以上、マウスにおける食餌たんぱく質のChl胆石形成への影響は、必ずしも血清Chlレベルと密接な相関は示さなかった。その理由は血清Chlレベルに及ぼすChl代謝の機構には少なくとも数種類あり、さらに胆汁酸代謝を介しての複雑な相互作用があり、Chl胆石形成との間には必ずしも同様なメカニズムで関与しているとは限らないためと推定される。いずれにしろ、同じ乳たんぱく質のなかに、Chl代謝を改善するホエータンぱく質と、しないカゼインとがあり、さらにはこれらを日常牛乳として共に摂取していることは興味深い。今後、ホエータンぱく質の構成成分としてのアミノ酸の面やメカニズム解明の面から、さらに詳しく検討を続けたい。

#### 引用文献

- 1) Bergen, S. S. B. Theodore, Van Itallie, D. M. Tennent and W. H. Sebrell. Effect of anion exchange resin on serum cholesterol in man. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102, 676-679. 1959
- 2) 大郷利治：実験的胆石症（マウス），「疾患モデル動物ハンドブック I」 p281. 1979
- 3) Tepperman, J. F. T. Caldwell and H. M. Tepperman. Induction of gallstones in mice by feeding a cholesterol-cholic acid containing diet. Am. J. Physiol. 206, 628-634. 1964
- 4) 辻 啓介，山中優美子，市川富夫，中川靖枝，松浦裕子，河村雅子。マウスの Cholesterol 胆石形成に及ぼす食餌 Taurine の影響。含硫アミノ酸，6，249-255. 1983
- 5) 中川靖枝，辻 啓介，河村雅子，猪俣美知子，市川富夫。マウスの Cholesterol 胆石形成に及ぼす Methionine の抑制作用。含硫アミノ酸，9，227-232. 1986
- 6) 中川靖枝，河村雅子，辻 啓介，山中優美子，市川富夫。マウスの Cholesterol 胆石形成に及ぼす食餌 Taurine レベルの影響。含硫アミノ酸，7，265-271. 1984

7) Yamanaka, Y., K. Tsuji, T. Ichikawa, Y. Nakagawa and M. Kawamura. Effect of dietary taurine on cholesterol gallstone formation and tissue cholesterol contents in mice. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 31, 225-232. 1985

8) Yamanaka, Y., K. Tsuji and T. Ichikawa. Stimulation of chenodeoxycholic acid excretion in hypercholesterolemic mice by dietary taurine. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 32, 287-296. 1986

9) Nakamura-Yamanaka, Y., K. Tsuji and T. Ichikawa. Effect of dietary taurine on cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity in the liver of mice fed a lithogenic diet. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 33, 239-243. 1987

10) Carrol, K.K. and R.M.G. Hamilton. Effects of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol levels in relation to atherosclerosis. J. Food Sci. 40, 18-23. 1975

11) Kritchevsky, D. and D.M. Klurfeld. Influence of vegetable protein on gallstone formation in hamsters. Am. J. Clin. Nutr. 32, 2174-2176. 1979

12) 日本栄養・食糧学会監修 牛乳成分の特性と健康；長岡光徳，金丸義敬，葛谷泰雄：乳清タンパク質の血清コレステロール低下作用 pp57-84, 光生館，東京。1993

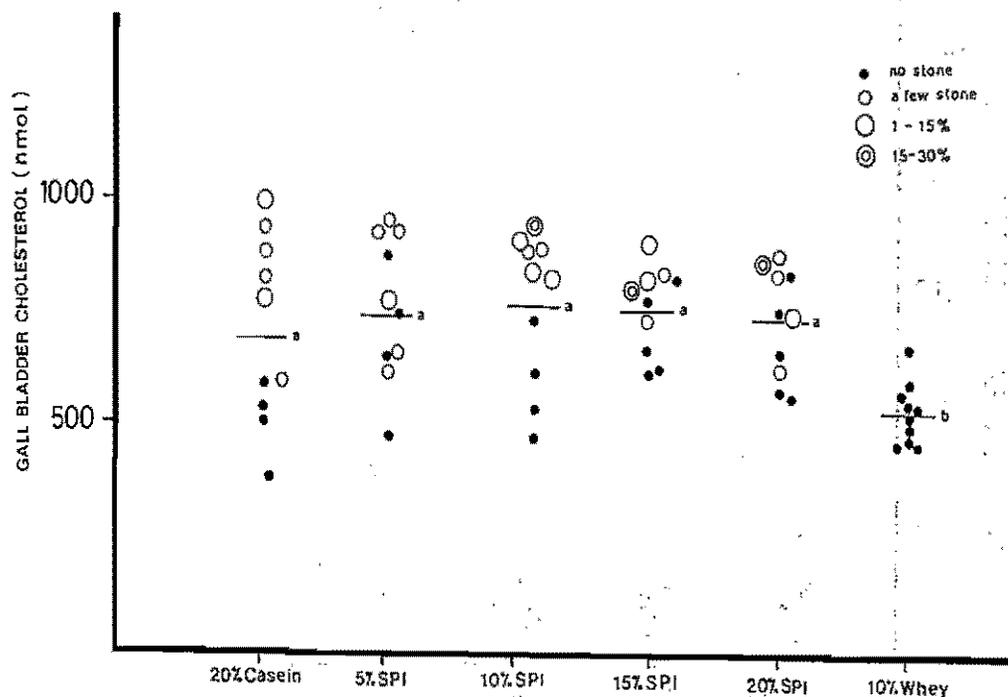


Fig. 1 Interrelationships between gall bladder cholesterol and dietary concentration of protein sources. (Exp. 1)

