

Review

피부조직검사: 소신경섬유 평가의 유용한 방법

충남대학교병원 신경과

손 은 희

Skin Biopsy: Emerging Method for Small Nerve Fiber Evaluation

Eun Hee Sohn

Department of Neurology, Chungnam National University Hospital, Daejeon, Korea

Skin biopsy with investigation of small nerve fiber in human epidermis and dermis has been proven to be a useful method for demonstration of small fiber neuropathy. Quantification of intraepidermal nerve fiber density using anti-Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5) antibody is standardized method to diagnose the small fiber neuropathy. Skin biopsy method also makes it possible to differentiate the type of nerve fibers by using different antibodies. Quantification of dermal structures with different type of nerve fibers could be used to invest pathophysiologic mechanism of diseased state. (Korean J Clin Neurophysiol 2015;17:53-60)

Key Words: Skin biopsy, Small fiber neuropathy, Intraepidermal nerve fiber

Received 30 October 2015; received in revised form 23 November 2015; accepted 26 November 2015.

서 론

항 Protein Gene Product (PGP) 9.5 항체를 이용하여 인간 표피(epidermis)와 진피(dermis)에 존재하는 신경을 관찰할 수 있는 방법이 소개된 이후¹ 이를 이용하여 표피와 진피에 존재하는 신경을 염색하고 정량화하는 다양한 방법이 개발되었다.^{2,3} 피부 내의 신경은 직경이 작은 말단신경 또는 진피 내의 구조물을 지배하는 자율신경이므로, 피부조직검사를 하여 피부 내 신경을 관찰하는 방법은 신경전도검사로 알 수 없었던 소신경섬유(small nerve fiber)의 이상을 발견할 수 있는 주요 검사법으로 대두되었다. 유럽신경과학회에서

는 2005년과 2010년 각각 피부조직검사를 이용하여 소섬유신경병(small fiber neuropathy, SFN)을 진단하는 방법과 기준을 제시하고 이의 근거를 제시하며 SFN 진단을 위해 피부조직검사를 시행할 것을 권고하고 있다.^{4,5} 본고에서는 SFN을 진단하기 위한 피부조직검사 방법과 피부조직검사법의 다른 적용에 대해 알아보려 한다.



Figure 1. Nerve fibers of epidermis and superficial dermis. Epidermal nerve fibers (arrow) originate from the subepidermal neural plexus (arrow head) and travel vertically to the epidermal surface (anti-PGP 9.5 antibody for nerve fiber).

Address for correspondence;

Eun Hee Sohn

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

Copyright 2015 by The Korean Society of Clinical Neurophysiology

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

본 론

1. 피부의 정상해부

피부에는 등신경신경절(dorsal root ganglia)에서부터 나

오는 감각신경과 자율신경이 다양하게 분포하고 있다. 피부는 기저막(basement membrane)을 경계로 표피와 진피로 나뉜다. 표피에 존재하는 신경섬유는 표층(superficial)진피에 있는 표피하신경얼기(sub-epidermal neural plexus)에서 표

