皮膚計測技術の進歩と物質の経皮吸収

特集 皮膚バリア機能と皮膚を介するDDSの進歩

高橋元次*

Recent progress in skin bioengineering technique and its application to percutaneous absorption

Many noninvasive techniques to measure skin physiological properties have been developed in skin bioengineering field. They are measurement of water content of stratum corneum, skin surface contour, TEWL (transepidermal water loss), skin color, blood flow, sebum secretion rate and so on. In addition to above methods, recently, a few bio-microscopes which can examine the inside of the skin *in vivo* have been developed and applied to skin absorption of drugs. I describe in this paper the study on drug delivery using *in vivo* confocal Raman microscopy and multiphoton microscopy.

皮膚の生理学的性質を非侵襲的に測定する方法は皮膚計測工学の分野において数多く開発されてきた。それらは角層水分量、肌理、TEWL(経表皮水分蒸散量)、皮膚色、血流、皮脂などであるが、最近、無侵襲で皮膚内部を観察する生体顕微鏡が開発され、物質の経皮吸収測定に活用されている。本稿では、*in vivo* 共焦点ラマン顕微鏡と多光子顕微鏡を用いた測定例について述べる。

Motoji Takahashi*

key words : multiphoton microscopy, in vivo confocal Raman microscopy, skin absorption, noninvasive skin bioengineering method, TEWL (transepidermal water loss)

皮膚の状態を非侵襲で定量的に調べることを目的に皮膚計測工学が皮膚科学領域の一分野として約30年前に確立され、その研究対象は皮膚の物理特性や生理特性から生化学特性まで、すなわち皮膚の力学的、電氣的、温熱的、光学的、音響的特性や、発汗、皮脂分泌、皮膚血流、皮膚組織構造、代謝活性など幅広い。開発された測定法は皮膚科学においては疾病の定量的把握に、また医薬品や香粧品においてはその有効性評価などに活用されている。

表1に示すように、生体計測技術の進歩とともに皮膚生理測定法は大きく変化した¹⁾。たとえば、角層水分量測定においては、以前は皮膚表面の電気特性(コンダクタンスやキャパシタンスなど)から推定していたが、最近では*in vivo* 共焦点ラマン顕微鏡を用いて、角層や表皮、真皮中の深さ方向における水分プロファイルが描かれ、皮膚内各層の水分濃度分布状態がわかり、またこれを利用して化粧品などによる皮膚への水の浸透性(保湿効果)が評価できるようになってきている。また、皮膚内部の観察

においては、超音波やMRIを用いた断層撮影以外に、OCT(optical coherence tomography: 光干渉断層撮影法)、*in vivo* 共焦点レーザー顕微鏡、SHG(second harmonic generation: 第二高調波発生光)顕微鏡、多光子顕微鏡など新しい光学理論を用いた測定法が開発され、皮膚の組織構造だけでなく皮内の成分分析も可能になってきている。

一方、物質の経皮吸収に関しては、皮膚状態との関連性から角層のバリア機能をTEWL(transepidermal water loss: 経表皮水分蒸散量)から測定・評価し、両者の関連性について多くの研究者が検討してきた。しかし、まだ不明な点が多い²⁾。経皮吸収物質の皮内分布を調べるのに、これまでは主に角層のテープストリッピングや皮膚を薄切するなど破壊実験を伴うケースがほとんどで、これらの方法では時間経過を調べるときには異なった試料を用いなければならないこと、また深さ方向(Z-方向)や平面方向(X, Y 方向)における物質の濃度は分析上、領域ごとの平均値でしか求められず、詳細な三次元分布がわからないなどの欠点がある。また、フランツセルによる拡散実験では切除皮膚や培養皮膚モデ

