



손 은 희

충남대학교병원 신경과

Skin Biopsy and Small Fiber Neuropathy

Eun Hee Sohn

Chungnam National University Hospital, Department of Neurology

Small nerve fibers, C-and A δ -nerve fibers, transmit the signals of pain and temperature and the signals of autonomic nervous system. Routine nerve conduction study which is vital to diagnose the neuropathy could not show the function of small nerve fibers, so it has been hard to diagnose small fiber neuropathy. Skin biopsy and immunohistochemical staining the nerve fibers with anti-Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5) antibody is new emerging method to diagnose small fiber neuropathy by quantifying epidermal nerve fiber density. This method also could be used to quantify the innervation of the dermal autonomic structures.

Key Words: Small fiber, Skin biopsy, Immunohistochemical stain

Introduction

피부조직검사법은 인간의 피부에 존재하는 신경을 관찰함으로써 일반적인 신경전도검사로는 알 수 없는 세신경섬유(small nerve fiber)의 손상 정도를 파악할 수 있는 검사법이다. 따라서 다발성말초신경병을 포함한 여러 말초신경병증(peripheral neuropathy)의 진단과 추적 검사에 이용되고 있다.¹⁻⁷ 피부조직은 피부과에서 일반적으로 사용하고 있는 방법인 편치를 이용하여 얻고, 얻은 조직을 여러 항체를 이용하여 면역조직화학염색법(immunohistochemical stain)으로 염색하여 피부에 존재하는 신경을 관찰한다.^{8,9} 피부조직을 모든 축삭의 표지자인 Protein gene product-9.5 (PGP9.5) 항체로 염색하여 표피내신경(intraepidermal nerve fiber, IENF) 밀도를 분석하는 방법은 시행하는 방법과 임상적 적용에 대한 기준이 제시되었고, 다발성말초신경병증과 세섬유신경병증(small fiber neuropathy, SFN)의 진단에 유용한 방

법으로 추천되고 있다.^{1,7} 본고에서는 피부조직검사의 방법과 이의 다양한 임상적 이용에 대해 알아보고자 한다.

1. 피부의 정상해부

1.1. 표피의 신경섬유

피부는 기저막(basement membrane)을 경계로 표피와 진피로 나뉜다. 표피에 존재하는 신경섬유는 표피의 표면으로부터 1-2 mm 이내의 표층(superficial)진피에서 표피하신경얼기(sub-epidermal neural plexus)로 연결되고 이는 다시 심부진피의 신경얼기를 지나 등신경신경절(dorsal root ganglia)을 통해 척수로 들어간다(Figure 1). 표피와 표층진피에 있는 신경섬유는 대부분 말미가집(unmyelinated) C-신경섬유이거나 직경이 작은 말미가집 A δ -신경섬유로 통각과 온도각을 전달한다고 알려져 있다. 특히 표피에는 자율신경신호를 전달하는 신경섬유는 존재하지 않고, 통각과 온도각을 전달하는 C-신경섬유가 주로 존재한다.

1.2. 진피의 구조물

진피에는 땀샘(sweat gland), 모낭(hair follicle), 털운동근육(arrector pili muscle), 혈관 등 자율신경에 의해 조절되는 여러 구조물이 있다.

Eun Hee Sohn

Department of Neurology Chungnam National University Hospital,
282 Munhwa-ro, Jung-gu, Daejeon 35015, Korea
TEL: +82-42-280-7882 FAX: +82-42-252-8654
E-mail: seh337@daum.net

표층진피에는 상부혈관열기(upper blood vessel plexus)가, 심부진피에는 하부혈관열기(lower blood vessel plexus)가 있고 이 사이에 이들을 연결하는 혈관이 있다. 혈관에 분포하는 신경들이 혈관과 함께 신경혈관다발(neurovascular bundle)을 이루어 같이 주행하고 있다(Figure 1). 모세관(capillary)은 상부혈관열기에서부터 나와 표피에 대해 수직으로 진피유두(dermal papilla)내에 존재한다.¹⁰ 표피로부터 3-5 mm 깊이에 하부혈관열기가 있으며, 주위에 있는 땀샘과 모낭에 혈액을 공급한다(Figure 2,3). 땀샘을 지배하는 신경은 땀샘 전체에 골고루 퍼져 있으며, 땀샘을 지배하는 신경의 대부분이 교감신경계 콜린성섬유이다(Figure 2). 털운동근육과 혈관은 주로 교감신경계 아드레날린성섬유에 의해 지배되고 일부 콜린성섬유가 발견된다(Figure 2,3). 따라서 진피 내 구조물의 신경지배 정도를 정량화하는 방법은 자율신경이상이나 동반된 질환의 진단에 유용한 정보를 줄 수 있다.