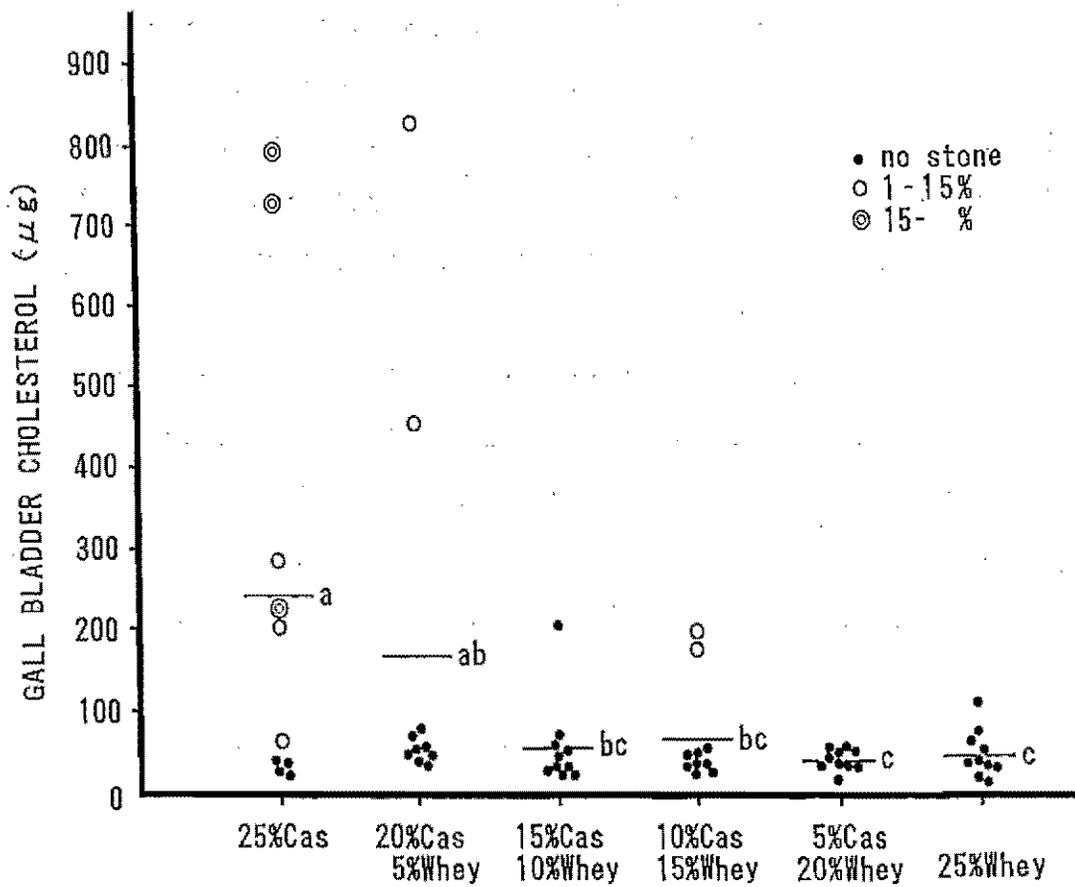


Fig. 2 Interrelationships between gall bladder cholesterol and dietary concentration of whey protein isolate (Exp. 2)

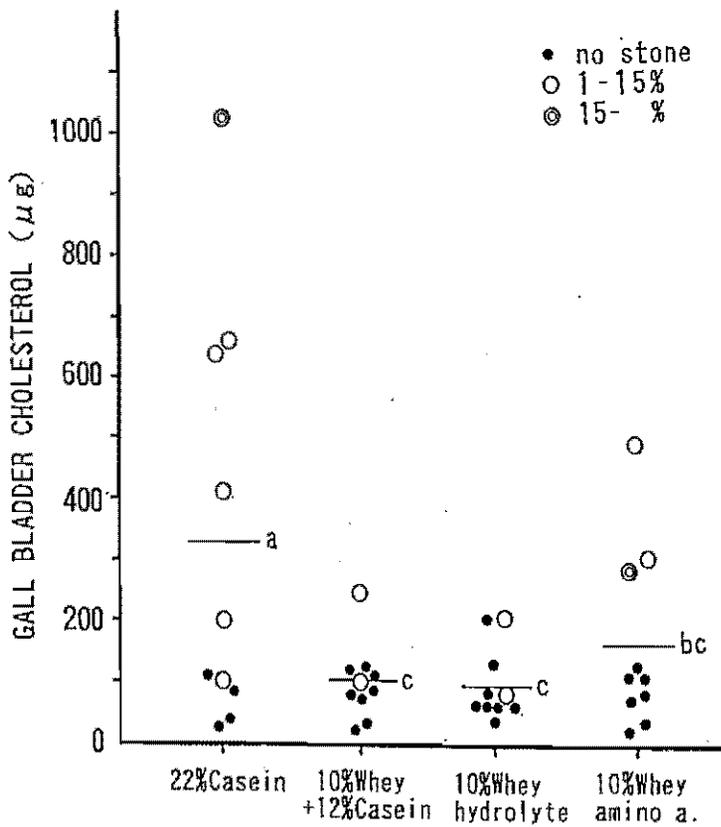


Fig. 3 Interrelationships between gall bladder cholesterol and dietary hydrolyzed WPI or WPI's amino acid mixture (Exp. 3)

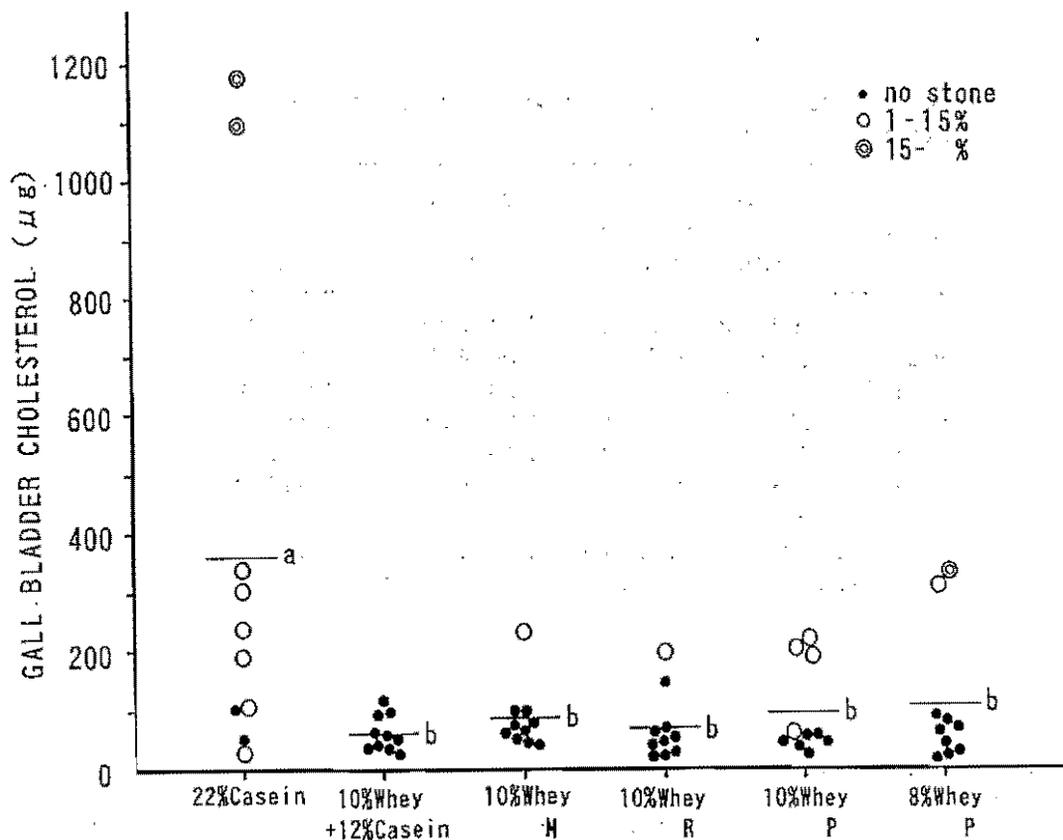


Fig. 4 Interrelationships between gall bladder cholesterol and molecular weight of hydrolyzed WPI (Exp. 4)

