HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ガラス板法による結核菌リン脂質の血清反応
Author(s)	佐々木, 昭雄; 立花, キヨ; 有馬, 純 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 36, 17-22
Issue Date	1976-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26498
Type	departmental bulletin paper
File Information	36_P17-22.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ガラス板法による結核菌リン脂質の血清反応

佐々木昭雄　立花キヨ　有馬　純
（北海道大学免疫科学研究所　細菌感染部門）
永山能為　西出鬼一郎　柴田正弘
（国立療養所　札幌南病院）

（昭和50年11月4日受付）

カオリン凝集反応あるいは高橋結核反応の名で知られている結核血清反応において，抗原として使用されている結核菌体リン脂質は，12以上の成分を含む一群の物質である。化学的にはジホスファチジルグリセロール（カルジオリピン，CL），ホスファチジルエタノールアミン（PE），およびホスファチジルイノシトールオリゴマンノシド（PIM_xR_y）の3種類のリン脂質であるが，PIM_xR_yにはマンノースおよび脂肪酸の残基数が違ういくつもの成分が存在するためである（図1）。

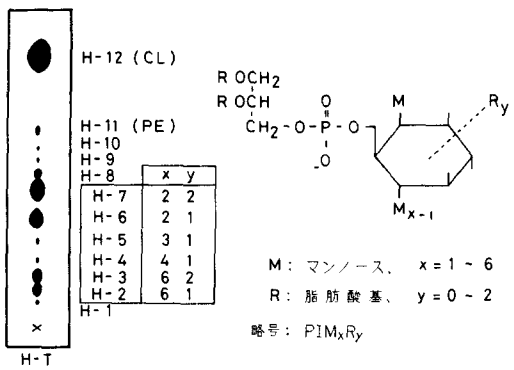


図1　結核菌 $H_{37}R_v$ 株菌体全リン脂質の薄層クロマトグラムと，ホスファチジルイノシトールオリゴマンノシドの構造

一部のPIM_xR_y成分について血清学的活性が報告されているが[1)~5)]，いくつか存在するPIM_xR_y成分相互間の血清学的あるいは免疫学的関係はまだ明らかでない。

最近我々は6種のPIM_xR_y成分を単離・精製することに成功し，これらすべてが抗原活性を有すること，これらの間には複雑な交差反応性があることを明らかにした[6)~8)]。従って，結核菌リン脂質の血清反応には2種以上の抗原抗体系が関与していると考えられる。一見複雑な交差反応の成績が2つの系の組合せのみで説明できるかどうかを解析するに当り，従来用いてきた間接赤血球凝集反応は操作が繁雑な上，溶血が起りやすく，不便となった。そこで，梅毒血清反応の一つであるガラス板法（VDRL法）を結核血清反応に適用するための実験条件を検討した結果，ガラス板法は結核菌リン脂質抗原に対する抗体系の解析に便利な方法であること，抗体価の測定のみに限ってもカオリン反応より有利なことが明らかとなった。

実験材料と方法

脂質：抗原リン脂質としては，結核菌 $H_{37}R_v$ 株より抽出・分画した菌体全リン脂質H-T，およびこの画分に含まれるH-2～H-7と名づけた6種のPIM_xR_y（図1参照）を使用した。これらの脂質の製法と化学的性質の詳細については既に報告した[6)]。

コレステロールは市販特級品をそのまゝ使用した。

レシチンは井上の方法[9)]に従い，卵黄より得た全脂質画分から，カラムクロマトグラフィーにより分画精製した。

抗血清：結核死菌感作ウサギ血清は，前報[8)]の抗 $H_{37}R_v$-I 血清を使用した。

ウサギ抗 H-3 および抗 H-7 血清は，精製リン脂質 H-3（PIM_6R_2）0.5 mg または H-7（PIM_2R_2）5 mg を等量の M-BSA と混合し，FIA と共に2週間隔で3回筋注して作製した。