2. 표피내신경(IENF) 정량화

2.1. 피부조직검사와 염색방법

조직검사는 검사부위를 국소마취 후 3mm 펀치를 이용하여 시행한다. 합병증은 없으나, 출혈이나 감염이 발생할 수 있어 항응고제 복용 등 출혈성 경향이 있는 경우 주의를 요한다. 상처는 대부분의 경우 7-10일 이내에 호전된다. 다발성말초신경병증이나 SFN과 같이 길이가 긴 신경이 먼저 침범되는 경우는 원위부만을 검사해도 충분하지만, 비대칭적이면서 길이에 따른 차이가 없을 경우 원위부와 근위부를 모두 검사해야 한다. 원위부 검사 부위는 가쪽 복사뼈(lateral malleolus)로부터 상방으로 10 cm 부위를, 근위부 검사 부위는 전장골가시(anterior iliac spine)로부터 하방으로 20 cm의 허벅지 부위를 검사할 것을 권고하고 있다.¹

고정액은 일반적인 조직검사와 달리 2% paraformaldehyde-lysine-periodate (2% PLP) 용액이나 Zamboni 용액(2% paraformaldehyde, picric acid)을 사용하며, 고정액에 조직을 넣어 4°C에서 18~24시간 동안 고정한다. 포르말린 용액을 고정액으로 사용하면 신경섬유가 잘라져 보이는 단점이 있어 사용을 권고하지는 않지만, 연구에 의하면 IENF 밀도에 영향을 끼치지 않는 것으로 보인다.^{11,12} 조직은 고정 후 cryoprotective 용액에 넣어 4°C에서 하룻밤 동안 보관 후, 냉동미세절단기(cryostat)를 이용하여 50 um 두께로 절단한다. 절단된 절편은 PGP9.5 항체를 이용하여 면역화학염

색법으로 염색한다. 염색방법에 따라 광학현미경(bright-field microscope)이나 confocal 현미경을 이용하여 신경을 관찰

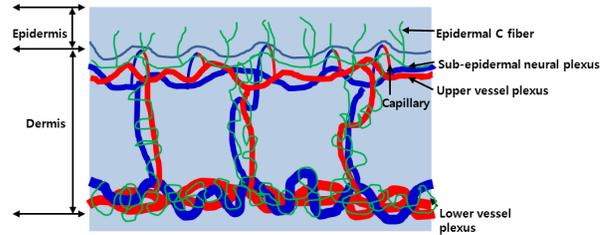


Figure 1. Schematic diagram of dermal vasculature and nerve fibers. Epidermal C fibers are connected with sub-epidermal neural plexuses and deep dermal nerves. Capillaries orient vertical to the epidermal surface from the upper blood vessel plexuses. Lower blood vessel plexuses are located within 3~5 mm from the epidermal surface and supply adjacent sweat glands or hair follicles (nerve fibers in green, arteries in red, veins in blue).

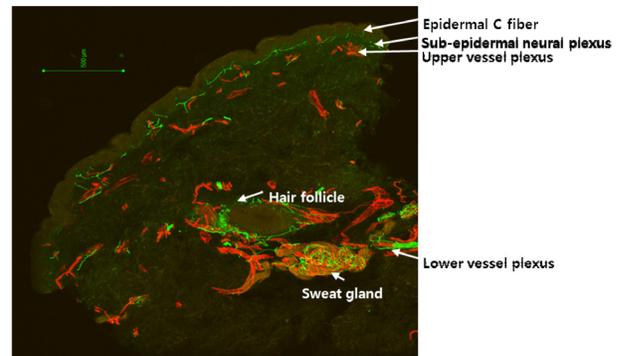


Figure 2. Sample of hair follicle, sweat gland and blood vessels. Epidermal C fiber, sub-epidermal neural plexus and upper blood vessel plexus are located at the superficial dermis. Hair follicle and sweat gland are located near the lower blood vessel plexus. (nerve fibers in green, endotheliums in red).