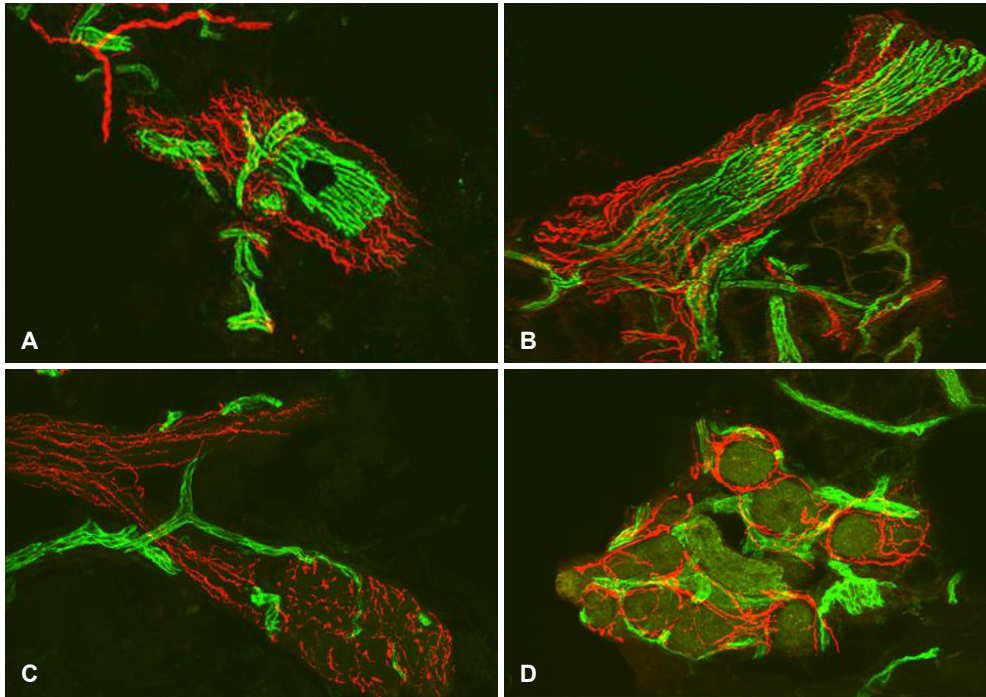


Figure 2. Dermal structures stained with anti-PGP 9.5 antibodies for nerve fibers (red) and anti-CD31 antibodies for blood vessels (green). (A,B) Deep dermal vessels are densely surrounded by innervating nerve fibers. (C) The nerve fibers innervating arrector pili muscle run parallel with muscle fibers. Intervening blood vessels were also showed. (D) Sweat gland and intervening capillaries. Sweat gland is innervated densely and complicatedly.

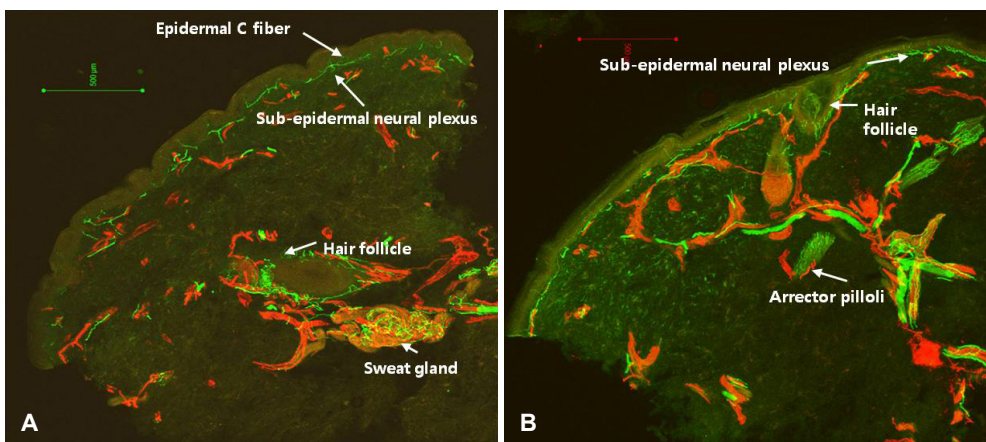


Figure 3. Samples of stained skin biopsy tissue. Epidermal C fiber and sub-epidermal neural plexus are located at the superficial dermis. Hair follicle travels from the deep dermis to the superficial dermis and arrector pili muscles are located near the hair follicle. Sweat glands are located in the deep dermis and innervated densely. (anti-PGP 9.5 antibodies for nerve fibers (green) and anti-CD31 antibodies for endothelia (red))

