

各種哺乳動物の線維柱組織における糖残基の種差に関する レクチンによる組織化学的研究

野 原 雅 彦

信州大学医学部眼科学教室

要 約

ウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウスの 5 種の哺乳動物の線維柱組織における糖残基の組織化学的検索を行った。凍結切片を作製し 16 種のビオチン化レクチンで染色、アビジンビオチン化ペルオキシダーゼ複合体を作用させ DAB 反応で発色を行い光学顕微鏡にて観察した。線維柱組織の染色性は、ConA, PHA-E₄, PHA-L₄, WGA, ABA, LCA, RCA 60, RCA 120, DSA, SSA では 5 種とも陽性、Lotus では 5 種とも弱陽性であった。MAM ではウシ、ブタ、ウサギが陽性で他が陰性であり、PNA ではウシ、ブタ、ウサギが弱陽性で他が陰性であった。SBA ではラットで弱陽性で他は陰性であり、UEA-I, DBA では 5 種とも陰性であった。5 種の哺乳動物の線維柱組織における糖残基の局在性には種差が存在することが判明した。今後、人線維柱組織における糖残基を検索することにより、人眼に代わる実験モデルとして 5 種のうちいずれかが使用できる可能性が示唆された。(日眼会誌 97: 1279—1285, 1993)

キーワード：線維柱組織，レクチン，糖残基，種差，哺乳動物

Lectin Histochemical Studies on Species Differences in the Mammalian Trabecular Meshwork

Masahiko Nohara

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

Abstract

Lectin histochemical studies were performed to clarify the species differences in the location of glycoconjugates in the trabecular meshwork (TM) of various mammals, i.e., the mouse, rat, rabbit, pig, and ox, to find an experimental model for human TM. Cryosections were made and stained with sixteen kinds of biotinylated lectin followed by an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC). Strong positive reactions in the TM of all 5 kinds of mammals were observed for ConA, PHA-E₄, PHA-L₄, WGA, ABA, LCA, RCA 60, RCA 120, DSA, and SSA. The TM of the 5 kinds of mammals was weakly positive for Lotus. Rabbit, pig and ox TM were positive for MAM and others were negative. Rabbit, pig and ox TM were weakly positive for PNA and were negative in the other's. Rat TM was weakly positive for SBA and was negative in the other's. The TM of all 5 kinds of mammals was negative for UEA-I and DBA. It could be concluded that species difference exists in lectin binding site in the TM. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1279—1285, 1993)

Key words: Trabecular meshwork, Lectins, Glycoconjugates, Species differences, Mammals

別刷請求先：〒390 松本市旭 3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 野原 雅彦

(平成 5 年 4 月 15 日受付，平成 5 年 6 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Masahiko Nohara, M.D. Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi Matsumoto 390, Japan

(Received April 15, 1993 and accepted in revised form June 7, 1993)

I 緒 言

哺乳動物における主要な房水流出路は人眼と同様に隅角組織に存在する。哺乳動物の隅角組織の構築については、ウシ、ウサギ、ラットは Tripathi ら¹⁾²⁾によって、ブタは Tripathi ら³⁾によって、マウスは Vanden Hoek ら⁴⁾によって報告されている。また、哺乳動物の隅角組織には、線維柱組織や人眼の Schlemm 管に類似した管状構造を呈する aqueous plexus が存在することから¹⁾、実験動物として人眼の房水流出機構のモデルとなり得るものと考えられ、緑内障の研究対象として使用されることが多い。

一方、種々の組織において、特定の糖残基に対し結合特異性を持つレクチンが、糖蛋白をはじめとする糖複合体の検索に有用であることが確認されている^{5)~7)}。隅角組織においては、Vanden Hoek ら⁴⁾がマウスの線維柱組織においてレクチンの結合性を報告し、Rittig ら⁸⁾が人線維柱組織におけるレクチン結合部位の存在を報告している。また、Kurosawa ら⁹⁾はカニタイザルと牛胎児由来の培養線維柱細胞の表面にレクチン結合部位が存在することを報告している。これらのことから、人眼と同様に種々の哺乳動物の房水流出路においても糖複合体が存在し、線維柱組織における房水流出抵抗に何らかの影響を与えるものと推定している。