患者血清は国立療養所札幌南病院の外来および入院患者より得た。

ガラス板法血清反応：テトラヒドロフランにコレステロールを 18 mg/mℓ の濃度に溶解し，この溶液に適当量のレシチン，抗原リン脂質，および 2 mg/mℓ の脂溶性色素スーダン III などを溶解して抗原液とした。

希釈液は，梅毒抗原希釈用緩衝液およびこれに 1 mM EDTA を加えたもので，その組成はつぎの通りである。

塩化ナトリウム	10.0 g
第二リン酸ナトリウム ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	0.093 g
第一リン酸カリウム (KH_2PO_4)	0.170 g
EDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)	0.372 g
蒸溜水	1000 mℓ

(pH 5.9～6.1 に調整)

希釈液19容をバイブロミキサー上で攪拌しながらこれに抗原液1容を滴下し，さらによく攪拌して抗原浮遊液を作製した。

エクセルマイクロピペット 25-III (硝英製作所) を使用し，梅毒血清診断用のガラス板 (10穴) のすべての穴に希釈液 0.05 mℓ を入れた後，被検血清 0.05 mℓ をとり，ガラス板上で血清の2倍希釈系列を作りつゝ液を穴全体にひろげた。

抗原浮遊液一滴 (1/60 mℓ) ずつを22ゲージの注射針から滴下し，水平回転器にかけて1分間120回転の割合で室温5～15分回転した後，凝集の有無をX線間接撮影フィルム用観察器 (SEICO FL-657, 精光社) 上で判定した。

カオリン凝集反応： 高橋法に従い市販品 (第一化学薬品 K.K.) を使って行なったが，抗原液は前記の菌体全リン脂質 H-T と精製卵黄レシチンより新しく作製した。

抗体の吸収： スーダン III を含まない抗原浮遊液を作り，氷庫に一夜放置した後 10,000 回転 30 分の遠心操作により脂質粒子を沈澱させ，希釈液で2回洗滌し，吸収用抗原とした。

血清と抗原を混合し，37°C 水浴中に 30 分間ついで氷水中に 30 分間放置した後，遠心により上清を分離してミリポアフィルター (HAWP, 0.45 μ) を通し，吸収血清とした。

血清分画： 血清 0.5 mℓ をセファデックス G-200 のカラム (2.5×35 cm) にかけ，ホウ酸緩衝食塩水 (0.5 M NaCl, pH 8.2) で分画した。溶出液は 4 mℓ ずつ集めたが，抗体価測定のためにはこの中の 1 mℓ をとり，正常ウサギ血清 0.05 mℓ と飽和硫安溶液 1 mℓ を加え，56°C 15分間インキュベートした後 2,000 回転 15 分の遠心で沈澱物を集め，0.5 mℓ の血清反応用希釈液に溶解した。

実験結果

基礎的検討

以下の実験は，抗原浮遊液中のコレステロール濃度を 0.9 mg/mℓ とし，結核死菌感作ウサギ血清を使用して行った。

コレステロールに H-3 のみを加えた場合，浮遊液中の濃度が 0.03 mg/mℓ 以下では自然凝集がみられたが，0.09 mg/mℓ 以上では安定な微細浮遊液が得られ，抗血清と混合すると凝集反応が起った。H-3 濃度が 0.09 mg/mℓ と 0.30 mg/mℓ とでは得られた血清抗体価に差がなかったが，0.60 mg/mℓ では抗体価が明らかに低下した。H-2～H-6 および H-T は，濃度が 0.10 mg/mℓ になるようコレステロールのテトラヒドロフラン溶液に加えておくことにより抗原浮遊液を作ることができた。しかし H-7 を加えたときは自然凝集が起り，添加量を増減しても安定な浮遊液を作ることができなかった。

