

報 文

抗カドミウム-EDTA モノクローナル抗体の作製と結合特異性の評価

俵田 啓¹, 佐々木和裕², 大村 直也², 松本 伯夫², 斉木 博²

Preparation of anti-cadmium-EDTA complex monoclonal antibody and its binding specificity

Kei TAWARADA¹, Kazuhiro SASAKI², Naoya OHMURA²,
Norio MATSUMOTO² and Hiroshi SAIKI²¹ Kansai Electric Power Company, Inc., Environmental Research Center, 3-11-20, Wakaouji, Amagasaki-shi, Osaka 661-0974² Central Research Institute of the Electric Power Industry, Department of Bioscience, 1646, Abiko, Abiko-shi, Chiba 270-1194

(Received 8 April 2003, Accepted 20 June 2003)

To develop a convenient immunoassay for the detection of heavy metals, an anti-cadmium EDTA monoclonal antibody (So26G8) was prepared and characterized for its binding affinities towards other metal complexes with EDTA. The cross reactivities of the antibody for metal free EDTA and its complexes with Ca, Cu, Fe, Hg, Mg, Ni, Pb and Zn were less than 0.73% compared with Cd-EDTA. The equilibrium binding constant (K_A) towards Cd-EDTA was determined to be 5.9×10^{-7} M, and these towards Cu-EDTA, Zn-EDTA and Hg-EDTA were approximately 1.0×10^{-4} M. In addition, EDTA complexes with the other metals and metal free EDTA were 1000-fold or 10000-fold greater than K_A s compared with Cd-EDTA. This antibody can be applied to a kinetic exclusion assay to quantify Cd in the presence of EDTA. The dynamic range of the assay was from 4.5 ppb to 2.8 ppm.

Keywords : anti-cadmium EDTA monoclonal antibody; immunoassay; screening; heavy metals.

1 緒 言

重金属は、その毒性から過去に多くの公害問題の原因となった。更に近年、微量な重金属種による広域な土壌汚染が指摘され、新たな環境問題となっている。汚染の防止と浄化には環境中の重金属種の存在量を調べる必要があり、フレイム原子吸光法や inductively coupled plasma (ICP) 発光分光分析法などの公定法に加え、特に現場にて簡便・迅速かつ高感度に重金属種を検出できる分析法の開発が望まれている。現状の簡易分析法としては比色法が主流であるが、これらの検出限界濃度は 0.1~1 ppm (=mg/l) で

ある。そこで近年、農業¹⁾やポリ塩化ビフェニル²⁾³⁾など環境中の様々な微量化学物質の簡易測定法としてイムノアッセイが注目されている。このイムノアッセイは、生物体内で起こる抗原抗体反応を測定に利用する方法で、抗体が特定の物質に示す結合性を測定に利用することから、簡便で特異性に優れた検出が可能である⁴⁾。

重金属をイムノアッセイによって検出するためには、重金属に結合性を示す抗重金属抗体が必要となるが、これまで原子を直接抗原として結合する抗体は知られていない。しかし、Reardan⁵⁾らによって重金属イオンと配位化合物の錯体に結合性を有する抗体が報告された⁵⁾。続いて Blake⁶⁾⁷⁾らは、重金属錯体とタンパク質の複合体を免疫源として幾つかの重金属抗体を得ている。一方、これらの抗重金属錯体抗体は種々の異なる重金属錯体に対して交差性を示すことも報告されており⁶⁾⁷⁾、複数種の重金属錯体が

¹ 関西電力株式会社総合技術研究所電力技術研究所: 661-0974
兵庫県尼崎市若王子 3-11-20

² 財団法人電力中央研究所我孫子研究所: 270-1194 千葉県我孫子市我孫子 1646

共存する試料を測定する場合には、抗体の結合交差性に起因する擬似陽性反応に十分注意しなければならない。このためには検出を目的とする特定の重金属錯体に対して、できるだけ結合特異性の高い抗体を得ることが肝要であり、同時に抗体の結合特異性を最大限に生かした検出法を採用する必要がある。現在、最も一般的に用いられている酵素免疫測定法は簡便である一方、必ずしも抗体の有する結合特異性を検出に十分利用できていない面も指摘されている^{8)~10)}。最近、著者らは、抗体の結合特異性を理想的に利用できるフロー式蛍光光度計を用いた非競合イムノアッセイ（結合平衡除外）法について報告した¹¹⁾。

