

결 과

1) 임상 및 병리학적 소견

총 46예의 항문암의 위치는 항문관암이 35예(76.1%), 항문주위(margin) 편평상피암이 11예(23.9%)였고 이중 항문관암은 편평상피암이 22예(62.9%), 총배설강암이 13예(37.1%)였다. 성별분포는 남자가 20예, 여자가 26예(56.5%)로 여자에서 발생빈도가 높았으며 항문주위암은 남녀비가 6대5로 비슷하였고 항문관암은 남녀비가 1:1.5로 여자에서 발생빈도가 높았다. 연령분포는 30세부터 86세까지였고 평균 연령은 61.4세였으며 항문주위 편평상피암은 58.2세, 항문관암은 62.4세로 항문관에서 높았으나 통계학적 의의는 없었다. 항문암의 암병기는 II기가 23예(50%)로 가장 많았고 III기가 11예(23.9%), I기가 6예, carcinoma in situ가 4예, IV기가 2예였다(Table 1).

항문 침규 콘딜로마 환자의 평균연령은 32.8세였으며 연령 분포는 17세부터 61세까지 분포하였다. 남녀 성비는 23 대 5로 남자에서 높은 발생빈도를 보이고 있었고 발생부위는 28예중 24에서 그 위치를 확인할 수 있었는데 이중 13예(54.2%)가 항문주위에서 발생하였고 항문관에서 7예, 그리고 4예는 양측 모두 또는 항문연에서 발생하였다. 동성연애자는 6명으로 모두 남자였고 이중 1명은 후천성 면역결핍증에 이환되어 있었다(Table 2).

2) in situ hybridization(ISH)에 의한 인유두암 바이러스 DNA의 발현

ISH는 항문암 환자의 35예에서 시행하였는데 인유두암 바이러스 type 6/11에 대해서는 모두 음성이었

고 type 16/18에 대해서는 4예(11.4%)에서 양성반응을 보였고 이들은 모두 항문관암 이었고 항문주위암은 전 예에서 음성이었다. 항문 침규 콘딜로마는 28예에서 ISH를 시행하였는데 26예(92.9%)에서 인유두종 바이러스 DNA에 대해 양성반응을 보였고 이중 24예(85%)는 type 6/11에 대해 양성 반응을 보였고 2예(7.1%)에서 type 16/18에 대해서 양성반응을 보였다(Fig. 1). 반면에 직장선암 환자 25예의 파라핀 조직괴에서 시행한 ISH의 결과는 전예에서 음성을 보였다(Table 3).

3) polymerase chain reaction(PCR)에 의한 인유두암 바이러스 DNA의 발현

항문암 환자 46예에서 PCR을 시행하였는데 30예(65.2%)에서 인유두종 바이러스 type 16에 양성반응을 보였고 type 6, 11, 18, 33에 대해서는 음성반응을 보였다(Fig. 2). 항문암의 위치에 따른 차이를 보면 항문주위 편평상피암은 11예중 3예(27.3%)에서 양

Table 2. Patients characteristics of condyloma acuminata

		Number	%
Site	Margin	13	54.2
	Canal	7	29.2
	Both or verge	4	8.7
	Not defined	4	
Sex	Male	23*	82.1
	Female	5	17.9
Mean age (range)		32.8 (17~16)	

*6 of 23 were homosexual man

Table 3. In situ hybridization results of HPV DNA typing

Diagnosis	Total No.	Positive No.(%)	HPV type	
			6/11	16/18
Condyloma	28	26(92.9)	24	2
Anal cancer	35	4(11.4)	0	4
Canal	25	4(16.0)	0	4
Margin	10	0	0	0
Rectal Cancer	25	0	0	0