コレステロールにレシチンのみを加えた場合，0.30 mg/mℓ 以上で安定な脂質浮遊液が得られた。コレステロールとレシチンを3:1に混合したテトラヒドロフラン溶液に抗原である結核菌リン脂質を加えると，H-7 を含めてどの脂質でも広い濃度範囲で安定な浮遊液が得られ，抗血清を加えると凝集反応が起った。最高抗体価を与える抗原濃度は 0.01～0.1 mg/mℓ であったが，抗原が低濃度のときは抗体価は同じでも凝集塊は小さくなる傾向がみられた。従って抗原濃度は 0.03 mg/mℓ，すなわちコレステロール，レシチン，抗原リン脂質の比はカルジオリピンの系と同じく 30:10:1 が適当であった。H-3 に対するウサギ血清の抗体価は，レシチンを含まない抗原浮遊液のときと同じであった。

抗原液にスーダン III を加えたときと加えない時とでは，抗原浮遊液の安定性および血清抗体価に差はみられなかった。スーダン黒はテトラヒドロフランに対する溶解度が低く，不適当であった。

希釈液の pH を 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 と変えても凝集反応の成績に差はみられなかった。食塩濃度を標準の 1/2 および2倍にすると，凝集塊は小さくなったが反応の終価は変らなかった。

抗原浮遊液は室温または 4°C の氷庫に保存すると沈澱を生ずるが，よく振って再浮遊すると少くとも1ケ月間は使用可能であった。42°C 孵卵器中に，または室温で 10 W 殺菌灯の下 10 cm の位置に一夜放置したときは，再浮遊しても小さな凝集塊が残った。100°C 30 分の処理では脂質が凝固し，機械的に再浮遊することはできなかった。ゆっくり凍結させた後融解すると，よく振っても小さな凝集塊が残ったが，液体窒素による急速凍結を行ったときは融解後使用可能であった。急速凍結後凍結乾燥し，水を加えてもとに戻すと，均一な浮遊液は得られたが抗血清と混合しても凝集は起らなかった。

種々の血清の抗リン脂質抗体

抗体価の高い (128 以上) 結核患者およびウサギ抗血清においては一般に大きな凝集塊がみられ，反応の終価が判定しやすかったが，免疫初期のウサギ血清および大部

分の患者血清で抗体価32以下の場合，一般に凝集塊は小さく反応の終価が判定困難な例が多かった。一部の血清では血清希釈液にEDTAを加えると非特異凝集と思われる弱い凝集が消失し，反応の終価の判定が容易となった。一般に反応が弱いときは判定後再び5～10分間回転するか，あるいは始めから10～15分間回転すると凝集塊が比較的大きくなり，判定が容易となった。しかし，このような検討にもかかわらず，H-Tを抗原とする反応においてはときどき判定困難な弱い凝集がみられた。

H-3感作ウサギ血清の抗体価はH-3に対して256，H-7に対して16，一方H-7感作ウサギにおいては抗H-3が4，抗H-7が128であり，H-3とH-7は特異性の違う抗原であるという以前の成績[7),8)]が確認された。結核感作ウサギ血清の抗体価は，抗H-3が抗H-7より大きいもの，等しいもの，小さいものがみられ，感作条件によって変動するようであった。

患者血清71例についてH-3とH-7に対する抗体価を比較した成績では，両抗原に対して陰性なもの6例，抗H-3抗体価の方が明らかに高いもの43例，両抗体価が大体等しいもの（±1血清希釈単位以内）22例であった。陰性の6例はすべて非結核患者であった。抗体価の等しい22例中3例において，抗H-7抗体価は抗H-3抗体価より1血清希釈単位高い値を示したが，抗H-7抗体価の方が明らかに高い例はみられなかった。

抗体の吸収テスト

ガラス板法凝集反応においては血清（希釈液）と抗原浮遊液との混合容積比は3:1である。従って抗体価32の血清中の抗体を吸収するためには，10.7倍容の抗原浮遊液中に存在する抗原脂質が必要となる。このような計算が成り立つかどうかを確めるため，次の実験を行った。H-3に対する抗体価32で，H-7とは反応しない患者血清（プールしたもの）を，6倍容に相当する量のH-3抗原で吸収したときの残存抗体価は16であった。この部分吸収血清を4つに分け，それぞれを6，3，1.5，および0.75倍容相当の抗原で再吸収した時の残存抗体価は＜4，＜4，4，8であった。従って吸収に必要な抗原量は大体上の計算に従うことが確められた。