この方法は、抗原と抗体の混合液において、抗原抗体反応が抗体自身の結合解離定数に支配されるまで抗体濃度を低減することで、抗体が有する結合特異性を最大限に検出に利用しうる¹¹⁾¹²⁾。そこで著者らはカドミウムを検出しようとするイムノアッセイの構築を目指し、マウスのひ(脾)臓細胞より得られたハイブリドーマをフロー式蛍光光度計により選抜・評価することで、カドミウム-エチレンジアミン四酢酸(EDTA)錯体を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製できたので、その結果について報告する。

2 実験

2.1 試薬

1-(4-Isouthiocyanobenzyl)ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (isothiocyanobenzyl-EDTA) は、同人化学より購入した。スカシガイ由来のヘモシアニン (KLH)、及びニワトリ卵由来のアルブミン (OVA) は、シグマアルドリッチジャパンより購入した。細胞融合に用いたポリエチレングリコールは重合度 1500 のものをルシェより購入した。Hypoxantin aminopterin thymidine (HAT) 培地及び hypoxantin thymidine (HT) 培地は、市販の RPMI1640 液体培地 (Invitrogen 製) に、HAT サプリメント又は HT サプリメント (Invitrogen 製) を適量加えて作製した。カドミウムと EDTA の錯体 (Cd-EDTA) は塩化カドミウム (II) と EDTA ナトリウム塩を混合して作製した。アジュバントはフロイント完全アジュバントを使用し、Difco Laboratories より購入した。

2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) と 2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES) は、同仁化学研究所より購入した。塩化カドミウム (II)、EDTA ナトリウム塩、その他の試薬は市販特級品を用いた。

2.2 Cd-EDTA とタンパク質の複合体の作製

Blake らの方法⁶⁾を若干変更して行った。1 mg の isothiocyanobenzyl-EDTA を 200 μ l の 50 mM MES 緩衝液 (pH 5.0) に溶解した後、10 mM の塩化カドミウム溶液を

200 μ l 加えた。錯体を安定させるために 30 分間放置した後、2 mg/ml のキャリアタンパク質を 1 ml 加えた。これに 10 N (=g 当量/l) ないし 1 N の水酸化ナトリウムを数 μ l 加え、pH を 9.5 に調整した。これを 1 晩かくはんした後、脱塩カラム (エコノパック 10DG カラム, 日本バイオ・ラッド製) で 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) に置換したものを免疫用の抗原とした。キャリアタンパク質として KLH を用いた複合体を免疫に、OVA を用いた複合体をモノクローナル抗体のスクリーニングに用いた。

2.3 抗 Cd-EDTA モノクローナル抗体の作製

2.3.1 マウスの免疫 6 匹の BALB/c A 系統のマウス (雌, 5 週齢, 日本クレア) を 1 週間程度飼育環境に慣らした後、1 回目の免疫を行った。免疫の際は、前述の免疫用抗原と等量のアジュバントを十分に混合して皮下に注射した。注射は 1 回につき 2 か所、100 μ l ずつ行った。2 回目以降の免疫は 2 週間程度おきに 3 回又は 4 回行った。1 回の免疫につき、タンパク量にして約 0.3 mg の抗原を注射した。3 回目の免疫後、4~7 日の間にマウスの尾部より数滴の血液を採取し、血清を調整後、Cd-EDTA-OVA を用いて抗体価を測定し、抗体が作られていることを確認した。

