

スラブ光導波路分光法を用いた固液界面における吸収スペクトルのその場測定

松 田 直 樹

In Situ Observation of Absorption Spectra on Solid/Liquid Interfaces by Slab Optical Waveguide Spectroscopy

Naoki MATSUDA

We have been inventing slab optical waveguide (SOWG) spectroscopy and tried a number of ways to investigate interfacial phenomena involving proteins and dye molecules, particularly adsorption processes. Recently we have developed a cell arrangement wherein a polychromatic light is transmitted within the waveguide using a glycerol drop *in lieu* of conventional prism or grating couplers. In this paper, we reported *in situ* absorbance measurement of adsorption phenomena and in millisecond timescale for probing the kinetics of initial adsorption stage of cytochrome *c* on solid/liquid interfaces. Additionally, the electrochemical activity of surface immobilized cytochrome *c* was investigated from *in situ* absorption spectra obtained using ITO-SOWG spectroscopy.

Key words: slab optical waveguide spectroscopy, solid/liquid interfaces, adsorption phenomena, proteins, cytochrome *c*, ITO electrode, electron transfer reaction

筆者らが開発したスラブ光導波路 (slab optical waveguide: SOWG) 分光法は紫外-可視の広い波長範囲の (白色) 光を同時に伝播させることが可能で, 界面に極微量だけ吸着した物質の吸収スペクトルのその場測定に適している¹⁻²⁶⁾. そもそもスラブ光導波路 (slab optical waveguide: 以下, SOWG と略す) とは平板型の光導波路のことで, 高屈折率 (コア) と低屈折率 (クラッド) の薄膜を組み合わせて構成され, 界面で生じる全反射を利用して光を伝播させている. 情報・通信では遠方まで光透過性を保障するためコアを万遍なくクラッドで覆った光ファイバーを用いているが, SOWG ではエバネセント波を利用するため, 少なくとも試料と接する部分はコアを剥き出しにする必要がある. SOWG は比較的古くから分析化学・表面分析に取り入れられてきたが, 光の屈折や反射を利用する測定法であるため, 従来はレーザーの単一波長の光を用い, その光強度が増加あるいは減少することを利用して表面・界面上あるいはその近傍で起きている現象を検討して

きた²⁷⁾.

Kato らは, 光ファイバーとカップリングプリズムの間にレンズを配置し, 異なる波長の光が異なる角度でカップリングすることを利用して SOWG 内に白色光を導入することに成功した¹⁾. このため, SOWG 表面に単分子層程度の量で吸着した物質の紫外-可視領域の吸収スペクトルのその場測定を行うことが可能になった. また, ほぼ同時期にアリゾナ大学の Saavedra らは, SOWG 上に回折格子を成形し白色光を導入することに成功した^{28,29)}. 従来の SOWG を用いた研究では高感度化を実現するため, あるいは物理化学的に吸着構造・分子配向を検討するため, 例えばイオン交換で表面からごく近い層の屈折率だけ変化したシングルモードの SOWG に単波長の光を導入する方法がおもに用いられてきた. しかし, 近年は徐々に吸収スペクトル測定を行う例も発表されている³⁰⁻³²⁾. また, Ohno らは, エバネセント波が届く 100 nm 程度の距離まで金属電極を接近させ, 金属電極上に吸着した物質の吸収スペク

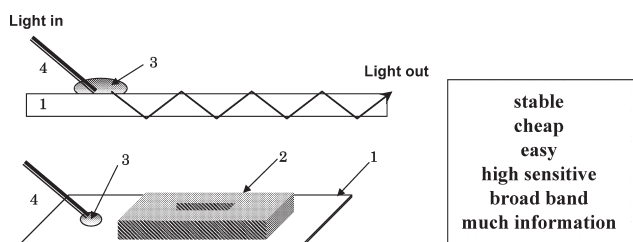


図1 SOWGセル部分の模式図。1：SOWG (50×20×0.05 mm)，2：溶液保持用セル(シリコンラバー製)，3：グリセリンドロップ，4：入射光用光ファイバー。

トルをその場測定できる“非接触型 SOWG 分光法”を開発した^{33,34)}。

一方、Qiらは、SOWG 上に垂らしたグリセリン滴に入射用の光ファイバーを直接挿入し、白色光を SOWG 内に導入した⁷⁾。この方法では、数十 μm 程度の厚みをもつ薄板状のガラスや石英をそのまま SOWG として用いることができる。そのため、SOWG が安価で、イオン交換したものに比べると SOWG ごとの性能の差が小さく、光透過が容易なため実験が簡単で、長時間にわたってドリフトが小さい、などの長所がある。さらに、得られたデータの再現性が向上し高感度化が達成されたため、20 ミリ秒程度の時間分解吸収スペクトル測定を行うことが可能になった。