Table 1 Composition of dietary protein sources

Constituents (%)	Moisture	Protein
Milk casein	9.6	86.5
Milk whey protein isolate	6.0	90.0
Soy protein isolate	5.7	86.5

Table 2 Composition of diet (%)

Group	A	B	C	D	E	F
Constituent	20%Casein (%)	5%SPI <sup>1)</sup> (%)	10%SPI (%)	15%SPI (%)	20%SPI (%)	10%WPI (%)
Casein	20	15	10	5	-	10
Soy protein isolate	-	5	10	15	20	-
Whey protein isolate	-	-	-	-	-	10
Corn oil	10	10	10	10	10	10
Mineral mixture <sup>2)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	1	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Na-Cholate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Cellulose <sup>2)</sup>	3	3	3	3	3	3
Sucrose	61.55	61.55	61.55	61.55	61.55	61.55

1) ATH-76™ mixture

2) PC-200

3) Soy protein isolate

Table 3 Effects of dietary protein on body weight gain and food intake in cholesterol fed mice

Dietary group	Body wt. (g)		Body wt. gain (g/day)	Food intake (g/day)
	Initial	Final		
20% Casein	26.9±0.4 <sup>a</sup>	37.5±1.1 <sup>a,b</sup>	0.371±0.035 <sup>a</sup>	4.19±0.04 <sup>d</sup>
5% SPI	26.6±0.3 <sup>a</sup>	37.7±0.8 <sup>a</sup>	0.397±0.025 <sup>a</sup>	4.40±0.03 <sup>c</sup>
10% SPI	26.7±0.3 <sup>a</sup>	37.7±1.0 <sup>a,b</sup>	0.394±0.032 <sup>a</sup>	4.51±0.04 <sup>b</sup>
15% SPI	26.5±0.4 <sup>a</sup>	37.6±1.0 <sup>a,b</sup>	0.395±0.025 <sup>a</sup>	4.56±0.03 <sup>b</sup>
20% SPI	26.6±0.2 <sup>a</sup>	36.1±0.7 <sup>b</sup>	0.338±0.025 <sup>a</sup>	4.76±0.10 <sup>a</sup>
10% WPI	26.8±0.2 <sup>a</sup>	38.6±0.8 <sup>a</sup>	0.420±0.028 <sup>b</sup>	4.27±0.03 <sup>d</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 4 Effects of dietary protein on liver weight and liver lipids in cholesterol fed mice

Dietary group	Liver weight		Cholesterol		Triglyceride		Phospholipid	
	(g)	(% of B.W.)	(mg/g)	(mg/Liver)	(mg/g)	(mg/Liver)	(mg/g)	(mg/Liver)
20% Casein	3.16±0.18 <sup>a,b</sup>	8.50±0.60 <sup>a</sup>	38.8±1.4 <sup>a</sup>	122.3±7.9 <sup>a</sup>	16.6±1.0 <sup>c</sup>	52.1±3.7 <sup>c</sup>	34.4±0.2 <sup>d</sup>	108.7±6.3 <sup>b</sup>
5% SPI	3.16±0.24 <sup>a</sup>	8.37±0.56 <sup>a</sup>	36.5±1.0 <sup>b,c</sup>	115.4±9.3 <sup>a,b</sup>	14.2±0.6 <sup>c</sup>	44.9±4.0 <sup>c</sup>	34.5±1.0 <sup>c,d</sup>	108.0±7.0 <sup>b</sup>
10% SPI	2.99±0.13 <sup>a</sup>	7.91±0.25 <sup>a</sup>	38.7±0.7 <sup>a</sup>	115.8±5.8 <sup>a</sup>	16.1±1.3 <sup>d</sup>	48.1±4.3 <sup>c</sup>	35.4±0.8 <sup>c,d</sup>	105.0±3.4 <sup>b</sup>
15% SPI	3.08±0.11 <sup>a</sup>	8.19±0.23 <sup>a</sup>	36.5±1.0 <sup>b,c</sup>	112.1±4.0 <sup>a,b</sup>	20.1±1.1 <sup>b</sup>	62.0±4.0 <sup>b</sup>	35.9±0.6 <sup>c</sup>	110.2±4.1 <sup>b</sup>
20% SPI	3.01±0.11 <sup>a</sup>	8.38±0.41 <sup>a</sup>	35.4±0.9 <sup>c</sup>	105.8±3.5 <sup>b</sup>	20.8±1.3 <sup>b</sup>	63.0±4.9 <sup>b</sup>	45.1±1.3 <sup>b</sup>	136.4±7.9 <sup>a</sup>
10% WPI	2.65±0.08 <sup>b</sup>	6.88±0.14 <sup>b</sup>	37.2±0.8 <sup>b</sup>	98.7±3.3 <sup>c</sup>	35.1±2.3 <sup>a</sup>	93.2±7.1 <sup>a</sup>	54.6±0.6 <sup>a</sup>	145.0±4.9 <sup>a</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 5 Effects of dietary protein on serum lipid levels in cholesterol fed mice