表1　脂質粒子による特異抗体の吸収

吸収抗原	反応抗原	血清希釈倍数 4	8	16	32	64
—	H-3	＋＊	＋	＋	＋	＋
	H-7	＋	＋	＋	＋	—
H-3	H-3	±	—	—	—	—
	H-7	＋	＋	＋	＋	—
H-7	H-3	＋	＋	＋	＋	＋
	H-7	—	—	—	—	—

＊　凝集の程度を＋＋～－で表した。

H-3に対して64，H-7に対して32の抗体価を示した別の患者血清（プールしたもの）を10倍容に相当する量の抗原で2回吸収したときの成績を表1に示した。吸収抗原に対応する抗体のみが特異的に消失し，もう一方の抗原に対する反応性は抗体価のみならず，凝集の強さにおいてもほとんど変らなかった。

血清の分画テスト

結核死菌感作ウサギ血清をセファデックスG-200のカラムで分画し，溶出液の抗体価を測定した成績を図2に示した。抗H-3および抗H-7抗体活性は，いずれもIgMを含む第1ピークとIgGを含む第2ピークの両方にみられ，測定された抗体価の総和は抗H-3については84，抗H-7については52であった。溶出液はその抗体価測定時に4倍希釈になっているので（方法の項参照），全抗体価はH-3について336，H-7について208と計算される。分画前の血清抗体価はH-3とH-7の両抗原に対して共に320であり，いずれも計算値に近かった。

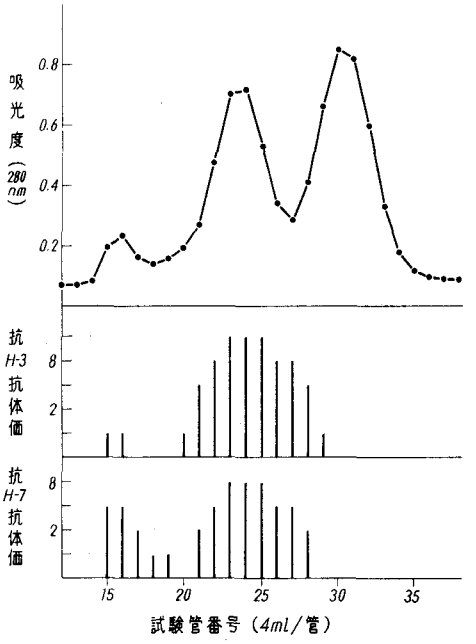


図2　ウサギ抗血清のセファデックスG-200による分画

カオリン反応との比較

結核患者血清181例について，H-Tを抗原とするカオリン凝集反応とH-3を抗原とするガラス板法凝集反応を平行して行ない，両抗体価を比較した成績を表2に

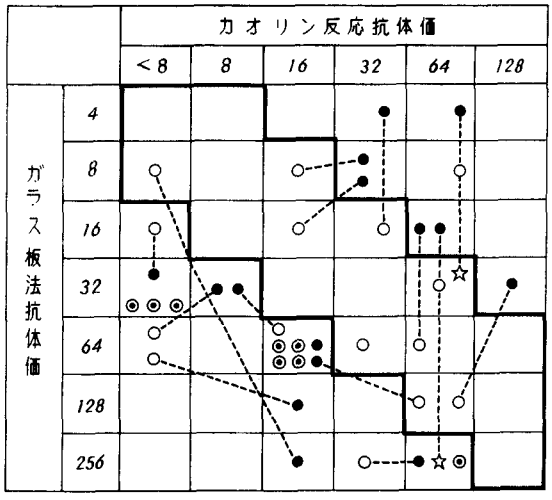
表 2　患者血清 181 例におけるカオリン反応抗体価との比較

ガラス板法抗体価	カオリン反応抗体価 <8	8	16	32	64	128	256	合計
2	8		1	1				10
4	7	9	12	1	1			30
8	25	9	10	2	1			47
16	13	7	13	3	4			40
32	3	3	13	2	5	1		27
64			7	5	4	1		17
128			1		4	1	1	7
256			1		1		1	3
合　計	56	28	58	14	20	3	2	181