本稿では、グリセリン滴を用いて最近筆者らの研究グループで開発した SOWG 分光法と、本方法で得られた結果を紹介させていただく。

1. 実験方法

筆者らが開発した SOWG 分光装置に関して、以下簡単に説明する。光源はキセノンランプで、光ファイバーを用いて SOWG まで光を導く。図1は SOWG セル部分の模式図である。SOWG 上に垂らしたグリセリン滴内へ光ファイバーを挿入し、白色光を SOWG 内に入射する。中央部分を切り抜いたシリコンラバー製のセルを SOWG 上に置き、試料溶液を保持させている。開放されているセルの底を介して試料溶液と SOWG が接しており、固液界面を形成している。SOWG のエッジから出た光は対物レンズを通り光ファイバーへ入り、分光器を経て CCD で検出される。SOWG として、例えば 50 μm の厚さのガラスを使用している。

電気化学測定を行う場合、SOWG の片面上に厚さ 20 nm の ITO 層を蒸着して形成し、作用電極として使用した。参照電極は Ag/AgCl、対極は Pt 線である。電極の電位はポテンシオスタット (EG&G Princeton Applied Research 273A) で制御した。試料溶液はチトクローム c (シグマ社

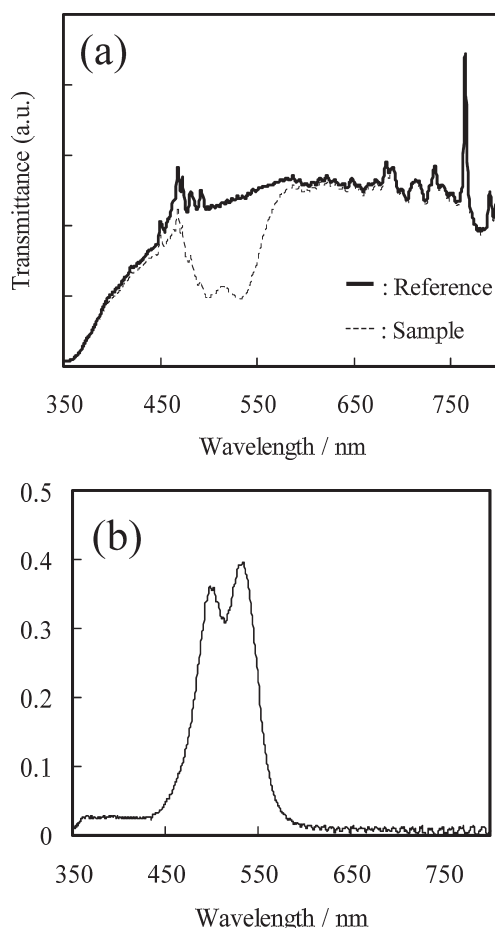


図2 SOWG 吸収スペクトル。(a) SOWG の透過スペクトルの一例、(b) SOWG 分光法で測定した吸収スペクトル。

製)を純水、あるいはリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈して調製した。

通常の透過法による吸収スペクトルの測定には、島津製作所の UV-2100PC を用いた。

図2に SOWG の透過スペクトルを示す。ガラスの SOWG を用いた場合、同時に 350~800 nm 程度の範囲の光を伝播させることができる。実際の測定では、図2 (a) に示したように、SOWG 上に試料が載っていないとき (リファレンス) と載っているとき (サンプル) の2回、SOWG 透過スペクトルを測定する。CCD の各チャンネルごとにランベルト・ベールの法則に従い、

$$A = \log(I_0/I) \quad (1)$$

を計算し、得られた結果を波長に対して表示することで吸収スペクトルを得ている。ただし、 A ：吸光度、 I_0 ：試料が載っていないとき (リファレンス) の透過光強度、 I ：試料が載っているとき (サンプル) の透過光強度である。図2 (b) は、そのようにして得られた、親水性の SOWG で測定

したローダミン 6G (rhodamine 6G: 以下, Rh 6G と略す) の吸収スペクトルである。この例では濃度は $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ である。