* Shiseido Research Center 資生堂リサーチセンター

表 1 皮膚計測法の変遷

測定項目	第一世代	第二世代	第三世代
皮膚(角層)水分量	電気特性測定 (Skicon, Corneometer)	ATR-FTIR NIR	<i>In vivo</i> 共焦点ラマン顕微鏡
TEWL(バリア機能)	密閉型(Meeco)	開放型 (Evaporimeter, Tewameter) 密閉型(Vapometer)	
皮膚表面形態 (肌理, シワ)	レプリカ二次元画像処理	レプリカ三次元測定 レーザー3D-Profilometer	<i>In vivo</i> 3D 測定 (PRIMOS, Derma-Top Blue)
皮膚粘弾性	歪-応力測定(吸引法: Cutometer, 強制振動法) 機械インピーダンス	共鳴振動法(Venustron) 音響インピーダンス	
皮膚内部構造	超音波断層撮影 MRI	OCT <i>In vivo</i> 共焦点レーザー顕微鏡	<i>In vivo</i> SHG 顕微鏡 <i>In vivo</i> 多光子顕微鏡
皮膚色 色素沈着, 紅斑	L*a*b*表色系, マンセル 表色系(H,V,C)	メラニン, ヘモグロビンの定量 (Mexameter, SIA) メラニンの顔面分布(VISIA)	表皮メラニンの3D分布 (<i>In vivo</i> レーザー共焦点顕微鏡)
皮膚血流	レーザードップラー (点測定)	レーザードップラー レーザースペックル (二次元測定)	OCT/ODT
表皮増殖速度 (代謝活性)	角層ターンオーバー測定 (ダンシルクロライド法, 角層細胞面積法)	<i>In vivo</i> 蛍光スペクトル (トリプトファン, NADPH)	

(高橋元次, 2007¹⁾より改変)

ルを用いるなど, *in vivo* の状態とは異なることなどが指摘されている。

最近では, このような問題点を解決するため上述した光学測定法の活用が検討されている。その結果, *in vivo* で非侵襲的(非破壊的)に吸収物質の皮内深さプロファイルの時間変化(X, Y, Z の三次元+時間軸の四次元変化)が求められるようになってきた。

本稿では, そのなかでも特に *in vivo* 共焦点ラマン顕微鏡, 2光子励起蛍光顕微鏡を用いて物質の経皮吸収を調べた例について述べる。

In vivo 共焦点ラマン顕微鏡を用いたヒトにおける物質の経皮吸収測定

ラマン分光法は光の散乱に基づく分光法で, 入射光として紫外線, 可視光線, 近赤外線などが用いられている。ある物質に振動数 ν_0 の光が照射されると, 入射光と等しい振動数を持つ散乱光(レイリー散乱)以外に振動数が $\nu_0 - \nu$ (ストークス線)あるいは $\nu_0 + \nu$ (アンチストークス線)の弱い光が散乱される。入射光とラマン散乱光の振動数差 ν をラマンシ

フトといい, この値は物質の分子構造に固有である。

したがって, ν を測定することによりどのような物質が存在するかを調べることが出来る。ラマン顕微鏡に共焦点装置をつけることによって皮膚の一定深さにおける成分情報を得ることができ, たとえば, 角層中の遊離アミノ酸や乳酸などの NMF 成分(natural moisturizing factor: 天然保湿因子)や水分の深さ方向における分布などが調べられる。また, 経皮吸収物質が強いラマン散乱を持つ場合には物質の皮内分布測定が可能である。

本章では, はじめに *in vivo* 共焦点ラマン顕微鏡を用いて角層内の NMF や水分を測定した筆者らの研究例³⁾を紹介したあと, グリセリンや DMSO (dimethyl sulfoxide) などの経皮吸収測定にこの装置を活用した例について述べる。

1. 角層中の NMF および水分の測定

市販されている River Diagnostic 社(オランダ)の装置(図 1)を用いた。光源として 671 nm および 785 nm のレーザーを用い, 671 nm では 2,500~4,000 cm^{-1} の高波数領域を調べ, 主に CH_3 , OH を

図1 *In vivo* 共焦点ラマン顕微鏡
薬剤や生体内成分を非侵襲で皮膚深さ方向に分析する。

図3 皮膚のラマンスペクトル解析による水分量の算出
(Caspers PJ et al., 2001)⁴⁾

検出し水分の測定を行った。一方、785 nm では指紋領域とよばれる $400\sim1,800\text{ cm}^{-1}$ を調べ、NMF 成分などの定量化を行った(図2)。皮膚深さ方向の変化については $2\mu\text{m}$ 間隔で測定できる。

湿重量当たりの水分量の測定には CH_3 のピーク面積(図3中 $2,910\sim2,966\text{ cm}^{-1}$ の領域)を蛋白量(P)として、OH のピーク面積(図3中 $3,350\sim3,550\text{ cm}^{-1}$ の領域)を水分量(W)として、Caspers ら⁴⁾の経験式($W/W+2P$)を用いて算出する。またNMF に関しては種々のアミノ酸、ケラチン、乳酸、尿素、セラミドなどを測定して得られたスペクトルを皮膚スペクトルにカーブフィッティングさせてそれぞれの量を求めることが出来る。