本研究では、糖複合体の標識物質として16種類のレクチンを用いて、ウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウスの5種の哺乳動物の線維柱組織におけるレクチン結合性を観察し、組織化学的検索を行った。さらに、5種の哺乳動物の線維柱組織におけるレクチン結合性の種差について検討した。

II 実験方法

1. 研究試料の作製

組織は、雄ウシ(3歳食肉和牛)、雄ブタ(1歳ランドレース種)、雄ウサギ(6か月白色家兎)、雄ラット(10週ウイスター系)、雄マウス(6週BALB/c系)の隅角組織(各5眼)で、屠殺後ただちに4×4mm角の大きさの組織片を作成した。Usuda ら¹⁰⁾の方法に従い4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.4にて4℃にて24時間固定後、0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.4/0.15M NaCl (0.1M PBS)で5分ごと4回洗浄、0.1M リジン/0.1M PBSで60分洗浄し、再び0.1M PBSで5分ごと4回洗浄後、10%蔗糖、

15%蔗糖、20%蔗糖に順次浸透して、nヘキサン/ドライアイスでOCT compound (Miles Inc., Elkhart, USA)に凍結包埋した。クライオスタット (Damon minotome IEC Co. Needham Heights, USA)にて6μmの凍結切片を作製し、ポリ-L-リジンコートスライドグラスに採取した。

2. レクチン染色

染色は、Hsu ら¹¹⁾の方法に従って行った。20mM PBSで洗浄後に16種類のビオチン標識レクチン10μg/mlを60分作用させた。使用したレクチン(生化学工業、東京)は、表1^{5)~7)}で示した如く、ヒマメレクチン(RCA 60, RCA 120)、マッシュルームレクチン(ABA)、タチナタマメレクチン(ConA)、レンズマメレクチン(LCA)、チョウセンアサガオレクチン(DSA)、小麦胚レクチン(WGA)、ニホンニワトコレクチン(SSA)、インゲンマメレクチン(PHA-E₄, PHA-L₄)、ミヤコグサレクチン(Lotus)、イヌエンジュレクチン(MAM)、ピーナッツレクチン(PNA)、ダイズレクチン(SBA)、ハリエンシダレクチン(UEA-I)、ドリコスマメレクチン(DBA)である。20mM PBSで洗浄後、avidin-biotin-peroxidase complex¹²⁾(ABC)試薬(Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA)を30分作用させ、さらに20mM PBSで十分洗浄した後0.05% 3,3'-diaminobenzidine-4 HCl(和光純薬、東京)と0.01% H₂O₂の混合液で10分間発色した後、蒸留水で洗浄し反応を停止した。1%メチルグリーン液で核染色を行い、段階アルコールで脱水しキシレンで処理後、試料をカバーガラスで封入し光学顕微鏡(Optiphot-2, ニコン、東京)にて観察した。対照として、それぞれのレクチンに特異的な0.1Mあるいは0.2Mの濃度の阻害糖(表1)をレクチンを混合して染色に用いた。

III 実験結果

本研究においては5種の哺乳動物の隅角組織における線維柱組織の染色性を中心に観察し、表2の結果を得た。ConAの染色性はウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウスとも線維柱組織は陽性であった(図1)。PHA-E₄, PHA-L₄, WGA, ABA, LCA, RCA 60, RCA 120, DSA, SSAの染色性も同様にウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウスとも線維柱組織は陽性であった。Lotusの染色性はウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウスの線維柱組織が弱陽性であった。MAMはウシ、ブタ、ウサギの線維柱組織が陽性で、ラット、マウスの線維柱組