2.3.2 ハイブリドーマの作製 最後の免疫から 4~6 日経過したマウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞とミエローマ細胞 (NS0 株, 理化学研究所製) の融合細胞 (ハイブリドーマ) を作製した。細胞を融合する際は定法¹³⁾に従い、ポリエチレングリコールで脾臓細胞とミエローマを処理した。細胞融合に関する一連の操作は 37°C で行った。

2.3.3 ハイブリドーマの培養 融合処理をした細胞は 6 枚の 96 穴プレートに分注し、37°C, 5% CO₂ に設定されたインキュベータで HAT 培地を用いて培養した。ハイブリドーマの培養は融合後約 2 週間行い、その間、3, 4 日に一度の割合で培地交換を行った。交換する培地は 10 日目前後までは HAT 培地を、その後は HT 培地を用いた。

2.3.4 ハイブリドーマのスクリーニング 抗体生産細胞のスクリーニングには、自動フロー式蛍光光度計 (KinExA 3000, Sapidyn Instrument 製)¹¹⁾¹⁴⁾を用いた。この光度計では、抗体と結合性を有する物質を固定したビーズ担体 (直径 90 μ m) を充填した微小なフロー式検出容器カラムに、抗体を含む溶液を通液することで、液中の未結合抗体の一部をビーズ担体上に捕そくできる。捕そくした抗体は、続いて通液する蛍光標識 2 次抗体によって染色され、その容器内から検出される蛍光強度として定量される。なお、ビーズの充填、溶液の送液、蛍光測定は光度計に接続したパソコンにより自動で行った。Cd-EDTA-OVA 複合体をアガロースビーズ上に固定するために、2

ml のアガロースビーズ (NHS-activated Sepharose, Amersham Biosciences 製) の懸濁液に, 100 μg のカドミウムを配位させた isothiocyanobenzyl-EDTA と OVA の複合体を加えた. この後, ビーズを検出容器内に充填し, ハイブリドーマの培養上清を含む試料溶液を通液した. 続いて, 蛍光物質 Cy5 で標識した二次抗体 (ヤギ抗マウス IgG 抗体, Jackson ImmunoResearch 製) を 2 nM 含む溶液を送液し, 蛍光強度から試料中の抗体の有無を測定した. なお, 抗体を含む試料では高い蛍光強度が観測される. この一次スクリーニングの結果, 抗体の生産が確認されたハイブリドーマについて, 二次スクリーニングを行った. 二次スクリーニングは, 各ハイブリドーマの培養上清を含む試料溶液に Cd-EDTA を 1 μM となるように過剰に加え, 前述と同様な測定を行った. これにより, Cd-EDTA に強い結合性を有する抗体を含む試料では, 溶液中の Cd-EDTA に抗体があらかじめ結合するため, 検出溶液内のビーズ担体に捕そくされにくくなり, 蛍光強度の低下が期待される. よって, 1 次スクリーニングの結果に比し, Cd-EDTA の添加によって蛍光強度の低下したハイブリドーマを陽性として選別した.

2.3.5 ハイブリドーマのクローニング 96 穴プレートの各培養画分には由来の異なる複数のハイブリドーマが含まれている可能性があるために, ゲル状のメチルセルロース HAT 培地 (StemCell Technologies 製) を用いて, ハイブリドーマのコロニーを作製し, 単一細胞に由来する抗体生産細胞を分離した. 抗体を生産していることが特定された 96 穴プレートの培養画分を白金耳でよく混ぜ, プレート底部に付着している細胞をはがした. ここから 100 μl の培養液を 10 ml の新しい HT 培地で希釈した. 希釈した培養液 1 ml を 9 ml のメチルセルロースゲル培地とよく混ぜ, 直径 9 cm のプラスチックシャーレに流し込んだ. 約 10 日後に 30~40 個ほどのコロニーを別個に HT 培地に移し, 更に数日後培養上清中の抗体を蛍光光度計によって測定し, Cd-EDTA を認識する抗体を生産する細胞株を選別した.

