

피부생검과 말초신경병

서 범 천

성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 신경과

Skin Biopsy and Peripheral Neuropathy

Bum Chun Suh, MD, PhD

Department of Neurology, Kangbuk Samsung Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Skin biopsy is a recently developing tool for neurology. Skin is a very easily accessible human tissue and it is also easy to be used for follow up study. Protein gene product (PGP) 9.5 is a marker for nerve and neuroendocrine cell and is now regarded as pan-axonal marker. In 1990s, skin biopsy protocols using PGP 9.5 antibody for examining intraepidermal nerve fiber density (IENFD) were developed and immunohistochemical fluorescence stain methods with confocal microscopy provided more sophisticated tools for examining dermal adnexa and cutaneous autonomic system. This review might provide introduction to skin biopsy and its application for neurologist.
(J Pain Auton Disord 2016;5:37-41)

KEYWORDS

Biopsy, Nerve fibers, Small fiber neuropathy

서 론

소신경섬유병(small fiber neuropathy)은 주로 직경이 작은 소신경섬유인 A δ (얇은 수초신경) 또는 C(무수초신경) 신경섬유의 말단부위가 손상되는 병이다.¹ 소신경섬유는 통각, 온도감각 등의 체성감각이나 자율신경을 담당하고 병적 상태에서는 타는 듯한 통증, 쏘는 듯한 통증, 이상 감각 등의 증상을 나타낸다. 병소가 소신경섬유에 국한된 경우에는 신경학적 진찰에서 근력 소실이 없고 심부건반사 변화가 없으며 단지 사지 말단 부위에서 통증, 온도감각 저하만 관찰되거나 자율신경 이상이 관찰된다. 또한 신경병 평가에 가장 중요한 신경전도검사는 굵은 직경의 수초신경을 검사하는 방법으로 소신경섬유병의 진단에 사용될 수

없다.² 이렇게 소신경섬유병은 환자의 증상이 의심되더라도 객관적인 검사가 마땅하지 않았기 때문에 과거에는 실체가 불분명한 병으로 간주되기도 하였다.

피부생검은 근래에 신경과 영역에서 사용되기 시작하였으며 소신경섬유병 진단에 최적표준(gold standard)으로 받아들여지고 있다.³ 여러 연구에서 소신경섬유병의 진단에 높은 민감도(74-90%)와 특이도(64-90%)를 보였다.⁴ 증상과 진찰을 통하여 소신경섬유병이 의심되는 경우에 신경전도 검사로 대섬유신경(large fiber) 침범이 없음을 확인한 후 정량적감각검사(quantitative sensory testing, QST) 또는 피부생검을 통한 표피내신경섬유밀도(intraepidermal nerve fiber density, IENFD)검사를 통하여 진단한다.⁵ QST가 환자의 주관적 판단에 의지하는 검사이고 인지기능이나 의식이 저

Received: December 8, 2016 / Revised: December 16, 2016 / Accepted: December 16, 2016

Address for correspondence: Bum Chun Suh, MD, PhD

Department of Neurology, Kangbuk Samsung Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, 29 Saemunan-ro, Jongno-gu, Seoul 03181, Korea
Tel: +82-2-2001-1938, Fax: +82-2-2001-1284, E-mail: bcsuh@skku.edu

하된 환자에 적용할 수 없는 한계가 있는 반면에 피부생검을 통한 IENFD의 확인은 이러한 제한점이 없어서 좀 더 객관적이라고 할 수 있다. 또한 최근에는 표피에 국한된 연구뿐만 아니라 진피의 구조를 이용한 다양한 연구가 진행되고 있어서 신경과 영역에서 사용 범위가 넓어지고 있다.^{6,7} 본문에서는 피부생검에 대한 소개와 말초신경병에서의 역할에 대하여 기술하고자 한다.