表 1 使用したレクチンと糖鎖特異性ならびに阻害糖

	レクチン	糖鎖特異性	阻害糖
RCA 60:	<i>Ricinus communis</i> toxin(ricin)(ヒママメ)	Gal β 1-3 GalNAc, Gal β 1-4 GlcNAc	Gal, Lactose
RCA 120:	<i>Ricinus communis</i> agglutinin(ヒママメ)	Gal β 1-4 GlcNAc	Gal, Lactose
ABA:	<i>Agaricus bisporus</i> (マッシュルーム)	Gal β 1-3 GalNAc	Gal, GalNAc
ConA:	<i>Canavalia ensiformis</i> (タチナタマメ)	α -Man, α -Glc	Man, MM, MG
LCA:	<i>Lens culinaris</i> (レンズマメ)	Fuc- α 1-6 GlcNAc	Man, MM, MG
DSA:	<i>Datura stramonium</i> (チョウセンアサガオ)	Gal β 1-4 GlcNAc	Chitooligosaccharide
WGA:	<i>Triticum vulgaris</i> (小麦胚)	GlcNAc	GlcNAc, Chitooligosaccharide
SSA:	<i>Sambucus sieboldiana</i> (ニホンニワトコ)	Sia α 2-6 Gal	Lactose
PHA-E 4:	<i>Phaseolus vulgaris</i> (インゲンマメ) *Erythroagglutinating phytohemagglutinin	bisecting GlcNAc	GlcNAc
PHA-L 4:	<i>Phaseolus vulgaris</i> (インゲンマメ) *Leucoagglutinating phytohemagglutinin	(Gal β 1-4 GlcNAc β 1) ₂ -2, 6 Man α 1	GlcNAc
Lotus:	<i>Lotus tetragonolobus</i> (ミヤコグサ)	α -Fuc	Fuc
MAM:	<i>Macckia amurensis</i> (イヌエンジュ)	Sia α 2-3 Gal	Lactose
PNA:	<i>Arachis hypogaea</i> (ピーナッツ)	Gal β 1-3 GalNAc	Gal, Lactose
SBA:	<i>Glycine Max</i> (ダイズ)	GalNAc α 1-3 Gal	GalNAc
UEA-I:	<i>Ulex europaeus</i> I(ハリエンジダ)	α -Fuc	Fuc
DBA:	<i>Dolichos biflorus</i> (ドリコスマメ)	GalNAc α 1-3 GalNAc	GalNAc

Gal, D-galactose; GalNAc, N-acetyl-D-galactosamine; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; Man, D-mannose; Glc, D-glucose; MM, methyl- α -D-mannoside; MG, methyl- α -D-glucoside; Fuc, L-fucose; Sia, sialic acid

表 2 各種哺乳動物線維柱組織のレクチン染色結果

レクチン	哺乳動物				
	ウシ	ブタ	ウサギ	ラット	マウス
RCA 60	++	++	++	++	++
RCA 120	++	++	++	++	++
ABA	++	++	++	++	++
ConA	++	++	++	++	++
LCA	++	++	++	++	++
DSA	++	++	++	++	++
WGA	++	++	++	++	++
SSA	++	++	++	++	++
PHA-E ₄	++	++	++	++	++
PHA-L ₄	++	++	++	++	++
Lotus	+	+	+	+	+
MAM	++	++	++	—	—
PNA	+	+	+	—	—
SBA	—	—	—	+	—
UEA-I	—	—	—	—	—
DBA	—	—	—	—	—

ブタの線維柱組織を ConA で染色して強陽性の所見を++, 反応陰性の所見を-, 中等度の所見を+と表現した。

組織が陰性であった(図 2)。PNA も染色性がやや弱い
が、同様にウシ、ブタ、ウサギの線維柱組織が弱陽性
で、ラット、マウスの線維柱組織が陰性であった。SBA
の染色性はラットの線維柱組織で弱陽性で、ウシ、ブ
タ、ウサギ、マウスで線維柱組織は陰性であった(図

3)。UEA-I、DBA はウシ、ブタ、ウサギ、ラット、
マウスとも線維柱組織は陰性であった。また UEA-I で
は、人眼の Schlemm 管に相当する aqueous plexus は
染色されず、他のレクチンにおいても特に Schlemm
管内皮のみが特異的に染色される所見は見られなかつ
た。以上の染色性は各眼に個体差は見られなかった。

副所見として、ConA(図 1)では、角強膜、毛様体
もウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウスにおいて染色
されたが、MAM(図 2)では、ウシ、ブタ、ウサギの
角強膜は陰性となり、マウス、ラットでは弱陽性となつ
た。SBA(図 3)では、角膜がウサギで陽性、ウシ、
ラットで弱陽性で、またブタ毛様体が陽性となった。

それぞれのレクチンに特異的な阻害糖を混合して染
色した陰性対照染色においては、染色性が消失ないし
減弱することを確認した。また陽性対照染色として、
線維柱組織がいずれの動物でも陰性であった UEA-I
においてラット小腸の杯細胞が陽性に染色され、DBA
においてはラットの肝臓の胆管上皮が陽性に染色され
るのを確認した^{13)~15)}。