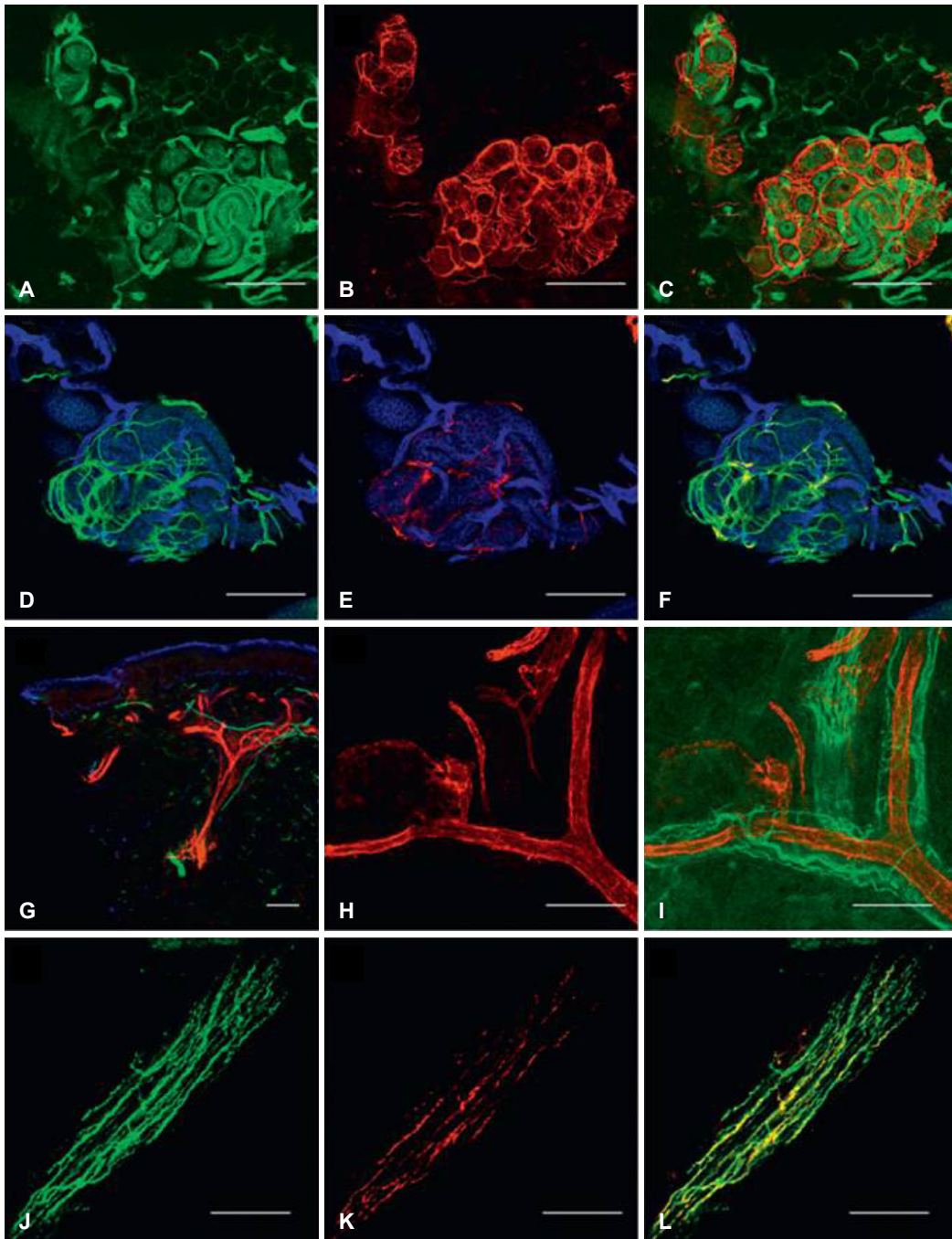


Figure 4. Example of images obtained by immunohistochemical staining. [A-C] A sweat gland. Endothelia of capillaries are stained with anti-CD31 antibody in green (A). Nerve fibers innervating sweat gland are stained with anti-PGP 9.5 antibody in red (B). Merged image (C). [D-F] A sweat gland and endothelia (anti-CD31 antibody, blue). Sympathetic cholinergic fibers are stained with anti-VIP antibody in green (D) and sympathetic adrenergic fibers are stained with anti-TH antibody in red (E). Merged image (F). [G-I] Cutaneous blood vessels. Endothelia are stained with anti-CD31 antibody in red and nerve fibers are stained with anti-PGP 9.5 antibody in green (G-I). [J-L] Arrector pili muscles are innervated with sympathetic adrenergic fibers (anti-TH antibody, J) and sympathetic cholinergic fibers (anti-VIP antibody, K). Merged image (L). (Originally adapted from Wang et al. 2013⁶).

면에 수직 방향으로 뻗어 기저막을 뚫고 표피로 들어온다 (Fig. 1). 표피와 표층진피에 있는 신경섬유는 대부분 말미이집(unmyelinated) C-신경섬유이거나 직경이 작은 말미이집(myelinated) A δ -신경섬유이다. A δ -신경섬유는 빠르게 전달되는 통증과 냉각을 전달하고 C-신경섬유는 천천히 전달되는 통증과 온각을 전달한다. 표피에는 자율신경신호를 전달하는 신경은 존재하지 않는다.⁶