본 론

1. 역사

1852년에 Kölliker와 Wagner, Meissner가 사람의 피부 감각신경 말단에 대하여 처음 기술하였다. 당시에는 감각신경 말단이 모세혈관과 유사하게 고리를 형성하며 진피유두(dermal papillae)에서 끝난다고 생각하였으나 1868년에 Paul Langerhans는 감각신경 말단이 분지를 하고 진피-표피 경계를 지나 표피에도 존재함을 보고하였다. 당시 제시하였던 표피내신경 그림은 현재 시행하고 있는 피부생검을 통한 표피내신경의 사진과 유사하다(Fig. 1).⁸ Silver, methylene blue, gold chloride impregnation 등 신경조직을 염색하는 여러 방법이 개발되었다. 그러나 피부 소신경섬유는 보호되지 않는 자유말단(free ending)을 갖는 특성이 있어서 염색을 위하여 피부 조직을 다룰 때 손상되기 쉬웠고 민감도가 낮은 문제가 있었다.^{8,9}

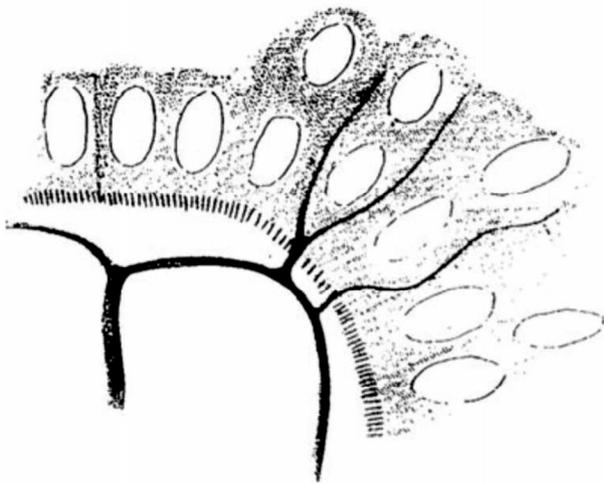


Figure 1. Paul Langerhans' drawing of cutaneous nerve fiber published in 1868. Intraepidermal nerve fibers arise from subepidermal neural plexus and pierce dermo-epidermal junction to enter the epidermis.

현재 신경과 영역에서 사용하는 피부생검은 protein gene product (PGP) 9.5가 발견된 이후 시작되었다. PGP 9.5는 ubiquitin C-terminal hydrolase 1 (UCHL-1)으로도 알려져 있으며 1983년에 척추동물에서 신경세포와 신경내분비세포에 매우 선택적으로 발현되는¹⁰ 새로운 표지자(marker)로 보고 되면서 주목 받기 시작하였고 현재는 pan-axonal marker로 받아들여지고 있다. 1990년대에 들어서면서 PGP 9.5 항체를 이용한 표피내신경조직에 대한 면역화학염색이 개발된 후 연구가 활발해 지기 시작하였고¹¹⁻¹³ Kennedy 등은 면역화학 형광염색(immunohistochemical fluorescence stain) 후 동일초점 현미경(confocal microscope)을 이용하여 표피내신경섬유뿐만 아니라 땀샘, 모낭, 혈관 등의 진피 구조물을 관찰하였다.¹² 최근에는 진피내 자율신경 구조물인 땀분비신경(sudomotor nerve), 털운동신경(pilomotor nerve) 등에 대한 정량적 검사 방법도 개발되었고 α -synuclein에 대한 염색법도 개발되어 피부생검을 통해 파킨슨병을 포함한 α -synucleinopathy에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다.^{7,14-17}

2. 피부의 신경 구조

피부의 신경은 감각신경과 자율신경으로 이루어져 있으며 90%가 무수초신경이다.⁹ 유수초신경은 A δ 신경섬유이고 예리한 통각(sharp pain)과 냉감각(cold impulse)을 전달한다. 무수초신경은 C 신경섬유로 가장 가는 신경이며 느린 통각(slow pain)과 온감각(warm sensation)을 담당한다. 신경섬유가 진피-표피 접합부의 기저막을 지나면 더 이상 슈반세포가 신경섬유를 감싸지 않으며 표피에는 감각을 담당하는 C 신경섬유만 있고 자율신경섬유는 없다.⁹ 표피의 신경은 표피하신경얼기(subepidermal neural plexus)에서 유래하고 표피하신경얼기 부근에 표재혈관얼기가 있다. 표재혈관얼기에서 모세혈관이 유래하며 진피유두에서 고리를 형성하지만 진피를 벗어나지는 않기 때문에 표피에는 혈관 구조가 없다.¹⁸ 진피의 좀 더 깊은 부분에는 모낭, 털세움근(arrector pilli muscle), 땀샘, 혈관 등의 부속기관이 위치하며 이 부분에는 자율신경이 분포한다.⁷