2.4 モノクローナル抗体の精製

抗体を含む 10 ml の培養上清を 1 ml のプロテイン A を固定した樹脂 (アフィゲルプロテイン A, 日本バイオ・ラッド製) を充填したカラムに流した. この後, 0.1 M クエン酸ナトリウム溶液 (pH 3.0) を 3 ml 加えて, 抗体を溶出した. 抗体を含む溶出液 3 ml は, 脱塩カラム (エコノパック 10DG カラム, 日本バイオ・ラッド製) を用いて 25 mM, HEPES 緩衝液 (pH 7.0) に置換した.

2.5 抗 Cd-EDTA モノクローナル抗体の評価

2.5.1 結合平衡解離定数の測定 作製した抗体の結合平衡解離定数は, 前述の蛍光光度計⁽¹¹⁾⁽¹²⁾を用いて各種重金属 EDTA 錯体について以下の手順で決定した. 生理食塩水を用いて希釈した精製抗体溶液に, 記載した種々の濃度で各種重金属 EDTA 錯体を個別に添加した. 抗体濃度は 500 pM 以下ですべての抗原抗体混合液について一定とした. これらの抗原抗体混合液を試料とし, フロー式蛍光光度計の検出容器内に充填した Cd-EDTA タンパク質複合体を固定化したビーズに 0.25 ml/min で 100 秒間送液した. これにより, 抗原抗体混合液中において, 抗原と結合していない未結合抗体の一部をビーズ担体上に捕そくした. この後, 2 nM の Cy5 標識したヤギ抗マウス IgG 抗体溶液を 0.25 ml/min で 30 秒間送液し, 捕そくした一次抗体を二次抗体により蛍光染色した. 最後に, 蛍光強度が一定になるまで生理食塩水を 1.5 ml/min で送液した. 残存した蛍光強度から一次抗体を送液する前の蛍光強度を差し引いた値を混合液中の未結合抗体濃度として示した. なお, あらかじめ未結合抗体濃度と残存蛍光強度との間には直線関係が成立することを確認した.

2.5.2 結合解析 結合平衡解離定数は, 下記の式 (1)⁽¹²⁾ から算出した.

式 (1) で, NSB は非特異吸着による蛍光強度値, Sig₀ は抗原不存在下での蛍光強度値, Ab₀ は抗体濃度, Ag₀ は抗原濃度, k は平衡解離定数である. なお, 交差反応性は, 平衡解離定数の百分率として示した.

3 結果及び考察

3.1 ハイブリドーマのスクリーニング

免疫したマウス 1 匹 (合計 6 匹) につき, 96 穴プレート 6 枚のハイブリドーマ培養を得た (合計 36 枚). これらすべての培養について, 一次スクリーニングを行った結果, 抗体生産が見られた陽性は 12 培養であった. 更に二次スクリーニングを行った結果, 6 培養について Cd-EDTA に結合性を示す抗体の生産が見られた. そこで, 陽性の 6 培養について, ハイブリドーマの単一化を行った後, 二次スクリーニングを繰り返した. その結果, すべての単一クローン株において Cd-EDTA に結合性を示す抗体の生産が確認された. これら 6 株のハイブリドーマをそれぞれ So26G8, So25A1, So21D5, So22B11, So24D1, So25H2 と名付けた (以下, 接頭文字の So2 を略す).

3.2 抗 Cd-EDTA モノクローナル抗体の選択

得られた 6 株のハイブリドーマが生産するモノクロー

$$\text{Signal} = \text{NSB} + \frac{(\text{Sig}_0 - \text{NSB}) (k[\text{Ab}_0] - 1 - k[\text{Ag}_0] + \sqrt{k^2[\text{Ab}_0]^2 + 2k[\text{Ab}_0] - 2k^2[\text{Ab}_0][\text{Ag}_0] + 1 + 2k[\text{Ag}_0] + k^2[\text{Ag}_0]^2})}{2k} \quad (1)$$