波長が大きく異なる場合は, SOWG 内での反射回数, エバネセント波 (電場) の染み込み深さ, および強度分布などが異なるため, 吸光度を比較することに意味はない。また, ある特定波長の吸光度に関しても, 定量的に分析し議論することは非常に困難である。したがって, われわれが吸収スペクトルと称しているデータは非常に定性的な測定結果である。しかし, 紫外-可視の広範な波長領域にわたって吸収スペクトルが測定できるため, 複数の分子や状態が混在していても吸着種がわかるなど, 固液界面に微量存在する物質に関して, 定性的とはいえ他の測定法では得られない情報を得ることができる。特に, 時間分解吸収スペクトル測定から, 吸着に伴うギブスの自由エネルギー変化が得られ, 界面における分子間の相互作用と吸着状態をその場観察しながら決定することができる。

2. 結果と考察

以下, 色素やタンパク質分子を試料として SOWG 分光法による吸収スペクトルのその場測定を行い, その希薄溶液からの吸着過程・状態や電気化学的活性を観察した結果を紹介する。

2.1 色素の吸収スペクトルのその場観察と吸着種の決定

図 3 は, 希薄水溶液からガラス表面に吸着した Rh 6G の吸収スペクトルである^{2,11)}。濃度は $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ で, 支持塩は加えていないため溶媒は純水である。図 3 (a) は, 未処理で親水性の SOWG を用いた結果である。500 および 532 nm に吸収バンドのピークが観察され, 最初は時間とともに吸収強度が増加し吸着量が増加することがわかる。Rh 6G のモノマーは 525 nm, ダイマーは 500 および 535 nm に吸収バンドのピークが存在する。親水性で未処理の SOWG (Bare-SOWG) では, モノマーとダイマーが観察された。一方, オクチルトリクロロシラン (octyltrichlorosilane: OTS) で疎水処理をした SOWG 表面では, 530 nm に吸収バンドのピークと 500 nm にショルダーが観察され, モノマーで吸着している。親水性と疎水性で吸着種が異なる理由として, Rh 6G はカチオン性の色素であり, OTS で表面修飾を施し疎水性が強くなると表面に存在する OH 基の密度が減少し, 界面に存在する Rh 6G からみると対イオンが存在しないため会合することができずモノマーのまま存在する, と考えられる。メチレンブルー (methylene blue: 以下 MB と略す) 等の他のカチオン性色素でも疎水性になるとモノマーの割合が多くなる, とい

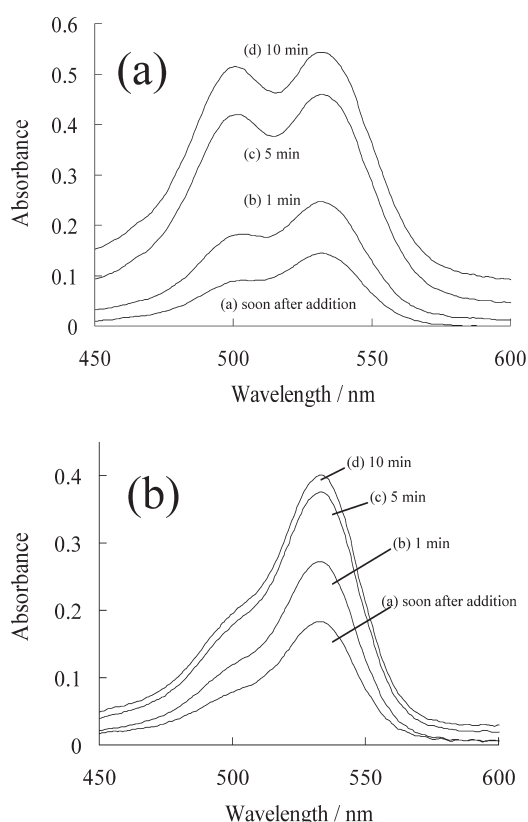


図3 SOWG 分光法で測定した純水中のローダミン 6G (rhodamine 6G: Rh 6G) の吸収スペクトル。濃度は $1 \mu\text{M}$ 。(a) 親水性の SOWG の結果, (b) オクチルトリクロロシランで疎水処理した SOWG の結果。

う同様の傾向が観察された。例えば, MB では親水性の SOWG ではダイマーが, 疎水性の SOWG ではモノマーとダイマーの両方が観察された¹¹⁾。

実験が終了した後, Rh 6G が含まれているセル内の試料溶液を取り出して透過法で吸収スペクトルを測定し, 濃度の減少分から固液界面, すなわち SOWG 表面に吸着した色素の量を見積もると, 単分子層以下程度である。例えば, 色素が $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ 程度含まれた希薄溶液を試料として用いた場合を考える。固液界面に単分子層程度の量で吸着していると仮定すると, エバネセント波が届く固液界面から 100 nm 程度の厚さの層に存在する色素分子の量に比較して, 吸着している色素分子の量のほうが 2~3 桁程度多いため, 結果として溶液中にも同じ分子があるが固液界面に吸着した分子の吸収を選択的に観察している。固液界面に対象物質を吸着させることで, “濃縮” していることになる。したがって, 用いる試料溶液が濃厚になればなるほど, 溶液中に存在する分子の情報を観察していることになる。このように, SOWG 分光法を用いると吸着種がその場観察できる。