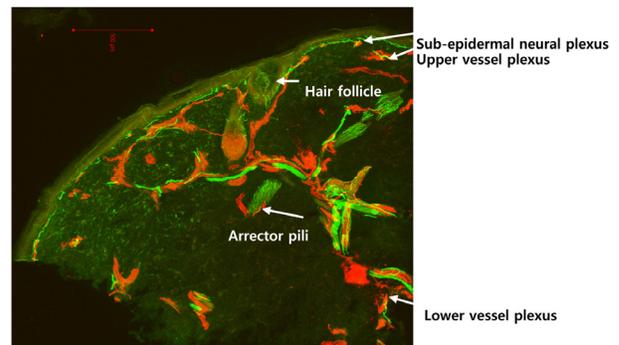


Figure 3. Sample of hair follicle, arrector pili muscle and blood vessels. Epidermal C fiber, sub-epidermal neural plexus, hair follicle and upper blood vessel plexus are located at superficial dermis. Arrector pili muscles are usually located near the hair follicle. (nerve fibers in green, endotheliums in red).

할 수 있다(Figure 4). 광학현미경을 이용하면 신경섬유만을 관찰할 수 있고 다른 구조물과 감별이 어려운 단점이 있지만, 검사과정과 관독과정이 더 쉽기 때문에 임상적인 목적으로는 광학현미경법을 주로 사용한다. Confocal 현미경을 이용하면 신경 외에도 다른 구조물을 같이 관찰할 수 있고, 사용하는 항체의 종류에 따라 신경섬유의 종류도 구별할 수 있기 때문에 연구 목적으로 많이 사용되고 있다.^{1,9,13,14}

2.2. 표피내신경(IENF)밀도 분석

IENF밀도는 IENF 개수를 IENF가 분포한 전체 표피의 길이로 나누어서 계산한다.¹⁷ 절단된 절편 중 양끝은 길이가 짧고 신경분포 관찰에 용이하지 않기 때문에 이를 제외한 가운데 부분의 절편 중 적어도 3개의 절편을 염색하고 분석하여 평균을 구한다. 광학현미경을 사용하여 IENF 개수를 셀 때는 40배의 고배율을 사용하며, 표피와 진피경계선을 지나가는 신경섬유만을 센다(Figure 5). 신경섬유가 표피 내에서 나뉘거나 표피 내에만 있는 경우에는 IENF 개수에 포함시키지 않는다. 계산된 IENF 밀도는 IENF/mm 로 표현된다.

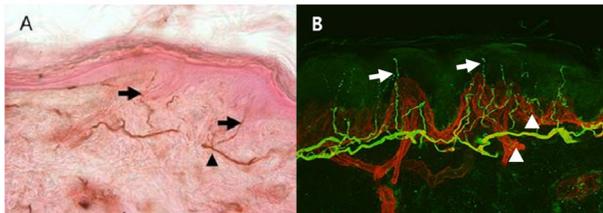


Figure 4. Intraepidermal nerve fibers with anti-PGP 9.5 antibodies. (A) Bright-field microscopy findings. Intraepidermal nerve fibers are stained with anti-PGP 9.5 antibodies (arrow) and sunepidermal neural plexus are indicated with arrow head. (B) Nerve fibers and blood vessels are shown by confocal microscopy. Nerve fibers are stained in green (arrow) and basement membrane and blood vessels are stained in red (arrow head).

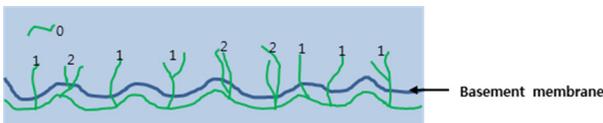


Figure 5. Counting rule of intraepidermal nerve fibers. Diagram of skin innervations shows nerve fibers (green) and basement membrane (dark blue). Nerve fibers which cross the basement membrane are only counted as one nerve fiber. Nerve fibers which branches after crossing the basement membrane or which resides only in the epidermis should be excluded when count the nerve fibers. The epidermal nerve fiber which branches before crossing the basement membrane should be counted as two fibers.