Dietary group	Cholesterol				Triglyceride (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
	Total (mg/dl)	HDL (mg/dl)	VLDL+LDL (mg/dl)	A. I. <sup>2)</sup>		
20% Casein	196±9 <sup>a,b</sup>	114±3 <sup>d</sup>	82.2±11.8 <sup>a</sup>	0.747±0.126 <sup>a</sup>	66.1±6.3 <sup>b</sup>	244±8 <sup>b,c</sup>
5% SPI	199±11 <sup>b</sup>	134±5 <sup>b,c</sup>	64.6±9.8 <sup>a</sup>	0.489±0.082 <sup>b</sup>	63.5±4.8 <sup>b</sup>	249±10 <sup>a,b</sup>
10% SPI	164±9 <sup>c</sup>	127±11 <sup>b,c,d</sup>	37.8±11.2 <sup>b</sup>	0.720±0.310 <sup>a,b</sup>	54.0±4.1 <sup>c</sup>	264±21 <sup>a,b</sup>
15% SPI	222±12 <sup>a</sup>	154±5 <sup>a</sup>	68.9±11.2 <sup>a</sup>	0.455±0.073 <sup>b</sup>	46.3±5.0 <sup>d</sup>	265±10 <sup>a</sup>
20% SPI	212±11 <sup>a,b</sup>	143±5 <sup>b</sup>	68.5±8.1 <sup>a</sup>	0.480±0.060 <sup>b</sup>	43.8±2.0 <sup>d</sup>	259±10 <sup>a,b</sup>
10% WPI	154±6 <sup>c</sup>	125±5 <sup>c</sup>	28.2±4.6 <sup>b</sup>	0.232±0.041 <sup>c</sup>	95.5±12.2 <sup>a</sup>	233±3 <sup>c</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

2) Atherogenic index:Cholesterol ratio of (VLDL+LDL)/HDL

Table 6 Effects of dietary protein on gallstones formation in cholesterol fed mice

Dietary group	Gallstone incidence (%)	Cholesterol (Chl) (nmol)	Bile acid (BA) (nmol)	(Chl/BA)
20% Casein	6/10(60)	695±67 <sup>a,1)</sup>	2520±530 <sup>a</sup>	0.38±0.08 <sup>c</sup>
5% SPI	6/10(60)	745±47 <sup>a</sup>	2710±440 <sup>a</sup>	0.41±0.10 <sup>b,c</sup>
10% SPI	6/10(60)	764±53 <sup>a</sup>	1600±360 <sup>b</sup>	0.79±0.17 <sup>a</sup>
15% SPI	6/10(60)	757±31 <sup>a</sup>	2500±340 <sup>a</sup>	0.37±0.06 <sup>c</sup>
20% SPI	5/10(50)	734±39 <sup>a</sup>	1560±350 <sup>b</sup>	1.15±0.43 <sup>a</sup>
10% WPI	0/10(0)	532±22 <sup>b</sup>	1140±140 <sup>b</sup>	0.56±0.10 <sup>b</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 7 Effects of dietary protein on food intake, fecal weight and sterol concentrations in cholesterol fed mice

Dietary group	Food intake				Dry Feces			
	(g/day)	(mg/day)		(g/day)	(mg/day)		(μmol/day)	
		Chl	Na-Cholate		Chl	BA	(% of intake)	(% of intake)
20% Casein	3.88	19.4±0.8 <sup>c,1)</sup>	22.5±0.9 <sup>c</sup>	0.30±0.01 <sup>b</sup>	13.6±0.6 <sup>b</sup>	70.5±2.5 <sup>a,b</sup>	6.07±0.32 <sup>c</sup>	27.2±1.3 <sup>b,c</sup>
5% SPI	4.01	20.1±0.4 <sup>b,c</sup>	23.3±0.5 <sup>b,c</sup>	0.32±0.01 <sup>b</sup>	13.2±0.4 <sup>b</sup>	65.9±1.4 <sup>c</sup>	5.82±0.23 <sup>c</sup>	25.0±0.8 <sup>c</sup>
10% SPI	4.10	22.0±0.4 <sup>a</sup>	25.5±0.5 <sup>a</sup>	0.35±0.02 <sup>a</sup>	14.3±0.9 <sup>a,b</sup>	65.1±3.7 <sup>b,c</sup>	6.99±0.32 <sup>b</sup>	24.9±2.7 <sup>c</sup>
15% SPI	4.11	20.5±0.5 <sup>b,c</sup>	23.9±0.6 <sup>b,c</sup>	0.32±0.01 <sup>b</sup>	11.6±0.5 <sup>c</sup>	56.7±2.0 <sup>d</sup>	7.07±0.32 <sup>b</sup>	29.5±0.8 <sup>b</sup>
20% SPI	3.88	20.9±0.6 <sup>b</sup>	24.3±0.6 <sup>b</sup>	0.36±0.02 <sup>a</sup>	15.6±1.2 <sup>a</sup>	74.5±5.0 <sup>a</sup>	10.68±0.80 <sup>a</sup>	43.6±2.5 <sup>a</sup>
10% WPI	4.11	20.3±0.1 <sup>b,c</sup>	23.6±0.1 <sup>b,c</sup>	0.30±0.01 <sup>b</sup>	13.2±0.4 <sup>b</sup>	64.8±2.0 <sup>c</sup>	10.77±0.24 <sup>a</sup>	45.6±1.0 <sup>a</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 8 Composition of diet (%)

Group	A	B	C	D	E	F
Constituent	25%Casein (%)	5%WPI (%)	10%WPI (%)	15%WPI (%)	20%WPI (%)	25%WPI (%)
Casein	25	20	15	10	5	-
WPI	-	5	10	15	20	25
Corn oil	10	10	10	10	10	10
Mineral mixture <sup>1)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>1)</sup>	1	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Na-Cholate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Cellulose <sup>2)</sup>	3	3	3	3	3	3
Sucrose	56.55	56.55	56.55	56.55	56.55	56.55

1) ATN-76<sup>TM</sup> mixture

2) PC-200

Table 9 Effects of dietary protein on body weight gain and food intake in cholesterol fed mice

Dietary group	Body wt. (g)		Body wt. gain (g/day)	Food intake (g/day)
	Initial	Final		
25% Casein	25.3±0.3 <sup>a</sup>	39.0±0.8 <sup>a</sup>	0.506±0.024 <sup>a</sup>	4.19±0.01 <sup>c</sup>
5% WPI	25.3±0.4 <sup>a</sup>	36.9±0.6 <sup>b</sup>	0.433±0.017 <sup>c</sup>	4.88±0.05 <sup>a</sup>
10% WPI	25.1±0.3 <sup>a</sup>	37.3±0.8 <sup>b</sup>	0.452±0.028 <sup>b,c</sup>	4.41±0.07 <sup>b</sup>
15% WPI	25.3±0.3 <sup>a</sup>	39.0±1.4 <sup>a,b</sup>	0.507±0.044 <sup>a,b</sup>	4.19±0.07 <sup>c</sup>
20% WPI	25.3±0.3 <sup>a</sup>	37.3±1.0 <sup>a,b</sup>	0.442±0.032 <sup>b,c</sup>	4.00±0.05 <sup>d</sup>
25% WPI	25.0±0.2 <sup>a</sup>	37.4±1.0 <sup>a,b</sup>	0.459±0.033 <sup>a,b,c</sup>	4.01±0.02 <sup>d</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 10 Effects of dietary protein on liver weight and liver lipids in cholesterol fed mice