図2 ヒト皮膚の *in vivo* 共焦点ラマンスペクトル
a : $400\sim1,800\text{ cm}^{-1}$ (指紋領域)
b : $2,500\sim4,000\text{ cm}^{-1}$ (高波数領域)

図4 *In vivo* 共焦点ラマンスペクトル解析による角層中の水分およびNMFの深さ分布(前腕屈側)

この機器を用いて前腕屈側部の皮膚の深さ方向における水分量およびNMF量変化について調べた結果を図4に示す。水分の分布は、皮膚表面から内部に向かって増加し約 $15\mu\text{m}$ 前後の深さ(角層厚にほぼ相当)から一定になる。この皮膚深さ方向における水分プロファイルは身体各部位によって特徴的に変化し、手掌のように角層の厚い部位では皮膚内部に入っても水分量は少ないことがわかる(図5)。一方、NMFは皮膚表面よりもやや内側に入った点で最も多く、角層の下層に行くに従って低くなる(図4)。

図5 *In vivo* 共焦点ラマンスペクトルによる皮膚水分の深さ分布(部位差)

図6 皮膚水和による水分の経皮吸収

水を充分含浸させたコットンを各15, 50, 90分間、前腕屈側に閉塞状態で接触させ、コットンを外してから3分後に測定した。接触時間の短い間(15分)は角層上層が水和され、時間が長くなる(90分)につれて角層(厚さは15~20 μm 程度)全体に水分が移行しているのがわかる。閉塞90分の結果で表層5 μm くらいまでの水分量が深部に比べて低いのは3分後の測定開始なので、その間に蒸散が起きたものと考えられる。

このように、本機器は皮膚内の物質を深さ方向に非侵襲的に定量できる装置である。

2. 水分の経皮吸収(保湿効果)

水(120 μL)を含浸させたコットン(6×6 mm²)を乾かないよう閉塞状態で前腕屈側に接触させ15, 50, 90分間放置した。コットンを外して3分後に *in vivo* 共焦点ラマン顕微鏡を用いて角層内の水分量を測定し、水の皮内への移動を調べた。結果を図6に示す。

コットンと皮膚との接触時間(水和時間)の短い間(15分)は角層上層が水和され、接触時間が長くな

る(90分)につれて角層(厚さは15~20 μm 程度)全体に水分が移行しているのがわかる。閉塞90分の結果で表層5 μm くらいまで水分量が低いのは3分後の測定開始なので、その間に水の蒸散が起きたものと考えられる。また皮膚水和後の乾燥過程における変化も調べられ、水の吸収-乾燥過程のダイナミクスも検討できる。

3. グリセリンの経皮吸収

この測定装置を用いてグリセリンの経皮吸収性を調べた。まず、測定対象物質(グリセリン)のラマンスペクトル(原スペクトル)を測定する。つぎに、塗布前後において同一部位の皮膚のスペクトルを測定し、両者の差スペクトルを求める。差スペクトルと原スペクトルとを対比させ、どのくらいの深さまで対象物質が検出されているかを調べる。10%グリセリン水溶液を1時間開放塗布すると6~8 μm 程度、皮内に入ることがわかった。

また Zhang ら⁵⁾は、検出力を上げるため重水素化したグリセリンを化粧品処方に配合・塗布したあと、皮膚表面を濡れコットンで拭い、塗布3時間後におけるグリセリンの皮膚(角層)内分布を調べた。その結果を(図7)に示す。8 μm までは明確にグリセリンによるピークが検出でき、この程度までは角層内に入ることが示されている。

4. DMSO の経皮吸収

Caspers ら⁶⁾は DMSO の経皮吸収を調べている。5%プロピレングリコール水溶液に80%のDMSOを溶かした溶液を親指の付け根(手掌)に4 μL 、テンプレートを用いて塗布し自然乾燥させ、皮膚表面を水洗し、塗布後の経過時間によるDMSOの皮内分布の変化を調べた。結果を図8, 9に示す。

図8はDMSO溶液を塗布した皮膚のラマンスペクトル(a)とDMSO溶液のラマンスペクトル(b)を示す。図8aにおいてDMSOに基づくピークにシフトが見られることから(671→677, 702→711, 1,030→1,017 cm^{-1})、DMSOは角層と相互作用を持つことが推察される。