표피의 길이는 프로그램을 이용하여 직접 측정하여 사용하는 것이 원칙이다. 그러나 피부조직검사를 위하여 3 mm 펀치를 이용하므로, 길이를 측정하지 않고 표피의 길이를 3 mm로 추정하여 IENF밀도를 계산한 값도 표피의 길이를 측정하여 계산한 결과와 유사하다는 연구결과도 있다.¹²

IENF밀도는 여성이 남성에 비해 더 높으며, 연령이 증가함에 따라 감소하는 것으로 알려져 있다. 임상에서 주로 사용하고 있는 광학현미경을 이용하여 분석한 IENF밀도의 정상 범위를 Table 1에 나타내었다.^{7,15}

2.3. 표피내신경밀도분석법의 적용 및 제한점

IENF밀도분석법은 신경병증성 통증을 동반하는 SFN의 진단에 중요한 검사법으로 이용되고 있다.^{7,11,16-21} 최근에는 축삭성말초신경병증 외에도 혈관염에 의한 말초신경병증이나 유전성질환의 진단에도 IENF밀도분석법이 사용되고 있다.²²⁻²⁴ 또한 길이에 따른 차이가 보이지 않는 비대칭성말초신경병증에서도 건측과 환측의 IENF밀도를 비교하여 진단할 수 있다.²⁵ 또한 반복적으로 조직검사를 할 수 있기 때문에 치료 효과 판정이나 질환의 진행 정도를 파악하는 데에 사용할 수 있고, 정량적감각검사(quantitative sensory testing) 등 세심유기능을 평가하는 검사를 시행한 부위의 조직을 얻어 IENF밀도를 분석함으로써 두 검사법을 비교하는 연구에 사용하기도 한다.

그러나 IENF밀도분석법은 SFN 증상이 있는 환자에서도 정상인 경우가 있으며,¹⁶ 말초신경병의 원인을 알 수 없다는 제한점이 있다.

3. 진피 구조물 신경분포 정량화

진피의 구조물인 땀샘, 털운동근육 등은 절단된 절편 중 일부에만 존재하고 모든 절편에 균등하게 분포하는 것이 아니기 때문에 이를 정량화하기 위해서는 IENF밀도분석법보다 더 많은 절편을 염색할 필요가 있다.²⁶⁻²⁸

진피의 자율신경에 의해 지배되는 구조물들의 신경분포를 정량화함으로써 SFN뿐만 아니라 자율신경을 침범하는 유전성말초신경병증, 염증성 말초신경병증 등 다른 질환의 진단에 사용되고 있으며, 현재까지 알려지지 않았던 자율신경침범여부를 판단하는 데에 많은 도움을 주고 있다.

3.1. 땀샘 신경분포의 정량화

땀샘은 진피의 구조물 중 가장 복잡하게 신경지배를 받고 있는 구조물이다(Figure 6).²⁹ 이런 복잡한 구조 때문에 땀샘

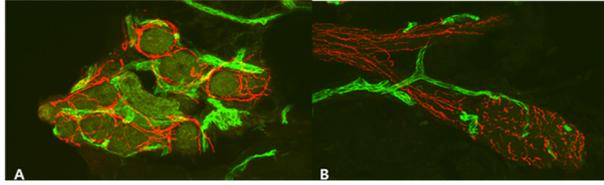


Figure 6. Deep dermal structures stained with anti-PGP 9.5 antibody for nerve fiber and anti-CD31 antibody for blood vessel. (A) Sweat glands are innervated densely and complicatedly. Capillaries are intervened within the sweat glands. (B) Pilomotor nerves innervate the muscle linearly according to the muscle fiber. (nerve fibers in red and blood vessels in green).