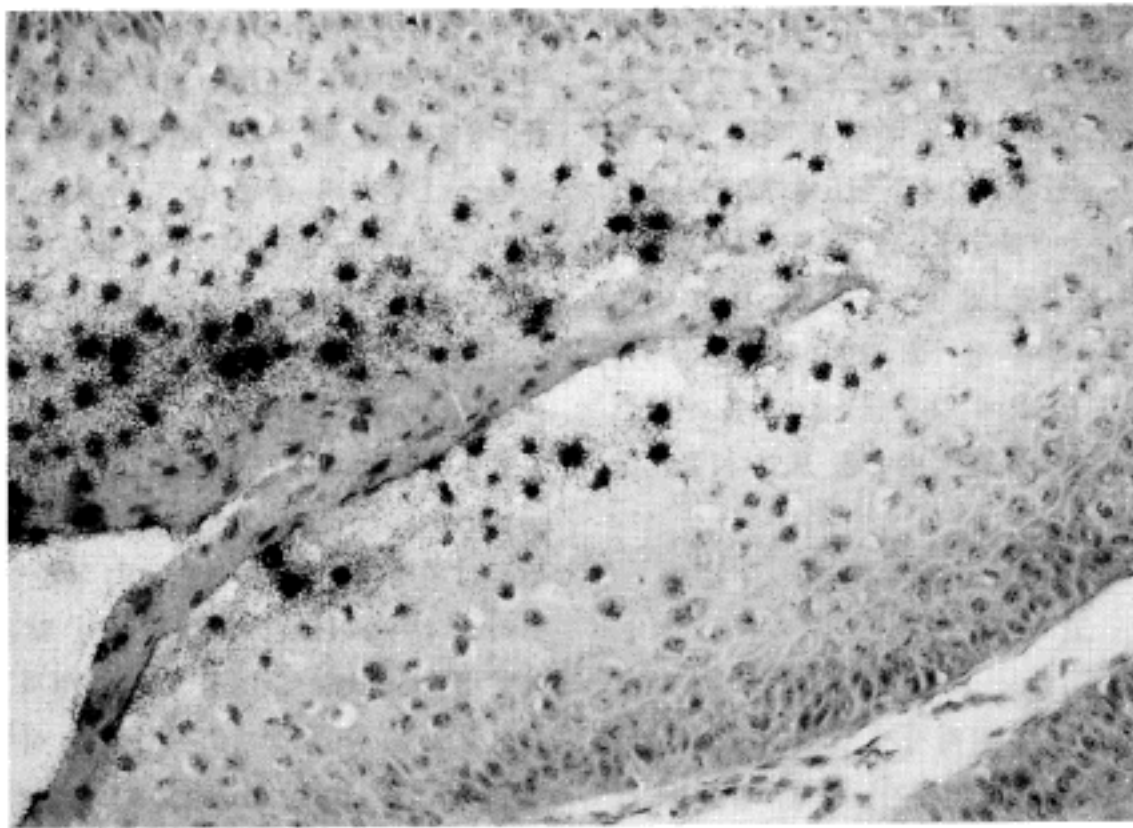


Fig. 1. HPV DNA in situ hybridization of tissue demonstrating HPV 6/11 DNA in the outer epithelial layer of anal condyloma cells($\times 100$).