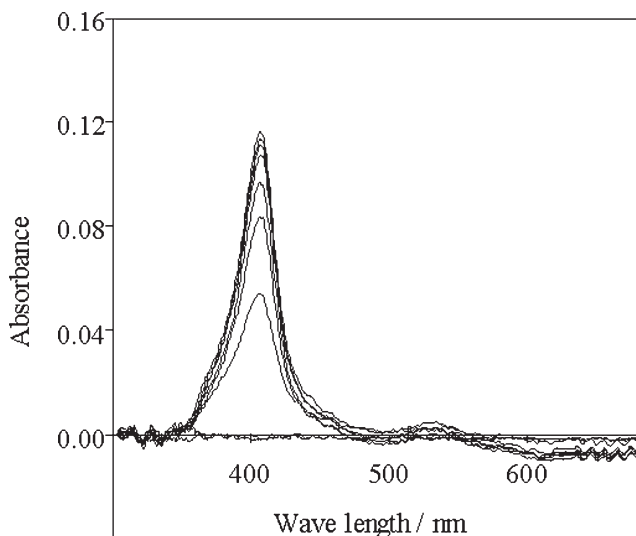


図4 試料溶液をセルに注入後SOWG分光法で1秒おきにその場観察したチトクローム *c* の吸収スペクトル。

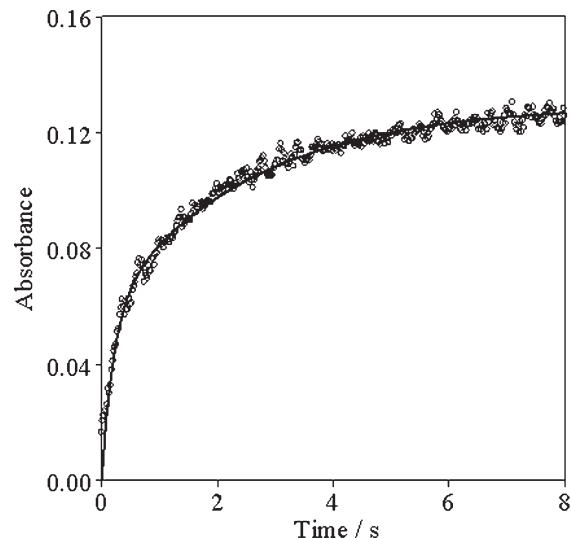


図5 SOWG分光法でその場観察したチトクローム *c* のソーレ帯の吸収ピーク強度の経時変化 (409 nm)。

2.2 タンパク質の固液界面における吸着現象のその場測定

タンパク質は生体内で呼吸や情報伝達に用いられており、従来からその機能を利用しセンサー等への応用が試みられている。そのため、さまざまな手法でタンパク質の基板表面への吸着現象の解明や固定化が試みられてきたが、吸着過程・構造とその機能に関しては不明な点が多い。筆者らは最初、ITO上に固定化したチトクローム *c* 等の電子移動反応をSOWG分光法で得られる吸収スペクトルでその場観察することを試みたが、ITOを用いる電気化学的に制御可能なSOWG分光法の開発が困難であり、意図通りの測定ができなかった。チトクローム *c* 等のタンパク質の吸着に関しては興味をもっていなかったが、実験を繰り返すうちに吸着過程に規則性があることに気づいてきた^{8-10,14}。

図4に、SOWG分光法を用いて測定したチトクローム *c* の固液界面への吸着に伴う吸収スペクトルの経時変化を示す。チトクローム *c* の濃度は $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ で、溶液はリン酸緩衝液である。また、Bare-SOWGを用いている。チトクローム *c* を含む試料溶液をセル内に導入してから7秒後までを1秒ごとに観察した結果である。ソーレ帯のピーク位置は、透過法で測定した溶液中の結果とほぼ一致し、チトクローム *c* が酸化体であるので409 nmである。

筆者らがチトクローム *c*、ヘモグロビン、ミオグロビンを用いて親水性と疎水性のSOWGを用いて吸着過程をその場観察した結果、①単分子層程度の吸着現象は10秒以内で終了する、②吸着に伴い数分以内にタンパク質が構造変化を起こし1分子が占める面積が増加する場合がある、