3. 피부생검 및 염색

피부생검은 직경 3 mm (2-5 mm)의 일회용 펀치생검(punch biopsy)을 이용하며 IENFD 검사만 필요한 경우에는 3-4 mm 깊이로 생검하고 모낭, 땀샘, 혈관 등의 검사를 위해서는 깊은 생검(6-8 mm)을 하는 것이 유리하다.^{3,5} 국소마

취 후 생검을 진행하고 대개 봉합은 필요하지 않으며 7-10 일 경과되면 생검부위가 아물게 된다. 부작용은 감염, 출혈 등이 있지만 빈도는 매우 적다.⁵ 생검부위는 hairy skin인 가쪽복사(lateral malleolus) 상방 10 cm 부위가 가장 많이 선택되며 근위부로는 가쪽 무릎 상방 10 cm, 골반 하방 10-20 cm 등의 부위가 많이 사용되는데 연구 목적에 따라 이외에도 다양한 생검부위를 선택할 수 있다.^{4,5}

피부조직을 떼어내면 바로 찬 고정액에 담근 후 4°C에서 약 24시간 동안 보관한다. 고정액은 광학현미경(bright-field microscopy)을 사용하는 경우에는 2% paraformaldehyde-lysine periodate (2% PLP) 또는 Zamboni (2% paraformaldehyde, picric acid) 고정액을 사용하고 indirect immunofluorescence를 사용하는 경우에는 Zamboni 고정액을 사용한다. 이후 냉동상해 방지용액(cryoprotectant solution)에 담가서 -20°C 이하에서 보관하고 미끄럼절단기(sliding microtome)를 이용하여 50 μm 두께로 피부조직을 자른다. 이런 과정을 통하여 고정된 한 개의 피부조직에서 약 50개의 피부 조직 샘플을 얻을 수 있으며 냉동상해방지용액에서 장기간 보관이 가능하다.^{3,5,7,9,19}

50 μm의 두꺼운 조직을 사용하기 때문에 자동 염색을 이용할 수 없고 자유부유법(free floating method)을 이용한 면역조직화학염색을 한다. 조직의 염색은 광학현미경을 위해서는 PGP 9.5 항체만 사용하고 면역화학형광염색을 하는 경우에는 PGP 9.5 항체 이외에 1-3개의 항체를 추가로 사용하여 기저막, 혈관, 교감신경, 부교감신경, α-synuclein 등에 대한 염색이 가능하다. 단일 항체 염색(PGP 9.5)과 이중 염색(double stain)에는 2일이 소요되며 삼중 염색(triple stain)의 경우에는 3일이 필요하다.^{3,5,7,9,19}

편치생검보다 덜 침습적인 방법으로 물집방법(blister technique)이 있다. 2-3 mm의 구멍이 있는 캡슐을 피부에 부착하고 음압을 걸어서 표피만 얻는 방법으로 표피에는 혈관이 없기 때문에 출혈이 없고 국소마취제를 사용하지 않는 장점이 있다. IENFD를 구하는 데 사용할 수 있지만 진피의 구조(땀샘, 털세움근, 혈관 등)를 확인할 수 없고 조직을 얻는데 걸리는 시간이 45분에서 2시간 30분 정도로 오래 걸리는 단점이 있다.^{9,20}

4. 말초신경병과 피부생검

IENFD를 확인하기 위해서는 적어도 3개 이상의 연속되지 않는 피부절편을 검사해야 한다. IENFD는 고배율(x40)에서 mm 당 진피-표피 경계부위 기저막을 지나가는 신경 섬유 수로 나타낸다(IENFD/mm). 경계부위에 닿았지만