図9は皮膚内の深さ方向におけるDMSO濃度を経過時間で示したものである。図9aから、早い

図7 グリセリンの経皮吸収 (Zhang SL et al., 2005)⁵⁾
重水素化したグリセリンを化粧品に配合・塗布したあと、皮膚表面を濡れたコットンで拭いて測定した。3時間後における皮膚内各深さにおけるスペクトルを調べた結果、皮表から8 μm までグリセリンが検出できた。2,000 cm^{-1} 以上のバンドが重水素化されたグリセリンのC-D伸縮振動

図8 DMSO 溶液を塗布した皮膚のラマンスペクトル (Caspers PJ et al., 2002)⁶⁾

a: 塗布 17 分後における皮下 20 μm でのラマンスペクトル
b: DMSO 試料溶液のスペクトル. 671 と 702 cm^{-1} は CSC, 1,030/1,048 cm^{-1} のブロードなバンドは S=O による. a のピークがシフトしていることから DMSO は皮膚と相互作用していることを示す.

段階で DMSO は角層全体および表皮顆粒層辺りにまで浸透していることがわかる(皮下 120 μm では NMF のシグナルが検出されないのでこの深さでは顆粒層以下と考えられる). 塗布 15 分から 170 分くらいまでは皮膚表面や皮内 30 μm 程度の深さまでの DMSO 濃度が高く, 72 時間後でも角層中に残っている.

5. カフェインの経皮吸収

また Puppels らのグループは, 1.8% カフェイン水溶液および同一濃度のエタノール/水(1:2)溶液 0.5mL を, 1 時間, 前腕屈側に閉塞塗布し, カフェインの経皮吸収挙動を調べている. 結果を図 10 に示す. エタノール/水溶液系のほうが水系よりも 4 倍程度多く角層に浸透することが示されている.

2 光子励起蛍光顕微鏡とそれを用いた物質の経皮吸収測定

従来の蛍光顕微鏡が一つの光子で分子(fluorophores)を励起する(1 光子励起)のに対し, 2 光子励起蛍光顕微鏡とは二つの光子が同時に吸収され,

励起された分子がもとの基底状態に戻るとき放出される蛍光を観察する装置のことである(図 11). 二つの光子が同時に吸収されるため励起光の 1 光子当たりのエネルギーは 1/2 ですむので振動数は 1/2 に, したがって波長は 2 倍になり, 生体の窓(optical window)とよばれる皮膚組織による吸収や拡散が小さい波長領域(700~1,100 nm)の光を励起光として用いることが出来る(図 12).

その結果, 生体の深部まで観察できることや紫外励起で問題となる細胞毒性を防ぐことが出来る. 2 光子吸収は通常では起きず, これを起こすために光源として時間的に非常に短いパルス幅(100 フェムト秒程度: 1fs = 10^{-15} 秒)に圧縮されているレーザーを用いる. 焦点に集光された光は密度が高く, その領域だけでしか 2 光子吸収は起きない(1 個の蛍光分子に 2 個の光子が当たる確率は光子密度の二乗に比例するため 2 光子励起は焦点から外れるに従ってきわめて急速に減衰する)ので, 共焦点ピンホールを用いずに深さ方向における情報を得ることが出来る(図 13).

このように, 焦点の合った位置しか励起されないため, 焦点外での蛍光の退色を防ぐことが出来るな

図9 DMSO 皮内分布の時間変化

(Caspers PJ et al, 2002)⁴⁾

DMSO 溶液塗布後, a: 15~45 分, b: 150~170 分, c: 4 時間, d: 22 時間, e: 48 時間, f: 72 時間. 縦軸は DMSO (677 cm^{-1}) と角層蛋白 ($1,450\text{ cm}^{-1}$) の比を示す.

図10 *In vivo* 共焦点 ラマンスペクトルによる
カフェインの経皮吸収測定

(未発表データ: Puppels GJ, River Diagnostics)

図11 1光子励起と2光子励起の違い

(田邊卓爾・他: O plus E, 5月号, 488-491, 2006)

通常, 蛍光色素は1分子当たり1光子を吸収して励起状態に遷移し, 基底状態に戻る際に蛍光を発する (1光子励起). これに対し, 2光子励起では蛍光色素1分子当たり同時に二つの光子を吸収し励起状態に遷移し, 1光子励起と同様に基底状態に戻る際に蛍光を発する.

図12 主な生体成分の吸収スペクトル

(König K: J Microscopy 200 (Pt 2): 83-104, 2000)

700~1,100 nm の領域の光はメラニンやヘモグロビンの吸収が小さく皮膚の奥深くまで入りやすいので生体の窓と呼ばれている.