피부는 털의 유무에 따라 털이 있는 피부(hairy skin)와 털이 없는 피부(glabrous skin)로 나눌 수 있다. 인체의 대부분은 털이 있는 피부이며, 일반적으로 피부조직검사를 하는 부위인 발목 부위도 털이 있는 피부이다. 털이 있는 피부의 진피에는 혈관, 모낭(hair follicle), 털운동근육(arrector pili muscle), 땀샘(sweat gland) 등이 있다(Fig. 2). 털이 없는 피부는 손바닥과 발바닥이 대표적이며, Meissner corpuscle이나 Merkel cell 등이 분포하여 말미이집 신경섬유를 관찰하는데에 유용하다. 털이 없는 피부의 진피에는 모낭과 털운동근육은 관찰되지 않는다. 땀샘은 표피로부터 3-5 mm 깊이의 심부(deep)진피에 분포하고 땀관(sweat duct)을 통해 피부 표면으로 연결되어 있다. 모낭은 심부진피에서 표층진피까지 길게 뻗어 있고 주변에 털운동근육이 산재해 있다(Fig. 3). 혈관은 상부혈관신경총(upper blood vessel plexus)과 하부혈관신경총(lower blood vessel plexus)이 각각 표층진피와 심부진피에 있으며, 모세혈관(capillary)은 상부혈관신경총에서 나와 표피에 수직 방향으로 주행한다.⁷

진피에서 관찰되는 구조물들은 주로 자율신경에 의해 지배되며, 염색 시 사용하는 항체의 종류에 따라 신경섬유의 기능을 알 수 있다. 모낭은 대부분이 감각신경에 의해 지배되고 일부 콜린성과 아드레날린성 교감신경의 지배가 관

찰된다.⁶ 혈관과 털운동근육은 주로 아드레날린성 교감신경에 의해 지배되며, 이들을 지배하는 신경섬유는 tyrosine hydroxylase (TH)와 dopamine β -hydroxylase (DBH)로 잘 염색된다.^{8,9} 땀샘을 지배하는 신경은 대부분이 콜린성 교감신경으로 vasointestinal peptide (VIP)로 잘 염색된다(Fig. 4).⁹

2. 표피내신경 정량화

표피내신경(intraepidermal nerve fiber, IENF)은 주로 감각신경인 C-섬유로 이루어져 있다. 따라서 IENF를 정량화하여 IENF밀도를 계산하는 방법은 통증을 주로 호소하는 SFN의 주요 진단방법으로 제시되고 있다.^{4,5}

1) 피부조직검사와 염색방법

피부조직검사는 검사부위를 국소마취 한 후 3 mm 펀치를 이용하여 시행한다. 검사에 의한 합병증은 거의 없으나 출혈이나 감염이 발생할 수 있으며, 특히 항응고제 복용 등 출혈성 경향이 있는 경우 주의를 요한다. 다발성말초신경병증이나 SFN과 같이 신경의 길이에 따라 침범되는 경우는 원위부만을 검사해도 충분하지만, 비대칭적이면서 길이에 따른 차이가 없을 경우 원위부와 근위부를 모두 검사하거나 증상이 있는 부위를 증상이 없는 대칭되는 부위와 비교하여 검사한다. 원위부 검사는 가쪽 복사뼈(lateral malleolus)로부터 상방 10 cm 부위를, 근위부 검사는 전장골가시(anterior iliac spine)로부터 하방 20 cm의 앞쪽 허벅지 부위를 검사한다.⁴

고정액은 2% paraformaldehyde-lysine-periodate (2% PLP) 용액이나 Zamboni 용액(2% paraformaldehyde, picric acid)을 사용하며, 채취한 조직을 채취 직후 4°C에서 18-24시간 동

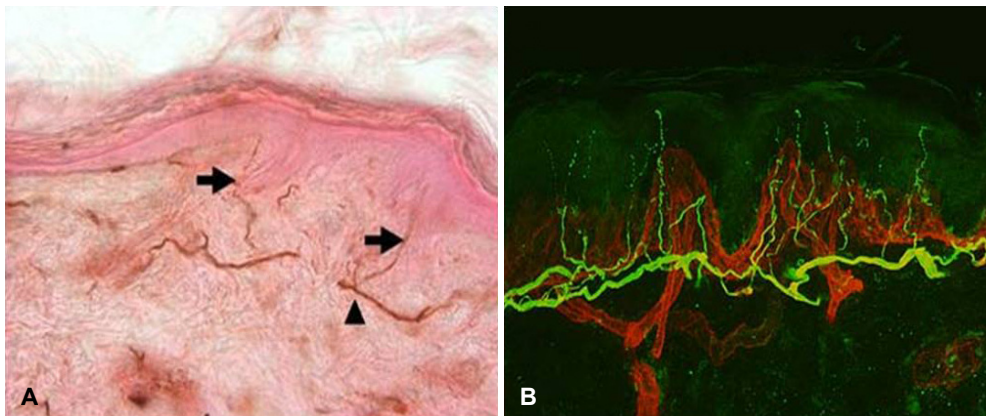


Figure 5. Dermal and epidermal nerve fibers stained with anti-PGP 9.5 antibodies. (A) Bright-field microscopy finding. Intraepidermal nerve fibers (arrow) cross from the sunepidermal neural plexus (arrow head) to the epidermis. (B) Confocal microscopy showing nerve fibers (in green) and blood vessels and basement membrane (in red).