IV 考 按

レクチンは、1888 年 Stillmark により赤血球の植物
凝集素として発見され、1932 年 Sumner⁶⁾によって糖
に対し特異的反応を示すことが発見された。レクチン

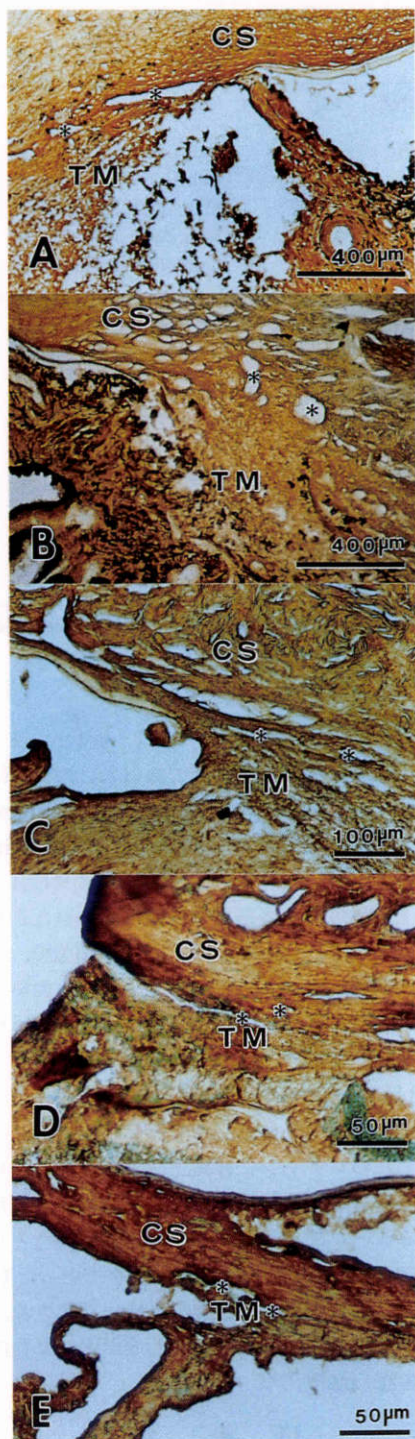


図1 ConA 染色.

線維柱組織 (TM) はいずれも陽性に染色されている.

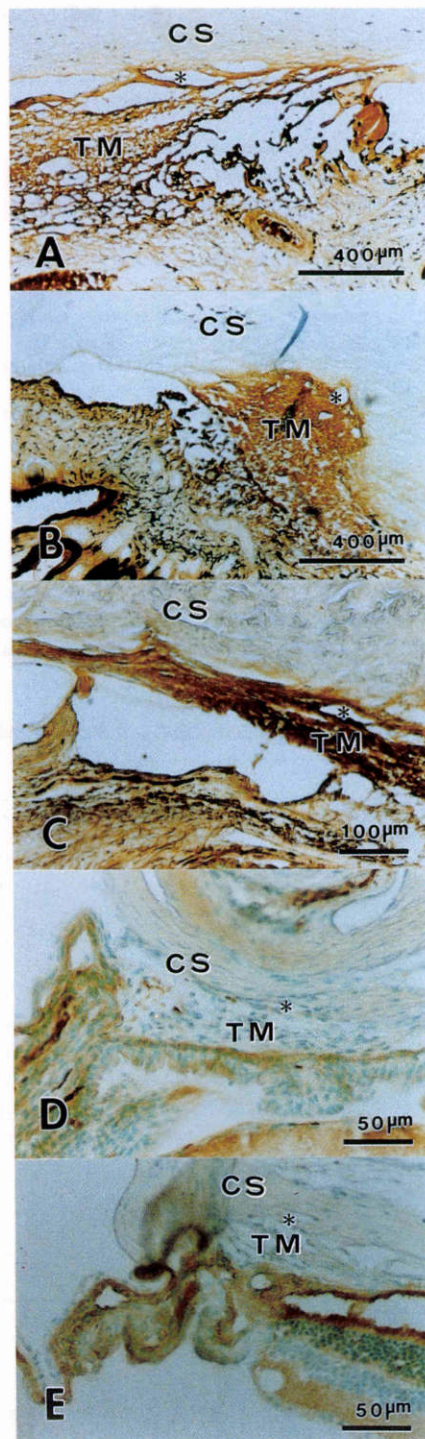


図2 MAM 染色.