図13 1光子励起と2光子励起において
励起される分子の位置の違い

(田邊卓爾・他: O plus E, 5月号, 488-491, 2006)

1光子励起においては焦点外にある分子も励起される. そのため一定深さの位置からの蛍光は共焦点ピンホールを用いて検出する. 一方, 2光子励起では光子密度が充分な焦点近傍のみで起こるため, 共焦点装置を用いなくとも深さ方向の情報が得られる.

図 14 *In vivo* 多光子顕微鏡で撮影されたヒト皮膚水平断面像

(Schenke-Layland K et al., 2006)⁷⁾

2 光子励起 (波長 740 nm) したときの皮膚内成分による自家蛍光画像。焦点位置を皮下 200 μm まで変えて測定した。

表 2 皮膚内在性 fluorophore の励起波長と最大蛍光波長

Fluorophore	Excitation (nm)	Emission (nm)	Fluorescence lifetime (ns)
Keratin		525	
NAD(P)H	340	450-470	0.3
Flavins	370, 450	530	5.2
Melanin	UV/VIS	440, 520, 575	0.2/1.9/7.9
Elastin	300-340	420-460	0.2-0.4/0.4-2.5
Collagen	300-340	420-460	0.2-0.4/0.4-2.5
Collagen SHG	720-960	360-480	0
Lipofuscin	UV/VIS	579-590	
Protoporphyrin IX	405, 630	635, 710	11

(Schenke-Layland K et al., 2006)⁷⁾

カラー 1 PLGA ナノ粒子に包接されたテキサスレッド (TR) の皮内送達状態を示す蛍光顕微鏡画像 (Stracke F et al., 2006)⁸⁾

粒子は 5-fluoresceinamine で蛍光ラベルされている。a, b, c は同一部位の各深さにおける水平断面画像で 4 枚 1 組。a~d の各左上の画像は励起波長 800 nm の 2 光子顕微鏡画像でケラチン(角層)とフルオレセインが観察される。右上, 左下はそれぞれ励起波長が 488 nm, 543 nm で、フルオレセイン(緑), TR(橙)の観察像。右下はフルオレセインと TR を重ねた画像。a の 2 光子励起画像(左上)で中央の黒く見える部分は皮溝。d は皮膚とゲル界面の状態を示す。

どの利点がある。同様に 3 光子や 4 光子励起などもあるが同じ原理で、2 光子励起以上を多光子励起蛍光顕微鏡という。

最近、2 光子励起蛍光顕微鏡を *in vivo* 皮膚組織観察に応用した例が報告されている。Schenke-Layland ら⁷⁾ は、顕微鏡として *DermaInspect* (Jen Lab GmbH, Jena, Germany. 光源はチタンサファイアレーザーで励起波長は 730~970 nm まで可変。パルス幅: 75fs, 繰返し: 80 MHz) を用いて、皮膚各層における水平断面像を調べた。その結果を図 14 に示す。参考のため皮膚内に存在する fluorophore の励起波長と最大蛍光波長を示す(表 2)。また細胞膜や核は蛍光を示さないので暗く見える。

図 14 において、角層ではケラチンによる強い蛍光と六角形を基調とする細胞が観察される。顆粒層

は角層と異なり生細胞で構成されるので、細胞質は NAD(P)H とケラチンによる蛍光によって明るく、また中央の核は暗く見える。また有棘層では核が二つに分裂している像がときどき見られ、細胞の大きさは顆粒層から基底層に向かうに従って小さくなる。基底層ではメラニンによる強い蛍光が観察される。さらに真皮においては、真皮乳頭でコラーゲンやエラスチンが観察され、網状層ではこれらの線維はより鮮明になる。

このように 2 光子励起蛍光顕微鏡では、生体成分特有の蛍光特性を利用して皮膚の三次元構築状態について非侵襲的に細胞レベルの精度で調べることが出来る。さらに、経皮吸収物質として蛍光物質を用いれば、皮膚の構築状態と合わせて物質の皮内分布状態を調べることが可能である。

1. ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(PLGA)ナノ粒子および これに包接されたテキサスレッド(TR)の皮内送達の検討