③吸着に伴うタンパク質の構造変化により、固液界面に吸着したタンパク質上へのタンパク質の吸着が生じる場合がある、等が明らかになり、表面や溶液の状態がタンパク質の吸着挙動に大きく影響することがわかった。

2.3 時間分解吸収スペクトル測定による吸着初期過程

時間分解SOWG分光法を用い数十ミリ秒間隔で連続的にタンパク質の吸収スペクトルのその場測定を行い、ホスト-ゲスト反応を仮定して固液界面に対する吸着現象の初期過程を検討した^{15,19,24}。最初に、チトクローム *c* を用いて20ミリ秒間隔で1つの吸収スペクトルを10秒間程度測定する。次に、各吸収スペクトルのソーレ帯のピーク位置の吸光度を求め時間に対してプロットする。図5は結果を示したもので、点は実測値で、実線は以下の式を用いてフィッティングした結果である。

$$A = A_{\max} [1 - \exp(-t/\tau)] \quad (2)$$

ただし、 A ：その時間での吸光度、 A_{\max} ：平衡後の吸光度、 τ ：時定数、 t ：吸着開始後の時間である。やはり、チトクローム *c* の濃度は $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ で、溶液はリン酸緩衝液で、Bare-SOWGを用いている。Bare- および OTS-SOWG のどちらを用いた場合も、吸収強度の経時変化はこの単純な速度式でよく相関できることがわかった。

また、20ミリ秒間隔で連続的に時間分解吸収スペクトルのその場測定を行い、ヘモグロビンの初期吸着挙動を観察した¹²。濃度は $1.0 \sim 10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ で、溶液はリン酸緩衝液である。ヘモグロビンの吸着ピークは410 nm付近に現れ、2~3秒程度以内に吸光度の増加は終了し平衡に達した。Bare- および OTS-SOWG のどちらを用いた場合も、

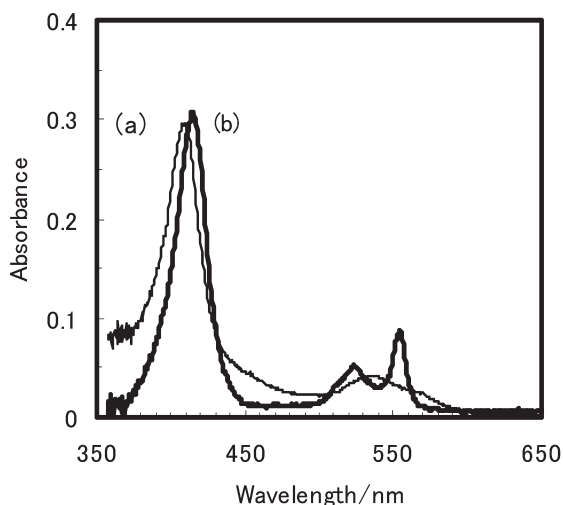


図6 ITO電極上に吸着したチトクローム *c* の吸収スペクトル。(a) 酸化体 (0 V vs. Ag/AgCl), (b) 還元体 (-0.5 V vs. Ag/AgCl)。

得られた数秒間の吸収ピーク強度の経時変化は、式(2)に示した単純な速度式でよく相関でき、吸着の速度定数 (k_1)、脱離の速度定数 (k_2)、吸着の平衡定数 ($K = k_1/k_2$)、ギブスの自由エネルギー変化 ($\Delta G = -RT \ln K$) を得た。これらの結果は、従来から得られている結果とほぼ一致した。現在、1 スペクトルを得る時間 (20~100 ミリ秒) や、速度式で計算する際に吸着開始後どこまでを用いるか (2~10 秒) 等の条件に関してもその影響を詳細に検討している。

2.4 電気化学

チトクローム *c* 等のタンパク質と電極間の電子移動反応に関しては非常に古くから研究が行われてきたが、電気化学的検討からは予想されたような観察結果が得られない例も多くあった。それを克服するため、電極表面を自己組織化単分子膜で被覆し配向状態や吸着構造を制御する、あるいはプロモーターやメディエーターと称される分子を系に加えて電子移動を促進する、といった試みが行われてきた。こうしたことを解明するためにも、単分子層以下の量で電極表面に吸着したタンパク質の電子移動反応をその場観察することは非常に重要である。

最初に、ITO 電極表面上にチトクローム *c* を、その希薄水溶液 ($5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, リン酸緩衝液, pH 7.2) から吸着させた²⁰⁾。ガラスや石英上への吸着では初期の吸着過程の立ち上がりは 10 秒程度と比較的短時間で終了したのに比べ、ITO では 10~60 秒程度かかった。ITO 吸着が終了した後チトクローム *c* 水溶液を捨て、次いでセル中にリン酸緩衝液を入れ洗浄した。この操作により、SOWG セルの溶液内にチトクローム *c* は存在せず、ITO 上に吸着したチト