안 고정액에 넣어둔다. 포르말린 용액에 고정하면 신경섬유가 잘라져(fragmented) 보이는 단점이 있어 사용 하지 않도록 권하고 있지만, 일부 연구에 의하면 IENF 밀도에는 영향을 끼치지 않는 것으로 보인다.^{10,11} 고정이 끝나면 조직을 다시 cryoprotective 용액에 넣어 4°C에서 하룻밤 동안 보관 후, 냉동미세절단기(cryostat)를 이용하여 50 μm 두께로 절단한다. 절단된 절편은 PGP 9.5 항체를 이용하여 염색한다. 염색방법에 따라 광학현미경(bright-field microscope)이나 confocal 현미경을 이용하여 신경을 관찰할 수 있다(Fig. 5). 광학현미경을 이용하면 한 가지 항체만 사용하여 염색하므로 신경섬유만 보이고 다른 구조물과 감별이 어려운 단점이 있지만, 검사과정이 더 쉽고 시간이 적게 들기 때문에 임상적인 목적으로는 광학현미경법을 주로 사용한다. Confocal 현미경을 이용하면 여러 가지 항체를 동시에 사용하므로 신경 외에도 다른 구조물을 같이 관찰할 수 있고 사용하는 항체의 종류에 따라 신경섬유의 종류도 구별할 수 있지만 시간이 많이 걸리는 단점이 있어 주로 연구 목적으로 많이 사용되고 있다.^{4,12-14}

2) IENF 밀도 분석법

IE NF 밀도는 IENF 개수를 IENF가 분포한 전체 표피의 길이로 나누어서 계산한다.^{4,5} 전체 조직을 50 μm로 절단할 때 조직의 양끝은 절편의 길이가 짧아 신경분포를 정확히 판단할 수 없다. 따라서 양끝을 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(Fig. 6). 신경섬유가 표피 내에서 나뉘거나 표피 내에만 있는 경우에는 IENF 개수에 포함시키지 않는다. 계산된 IENF 밀도는 IENF/mm로 표현된다.

IE NF 밀도는 여성이 남성에 비해 더 높고, 연령이 증가함에 따라 감소하는 것으로 알려져 있다. 임상에서 주로 사용하고 있는 광학현미경을 이용하여 분석한 IENF 밀도의

정상 범위를 Table 1에 나타내었다.^{5,15}

3) IENF 밀도분석법의 적용 및 제한점

IE NF 밀도분석법은 신경병증성 통증을 동반하는 SFN의 진단에 중요한 검사법으로 이용되고 있다.^{5,10,16-21} 최근에는 축삭성말초신경병증 외에도 혈관염에 의한 말초신경병증이나 유전성질환의 진단에도 IENF 밀도분석법이 사용되고 있다.²²⁻²⁴ 길이에 따른 차이가 보이지 않는 비대칭성말초신경병증에서도 건측과 환측의 IENF 밀도를 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 소신경섬유기능을 평가하는 다른 종류의 검사를 하고 검사한 부위에서 조직을 얻어 IENF 밀도를 분석함으로써 두 검사법을 비교하는 연구를 진행하기도 한다.

그러나 IENF 밀도분석법은 SFN 증상이 있는 환자에서도 정상인 경우가 있으며,¹⁶ 말초신경병증의 원인을 알 수

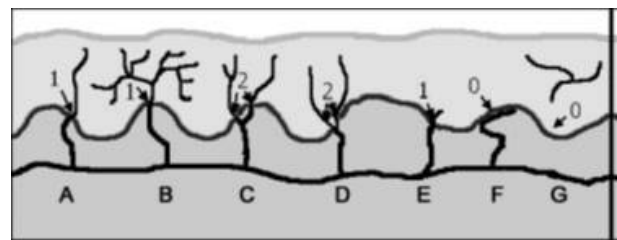


Figure 6. Intraepidermal nerve fiber counting rule. Diagram of skin innervations: nerves (black), basement membrane (dark grey), dermis (medium grey), and epidermis (light grey). Nerve fibers which cross the basement membrane are only counted as one nerve fiber. Nerve fibers which branches after crossing the basement membrane or which resides only in the epidermis should be excluded when count the nerve fibers. The epidermal nerve fiber branches before crossing the basement membrane, it should be counted as two fibers (Originally adapted from Lauria et al., 2005⁴).