数字は例数を表わす。太線の中は，1 血清希釈単位以内での一致例。

まとめた。カオリン反応は 8 倍希釈血清より，ガラス板法は 2 倍希釈血清より行ったものであるが，ガラス板法では全例が陽性であった。抗体価 8 以上で両抗体価が完全に一致したものは 29 例 16% にすぎないが，1 血清希釈単位以内で一致したものは 128 例 71% であった。不一致の 53 例中 24 例はカオリン反応の方が，29 例はガラス板の方が高い抗体価を示した。

不一致例中 23 例について再度採血し，両抗体価を測定した成績を図 3 に示した。23 例の内訳はカオリン反応抗体価が高かったもの 7 例，ガラス板法抗体価が高かったもの 16 例である。2 回の測定値が完全一致したものは 8 例で，いずれもガラス板法が高い抗体価を示した。1 血清希釈単位変化したものは 9 例で，合計 17 例 74% が前回の測定値と一致した。23 例中両反応の抗体価が 1 血清希釈単位以内で一致したもの 9 例，不一致 14 例であった。ガラス板法抗体価の方が高いものは 13 例で，この中 6 例においてはカオリン反応陰性にもかかわらずガラス板法抗体価は 16，32，あるいは 64 であった。カオリン反応抗体価の方が高いものは 1 例にすぎなかった。



●一回目　○二回目　◉二度の測定が一致　☆混合抗原による抗体価

図 3　不一致例の再検討成績

混合抗原

ウサギ抗 H-3 および抗 H-7 血清について，H-3 と H-7 を種々の割合で混合した抗原による凝集反応を行った成績を表 3 に示した。抗 H-3 血清の凝集は抗原の H-3 含量 25% 以上で H-3 単独のときと同じであった。これに対し，抗 H-7 血清は抗原の H-7 含量 25% 以上で一定の抗体価を示したが，凝集塊の大きさを考慮に入れると 75% 以上で H-7 単独と同じ反応がみられた。

前節の再測定で使用した 23 例の患者血清について，H-3 と H-7 を 1 : 3 の割合に混合した抗原に対する抗体価と，抗 H-3 抗体価とを比較した。21 例において両抗体価は 1 血清希釈単位以内で一致した。残り 2 例はいず

表 3　混合抗原による血清反応

反応抗原	抗 H-3 血清 希釈倍数							抗 H-7 血清 希釈倍数						
H-3 : H-7	8	16	32	64	128	256	512	8	16	32	64	128	256	512
H-3 のみ	＋＋	＋＋	＋	＋	＋	＋	−	−	−	−	−	−	−	−
9 : 1	＋＋	＋＋	＋	＋	＋	＋	−	＋	＋	＋	＋	−	−	−
3 : 1	＋＋	＋＋	＋	＋	＋	＋	−	＋	＋	＋	＋	＋	−	−
1 : 1	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋	＋	−	＋＋	＋	＋	＋	＋	−	−
1 : 3	＋＋	＋＋	＋	＋	＋	＋	−	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋	−	−
1 : 9	＋	＋	＋	＋	＋	−	−	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋	−	−
H-7 のみ	＋	＋	−	−	−	−	−	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋	−	−