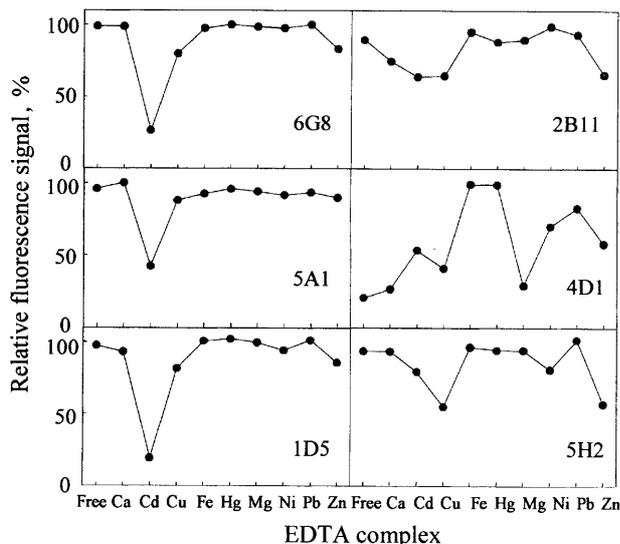


Fig. 1 Immunoassays for metal-EDTA complexes

Antibody was mixed with the 10 μM EDTA coordinating the metal. 'Free' means metal free EDTA. Each caption represents the name of antibody.

ナル抗体について、EDTA 及び Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn との各種 EDTA 錯体への結合性を調べた (Fig. 1).

濃度一定の各抗体溶液に、各金属 EDTA 錯体を個別に 10 μM になるように加えた。この後、各抗原抗体混合液をフロー式蛍光光度計に導入し、液中の未結合抗体濃度を相対蛍光強度として決定した。相対強度は、同時に測定した金属 EDTA 錯体を含まない同濃度の抗体溶液において得られた蛍光強度の百分率として示した。なお、相対蛍光強度は値が低いほど、抗体と金属 EDTA 錯体の複合体濃度が高いことを意味する。実験に供した 6 株のハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体のうち、2B11, 4D1, 5H2 については、蛍光強度の減少から Cd-EDTA 以外の重金属錯体あるいは EDTA について交差反応性が高かった。一方、6G8, 5A1, 1D5 は、調べた重金属錯体と EDTA の中では、いずれも Cd-EDTA に最も強い結合親和性を示した。このことから、これら 3 種の抗体について、更に詳細な結合解析を行った。

3.3 抗 Cd-EDTA モノクローナル抗体の結合解析

精製した 6G8 抗体について、結合平衡除外法¹¹⁾を用いて EDTA 及び各種 EDTA 錯体への結合性を調べ (Fig. 2)、平衡解離定数を決定するとともに交差反応性を算出した (Table 1)。

6G8 抗体の結合平衡解離定数は、Cd-EDTA では 5.9×10^{-7} M, Cu-EDTA, Zn-EDTA, Hg-EDTA では 1.0×10^{-4} M 程度であった。また、これら以外の重金属錯体 (Ca, Ni, Fe, Pb, Mg) では Cd-EDTA に比し、平衡解離定数

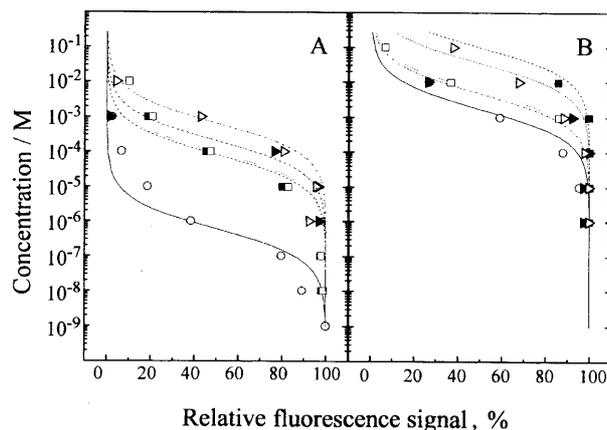


Fig. 2 Immunoassays for metal-EDTA complexes

A: ○, Cd-EDTA; ■, Zn-EDTA; □, Cu-EDTA; △, Hg-EDTA; ▲, Ni-EDTA; B: ○, Fe-EDTA; ■, Pb-EDTA; □, Mg-EDTA; △, Ca-EDTA; ▲, metal free EDTA