Dietary group	Liver weight		Cholesterol		Triglyceride		Phospholipid	
	(g)	(% of B.W.)	(mg/g)	(mg/Liver)	(mg/g)	(mg/Liver)	(mg/g)	(mg/Liver)
25% Casein	3.32±0.11 <sup>a,1)</sup>	8.54±0.23 <sup>a</sup>	80.7±3.1 <sup>a,b</sup>	267±12 <sup>a,b</sup>	26.8±4.3 <sup>c</sup>	87.9±13.4 <sup>b</sup>	37.2±0.9 <sup>a</sup>	123.6±5.1 <sup>a</sup>
5% WPI	3.14±0.12 <sup>a</sup>	8.50±0.30 <sup>a,b</sup>	88.0±4.3 <sup>a</sup>	275±13 <sup>a</sup>	30.5±3.8 <sup>c</sup>	95.1±12.1 <sup>b</sup>	34.8±0.8 <sup>b</sup>	109.4±5.3 <sup>b,c</sup>
10% WPI	3.16±0.17 <sup>a</sup>	8.44±0.37 <sup>a,b</sup>	82.5±3.9 <sup>a,b</sup>	256±11 <sup>a,b</sup>	48.5±3.7 <sup>a,b</sup>	153.0±13.8 <sup>a</sup>	37.3±0.6 <sup>a</sup>	117.4±5.5 <sup>a,b</sup>
15% WPI	3.13±0.14 <sup>a</sup>	8.04±0.21 <sup>b</sup>	76.8±5.2 <sup>b</sup>	239±16 <sup>b</sup>	54.8±3.1 <sup>a</sup>	172.6±14.1 <sup>a</sup>	38.3±0.6 <sup>a</sup>	119.7±4.7 <sup>a</sup>
20% WPI	3.08±0.17 <sup>a</sup>	8.23±0.32 <sup>a,b</sup>	63.3±3.8 <sup>c</sup>	199±18 <sup>c</sup>	50.4±2.6 <sup>a,b</sup>	154.6±11.0 <sup>a</sup>	33.0±2.5 <sup>b,c</sup>	100.6±8.5 <sup>c</sup>
25% WPI	3.18±0.16 <sup>a</sup>	8.51±0.38 <sup>a,b</sup>	61.6±3.8 <sup>c</sup>	194±10 <sup>c</sup>	46.8±3.6 <sup>b</sup>	149.0±13.4 <sup>a</sup>	33.3±0.6 <sup>c</sup>	106.3±5.8 <sup>b,c</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 11 Effects of dietary protein on serum lipid levels in cholesterol fed mice

Dietary group	Cholesterol				Triglyceride (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
	Total (mg/dl)	HDL (mg/dl)	VLDL+LDL (mg/dl)	A. I. <sup>2)</sup>		
25% Casein	181±9 <sup>a,1)</sup>	119±6 <sup>a</sup>	61.7±7.4 <sup>a,b</sup>	0.539±0.084 <sup>a,b</sup>	40.5±4.6 <sup>a</sup>	216±7 <sup>a</sup>
5% WPI	158±8 <sup>c</sup>	105±6 <sup>b</sup>	53.3±6.2 <sup>b</sup>	0.520±0.071 <sup>a,b</sup>	34.0±5.1 <sup>a</sup>	183±8 <sup>c</sup>
10% WPI	186±9 <sup>a</sup>	119±7 <sup>a</sup>	67.7±6.8 <sup>a</sup>	0.596±0.087 <sup>a,b</sup>	40.0±5.8 <sup>a</sup>	207±9 <sup>a,b</sup>
15% WPI	180±8 <sup>a,b</sup>	122±6 <sup>a</sup>	58.1±4.1 <sup>a,b</sup>	0.487±0.042 <sup>b</sup>	42.9±4.9 <sup>a</sup>	198±8 <sup>b,c</sup>
20% WPI	176±8 <sup>a,b</sup>	118±6 <sup>a</sup>	58.4±4.5 <sup>a,b</sup>	0.508±0.051 <sup>a,b</sup>	36.3±2.8 <sup>a</sup>	194±7 <sup>b,c</sup>
25% WPI	169±6 <sup>b,c</sup>	107±4 <sup>b</sup>	62.4±4.4 <sup>a,b</sup>	0.594±0.051 <sup>a</sup>	39.6±6.0 <sup>a</sup>	188±7 <sup>c</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

2) Atherogenic index:Cholesterol ratio of (VLDL+LDL)/HDL

Table 12 Effects of dietary protein on gallstones formation in cholesterol fed mice

Dietary group	Gallstone incidence (%)	Cholesterol (Chl) (nmol)	Bile acid (BA) (nmol)	(Chl/BA)
25% Casein	6/10(60)	631±236 <sup>a,1)</sup>	1083±225 <sup>b</sup>	0.59±0.22 <sup>a</sup>
5% WPI	2/10(20)	438±214 <sup>a,b</sup>	1782±445 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>b,c</sup>
10% WPI	0/10(0)	145±45 <sup>b,c</sup>	1209±469 <sup>a,b</sup>	0.15±0.02 <sup>c</sup>
15% WPI	2/10(20)	173±51 <sup>b,c</sup>	835±279 <sup>b</sup>	0.32±0.10 <sup>a,b</sup>
20% WPI	0/10(0)	102±9 <sup>c</sup>	800±58 <sup>b</sup>	0.13±0.01 <sup>c</sup>
25% WPI	0/10(0)	124±24 <sup>c</sup>	1164±280 <sup>a,b</sup>	0.12±0.01 <sup>c</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 13 Effects of dietary protein on food intake, fecal weight and sterol concentrations in cholesterol fed mice