れも混合抗原に対する抗体価の方が高く，その中1例はカオリン反応抗体価が抗 H-3 抗体価より高い例であった（図3参照）。

考　　察

近年，ウサギを使って種々の抗リン脂質抗体が作られるようになったが，抗体の検出には定量的 VDRL Microflocculation テスト，すなわち梅毒血清診断におけるガラス板法の手技を用いている例が多い。カルジオリピンはもとより，その類似体[10),11)]，ホスファチジルイノシトール[12)]，ホスファチジルセリン[13)]，ホスファチジルグリセロール[14)]などがあげられる。これに対し，結核菌リン脂質の血清反応は間接赤血球凝集反応で始まり[15)]，その後赤血球の代りにカオリンを凝集媒体とするようになった[16)]。しかし我々は，化学的に不均一な菌体リン脂質から抗原活性成分を単離するために，種々の脂質画分の抗原活性を比較しやすい赤血球の系を用いてきた。数種の活性リン脂質が精製された[6)]現在では，赤血球およびカオリンの系は比較的不安定でリン脂質抗原抗体系の免疫化学的解析には不便なため，ガラス板法に移行することにした。

今回の成績にもとずいて結核菌リン脂質に適用されたガラス板法は，本質的には梅毒用と同じであるが，次の4点で違っている。第1に，脂質濃度を2倍にしてテトラヒドロフランに溶解し，19容の希釈液中に滴下したこと。抗原リン脂質がアルコール難溶のためテトラヒドロフランを用いたが，脂質の溶解度が大き過ぎ，通常の1:9希釈では自然凝集が起りやすいためである。第2に希釈液に EDTA を添加したこと。一部の血清でこれが非特異凝集をおさえる作用を示したので，カオリン反応の場合と同様，補体を化学的に非動化するためである。従って，被検血清はあらかじめ非動化する必要はない。第3に，抗原液にスーダン III を加えたこと。脂質粒子を着色し，凝集の有無の判定を容易にするためで，適当な溶解性をもった色素なら何でも使えると思われる。判定は白紙上肉眼でもできるが，透過光の方が見やすく，数倍のレンズがついているとさらに便利である。第4に回転時間を長くしたこと。一部の血清で抗体価が上昇したり，反応の終価の判定が容易になるためである。血清によっては，このようにしても判定困難なことがあるが，赤血球やカオリンの反応系においても弱い凝集がみられることがあり，抗体の質的な問題と考えて検討中である。

通常，脂質抗原は補助脂質（レシチン）の存在下一定のミセルを形成する必要があると考えられている[10),12)]。これに対し，今回の成績ではレシチンの有無により血清抗体価に差はみられず，レシチンはコレステロールの自然凝集性をおさえ，抗原リン脂質の必要濃度を低くしているのみである。結核菌リン脂質抗原の主要活性因子であるホスファチジルイノシトールオリゴマンノシドは，通常のリン脂質よりも親水基の多いグリコリン脂質であり，補助脂質がなくても単独で免疫学的に活性なミセルを形成するものと考えられ，免疫化学的に興味ある脂質抗原である。

ガラス板法は，間接赤血球凝集反応およびカオリン反応に比して種々の利点を有している。抗原浮遊液は室温1ケ月以上の保存が可能であり，抗体価の測定は血清希釈系列を作り，抗原浮遊液を滴下し，7～15分回転するだけである。従って少数例の患者血清や，免疫途中の実験動物血清の抗体価測定は非常に短時間で行える。また抗原浮遊液の安定性は，同一抗原による抗体の段階的吸収，数種類の抗原による多重吸収を可能にする。反応液の pH や塩濃度の多少の変化に対する安定性は，原血清以外の被検試料の前処理を容易にする。今回はこれらについて予備的な実験を行ったのみであり，今後ガラス板法を使って結核菌リン脂質抗原抗体系をくわしく解析する予定である。

結核患者血清について検討した成績から，H-3 と H-7 を混合した抗原を用いたガラス板法の抗体価は，カオリン反応抗体価と同じ，あるいはそれより高くなる可能性が示され，現在実験中である。抗リン脂質抗体価が結核症の臨床面に如何なる意義を有するかについてはまだ明らかでないが，実験動物による基礎的検討と同時に患者血清についても検討を続ける必要がある。そのためにも，カオリン反応より操作が簡単で高い抗体価を示すこともあるガラス板法は，有利な方法であるといえよう。