Table 1. Normal values of intraepidermal nerve fiber (IENF) density at the ankle

Age (years)	Females (n = 97)		Males (n = 91)	
	0.05 Quantile values per age span	Median values per age span	0.05 Quantile values per age span	Median values per age span
20-29	6.7	11.2	5.4	9.0
30-39	6.1	10.7	4.7	8.4
40-49	5.2	9.9	4.0	7.8
50-59	4.1	8.7	3.2	7.1
60-69	3.3	7.9	2.4	6.3
≥70	2.7	7.2	2.0	5.9

의 신경분포를 정량화하는 방법을 개발하기에 많은 어려움이 있었다. 반정량적분석법이 처음으로 개발되었으나 신뢰도와 재현성이 떨어졌다.^{27,30,31} 이후 광학현미경을 이용하여 분석하는 수기입체분석법(manual unbiased stereological method)과 자동분석법(automated technique)이 개발되었다.^{26,27} 두 가지 방법 모두 당뇨병성 말초신경병증 환자에서 땀샘의 신경지배가 감소하였음을 보여주었고 신뢰도와 재현성이 높아 땀샘 분석에 유용한 방법으로 보인다. 당뇨병성말초신경병 환자와 정상인을 비교한 연구에서 수기입체분석법의 유용성과 신뢰도가 증명되었으며,²⁶ 최근 발표된 당뇨병성말초신경병 진단기준에서 당뇨병성 SFN의 진단을 위해 새롭게 사용할 수 있는 방법으로 제시되었다.³²

3.2. 털운동근육 신경분포의 정량화

털운동근육을 지배하는 신경은 근육의 축을 따라 길게 선형으로 분포되어 있다(Figure 6). 털운동근육의 신경분포를 정량화하는 방법으로 근육을 지나가는 신경의 개수와 근육의 넓이간의 비율을 계산하는 방법이 보고되었고 신뢰도가 입증되어³³ 피부의 아드레날린성 신경지배를 정량화하는 데

에 사용되고 있다.

3.3. α-synuclein 염색

파킨슨병은 초기부터 말초신경계에서도 α-synuclein 병변이 관찰되면서 이를 이용한 임상표지자를 밝히기 위한 여러 연구들이 있어왔다. 최근의 연구에서 파킨슨병 환자의 피부를 α-synuclein에 대한 항체로 염색하여 땀샘과 털운동근육의 신경에 α-synuclein이 침착됨을 발견함으로써, 피부조직검사가 신경계퇴행성질환의 임상표지자로 사용될 수 있음을 보여주었다.³⁴

결론

피부는 자율신경과 함께 세섬유신경을 관찰할 수 있는 주요한 구조물이며, 조직을 얻기가 용이하여 반복적으로 검사가 가능한 비교적 비침습적 검사법이다. 축삭에 대한 항체를 이용한 염색법뿐만 아니라 콜린성과 아드레날린성 신경을 구별할 수 있고, 특정 펩타이드를 가지고 있는 조직도 그에 대한 항체를 이용함으로써 원하는 구조물을 관찰할 수 있는 장점이 있다. 따라서 피부조직검사는 향후 현재까지 밝혀지지 않았던 병의 진행과정을 밝히거나 치료효과를 밝히는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

References

1. Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, et al. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2005;12:747-758.
2. Ebenezer GJ, Hauer P, Gibbons C, McArthur JC, Polydefkis M. Assessment of epidermal nerve fibers: a new diagnostic and predictive tool for peripheral neuropathies. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2007;66:1059-1073.
3. Lauria G, Devigili G. Skin biopsy as a diagnostic tool in peripheral neuropathy. *Nature clinical practice Neurology* 2007;3:546-557.
4. Lauria G, Lombardi R, Camozzi F, Devigili G. Skin biopsy for the diagnosis of peripheral neuropathy. *Histopathology* 2009;54:273-285.
5. Sommer C, Lauria G. Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy. *The Lancet Neurology* 2007;6:632-642.
6. Sommer C. Skin biopsy as a diagnostic tool. *Current opinion in neurology* 2008;21:563-568.

7. Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2010; 17:903-912, e944-909.
8. McCarthy BG, Hsieh ST, Stocks A, et al. Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. *Neurology* 1995;45:1848-1855.
9. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G. Utility of skin biopsy in diabetic neuropathy. *Seminars in neurology* 1996;16: 163-171.
10. Braverman IM. The cutaneous microcirculation. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 2000;5:3-9.
11. Pittenger GL, Ray M, Burcus NI, McNulty P, Basta B, Vinik AI. Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes care* 2004;27:1974-1979.
12. Chai J, Herrmann DN, Stanton M, Barbano RL, Logigian EL. Painful small-fiber neuropathy in Sjogren syndrome. *Neurology* 2005;65:925-927.
13. Di Leo R, Nolano M, Boman H, et al. Central and peripheral autonomic failure in cold-induced sweating syndrome type 1. *Neurology* 2010;75:1567-1569.
14. Donadio V, Nolano M, Elam M, et al. Anhidrosis in multiple system atrophy: a preganglionic sudomotor dysfunction? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2008;23:885-888.
15. Lauria G, Bakkers M, Schmitz C, et al. Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: a worldwide normative reference study. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 2010;15:202-207.
16. Devigili G, Tugnoli V, Penza P, et al. The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology. *Brain : a journal of neurology* 2008;131:1912-1925.
17. Nebuchennykh M, Loseth S, Jorde R, Mellgren SI. Idiopathic polyneuropathy and impaired glucose metabolism in a Norwegian patient series. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2008;15:810-816.
18. Nolano M, Provitera V, Donadio V, et al. Ross syndrome: a lesson from a monozygotic twin pair. *Neurology* 2013; 80:417-418.
19. Nolano M, Provitera V, Perretti A, et al. Ross syndrome: a rare or a misknown disorder of thermoregulation? A skin innervation study on 12 subjects. *Brain : a journal of neurology* 2006;129:2119-2131.
20. Smith AG, Ramachandran P, Tripp S, Singleton JR. Epidermal nerve innervation in impaired glucose tolerance and diabetes-associated neuropathy. *Neurology* 2001;57:1701-1704.
21. Sumner CJ, Sheth S, Griffin JW, Cornblath DR, Polydefkis M. The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurology* 2003;60:108-111.
22. Chao CC, Hsieh ST, Shun CT, Hsieh SC. Skin denervation and cutaneous vasculitis in eosinophilia-associated neuropathy. *Archives of neurology* 2007;64:959-965.
23. Tseng MT, Hsieh SC, Shun CT, et al. Skin denervation and cutaneous vasculitis in systemic lupus erythematosus. *Brain : a journal of neurology* 2006;129:977-985.
24. Nolano M, Manganelli F, Provitera V, et al. Small nerve fiber involvement in CMT1A. *Neurology* 2015;84:407-414.
25. Sghirlanzoni A, Pareyson D, Lauria G. Sensory neuron diseases. *The Lancet Neurology* 2005;4:349-361.
26. Gibbons CH, Illigens BM, Wang N, Freeman R. Quantification of sweat gland innervation: a clinical-pathologic correlation. *Neurology* 2009;72:1479-1486.
27. Gibbons CH, Illigens BM, Wang N, Freeman R. Quantification of sudomotor innervation: a comparison of three methods. *Muscle & nerve* 2010;42:112-119.
28. Wang N, Gibbons CH. Skin biopsies in the assessment of the autonomic nervous system. *Handbook of clinical neurology* 2013;117:371-378.
29. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Brelje TC. Innervation and vasculature of human sweat glands: an immunohistochemistry-laser scanning confocal fluorescence microscopy study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1994;14:6825-6833.
30. Dabby R, Djaldetti R, Shahmurov M, et al. Skin biopsy for assessment of autonomic denervation in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 2006; 113:1169-1176.
31. Dabby R, Vaknine H, Gilad R, Djaldetti R, Sadeh M. Evaluation of cutaneous autonomic innervation in idiopathic sensory small-fiber neuropathy. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 2007;12:98-101.
32. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes care* 2010;33:2285-2293.
33. Nolano M, Provitera V, Caporaso G, Stancanelli A, Vitale DF, Santoro L. Quantification of pilomotor nerves: a new tool to evaluate autonomic involvement in diabetes. *Neurology* 2010;75:1089-1097.
34. Wang N, Gibbons CH, Lafo J, Freeman R. alpha-Synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology* 2013;81:1604-1610.