Dietary group	Food intake				Dry Feces			
	(g/day)	Chl		(g/day)	Chl		BA	
		(mg/day)	Na-Cholate (μmol/day)		(mg/day)	(% of intake)	(μmol/day)	(% of intake)
25% Casein	3.94	19.7±0.4 <sup>1) d</sup>	22.9±0.5 <sup>d</sup>	0.29±0.01 <sup>c</sup>	13.0±0.8 <sup>a</sup>	85.7±3.0 <sup>a</sup>	8.53±0.57 <sup>d</sup>	37.2±2.0 <sup>a</sup>
5% WPI	4.13	20.6±0.3 <sup>c</sup>	24.0±0.3 <sup>c</sup>	0.32±0.01 <sup>a,b</sup>	11.8±0.3 <sup>b</sup>	57.5±1.8 <sup>d,e,f</sup>	9.54±0.40 <sup>c</sup>	39.9±1.7 <sup>b</sup>
10% WPI	4.42	22.1±0.5 <sup>a</sup>	25.7±0.5 <sup>a</sup>	0.33±0.01 <sup>a</sup>	12.5±0.2 <sup>a</sup>	56.4±0.9 <sup>c,g</sup>	12.88±0.31 <sup>a</sup>	50.3±1.4 <sup>a</sup>
15% WPI	4.26	21.3±0.4 <sup>a,b</sup>	24.7±0.4 <sup>a,b</sup>	0.31±0.01 <sup>b</sup>	12.8±0.4 <sup>a</sup>	60.1±2.3 <sup>b,d</sup>	12.79±0.40 <sup>a,b</sup>	51.7±1.1 <sup>a</sup>
20% WPI	4.11	20.5±0.5 <sup>b,c,d</sup>	23.8±0.6 <sup>b,c,d</sup>	0.29±0.01 <sup>c</sup>	12.6±0.4 <sup>a</sup>	61.7±2.3 <sup>a,b,c</sup>	12.52±0.16 <sup>a,b</sup>	52.9±1.8 <sup>a</sup>
25% WPI	4.06	20.3±0.5 <sup>c,d</sup>	23.5±0.5 <sup>c,d</sup>	0.28±0.00 <sup>c</sup>	11.3±0.5 <sup>b</sup>	55.8±2.0 <sup>c</sup>	11.78±0.72 <sup>b</sup>	50.2±3.1 <sup>a</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 14 Composition of diet (%)

Constituent	22%Casein	12%Casein	12%Casein	12%Casein
	(%)	10%WPI (%)	10%WPI-H (%)	10%WPI-AA (%)
Casein	22	12	12	12
WPI	-	10	-	-
WPI-H <sup>2)</sup>	-	-	10	-
WPI-AA	-	-	-	9
Corn oil	10	10	10	10
Mineral mixture <sup>1)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>1)</sup>	1	1	1	1
Choline bitartarate	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5
Na-Cholate	0.25	0.25	0.25	0.25
Cellulose <sup>2)</sup>	3	3	3	3
Sucrose	59.55	59.55	59.55	59.55

1) ATM-76<sup>TM</sup> mixture

2) PC-200

3) Enzyme hydrolyzed whey protein isolate without free amino acid (protein: 85%, moisture: 4%, ash: 6%)

Table 15 Effects of dietary protein on body weight gain and food intake in cholesterol fed mice

Dietary group	Body wt. (g)		Body wt. gain	Food intake
	Initial	Final	(g/day)	(g/day)
22% Casein	28.1±0.3 <sup>a</sup>	40.1±0.9 <sup>a</sup>	0.457±0.028 <sup>a</sup>	4.74±0.01 <sup>a</sup>
10% WPI	28.1±0.5 <sup>a</sup>	38.8±0.9 <sup>b</sup>	0.382±0.021 <sup>b</sup>	4.94±0.04 <sup>b</sup>
10% WPI-H	28.1±0.3 <sup>a</sup>	37.9±0.8 <sup>b,c</sup>	0.351±0.026 <sup>b,c</sup>	3.94±0.03 <sup>c</sup>
10% WPI-AA	28.0±0.4 <sup>a</sup>	37.1±0.6 <sup>c</sup>	0.324±0.017 <sup>c</sup>	4.71±0.03 <sup>a</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 16 Effects of dietary protein on liver weight and liver lipids in cholesterol fed mice

Dietary group	Liver weight		Cholesterol		Triglyceride		Phospholipid	
	(g)	(% of H.W.)	(mg/g)	(mg/Liver)	(mg/g)	(mg/Liver)	(mg/g)	(mg/Liver)
22% Casein	3.64±0.26 <sup>a,1)</sup>	8.91±0.65 <sup>a</sup>	58.7±4.7 <sup>b</sup>	207±13 <sup>b</sup>	28.8±4.4 <sup>b</sup>	103.5±15.2 <sup>b</sup>	42.9±2.1 <sup>b</sup>	152.1±6.7 <sup>a</sup>
10% WPI	3.35±0.12 <sup>a,b</sup>	8.61±0.17 <sup>a</sup>	71.6±3.4 <sup>a</sup>	238±11 <sup>a</sup>	41.5±3.1 <sup>a</sup>	138.5±11.8 <sup>a</sup>	45.1±1.2 <sup>a,b</sup>	150.5±5.9 <sup>a</sup>
10% WPI-H	3.17±0.20 <sup>b</sup>	8.37±0.48 <sup>a</sup>	64.0±3.1 <sup>b</sup>	201±13 <sup>b</sup>	30.3±3.2 <sup>b</sup>	94.0±9.7 <sup>b</sup>	46.8±0.7 <sup>a</sup>	147.5±7.8 <sup>a</sup>
10% WPI-AA	3.11±0.16 <sup>b</sup>	8.39±0.37 <sup>a</sup>	68.9±6.6 <sup>a,b</sup>	209±19 <sup>a,b</sup>	33.5±2.9 <sup>b</sup>	103.0±9.0 <sup>b</sup>	46.7±2.1 <sup>a,b</sup>	143.8±6.5 <sup>a</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 17 Effects of dietary protein on serum lipid levels in cholesterol fed mice

Dietary group	Cholesterol				Triglyceride (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
	Total (mg/dl)	HDL (mg/dl)	VLDL+LDL (mg/dl)	A.I. <sup>2)</sup>		
22% Casein	256±18 <sup>a,1)</sup>	109.6±7.8 <sup>a</sup>	146.8±17.7 <sup>a</sup>	1.430±0.239 <sup>a</sup>	36.7±6.9 <sup>a</sup>	238±11 <sup>a</sup>
10% WPI	225±8 <sup>b</sup>	115.8±4.9 <sup>a</sup>	109.3±5.3 <sup>b</sup>	0.955±0.050 <sup>c</sup>	34.7±4.0 <sup>a</sup>	237±7 <sup>a</sup>
10% WPI-H	216±10 <sup>b,c</sup>	107.0±4.3 <sup>a</sup>	109.4±8.1 <sup>b</sup>	1.029±0.070 <sup>b,c</sup>	32.9±5.5 <sup>a</sup>	211±7 <sup>b</sup>
10% WPI-AA	120±8 <sup>c</sup>	95.0±6.4 <sup>b</sup>	104.7±5.8 <sup>b</sup>	1.152±0.105 <sup>a,b</sup>	28.9±3.6 <sup>a</sup>	193±8 <sup>a</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

2) Atherogenic index:Cholesterol ratio of (VLDL+LDL)/HDL

Table 18 Effects of dietary protein on gallstones formation in cholesterol fed mice