Table 1. Normal values of intraepidermal nerve fiber 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

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 IENF 밀도분석법보다 더 많은 절편을 염색할 필요가 있다.⁶ 피부조직검사법은 진피 내 구조물들의 신경분포를 정량화함으로써 SFN뿐만 아니라 자율신경을 침범하는 유전성말초신경병증, 염증성 말초신경병증 등 다른 질환의 진단에 사용되고 있으며, 특정 질환에서 현재까지 알려지지 않았던 자율신경침범 여부를 판단하는 데에 도움을 주고 있다.

땀샘은 땀관과 그 사이에 혼재하는 모세혈관, 그리고 이들을 지배하는 신경들이 얽혀 있는 복잡한 구조이다. 땀샘의 신경분포가 보고된 후 이를 정량화하려는 여러 연구가 있었지만 복잡한 구조 때문에 많은 어려움이 있었다.²⁶ 반정량적분석법이 처음으로 개발되었으나 신뢰도와 재현성이 떨어졌다.²⁷⁻²⁹ 이후 광학현미경을 이용하여 분석하는 수기입체분석법(manual unbiased stereological method)과 자동분석법(automated technique)이 개발되었다.^{29,30} 수기입체분석법은 원으로 이루어진 그리드(grid)를 항 PGP 9.5 항체를 이용하여 염색한 땀샘 사진 위에 올려 놓은 후 신경이 통과하거나 신경과 만나는 원의 개수를 세어 이를 밀도로 나타내는 방법이다. 이때 밀도는 신경을 포함하고 있는 원의 개수를 전체 원의 개수로 나누어 나타내었다.³⁰ 이 방법을 사용하였을 때 당뇨병 환자에서 정상인에 비해 통계적으로 유의하게 땀샘신경분포가 떨어져 있는 것을 발견하였고, 땀샘신경분포는 정량화된 신체검진과도 좋은 상관관계를 보였으며, 두 명 이상의 연구자가 땀샘신경분포를 측정하여 신뢰도가 높음을 확인하였다.³⁰ 그러나 수기입체분석법은 분석을 위해 많은 시간이 필요하다는 단점이 있다. 자동분석법은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 땀샘이 분포하는 영역 내에 신경을 자동으로 측정하여 밀도를 계산하는 방법으로, 수기입체분석법에서 사용했던 같은 사진을 분석했을 때 당뇨병 환자에서 땀샘신경분포가 감소하는 같은 결과를 보였으나 검사자간 신뢰도가 떨어졌다.²⁹ 따라서 자동분석법은 빠른 시간에 결과를 내야 하는 연구에서 사용할 수 있으나, 그 신뢰도가 떨어진다고 볼 수 있겠다. 땀샘신경분포의 수기입체분석법은 최근 제시된 당뇨병성말초신경병증 진단 기준 중 당뇨병성 SFN의 진단을 위해 새롭게 사용할 수 있는 방법으로 제시되었다.³¹

털운동근육을 지배하는 신경은 근육을 따라 길게 선형으로 분포되어 있다. 털운동근육신경분포 정량화법은 털운동

근육의 축에 대해 수직으로 가상의 선을 그어 그 선을 지나가는 신경의 개수와 근육의 넓이간의 비율을 계산하는 방법이다.³² 분석결과는 신경개수/mm로 표현하였다. 이 방법을 이용하여 당뇨병환자를 정상인과 비교 시 털운동근육의 신경분포가 감소함을 알 수 있었다. 향후 털운동근육 신경분포정량화는 피부의 아드레날린성 신경분포의 이상 여부를 판단하는 데에 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

혈관을 지배하는 신경을 정량화하는 방법은 아직까지 개발되지 않았다. 혈관은 상부혈관신경총과 하부혈관신경총으로 구성되어 그 모양과 신경지배 양상이 다르고, 모세혈관은 신경지배 여부가 명확하지 않은 등 다양한 해부구조를 가지고 있다. 또한 피부 전반에 넓게 분포해 있어 이를 하나의 방법으로 정량화하기 어려웠다. 최근 원형 그리드를 이용하여 표층진피의 신경과 혈관을 정량화하는 수기입체분석법이 보고되었으며,³³ 향후 여러 질환에서 피부의 신경과 혈관을 분석함으로써 질환의 병태생리를 밝히는데 도움이 될 것이라 생각된다.