クローム *c* のみが残っている。

この状態で ITO 電極の電位を 0 および -0.5 V に設定し、吸着したチトクローム *c* の吸収スペクトルを観察すると、電位変化に対応してソール帯の吸収ピークは酸化体と還元体に帰属される 409 nm と 414 nm に観察され、ITO 上に吸着したチトクローム *c* は電気化学的に活性であることがわかった。結果を図 6 に示す。

吸着したチトクローム *c* の電位変化に対する応答性を時間分解 SOWG 分光法を用いて検討するため、ITO 電極の電位をステップ状に変化 (+0.3~-0.6 V) させ、100 ミリ秒ごとに SOWG 分光法による吸収スペクトル測定を行った。電位変化に対応して吸収強度変化は非常に速く終了しており、100 ミリ秒の時間分解能よりも短時間で電子移動反応が起こっていた。

このように、ITO 上に対するチトクローム *c* の反応性に関しても、SOWG 分光法による吸収スペクトルのその場測定から検討を行った。特別な表面修飾等を行わない場合でも、チトクローム *c* の構造と電子移動に関する機能が保持されることが観察された。現在、さらに詳細な検討を行っている。

誌面の都合から、多くの結果を省略し、SOWG 分光法に関して簡潔に紹介させていただいた。説明不足が多くあり、ここに誌面を借りて筆者の力不足を謝罪させていただきたい。

以上述べてきたように、SOWG 分光法は他の表面・界面のその場測定法にはない特徴を有し、吸収スペクトルが観察できるため、得られる情報量が多いのが長所である。一方、測定感度に関しては、例えば表面プラズモンを利用した測定法に比較すると劣っている。しかし、単分子層~単分子層の 10 分の 1 程度の量で存在する吸着物質の測定は十分行うことができるため、固液界面における相互作用の検討等 SOWG 分光法でその場測定できる系は多く存在し、今後ますますの展開が期待される。

思い返してみると、筆者が大学院を修了し工業技術院に職を得た年に SOWG 分光法と出合った。「白色光をカップリングさせるためにプリズムの前にレンズを置く」という加藤さんの発想には、正直驚かされたことを覚えている。筆者は、大学院のときに表面増強ラマン散乱法を用いて、電極/電解質溶液界面の自己組織化単分子膜の吸着構造や光反応性のその場観察をしており、ちょうど、「どうにかして吸着物質の吸収スペクトルをその場測定できないだろうか」と考えていたときであった。また、湿式太陽電池の増感用色素や電極に吸着したタンパク質の電子移動反応に

関する従来から提案されていたモデルに対しても、「本当であろうか」と疑問を抱いていた。「この SOWG 分光法を用いれば簡単かつ直接確かめられるのではないかと、すぐ実験に取りかかった。それから 12 年が経過した。あつという間であった。こうして文章にして振り返ってみると、もっと多くの成果を発表できていたのではないかと後悔ばかりが浮かんでくる。ただ、幸いにも、最初に思いついた発想がそんなに大きくはずれていた訳ではなかった、ということに改めて自信になった。学生時代は落ちこぼれで“バブル”で人がいないから研究職につけたような 12 年前の筆者は、まさか将来自分が SOWG 分光法で総説・解説記事を書くようになるとは考えてもいなかった。まさに SOWG 様々である。

本稿で紹介させていただいた内容は加藤健次さん（産総研計測標準研究部門）、高津章子さん（産総研計測標準研究部門）の両先輩、ならびに祁志美さん（産総研電力エネルギー部門）、ホセ・サントスさん（ブルネイ大学）ほか一緒に仕事をしていただいた多くのポストクの方々との共同研究である。誌面を借りて、心からお礼を申しあげさせていただく。