Dietary group	Gallstone incidence (%)	Cholesterol (Chl) (nmol)	Bile acid (BA) (nmol)	Chl/BA
22% Casein	6/10(60)	858±279 <sup>a,1)</sup>	1440±233 <sup>a</sup>	0.59±0.17 <sup>a</sup>
10% WPI	2/10(20)	264±50 <sup>b</sup>	1629±239 <sup>a</sup>	0.17±0.02 <sup>b</sup>
10% WPI-H	2/10(20)	252±53 <sup>b</sup>	1839±409 <sup>a</sup>	0.15±0.02 <sup>b</sup>
10% WPI-AA	3/10(30)	428±122 <sup>b</sup>	1530±556 <sup>a</sup>	0.49±0.23 <sup>a</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 19 Effects of dietary protein on food intake, fecal weight and sterol concentrations in cholesterol fed mice

Dietary group	Food intake				Dry Feces			
	(g/day)	Chl (mg/day)	Na-Cholate (mg/day)	(g/day)	Chl		BA	
					(mg/day)	(% of intake)	(μmol/day)	(% of intake)
22% Casein	4.38	21.9±0.7 <sup>b,1)</sup>	25.4±0.8 <sup>b</sup>	0.31±0.01 <sup>a,b</sup>	14.4±0.6 <sup>a</sup>	65.9±1.8 <sup>b</sup>	7.80±0.18 <sup>d</sup>	30.9±0.9 <sup>d</sup>
10% WPI	4.78	23.9±0.9 <sup>a</sup>	27.8±1.1 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	11.6±0.5 <sup>b</sup>	49.5±2.9 <sup>c</sup>	9.96±0.47 <sup>b</sup>	36.3±2.0 <sup>c</sup>
10% WPI-H	3.49	17.4±0.3 <sup>c</sup>	20.2±0.4 <sup>c</sup>	0.29±0.01 <sup>b</sup>	11.5±0.6 <sup>b</sup>	66.4±4.4 <sup>b</sup>	8.81±0.22 <sup>c</sup>	43.6±1.3 <sup>b</sup>
10% WPI-AA	3.25	16.3±0.3 <sup>d</sup>	18.9±0.3 <sup>d</sup>	0.33±0.01 <sup>a</sup>	14.4±0.4 <sup>a</sup>	88.6±3.0 <sup>a</sup>	11.41±0.50 <sup>a</sup>	60.6±2.8 <sup>a</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 20 Composition of diet (%)

Constituent	22%Casein	12%Casein	12%Casein	12%Casein	12%Casein	13.95%Casein
	(%)	10%WPI (%)	10%WPI-H (%)	10%WPI-R (%)	10%WPI-P (%)	8%WPI-P (%)
Casein	22	12	12	12	12	13.95
Whey protein isolate	-	10	-	-	-	-
WPI-H <sup>3)</sup>	-	-	10	-	-	-
WPI-R <sup>4)</sup>	-	-	-	10	-	-
WPI-P <sup>5)</sup>	-	-	-	-	10	8.05
Corn oil	10	10	10	10	10	10
Mineral mixture <sup>1)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>1)</sup>	1	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Na-Cholate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Cellulose <sup>2)</sup>	3	3	3	3	3	3
Sucrose	59.55	59.55	59.55	59.55	59.55	59.55

1) ATH-93™ mixture

2) PC-200

3) Enzyme hydrolyzed whey protein isolate without free amino acid (protein: 86%, moisture: 4%, ash: 4%)

4) WPI Retentate: Insoluble higher-molecular (1900) fraction after ultrafiltration of hydrolyzed WPI

5) WPI Permeate: Soluble lower-molecular (790) fraction after ultrafiltration of hydrolyzed WPI

Table 21 Effects of dietary protein on body weight gain and food intake in cholesterol fed mice

Dietary group	Body wt. (g)		Body wt. gain (g/day)	Food intake (g/day)
	Initial	Final		
22% Casein	28.5±0.3 <sup>a</sup>	39.2±0.6 <sup>b</sup>	0.382±0.018 <sup>b</sup>	4.65±0.04 <sup>a</sup>
10% WPI	28.5±0.3 <sup>a</sup>	41.3±0.9 <sup>a</sup>	0.457±0.029 <sup>a</sup>	4.34±0.04 <sup>c</sup>
10% WPI-H	28.5±0.3 <sup>a</sup>	40.8±0.5 <sup>a</sup>	0.437±0.018 <sup>a</sup>	4.45±0.06 <sup>b</sup>
10% WPI-R	28.5±0.4 <sup>a</sup>	40.8±0.8 <sup>a</sup>	0.438±0.022 <sup>a</sup>	4.24±0.03 <sup>d</sup>
10% WPI-P	28.5±0.4 <sup>a</sup>	39.3±0.6 <sup>b</sup>	0.385±0.018 <sup>b</sup>	4.22±0.04 <sup>d</sup>
8% WPI-P	28.4±0.4 <sup>a</sup>	39.3±0.7 <sup>b</sup>	0.388±0.015 <sup>b</sup>	4.48±0.04 <sup>b</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 22 Effects of dietary protein on liver weight and liver lipids in cholesterol fed mice

Dietary group	Liver weight		Cholesterol		Triglyceride		Phospholipid	
	(g)	(% of B.W.)	(mg/g)	(mg/Liver)	(mg/g)	(mg/Liver)	(mg/g)	(mg/Liver)
22% Casein	3.42±0.08 <sup>a1)</sup>	8.71±0.12 <sup>a</sup>	62.6±3.2 <sup>d</sup>	214±12 <sup>d</sup>	20.2±2.0 <sup>c</sup>	68.7±6.7 <sup>c</sup>	60.6±1.7 <sup>d</sup>	207±7 <sup>a</sup>
10% WPI	3.40±0.13 <sup>a2)</sup>	8.24±0.28 <sup>b</sup>	74.9±2.7 <sup>c</sup>	254±12 <sup>c</sup>	36.6±0.9 <sup>a</sup>	124.5±5.9 <sup>a</sup>	68.7±0.8 <sup>c</sup>	234±10 <sup>d</sup>
10% WPI-H	3.29±0.12 <sup>a3)</sup>	8.07±0.30 <sup>b</sup>	69.2±5.3 <sup>c</sup>	223±13 <sup>d</sup>	28.0±1.1 <sup>b</sup>	91.9±5.0 <sup>b</sup>	70.6±1.9 <sup>c</sup>	231±9 <sup>d</sup>
10% WPI-R	3.21±0.10 <sup>b4)</sup>	7.86±0.13 <sup>b</sup>	71.2±2.6 <sup>c5)</sup>	228±9 <sup>d</sup>	26.5±0.9 <sup>b</sup>	85.2±4.4 <sup>b</sup>	81.7±3.4 <sup>b</sup>	262±14 <sup>c</sup>
10% WPI-P	3.55±0.21 <sup>a</sup>	9.02±0.48 <sup>a</sup>	88.6±7.7 <sup>b</sup>	308±24 <sup>b</sup>	20.0±1.2 <sup>c</sup>	71.1±6.2 <sup>c</sup>	121.5±5.9 <sup>a</sup>	423±16 <sup>a</sup>
8% WPI-P	3.13±0.13 <sup>c</sup>	7.95±0.27 <sup>b</sup>	112.5±5.4 <sup>a</sup>	385±28 <sup>a</sup>	20.0±1.6 <sup>c</sup>	67.2±5.5 <sup>c</sup>	113.0±6.3 <sup>a</sup>	333±39 <sup>b</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 23 Effects of dietary protein on serum lipid levels in cholesterol fed mice