표피로 진입하지 않았거나 표피 내에서 분지한 섬유는 세지 않으며 진피-표피를 지나간 것을 확인할 수 없고 표피 내에만 신경섬유가 관찰되는 경우에도 세지 않는다(Fig. 2).^{4,5,9} 피부조직의 길이는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 측정하기도 하고 간단히 편치생검의 직경인 3 mm로 간주하여 센 신경수를 3으로 나누기도 한다. 기준값은 각 검사실 별로 가지고 있는 것이 좋지만 피부생검을 전문적으로 시행하는 센터가 아니면 현실적으로 어려운 일이며 보고된 정상값을 활용하게 된다. 광학현미경 면역화학검사 방법에서 보고된 기준값은 13.8±6.7/mm (mean±standard deviation [SD])에서 9.8±3.6/mm (mean±SD) 범위이며(가쪽복사 상방 10 cm) 나이가 많아질수록 감소하고 남성이 여성보다 IENFD 값이 1 정도 낮다고 알려져 있다.^{4,5,21,22} 기준값을 단순화해서 사용하기도 하며 한 보고에서는 하지 원위부 5, 넓적다리 원위부 7, 넓적다리 근위부 8로 정하였고 실제 임상에서 기준으로 사용하고 있다.⁴ 소신경섬유병에서 피부 신경의 밀도 감소 이외에 swelling, crawler, branching/sprouting 증가 등 형태의 변화도 보고되고 있는데 정상인에서도 관찰될 수 있기 때문에 경계이상 소견으로 사용되기도 한다.^{2,4,5,9}

여러 연구에 따르면 당뇨병에서 표피의 소신경섬유가 감소되고 이는 당뇨병의 기간과 관련이 있다.²³ 뿐만 아니라 신경병이 없는 당뇨병 환자에서 국소캡사이신으로 표피신경을 제거한 후 추적 검사를 하였을 때 정상인에 비하여 재생능력이 떨어져 있다는 보고도 있다.²⁴ 아직 논란이 있지만 포도당내성장애(impaired glucose tolerance)가 있는 경우에 IENFD가 감소할 수 있고 생활습관수정(life style modification)을 통하여 IENFD가 회복된다는 보고가 있으며²⁵ 추가 연구가 필요하다. 포도당내성장애 환자의 신경병은

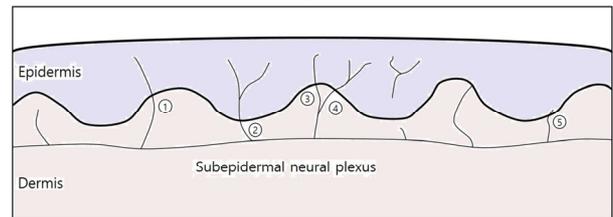


Figure 2. Counting method for intraepidermal nerve fiber density. Count nerve when it crosses the basement membrane intervening dermis and epidermis. Count as 1 when the nerve branches after crossing the basement membrane whereas count as 2 when it branches before crossing basement membrane. Do not count when the nerve fragment is only in epidermis without crossing dermo-epidermal junction and when the nerve touches the basement membrane but do not cross it. In this figure, counting number of epidermal nerve fiber is 5.

당뇨병이 신경병에 비하여 경미하며 주로 소신경섬유만 침범하기 때문에 IENFD의 감소가 가장 초기 변화 중의 하나이며 매우 민감한 검사 방법이라고 할 수 있다.⁹

특발소신경섬유병에 대한 피부생검 연구에서 하지 원위부 IENFD는 감소가 되지만 근위부 IENFD는 정상이어서 길이의존성 신경병의 특징이 있음을 보였고 1-2년 간의 추적 피부생검을 통하여 IENFD가 감소됨을 확인하여 신경 손상이 진행하고 있음을 확인하였다.²⁶ 소신경섬유병 평가에 사용되는 QSART(quantitative sudomotor axon reflex test)와 IENFD가 상관관계가 있고 피부생검이 QSART나 QST보다 더 민감하다는 연구도 있다.^{9,27,28}