文 献

- 1) K. Kato, A. Takatsu, N. Matsuda, R. Azumi and M. Matsumoto: "A slap-optical-waveguide absorption spectroscopy of Langmuir-Blodgett films with a white light excitation source," *Chem. Lett.*, **1995** (1995) 437-438.
- 2) N. Matsuda, A. Takatsu and K. Kato: "Absorption spectra of rhodamine 6G by slab optical waveguide spectroscopy," *Chem. Lett.*, **1996** (1996) 105-106.
- 3) K. Kato, A. Takatsu and N. Matsuda: "Photothermal signal detection on the optical waveguide," *Chem. Lett.*, **26** (1997) 583-584.
- 4) N. Matsuda, A. Takatsu and K. Kato: "*In situ* observation of adsorbed heptylviologen cation radicals by slab optical waveguide spectroscopy utilizing indium-tin-oxide electrode," *Chem. Lett.*, **27** (1998) 125-126.
- 5) K. Kato, A. Takatsu and N. Matsuda: "UV-visible slab optical waveguide spectroscopy of cytochrome *c* adsorbed on a liquid-solid interface," *Chem. Lett.*, **28** (1999) 31-32.
- 6) Z.-M. Qi, N. Matsuda, J. H. Santos, A. Takatsu and K. Kato: "Prism-coupled multimode waveguide refractometer," *Opt. Lett.*, **27** (2002) 689-691.
- 7) Z.-M. Qi, N. Matsuda, T. Yoshida, H. Asano, A. Takatsu and K. Kato: "Optical waveguide spectrometer based on thin-film glass plates," *Opt. Lett.*, **27** (2002) 2001-2003.
- 8) J. H. Santos, N. Matsuda, Z.-M. Qi, A. Takatsu and K. Kato: "Effect of surface hydrophilicity and solution chemistry on the adsorption behavior of cytochrome *c* in quartz studied using slab optical waveguide (SOWG) spectroscopy," *IEICE Trans. Electron.*, **E85-C** (2002) 1275-1281.
- 9) J. H. Santos, N. Matsuda, Z.-M. Qi, A. Takatsu and K. Kato: "The adsorption pattern of cytochrome *c*, myoglobin, and hemoglobin in quartz surface detected using slab optical waveguide (SOWG) spectroscopy," *Anal. Sci.*, **19** (2003) 199-203.
- 10) 吉田貴充, 浅野 肇, ホセ・サントス, 祁 志美, 孫 立賢, 高津章子, 加藤健次, 松田直樹: "スラブ光導波路分光法を用いた疎水性表面へのヘモグロビンの吸着現象の検討", *電子情報通信学会論文誌*, **J85-C** (2002) 1070-1074.
- 11) N. Matsuda, J.-J. Zheng, D.-K. Qing, A. Takatsu and K. Kato: "*In situ* absorption spectra and adsorbed species of methylene blue on glass/water interfaces by slab optical waveguide spectroscopy," *Appl. Spectrosc.*, **57** (2003) 100-103.
- 12) T. Yoshida, H. Asano, J. H. Santos, Z.-M. Qi, L.-X. Sun, A. Takatsu, K. Kato and N. Matsuda: "Study of initial adsorption process of hemoglobin to glass surface by using time-resolved slab optical waveguide (SOWG) spectroscopy," *Chem. Lett.*, **32** (2003) 270-271.
- 13) Z.-M. Qi, N. Matsuda, J. H. Santos, K. Itoh, A. Takatsu and K. Kato: "A study of molecular adsorption of bromothymol blue by optical waveguide spectroscopy," *Langmuir*, **19** (2003) 214-217.
- 14) J. H. Santos, N. Matsuda, Z.-M. Qi, T. Yoshida, A. Takatsu and K. Kato: "Experimental evidence of the reversibility of the first stage of protein adsorption at a hydrophobic quartz surface near the isoelectric point," *Surf. Inter. Anal.*, **35** (2003) 432-436.
- 15) 吉田貴充, 浅野 肇, ホセ・サントス, 祁 志美, 孫 立賢, 高津章子, 加藤健次, 松田直樹: "ガラス表面へのヘモグロビン初期吸着過程の Langmuir 吸着等温式を用いた検討", *表面技術*, **54** (2003) 358-362.
- 16) N. Matsuda, J. H. Santos, A. Takatsu and K. Kato: "Spectroelectrochemical studies on surface immobilized cytochrome *c* on ITO electrode by slab optical waveguide spectroscopy," *Thin Solid Films*, **438-439** (2003) 403-406.
- 17) L.-X. Sun, A. M. Reddy, N. Matsuda, A. Takatsu, K. Kato and T. Okada: "Simultaneous determination of methylene blue and new methylene blue by slab optical waveguide spectroscopy and artificial neural networks," *Anal. Chim. Acta*, **487** (2003) 109-116.
- 18) Z.-M. Qi, N. Matsuda, A. Takatsu, K. Kato and H. Isago: "Adsorption of copper tetra-*t*-butylphthalocyanine aggregates from alcoholic solution onto glass observed by optical waveguide spectroscopy," *Appl. Spectrosc.*, **57** (2003) 871-874.
- 19) Z.-M. Qi, N. Matsuda, A. Takatsu and K. Kato: "A kinetic study of cytochrome *c* adsorption to hydrophilic glass by broad-band, time-resolved optical waveguide spectroscopy," *J. Phys. Chem. B*, **107** (2003) 6873-6875.
- 20) N. Matsuda, J. H. Santos, A. Takatsu and K. Kato: "*In situ* observation of absorption spectra and adsorbed species of methylene blue on indium-tin-oxide electrode by slab optical waveguide spectroscopy," *Thin Solid Films*, **445** (2003) 313-316.
- 21) Z.-M. Qi, N. Matsuda, T. Yoshida, A. Takatsu and K. Kato: "Colloidal gold submonolayer-coated thin-film glass plates for waveguide-coupled surface plasmon resonance sensors," *Appl. Opt.*, **42** (2003) 4522-4528.
- 22) Z.-M. Qi, N. Matsuda, A. Takatsu and K. Kato: "*In situ* investigation of coadsorption of myoglobin and methylene blue to hydrophilic glass by broad band time-resolved optical waveguide spectroscopy," *Langmuir*, **19** (2003) 778-784.
- 23) Z.-M. Qi, N. Matsuda, J. H. Santos, T. Yoshida, A. Takatsu and K. Kato: "*In situ* monitoring of metal nanoparticle self-assembly on protein-functionalized glass by broadband