Table 1 Binding of So26G8 antibody to EDTA complexes

Complex	$K_d^a)/10^{-6}$ M	Cross reactivity ^{b)} , %
Cd-EDTA	0.59	100
Cu-EDTA	81	0.73
Zn-EDTA	95	0.62
Hg-EDTA	200	0.29
Ni-EDTA	650	<0.1
Fe-EDTA	1700	<0.1
Ca-EDTA	4800	<0.1
Mg-EDTA	5900	<0.1
Free EDTA ^{c)}	35000	<0.1
Pb-EDTA	100000	<0.1

a) K_d is equilibrium dissociation constant; b) Calculated as $100 \times K_d [\text{Cd-EDTA}] / K_d [\text{EDTA complex}]$; c) Free EDTA means metal free EDTA.

に少なくとも 3 けたの差が見られ、EDTA では 4 けたの差があった。よって、本抗体の交差反応性は、Cd-EDTA への結合性に比し、EDTA 及び Ca, Cu, Fe, Hg, Mg, Ni, Pb, Zn-EDTA 各種錯体においてすべて 1% 以下であった。以上より、本抗体が Cd-EDTA に対して高い結合特異性を有することが分かった。1D5, 5A1 抗体についても、同様の測定を行ったが、結果は 6G8 抗体の結果とほぼ一致し、これらの抗体は同一の細胞に由来するサブクローンであると考えられた。

一般に抗体は抗原特異性が高いことが知られている。本抗体においても、遷移金属の II b 族に属すカドミウムと亜鉛の EDTA 錯体との間に平衡解離定数に 100 倍の差が見られた (Table 1)。カドミウム(II) と亜鉛(II) のイオン半径はそれぞれ 0.95 Å と 0.75 Å であり、その差はわずか 0.2 Å であることから、抗体が両金属のイオン半径の違いを認識して結合するとは考えにくい。よって、抗体の結合性の差は、両金属の錯体での全体構造の差に由来すると

推測された。同じ理由で、亜鉛と銅の EDTA 錯体がほぼ同等の平衡解離定数を示すことが予想された。なぜなら、銅(II) のイオン半径は 0.73 Å であり、亜鉛(II) のイオン半径と極めて近いことから、その EDTA 錯体が Zn-EDTA 錯体と構造が非常に似ていることが類推できるからである。また、本抗体はカドミウムと DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) の錯体には、極めて低い結合性 (平衡解離定数 > 1 mM) しか示さなかった (図に示さず) ことから、抗体の結合性には、重金属 EDTA 錯体の構造が重要であると考えられた。なお、Blake らによって報告された抗 Cd-EDTA 抗体 (2A81G5) は、Cd-EDTA と Hg-EDTA にそれぞれ 2.1×10^{-8} M と 2.6×10^{-8} M の解離定数を示し⁶⁾、6G8 抗体よりも結合性に優れていた。しかし、結合特異性は本抗体のほうが優れていた。

Fig. 2 に示した曲線は、それぞれ理論曲線を示している。今回の測定の誤差を検討するために、理論値と実測値の差を 2 乗し、その平均の平方根を求めると、その値は 6.0% となった。但し、金属によって理論式よりも実測値が緩やかに変化するもの (カドミウムなど) と、逆に急峻になるもの (水銀など) があつた。そこで、カドミウムに限って、同様に誤差を求めると 6.8% となった。よって、結合平衡除外法¹¹⁾による本抗体のカドミウム検出下限を理論曲線の相対的蛍光強度が 93.2% を示すときの濃度とすると、カドミウムに対するそれは 0.04 μ M (4.5 ppb) となる。同様に上限は 25 μ M (2.8 ppm) である。このことから、カドミウムの環境基準 (10 ppb)、排水基準 (100 ppb) などの国内の法規制値は本抗体の定量範囲にあるといえる。