ウシ (A), ブタ (B), ウサギ (C) で線維柱組織 (TM) が陽性に染色されている.

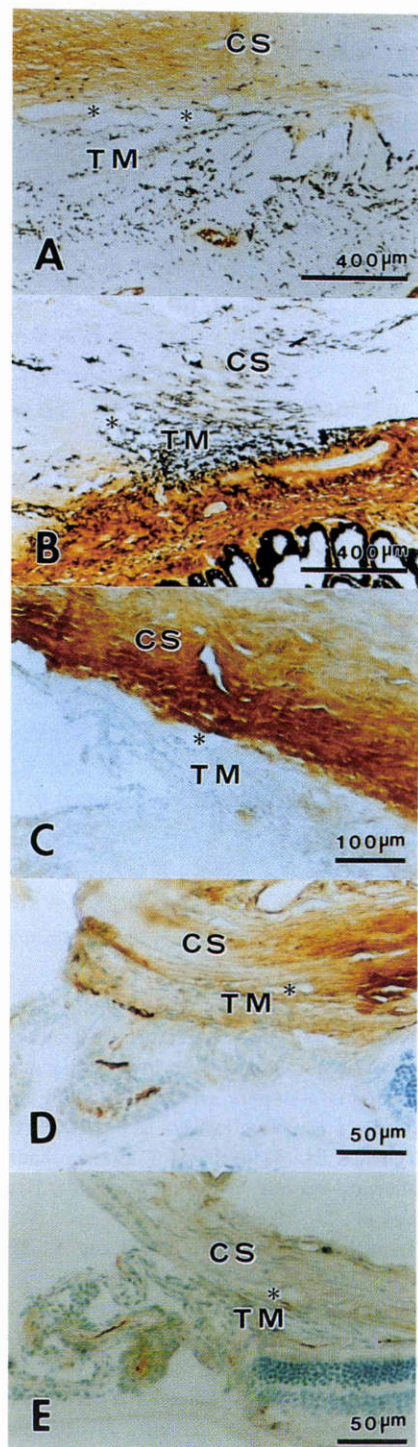


図3 SBA 染色.

ラット (D) で線維柱組織 (TM) が弱陽性に染色されている。

は、細胞を凝集したり糖複合体を沈降させる糖結合性の蛋白もしくは糖蛋白であり、免疫反応以外の産物である。レクチンには特定の糖構造と特異的に結合する特徴があるので、酸素を用いて可視化すれば、組織化学的マーカーとして各レクチンに対応する糖残基を同定することが可能である⁷⁾。

本研究では凍結包埋を行い切片を作製したが、これは反応性を保つためである。包埋法による差については、Bonvicini ら¹⁶⁾が角膜のレクチン染色においてパラフィン切片と凍結切片を比較し両者に差があることを報告し、Panjwani ら¹⁷⁾は格子状変性症角膜のレクチン染色において凍結切片の方がパラフィン切片より結合性が強いことを報告している。Panjwani ら¹⁸⁾は、ウサギの角膜のパラフィン切片において ConA で実質が弱陽性に染色されとしている。今回、副所見で述べたように凍結切片ではウサギ角膜の実質が強陽性に染色されており、凍結切片において反応性がよく保たれていることが示された。本研究においては凍結切片を作製し、ビオチン化レクチンを作用させ ABC 試薬を用いて染色したため、感度の良い染色を得ることができた。この陽性所見は、阻害糖を用いて十分陰性とすることができる。一方、線維柱組織で陰性であった所見については、他の組織を用いて染色を行い過去の報告と同じ陽性所見を得ることができた。感度が高く、陽性、陰性の対照をとともに十分とることができることから、この方法は妥当であると考えた。

Vanden Hoek ら⁴⁾はアラルダイト樹脂包埋して蛍光標識レクチンを用いて検索し、6 週のマウスの線維柱組織が WGA, ConA, RCA 120 に染色されると報告している。林ら¹⁹⁾は、パラフィン包埋し ABC 試薬を用いて検索し、ブタの線維柱組織と Schlemm 管様の脈管は UEA-I において陰性と報告している。本研究では凍結包埋し ABC 試薬を用いているが、マウスの線維柱組織は WGA, ConA, RCA 120 では陽性に染色され、ブタの線維柱組織と Schlemm 管様の脈管は UEA-I では陰性となった。これらのレクチンにおいては、包埋法や染色法が異なっても陽性、陰性の所見は過去の報告と同じ結果となった。

今回使用した各レクチンの特異的糖残基は表 1^{5)~7)}のとおりである。5 種の哺乳動物の線維柱組織がいず

図1~3 A:ウシ, B:ブタ, C:ウサギ, D:ラット, E:マウス, TM:線維柱組織, CS:角強膜, *:aqueous plexus.