4. 피부조직검사의 다른 적용

1) α -synuclein 염색

특발성파킨슨병은 대장의 점막 등 말초신경에 초기부터 α -synuclein 병변이 있다는 사실이 알려지면서 파킨슨병 진단과 치료제 개발을 위해 더 조직을 얻기 쉬운 곳에서 α -synuclein 병변을 관찰하려는 노력이 이어져 왔다.³⁴⁻³⁷ 최근 파킨슨병의 질환 진행 정도와 연관 없이 초기에도 IENF 밀도가 감소함이 보고되어 질환의 초기에 피부의 신경에서 α -synuclein 병변이 보일 수 있을 것이라는 가설이 생겼고, 이를 밝히기 위한 연구가 진행되었다.³⁸ 이후 다른 연구에서는 파킨슨병 환자의 피부를 α -synuclein에 대한 항체로 염색하여 땀샘과 털운동근육의 신경에 α -synuclein이 침착됨을 발견함으로써, 피부조직검사가 신경계퇴행성질환의 임상표지자로 사용될 수 있음을 보여주었다.³⁹ 또한 병적 상태인 인산화된 α -synuclein이 파킨슨병 환자의 피부 신경에 침착됨이 보고되면서, 파킨슨병에서 피부조직검사에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁴⁰

2) 질환의 병태생리에 대한 연구

긴장동공(tonic pupil), 심부건반사 감소, 분절성(segmental) 땀분비감소를 특징으로 하는 Ross 증후군은 임상적인 면에서 Holmes-Adie 증후군과 유사하여 두 질환이 같은 질환의 서로 다른 표현(manifestation)이라는 주장도 있었다.⁴¹ 그러나 피부조직검사를 통하여 Ross증후군에서는 피부내 모든 구조물에서 콜린성 교감신경이 관찰되지 않고 Holmes-Adie