- optical waveguide spectroscopy," *J. Colloid Interf. Sci.*, **271** (2003) 249-253.
- 24) J. H. Santos, N. Matsuda, Z.-M. Qi, T. Yoshida, A. Takatsu and K. Kato: "Time-resolved optical waveguide spectroscopy for studying protein adsorption kinetics," *Mater. Trans.*, **45** (2004) 1015-1018.
- 25) L.-X. Sun, N. Matsuda, A. Takatsu, K. Kato and T. Okada: "Study of adsorption of methylene blue and new methylene blue in liquid-solid interface by slab optical waveguide spectroscopy," *Talanta*, **65** (2005) 1143-1148.
- 26) Y. Ayato, A. Takatsu, K. Kato, J. H. Santos, T. Yoshida and N. Matsuda: "*In situ* observation of the initial adsorption process of heptylviologen cation radicals by slab optical waveguide spectroscopy synchronized with electrode potential modulation methods," *J. Electroanal. Chem.*, **578** (2005) 137-142.
- 27) K. Ito and A. Fujishima: "An application of optical waveguides to electrochemistry: Construction of optical waveguide electrodes," *J. Phys. Chem.*, **92** (1988) 7043-7045.
- 28) D. R. Dunphy, S. B. Mendes, S. S. Saavedra and N. R. Armstrong: "The electroactive integrated optical waveguide: Ultrasensitive spectroelectrochemistry of sub-monolayer adsorbates," *Anal. Chem.*, **69** (1997) 3086-3094.
- 29) A. F. Runge, N. C. Rasmussen, S. S. Saavedra and S. B. Mendes: "Determination of anisotropic optical constants and surface coverage of molecular films using polarized visible ATR spectroscopy: Application to adsorbed cytochrome *c* films," *J. Phys. Chem. B*, **109** (2005) 424-431.
- 30) T. Nagamura, T. Adachi, K. Sasaki, H. Kawai, X.-M. Chen, K. Itoh and M. Murabayashi: "Highly sensitive detection of transient absorption in dye-doped ultrathin polymer films by the TiO₂/K⁺ composite optical waveguide method upon pulsed laser excitation," *Talanta*, **65** (2005) 1071-1077.
- 31) K. Tsunoda, T. Umemura, H. Ueno, E. Okuno and H. Akaiwa: "Adsorption of methylene blue onto silylated silica surfaces, studied using visible attenuated total reflection spectroscopy with a slab optical waveguide," *Appl. Spectrosc.*, **57** (2003) 1273-1277.
- 32) K. Tsunoda, Y. Kasuya, T. Umemura and T. Odake: "A sub-second, time-resolved, linear dichroism measurement system for visible attenuated total reflection spectroscopy with a slab optical waveguide," *Talanta*, **65** (2005) 1097-1101.
- 33) K. Fujita and H. Ohno: "Redox reaction of PEO-modified cytochrome *c* adsorbed on the electrode in ion conductive PEO matrix analyzed with non-contact optical waveguide spectroscopy," *Polym. Advanced Technol.*, **14** (2003) 486-491.
- 34) K. Fujita, K. Taniguchi and H. Ohno: "Dynamic analysis of aggregation of methylene blue with polarized optical waveguide spectroscopy," *Talanta*, **65** (2005) 1066-1070.

(2005年7月11日受理)