피부생검은 소신경섬유병 뿐만 아니라 대섬유신경병과의 연관성도 있다. 탈수초성 길랑바레증후군(acute inflammatory demyelinating polyneuropathy, AIDP) 환자의 55%에서 하지 원위부 IENFD가 감소되었고 만성염증탈수초다발신경병(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIDP)에서도 IENFD가 감소되었다는 보고가 있다.^{29,30} 또한 AIDP와 CIDP 환자 중 IENFD가 감소된 환자군의 예후가 나쁘고 자율신경기능장애 확률도 높다는 연구가 있다. 그러나 대섬유신경병에서 피부생검의 유효성은 아직 확실하지 않다.⁹

이외에도 면역관련 질환(SLE, Sjögren syndrome, celiac disease, sarcoidosis), 유전신경병(Fabry's disease, familial dysautonomia, congenital insensitivity of pain, Friedrich's ataxia, Charcot-Marie-Tooth disease), HIV 신경병 등에서도 피부생검의 소신경섬유 이상이 보고되었다.⁹

결론

피부조직은 접근이 매우 쉽다는 점이 피부생검의 가장 큰 장점이다. 편치생검은 부작용이 거의 보고되지 않은 최소침습적 방법이고 필요에 따라서 인근 부위에서 2-3개의 조직을 동시에 얻을 수 있으며 추적 검사가 가능하다. 피부생검은 신경병의 원인적 진단이 어렵고 조직의 처리에 시간이 많이 소요되는 단점이 있지만 소신경섬유병의 진단에 최적표준일 뿐만 아니라 대섬유신경병이나 신경절병(ganglionopathy)에서도 이상 소견을 관찰할 수 있어서 앞으로 다양한 신경병에서의 적용이 기대된다. 뿐만 아니라 진피에는 다양한 자율신경이 분포하고 있어서 다양한 자율신경질환에 적용할 수 있고(Fig. 3) 최근에는 일부 중추신경계 퇴행병의 조기진단에도 응용되고 있다.

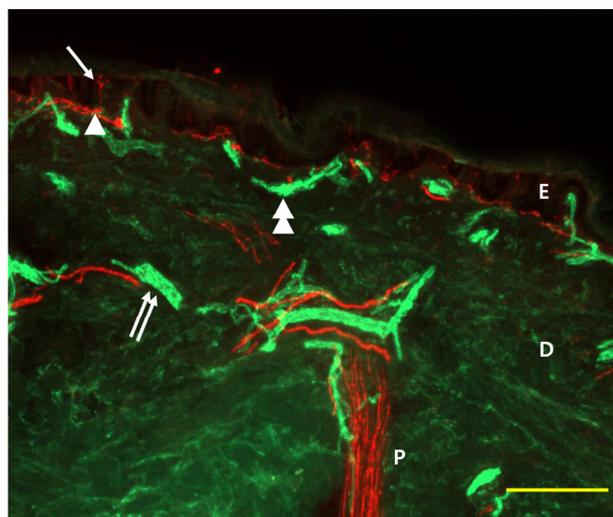


Figure 3. Immunohistochemical double stain of skin. Red color is the small nerve which stained with pan-axonal marker PGP 9.5 antibody and green color is the cutaneous vessel which stained with endothelial marker CD 31 antibody. Epidermal nerve fibers (arrow) are arising from subepidermal neural plexus (arrowhead) and superficial vascular plexus (double arrowhead) is located in subepidermal area. Double arrow, vessel; E, epidermis, D, dermis, P, pilomotor nerve.

REFERENCES

- Chan AC, Wilder-Smith EP. Small fiber neuropathy: getting bigger! *Muscle Nerve* 2016;53:671-682.
- Themistocleous AC, Ramirez JD, Serra J, Bennett DL. The clinical approach to small fibre neuropathy and painful channelopathy. *Practi Neurol* 2014;14:368-379.
- Myers MI, Peltier AC. Uses of skin biopsy for sensory and autonomic nerve assessment. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013;13:323.
- Boruchow SA, Gibbons CH. Utility of skin biopsy in management of small fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2013;48:877-882.
- Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI, 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. *Eur J Neurol* 2010;17:903-912.
- Karlsson P, Porretta-Serapiglia C, Lombardi R, Jensen TS, Lauria G. Dermal innervation in healthy subjects and small fiber neuropathy patients: a stereological reappraisal. *J Peripher Nerv Syst* 2013;18:48-53.
- Wang N, Gibbons CH. Skin biopsies in the assessment of the autonomic nervous system. *Handb Clin Neurol* 2013;117:371-378.
- Lauria G, Lombardi R. Skin biopsy in painful and immune-mediated neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 2012;17:38-45.
- Mellgren SI, Nolano M, Sommer C. The cutaneous nerve biopsy: technical aspects, indications, and contribution. *Handb Clin Neurol*