れも陽性に染色されたのは、RCA 60, RCA 120, ABA, ConA, LCA, DSA, WGA, SSA, PHA-E₄, PHA-L₄であった。このことから、5種の線維柱組織にはGal β 1-3GalNAc, Gal β 1-4GlcNAc, α -Man, α -Glc, Fuc- α 1-6GlcNAc, GlcNAc, Sia α 2-6Gal, bisecting GlcNAc, (Gal β 1-4GlcNAc β 1)₂-2, 6Man α 1の糖残基が存在するものと考えられた。Lotusは、ウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウスが弱陽性であったことから、 α -Fucの糖残基がやや量は少ないが含有されていると考えられた。以上の糖残基については、種を問わず線維柱組織に存在すると考えた。一方、MAM, PNA, SBAのレクチンについては陽性、陰性の所見が種によって異なり、種差があると考えた。MAMではウシ、ブタ、ウサギに陽性で、ラット、マウスが陰性であったことから、ウシ、ブタ、ウサギの線維柱組織にはSia α 2-3Galの糖残基が存在し、ラット、マウスと種差が存在することが考えられた。PNAではウシ、ブタ、ウサギに弱陽性で、ラット、マウスが陰性であったことから、ウシ、ブタ、ウサギの線維柱組織にはGal β 1-3GalNAcの糖残基が存在し、ラット、マウスと種差が存在することが考えられた。同じGal β 1-3GalNAcの糖残基でもPNAは他の同じ糖残基につくレクチンと染色性が若干異なったが、これはレクチンによる反応性の違いではないかと考えられた。SBAではラットで弱陽性のため、その線維柱組織にはGalNAc α 1-3Galの糖残基がやや量は少ないが存在し、ウシ、ブタ、ウサギ、マウスでは陰性であったことから、この糖残基が存在しないか、あってもごく微量と思われる、両者に種差が存在することが考えられた。UEA-IとDBAは5種とも陰性であり、これらの線維柱組織には α -Fuc, GalNAc α 1-3GalNAcの糖残基が存在しないか、あってもごく微量であると考えた。

表1において示したようにUEA-IとLotusはともに α -Fucの糖残基に反応するが、本研究においてこれら2つのレクチンの結果は異なった。Lotusは、 α -FucのH, Le^a, Le^x構造に反応する²⁰⁾のに対し、UEA-Iは α -FucのH構造のみに反応する²¹⁾ため、認識する α -Fucの属する分子が異なることによると思われる。

人眼の線維柱組織における糖残基について、過去に6種類のレクチンを用いた報告がある。パラフィン包埋しABC試薬を用いる方法で、Rittigら⁸⁾は人線維柱組織では、WGA, ConA, PNAは陽性、SBA, UEA-I, DBAで陰性と報告し、林ら¹⁹⁾も人線維柱組織ではUEA-Iは陰性と報告している。これら人眼における結

果と本研究における他の哺乳動物の結果を比較すると、5種の哺乳動物の線維柱組織の染色性に種差のみられなかったWGA, ConA, UEA-I, DBAのレクチンでは人眼と染色性が同じであった。SBAではラットのみ弱陽性で、ウシ、ブタ、ウサギ、マウスで陰性であった。PNAではウシ、ブタ、ウサギに弱陽性であり、ラット、マウスで陰性であった。これらのことから、人眼との染色結果と本研究結果と比較すると、ウシ、ブタ、ウサギの線維柱組織の糖残基が人眼と類似していると考えられた。本研究においては16種類のレクチンを用いたが、今後、人線維柱組織の染色性についても残り10種類のレクチンについて調べる必要があると思われる。

以上のことから、13種類のレクチンには種差が見られなかったが、SBA, MAM, PNAにおいて種差がみられたことから、5種の哺乳動物の線維柱組織における糖残基は若干の種差が存在していることが判明した。今後、人線維柱組織における糖残基の局在をさらに詳しく検索することによりウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウスのいずれかの隅角組織が人眼に代わる実験モデルとして使用できる可能性が示唆された。