증후군에서는 콜린성 교감신경이 어느 정도 유지되는 것을 보고하면서 두 질환의 서로 다른 병태생리에 대한 새로운 방향을 제시했다.¹⁹

결 론

피부에 존재하는 신경은 주로 진피의 구조물을 지배하는 자율신경과 감각신경의 말단이므로 소신경섬유를 관찰할 수 있는 주요한 구조물이다. 피부조직검사법은 신경조직검사법과 달리 조직을 얻기가 용이하고, 반복적으로 검사가 가능한 비교적 비침습적 방법이다. 피부조직검사법은 최근에는 항 PGP항체를 이용하여 SFN을 진단할 뿐만 아니라, α -synuclein처럼 질환의 원인이 될 수 있는 항체를 이용하거나 항 TH항체나 항 VIP항체처럼 진피 내 질환에 의해 침범되는 신경의 종류를 구별함으로써 질환의 병태생리를 밝히는 연구들에서 이용되고 있다. 따라서 피부조직검사는 향후 현재까지 밝혀지지 않았던 질환의 진행과정을 밝혀거나 치료효과를 밝히는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. 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.
2. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G. The innervation of human epidermis. *J Neurol Sci* 1993;115:184-190.
3. 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.
4. Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, McArthur JC, Mellgren SI, Nolano M, et al. Efn guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 2005;12:747-758.
5. 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, e944-909.
6. Wang N, Gibbons CH. Skin biopsies in the assessment of the autonomic nervous system. *Handb Clin Neurol* 2013;117:371-378.
7. Braverman IM. The cutaneous microcirculation. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:3-9.
8. Mellgren SI, Nolano M, Sommer C. The cutaneous nerve biopsy: Technical aspects, indications, and contribution. *Handb Clinical Neurol* 2013;115:171-188.
9. 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.
10. 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.
11. Chai J, Herrmann DN, Stanton M, Barbano RL, Logigian EL. Painful small-fiber neuropathy in sjogren syndrome. *Neurology* 2005;65:925-927.
12. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G. Utility of skin biopsy in diabetic neuropathy. *Semin Neurol* 1996;16:163-171.
13. Di Leo R, Nolano M, Boman H, Pierangeli G, Provitera V, Knappskog PM, 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, Montagna P, Provitera V, Bugiardini E, et al. Anhidrosis in multiple system atrophy: A preganglionic sudomotor dysfunction? *Mov Disord* 2008;23:885-888.
15. Lauria G, Bakkers M, Schmitz C, Lombardi R, Penza P, Devigili G, et al. Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: A worldwide normative reference study. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:202-207.
16. Devigili G, Tugnoli V, Penza P, Camozzi F, Lombardi R, Melli G, et al. The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: From symptoms to neuropathology. *Brain* 2008;131:1912-1925.
17. Nebuchennykh M, Loseth S, Jorde R, Mellgren SI. Idiopathic polyneuropathy and impaired glucose metabolism in a norwegian patient series. *Eur J Neurol* 2008;15:810-816.
18. Nolano M, Provitera V, Donadio V, Stancanelli A, Saltalamacchia A, Caporaso G, et al. Ross syndrome: A lesson from a monozygotic twin pair. *Neurology* 2013;80:417-418.
19. Nolano M, Provitera V, Perretti A, Stancanelli A, Saltalamacchia AM, Donadio V, et al. Ross syndrome: A rare or a misknown disorder of thermoregulation? A skin innervation study on 12 subjects. *Brain* 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. *Arch Neurol* 2007;64:959-965.
23. Tseng MT, Hsieh SC, Shun CT, Lee KL, Pan CL, Lin WM, et al. Skin denervation and cutaneous vasculitis in systemic lupus erythematosus. *Brain* 2006;129:977-985.
24. Nolano M, Manganelli F, Provitera V, Pisciotto C, Stancanelli A, Caporaso G, et al. Small nerve fiber involvement in cmt1a. *Neurology* 2015;84:407-414.
25. Sghirlanzoni A, Pareyson D, Lauria G. Sensory neuron diseases. *Lancet Neurol* 2005;4:349-361.
26. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Brelje TC. Innervation and vasculature of human sweat glands: An immunohistochemistry-laser scanning confocal fluorescence microscopy study. *J Neurosci* 1994;14:6825-6833.
27. Dabby R, Djaldetti R, Shahmurov M, Treves TA, Gabai B, Melamed

- E, et al. Skin biopsy for assessment of autonomic denervation in parkinson's disease. *J Neural transm (Vienna)* 2006;113:1169-1176.
28. Dabby R, Vaknine H, Gilad R, Djaldetti R, Sadeh M. Evaluation of cutaneous autonomic innervation in idiopathic sensory small-fiber neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2007;12:98-101.
 29. Gibbons CH, Illigens BM, Wang N, Freeman R. Quantification of sudomotor innervation: A comparison of three methods. *Muscle Nerve* 2010;42:112-119.
 30. Gibbons CH, Illigens BM, Wang N, Freeman R. Quantification of sweat gland innervation: A clinical-pathologic correlation. *Neurology* 2009;72:1479-1486.
 31. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, et al. Diabetic neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes care* 2010; 33:2285-2293.
 32. 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.
 33. Sohn E, Gibbons CH, Wang N, Freeman R. Quantitative analysis of human cutaneous vasomotor innervation. *Auton Neurosci Basic Clin* 2015;192:114.
 34. Beach TG, White CL, Hamilton RL, Duda JE, Iwatsubo T, Dickson DW, et al. Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods used by invited experts. *Acta neuropathol* 2008;116: 277-288.
 35. Shanon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, et al. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27:709-715.
 36. Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, des Varannes SB, Rouaud T, Roy M, et al. A comparison between rectal and colonic biopsies to detect lewy pathology in parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2012; 45:305-309.
 37. Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, et al. Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in parkinson's disease. *Brain* 2008;131:642-650.
 38. Nolano M, Provitera V, Estraneo A, Selim MM, Caporaso G, Stancanelli A, et al. Sensory deficit in parkinson's disease: Evidence of a cutaneous denervation. *Brain* 2008;131:1903-1911.
 39. Wang N, Gibbons CH, Lafo J, Freeman R. Alpha-synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology* 2013;81:1604-1610.
 40. Schneider SA, Boettner M, Alexoudi A, Zorenkov D, Deuschl G, Wedel T. Can we use peripheral tissue biopsies to diagnose parkinson's disease? A review of the literature. *Eur J Neurol* 2015.
 41. Shin RK, Galetta SL, Ting TY, Armstrong K, Bird SJ. Ross syndrome plus: Beyond horner, holmes-adie, and harlequin. *Neurology* 2000;55:1841-1846.