- 2013;115:171-188.
10. Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J. PGP 9.5—a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res* 1983;278:224-228.
 11. Wang L, Hilliges M, Jernberg T, Wiegleb-Edstrom D, Johansson O. Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibres and cells in human skin. *Cell Tissue Res* 1990;261:25-33.
 12. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G. The innervation of human epidermis. *J Neurol Sci* 1993;115:184-190.
 13. McCarthy BG, Hsieh ST, Stocks A, Hauer P, Macko C, Cornblath DR, et al. Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. *Neurology* 1995;45:1848-1855.
 14. Donadio V, Nolano M, Provitera V, Stancanelli A, Lullo F, Liguori R, et al. Skin sympathetic adrenergic innervation: An immunofluorescence confocal study. *Ann Neurol* 2006;59:376-381.
 15. Gibbons CH, Illigens BMW, Wang N, Freeman R. Quantification of sweat gland innervation a clinical-pathologic correlation. *Neurology* 2009;72.
 16. Gibbons CH, Illigens B, Wang N, Freeman R. Quantification of sudomotor innervation: A comparison of three methods. *Muscle Nerve* 2010;42:112-119.
 17. 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.
 18. Braverman IM. The cutaneous microcirculation. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:3-9.
 19. Wang N, Gibbons CH, Freeman R. Novel Immunohistochemical Techniques Using Discrete Signal Amplification Systems for Human Cutaneous Peripheral Nerve Fiber Imaging. *J Histochem Cytochem* 2011;59:382-390.
 20. Panoutsopoulou IG, Wendelschafer-Crabb G, Hodges JS, Kennedy WR. Skin blister and skin biopsy to quantify epidermal nerves: a comparative study. *Neurology* 2008;72:1205-1210.
 21. McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 1998;55:1513-1520.
 22. Provitera V, Gibbons CH, Wendelschafer-Crabb G, Donadio V, Vitale DF, Stancanelli A, et al. A multi-center, multinational age- and gender-adjusted normative dataset for immunofluorescent intraepidermal nerve fiber density at the distal leg. *Eur J Neurol* 2015;23:333-338.
 23. 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.
 24. Polydefkis M, Hauer P, Sheth S, Sirdofsky M, Griffin JW, McArthur JC. The time course of epidermal nerve fibre regeneration: studies in normal controls and in people with diabetes, with and without neuropathy. *Brain* 2004;127:1606-1615.
 25. Smith AG, Russell J, Feldman EL, Goldstein J, Peltier A, Smith S, et al. Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 2006;29:1294-1299.
 26. Lauria G, Morbin M, Lombardi R, Borgna M, Mazzoleni G, Sghirlanzoni A, et al. Axonal swellings predict the degeneration of epidermal nerve fibers in painful neuropathies. *Neurology* 2003;61:631-636.
 27. Periquet MI, Novak V, Collins MP, Nagaraja HN, Erdem S, Nash SM, et al. Painful sensory neuropathy: prospective evaluation using skin biopsy. *Neurology* 1999;53:1641-1647.
 28. Scherens A, Maier C, Haussleiter IS, Schwenkreis P, Vlckova-Moravcova E, Baron R, et al. Painful or painless lower limb dysesthesias are highly predictive of peripheral neuropathy: comparison of different diagnostic modalities. *Eur J Pain* 2009;13:711-718.
 29. Chiang MC, Lin YH, Pan CL, Tseng TJ, Lin WM, Hsieh ST. Cutaneous innervation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 2002;59:1094-1098.
 30. Pan CL, Tseng TJ, Lin YH, Chiang MC, Lin WM, Hsieh ST. Cutaneous innervation in Guillain-Barre syndrome: pathology and clinical correlations. *Brain* 2003;126:386-397.