結　　論

結核菌リン脂質の血清反応に梅毒血清診断用ガラス板法を適用するための実験条件を検討し，次のような方法を確立した。

1) 抗原液はつぎの組成をもつテトラヒドロフラン溶液で，−20°C に保存する。結核菌リン脂質 0.06%，精製レシチン 0.60%，コレステロール 1.80%，スーダン III 0.2%。

2) 抗原浮遊液は，希釈液 19 容にバイブロミキサー上で攪拌しながら抗原液を滴下して作製する。この浮遊液は室温1ケ月保存後も使用できる。

3) ガラス板上に 0.05 mℓ ずつの血清希釈系列を作り，抗原浮遊液 1/60 mℓ ずつ滴下し，1分間 120 回の割合で

7～15 分間水平回転した後，凝集の有無を判定する。

この方法を用いて，結核菌体全リン脂質画分は少くとも2種類の抗原を含むことを再確認し，また，抗リン脂抗体の活性はIgMとIgGの両画分に存在することを認めた。

結核患者181例についてこの方法を検討した結果，抗原として2種類の精製リン脂質の混合物を使用することにより，ガラス板法はカオリン反応と同じ，あるいはそれより高い抗体価を示す可能性が示された。

文　献

1) Stöss, B. and Herrmann, R.: Nature, **208**, 1224 (1965).
2) Subrahmanyam, D. and Singhvi, D. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **120**, 102 (1966).
3) Pangborn, M. C. and McKinnay, J. A.: J. Lipid Res., **7**, 627 (1966).
4) Pangborn, M. C.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **154**, 133 (1968).
5) Sasaki, A. and Takahashi, Y.: Compt. Rend. Soc. Biol., **166**, 476 (1972).
6) Sasaki, A.: J. Biochem., **78**, 547 (1975).
7) Sasaki, A. and Takahashi, Y.: Compt. Rend. Soc. Biol., **168**, 626 (1974).
8) 佐々木昭雄，山本健一，高橋義夫，榑松三郎，永山能為：結核の研究. **34**, 56 (1974).
9) 井上圭三：日本生化学会編，生化学実験講座 **3**. 脂質の化学，東京化学同人，258頁 (1974).
10) 井上圭三，野島庄七：蛋白質・核酸・酵素. **11**, 1458 (1966).
11) Inoue, K. and Nojima, S.: Chem. Phys. Lipids, **3**, 70 (1969).
12) Kataoka, T. and Nojima, S.: J. Immunol., **105**, 502 (1970).
13) Tamamura, S., Hashimoto, T. and Hara, I.: Japan. J. Exp. Med., **41**, 31 (1971).
14) DeSiervo, A. J.: Infection and Immunity, **9**, 835 (1974).
15) 高橋義夫，小野勝男：結核の研究. **7**, 1 (1957).
16) Takahashi, Y.: Amer. Rev. Resp. Dis., **85**, 708 (1962).

Microflocculation Test for Detection of Antiphospholipid Antibody in Tuberculous Sera

Akio SASAKI, Kiyo TACHIBANA, Jun ARIMA, Yoshitame NAGAYAMA, Kiichiro NISHIDE and Masahiro SHIBATA

Slide agglutination procedure used for the serodiagnosis of syphilis (VDRL microflocculation test) was applied to the detection of antibody against phospholipids of tubercle bacilli. In comparison to the indirect hemagglutination and kaolin agglutination methods, this technique had three main advantages, namely, serum titration was performed more rapidly with less labor, and stepwise adsorption of antibody and titration of serum fraction could easily be achieved.

Through use of this method, the existence of two different haptens in the total phospholipid of tubercle bacilli was reconifirmed. In addition, it was shown that more then one class of antiphospholipid antibodies were present in antiserum. When the test was performed by admixture of two purified phospholipids, antibody titer of tuberculous patient seemed to be similar to, or sometimes higher than, the one obtained by kaolin method.