Dietary group	Cholesterol				Triglyceride (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
	Total (mg/dl)	HDL (mg/dl)	VLDL+LDL (mg/dl)	A. I. <sup>2)</sup>		
22% Casein	243±11 <sup>c1)</sup>	115±5 <sup>a2)</sup>	128±7 <sup>c</sup>	1.11±0.05 <sup>d</sup>	57.1±7.4 <sup>a3)</sup>	229±10 <sup>a</sup>
10% WPI	283±9 <sup>b</sup>	114±5 <sup>a2)</sup>	169±4 <sup>b</sup>	1.50±0.05 <sup>c</sup>	65.1±7.0 <sup>a</sup>	228±9 <sup>a</sup>
10% WPI-H	340±28 <sup>a</sup>	121±4 <sup>a</sup>	219±25 <sup>a</sup>	1.79±0.15 <sup>a4)</sup>	34.1±4.6 <sup>c</sup>	227±9 <sup>a</sup>
10% WPI-R	315±16 <sup>a</sup>	118±8 <sup>a2)</sup>	197±10 <sup>a</sup>	1.70±0.09 <sup>b</sup>	49.7±6.0 <sup>b</sup>	228±11 <sup>a</sup>
10% WPI-P	300±14 <sup>a5)</sup>	101±6 <sup>c</sup>	199±11 <sup>a</sup>	2.05±0.17 <sup>a</sup>	27.8±3.2 <sup>c</sup>	194±11 <sup>b</sup>
8% WPI-P	299±12 <sup>a6)</sup>	107±4 <sup>b2)</sup>	192±12 <sup>a</sup>	1.82±0.14 <sup>a7)</sup>	30.4±3.8 <sup>c</sup>	184±4 <sup>b</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

2) Atherogenic index:Cholesterol ratio of (VLDL+LDL)/HDL

Table 24 Effects of dietary protein on gallstones formation in cholesterol fed mice

Dietary group	Gallstone incidence (%)	Cholesterol (Chl) (nmol)	Bile acid (BA) (nmol)	(Chl/BA)
22% Casein	8/10(80)	938±344 <sup>a,1)</sup>	1875±446 <sup>a</sup>	0.40±0.06 <sup>a</sup>
10% WPI	0/10(0)	151±23 <sup>b</sup>	992±147 <sup>b,c</sup>	0.17±0.02 <sup>b</sup>
10% WPI-H	1/10(10)	220±45 <sup>b</sup>	839±157 <sup>c</sup>	0.59±0.34 <sup>a,b</sup>
10% WPI-R	1/10(10)	177±48 <sup>b</sup>	1095±228 <sup>b,c</sup>	0.17±0.02 <sup>b</sup>
10% WPI-P	4/10(40)	239±63 <sup>b</sup>	1255±193 <sup>a,b</sup>	0.17±0.03 <sup>b</sup>
8% WPI-P	2/10(20)	269±95 <sup>b</sup>	824±233 <sup>c</sup>	0.49±0.16 <sup>a</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).

Table 25 Effects of dietary protein on food intake, fecal weight and sterol concentrations in cholesterol fed mice

Dietary group	Food intake			Dry Feces				
	(g/day)			(g/day)	Chl		BA	
		Chl (mg/day)	Na-Cholate (mg/day)		(mg/day)	(% of intake)	(μmol/day)	(% of intake)
22% Casein	3.89	19.5±1.4 <sup>b,c,1)</sup>	22.6±1.6 <sup>b,c</sup>	0.28±0.02 <sup>c</sup>	13.3±0.9 <sup>a</sup>	69.3±3.6 <sup>a</sup>	7.09±0.68 <sup>b</sup>	31.1±1.4 <sup>d</sup>
10% WPI	4.10	20.5±1.1 <sup>b,c</sup>	23.8±1.3 <sup>b,c</sup>	0.28±0.01 <sup>c</sup>	11.4±0.6 <sup>b,c</sup>	56.7±2.9 <sup>b,c</sup>	8.25±0.48 <sup>b</sup>	35.1±2.1 <sup>c</sup>
10% WPI-H	4.25	21.3±0.2 <sup>b</sup>	24.7±0.3 <sup>b</sup>	0.31±0.01 <sup>b</sup>	10.5±0.5 <sup>c,d</sup>	49.4±1.9 <sup>d,e</sup>	10.91±0.49 <sup>a</sup>	44.1±1.7 <sup>a</sup>
10% WPI-R	4.04	20.2±0.7 <sup>c</sup>	23.5±0.8 <sup>c</sup>	0.37±0.01 <sup>a</sup>	12.0±0.6 <sup>a,b</sup>	59.3±1.8 <sup>b</sup>	10.87±0.28 <sup>a</sup>	46.9±2.2 <sup>a</sup>
10% WPI-P	4.28	21.4±0.5 <sup>b</sup>	24.9±0.6 <sup>b</sup>	0.32±0.01 <sup>b</sup>	10.1±0.6 <sup>d</sup>	47.1±2.0 <sup>c</sup>	11.48±0.54 <sup>a</sup>	46.1±1.5 <sup>a</sup>
8% WPI-P	4.90	24.5±0.7 <sup>a</sup>	28.5±0.9 <sup>a</sup>	0.35±0.01 <sup>a</sup>	13.1±0.5 <sup>a</sup>	54.0±3.0 <sup>c,d</sup>	11.14±0.35 <sup>a</sup>	39.5±1.8 <sup>b</sup>

1) Mean±s. e. m. of mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different (p<0.05).