本論文の要旨は、第96回日本眼科学会(1992年5月、横浜)、ならびに第58回中部日本眼科学会(1992年10月、大阪)において発表した。

稿を終えるにあたり、本研究に際し御指導と論文の御校閲をいただいた恩師頼川雄三教授に深謝致します。また、実験の御指導をいただいた本学第一解剖学教室臼田信光助教ならびに同教室員各位に感謝致します。

文 献

- 1) Tripathi RC: Ultrastructure of the exit pathway of the aqueous in lower mammals (A preliminary report on the "angular aqueous plexus"). *Exp Eye Res* 12: 311-314, 1971.
- 2) Tripathi RC, Tripathi BJ: The mechanism of aqueous outflow in lower mammals. *Exp Eye Res* 14: 73-79, 1972.
- 3) Tripathi BJ, Tripathi RC, Yang C, Millard CB, Dixit VM: Synthesis of a thrombospondin-like cytoadhesion molecule by cells of the trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 181-188, 1991.
- 4) Vanden Hoek TL, Goossens W, Knepper PA: Fluorescence-labeled lectins, glycoconjugates, and the development of the mouse AOP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 451-458, 1987.
- 5) 大沢利昭 編: レクチンと細胞生物学。講談社、東京、1985.

- 6) Sharon N, Lis H: Lectins, Chapman and Hall, New York, 1989.
- 7) Spicer SS, Schulte BA: Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. *J Histochem Cytochem* 40: 1-38, 1992.
- 8) Rittig M, Brigel C, Lütjen-Drecoll E: Lectin-binding sites in the anterior segment of the human eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 228: 528-532, 1990.
- 9) Kurosawa A, Elner VM, Yue BYJT, Elvart JL, Tso MOM: Cultured trabecular-meshwork cells: Immunohistochemical and lectin-binding characteristics. *Exp Eye Res* 45: 239-251, 1987.
- 10) Usuda N, Kong Y, Hagiwara M, Uchida C, Terasawa M, Nagata T, et al: Differential localization of protein kinase C isozymes in retinal neurons. *J Cell Biology* 112: 1241-1247, 1991.
- 11) Hsu S, Ree HJ: Histochemical studies on lectin binding in reactive lymphoid tissues. *J Histochem Cytochem* 31: 538-546, 1983.
- 12) Hsu S, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981.
- 13) Roth J: Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin sections. *J Histochem Cytochem* 31: 987-999, 1983.
- 14) Taatjes DJ, Roth J: Selective loss of sialic acid from rat small intestinal epithelial cells during postnatal development: Demonstration with lectin-gold techniques. *Eur J Cell Biol* 53: 255-266, 1990.
- 15) Watanabe M, Muramatsu T, Shirane H, Ugai K: Discrete distribution of binding sites for *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and for peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. *J Histochem Cytochem* 29: 779-790, 1981.
- 16) Bonvicini F, Versura P, Caruso F, Maltarello MC, Caramazza R, Laschi R: Lectin receptors on human corneal epithelium: Visualization by fluorescence microscopy and electron microscopy. *Cornea* 2: 237-241, 1983.
- 17) Panjwani N, Rodrigues M, Free K, Krachmer JH, Albert D, Baum J: Lectin receptors of amyloid in corneas with lattice dystrophy. *Arch Ophthalmol* 105: 688-691, 1987.
- 18) Panjwani N, Moulton P, Alroy J, Baum J: Localization of lectin binding sites in human, cat and rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1280-1284, 1986.
- 19) 林 亜紀, 松田 環, 大舘祐治, 上野脩幸: 人眼・豚眼における線維柱帯, 毛様体筋移行部の微細構造的, 免疫組織化学的, 免疫電顕的研究. *日眼会誌* 96: 941-953, 1992.
- 20) Pereira MEA, Kabat EA: Specificity of purified hemagglutinin (lectin) from *Lotus tetragonolobus*. *Biochemistry* 13: 3184-3192, 1974.
- 21) Pereira MEA, Kisailus EC, Gruezo F, Kabat EA: Immunochemical studies on the combining site of the blood group H-specific lectin I from *Ulex europaeus* seeds. *Arch Biochem Biophys* 185: 108-115, 1978.