また、今回調べた範囲では、Cd-EDTA に対して 1% 以上の交差反応性を示す金属錯体はなく、本抗体がカドミウムを検出する抗体として十分な感度を持つことが推測された。しかしながら、種々の重金属錯体が共存する試料を測定する場合には、抗体の交差反応性に起因する疑似陽性反応に十分注意しなければならない。本抗体は前述のよう

に、既知の抗体に比べて特異性に優れているが、測定には同時に抗体の結合特異性を最大限に生かした検出法を採用する必要がある。本報告で用いた結合平衡除外法¹¹⁾は、抗体が有する結合特異性を最大限に検出に利用しうる¹¹⁾¹²⁾。この点において、結合平衡除外法の採用により、本抗体の有する結合特異性を十分に検出に役立てることができると考えられた。

(平成 15 年 4 月, 日本農芸
化学会において一部発表)

文 献

- 1) 中田昌伸, 大川秀郎: ぶんせき (*Bunseki*), **1999**, 492.
- 2) 牛山正志: ぶんせき (*Bunseki*), **1998**, 736.
- 3) A. J. Schuetz, M. G. Weller, R. Niessner: *J. Anal. Chem.*, **363**, 777 (1999).
- 4) D. S. Hage: *Anal. Chem.*, **71**, 294 (1999).
- 5) D. T. Reardan, C. F. Meares, D. A. Goodwin, M. McTigue, G. S. David, M. R. Stone, J. P. Leung, R. M. Bartholomew, J. M. Frincke: *Nature*, **316**, 265 (1985).
- 6) D. A. Blake, P. Chakrabarti, M. Khosraviani, F. M. Hatcher, C. M. Westhoff, P. Goebel, D. E. Wylie, R. C. Blake: *J. Biol. Chem.*, **271**, 27677 (1996).
- 7) D. A. Blake, R. M. Jones, R. C. Blake, A. R. Pavlov, I. A. Darwish, H. Yu: *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 799 (2001).
- 8) B. Friguet, A. F. Chaffotte, L. Djavadi-Ohanian, M. E. Goldberg: *J. Immunol. Methods*, **77**, 305 (1985).
- 9) T. O'Connor, M. M. Kane, J. P. Gosling: *Biochem. Soc. Trans.*, **23**, 393S (1995).
- 10) T. O'Connor, J. P. Gosling: *Biochem. Soc. Trans.*, **26**, S42 (1998).
- 11) N. Ohmura, S. J. Lackie, H. Saiki: *Anal. Chem.*, **73**, 3392 (2001).
- 12) N. Ohmura, Y. Tsukidate, H. Shinozaki, S. J. Lackie, H. Saiki: *Anal. Chem.*, **75**, 104 (2003).
- 13) 多田伸彦: “モノクローナル抗体作製マニュアル”, p. 40 (1995), (学際企画).
- 14) T. R. Glass, K. Sasaki, N. Ohmura, H. Saiki, K. Tawarada, (投稿中).

要 旨

抗原抗体反応を用いた重金属類の簡易検出法の確立を目指し、カドミウムとエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の錯体を特異的に認識するモノクローナル抗体 (So26G8 株) を作製するとともに、結合平衡除外法により、本抗体の種々の重金属錯体に対する結合特異性を評価した。その結果、本抗体の結合交差性は Cd-EDTA への結合性に比し、EDTA 及び Ca, Cu, Fe, Hg, Mg, Ni, Pb, Zn-EDTA 各種錯体においてすべて 1% 以下であった。なお、結合平衡解離定数は、Cd-EDTA では 5.9×10^{-7} M, Cu-EDTA, Zn-EDTA, Hg-EDTA では 1.0×10^{-4} M 程度であった。また、これら以外の重金属錯体では Cd-EDTA に比し、平衡解離定数に少なくとも 3 けたの差が見られ、EDTA では 4 けたの差があつた。また、本抗体を用いた結合平衡除外法により、EDTA の存在下、0.04 ~ 25 μ M (4.5 ppb ~ 2.8 ppm) のカドミウムを蛍光強度から定量できた。