Stracke ら⁸⁾は、5-fluoresceinamine で標識された PLGA 粒子(50:50 の共重合体、平均粒径が 290 ± 5 nm)にモデル薬剤として TR を封入し Natrosol 水和ゲルに分散させ、これをヒト切除皮膚に塗布し PLGA 粒子および TR の皮膚への移行を調べた。塗布後、スぺーサーをかませてカバーガラスを乗せ、その上から蛍光顕微鏡観察を行った。

320 分後の結果をカラー 1 に示す。図中 a, b, c は、同一部位における皮下 $4 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$, $32 \mu\text{m}$ での蛍光顕微鏡画像である。2 光子励起光として 800 nm のレーザーを照射するとフルオレセインとケラチンが発光する(左上のグレイ画像)。皮膚はケラチンの強い蛍光のため明るく見える。グレイ画像において中央の暗い部分は皮溝で、塗布されたゲルがそこに入り込み、PLGA 粒子が明るく見える(無数の明るいスポット)。同一部位を 488 nm のアルゴンレーザーで照射するとフルオレセインが緑色に発光するので、皮溝に多く粒子が存在するのがわかる(右上のグリーンスケール画像)。543 nm のヘリウムネオンレーザーを用いると TR がオレンジ色に発光し、皮膚(角層)の部分が橙色に見えるので、TR が皮膚に移行しているのが観察される。

このように、ナノ粒子やそれに内包された TR の分布状態が示され、測定画像から以下のようなことがいえる。① TR はナノ粒子から皮内に拡散し皮下 $20 \mu\text{m}$ 程度まで侵入する、② かなりの TR は粒子中に残っている、③ ナノ粒子の皮膚内への移行は起こらない。また彼らは TR とケラチンの蛍光強度比から、ゲル、角層表層、角層深部(あるいは有棘層)における TR 濃度の時間変化を調べている。このように、蛍光顕微鏡(特に 2 光子励起蛍光顕微鏡)を用いてターゲットとなる薬剤に蛍光があれば、皮膚の内部状態と併せてその経皮吸収挙動を直接、*in vivo* で調べることが出来る。

おわりに

光による計測・分析技術は本来、応用物理におけ

る固有テーマであったが、近年では生命科学分野に展開され、皮膚科学の領域においても活用されている。これまで実験室でしか達成できなかった技術が、レーザー光源から撮像素子まで光学デバイスやシステムの開発により市販機器として実用化され臨床現場で使われている。光計測技術の大きな利点は、光バイオプシーともよばれるように無侵襲で皮膚内部の構造解析や成分分析を三次元的(時間変化も含めれば四次元的)に測定できることであり、この利点はヒトで物質の経皮吸収挙動を調べるうえで有用な技術である。

現時点では *in vivo* 共焦点ラマン顕微鏡と多光子励起蛍光顕微鏡が経皮吸収測定に活用されはじめたばかりであるが、今後は新しい測定法も開発され、近い将来 *in vivo* で皮内での代謝過程も検討可能になってくるであろう。

文 献

- 1) 高橋元次: 皮膚の官能特性の評価・測定の進歩. フレグランス・ジャーナル 2月号: 12-17, 2007.
- 2) Levin J, Maibach H: The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *J Controlled Release* 103: 291-299, 2005.
- 3) Egawa M, Hirao T, Takahashi M: *In vivo* estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles obtained with Raman spectroscopy. *Acta Derm Venereol* 87: 4-8, 2007.
- 4) Caspers PJ, Lucassen GW, Carter EA, Bruining HA, Pupples GJ: *In vivo* confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol* 116: 434-442, 2001.
- 5) Zhang SL, Caspers PJ, Pupples GJ: *In vivo* confocal microspectroscopy of the skin: effect of skin care products on molecular concentration depth-profiles. *Microsc Microanal* 11(Suppl 2): 79-791, 2005.
- 6) Caspers PJ, Williams AC, Carter EA, Edwards HGM, Barry BW et al.: Monitoring the penetration enhancer dimethyl sulfoxide in human stratum corneum *in vivo* by confocal Raman spectroscopy. *Pharmaceutical Research* 19: 1577-1580, 2002.
- 7) Schenke-Layland K, Riemann I, Damour O, Stock U, König K: Two-photon microscopes and *in vivo* multiphoton tomographs-powerful diagnostic tools for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58: 878-896, 2006.
- 8) Stracke F, Weiss B, Lehr CM, König K, Schaefer UF, Schneider M: Multiphoton microscopy for the investigation of dermal penetration of nanoparticle-borne drugs. *J Invest Dermatol* 126: 2224-2233, 2006.