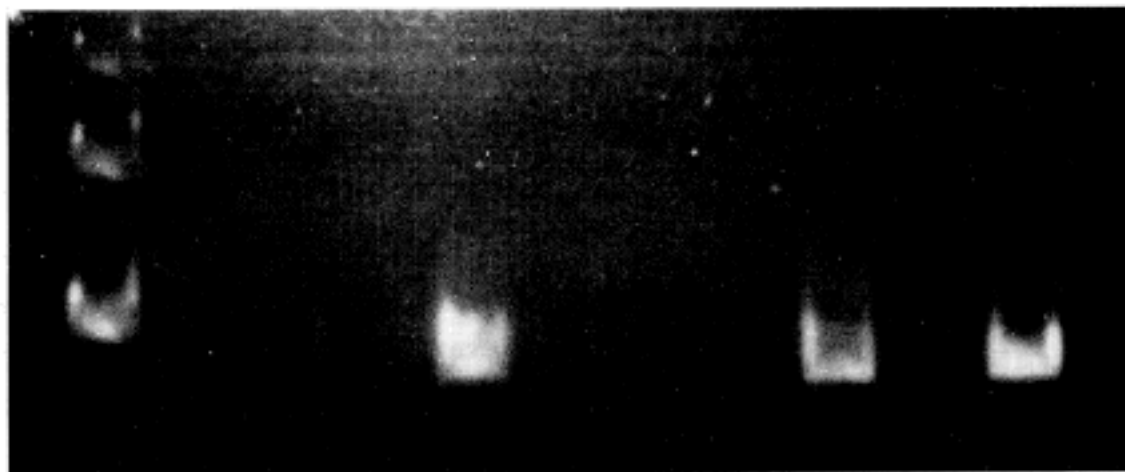


Fig. 2. 8.5% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide showing 101 base pair of amplified HPV 16 DNA fragment.

Table 4. Polymerase chain reaction results of HPV DNA typing in anal cancer

Diagnosis	Total	Positive No.(%)	HPV type				
			6	11	16	18	33
Anal Cancer	46	30(65.2)	0	0	30	0	0
Margin	11	3(27.3)	0	0	3	0	0
Canal	35	27(77.1)	0	0	27	0	0
SCC*	22	16(72.7)	0	0	16	0	0
Cloacogenic	13	11(84.6)	0	0	11	0	0

*squamous cell carcinoma

성반응을 보였고 항문관암은 35예중 27예(77.1%)에서 양성반응을 보여 항문관암에서 훨씬 높은 양성반응을 보였다. 항문관암의 병리학적 분류에 따른 차이를 보면 항문관 편평상피암은 22예중 16예(72.7%)에서 양성반응을 보인 반면 총배설강암은 13예중 11예(84.6%)에서 양성반응을 보여 항문관 편평상피암보다 다소 높은 양성반응을 보였다. 림프절에 전이를 보인 항문관암 9예중 3예의 림프절에서 PCR에 양성반응을 보였고 국소 재발을 보인 6예중 2예에서 양성반응을 보였다(Table 4).

고 찰

항문암의 뚜렷한 원인은 밝혀지지 않았지만 항문의 만성 염증성 질환, 남성 동성연애자, 흡연, 항문부 침윤 콘딜로마, 그리고 면역억제 등을 원인 인자로서 보고하고 있으며⁴⁻⁷⁾ 역학조사에 의하면 최근의 항문암의 증가는 성교에 의해 인유두종 바이러스와 같은 종양유전자를 갖는 바이러스의 전파 때문일 것으로 생각된다^{6,20)}. Daling 등⁷⁾이 148명의 항문암 환자를 대상으로 조사한 바에 의하면 남성 동성연애자중 항문성교를 받는 남성에서 항문암의 발생 위험이 훨씬 높았으며 이러한 결과를 볼때 항문 성교에 의한 인유두종 바이러스의 전파가 항문암의 발생에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 저자들의 경우, 항문암의 원인 인자로 알려진 항문 침윤 콘딜로마의 남녀비가 23대 5로 남성에서 훨씬 높은 발생율을 보였고 남성들중 6명에서 동성연애자였는데 이러한 결과는 최근 서구에서 젊은 남자에서 항문암의 발생율이 증가하고 젊은 연령층에서는 남성의 비율이 여성보다 더 높은 것과 관련이 있는 것으로 보인다.

현재까지 60종 이상의 인유두종 바이러스가 발견되었으며 이들중 약 15종이 외음부, 음경, 그리고 자궁경부의 병변과 관련이 있고 이 병변들은 전구암으로 간주되고 있다^{12,13)}. 침윤 콘딜로마는 인유두종 바이러스 type 6 및 11과 관련이 많으며 인유두종 바이러스 DNA의 발현율은 방법에 따라 62~82%까지로 보고되고 있다⁹⁾. Daling 등⁶⁾에 의하면 생식기 침윤 콘딜로마가 있을때 편평상피암이 발생할 상대적 위험도는 남성에서는 26.9, 여성에서는 32.5로 깊은 연관이 있었고 또한 인유두종 바이러스에 양성인 종양을 가지고

있던 환자 14명중 64%가 과거에 생식기 침윤 콘딜로마를 앓은 적이 있었다. 저자들의 경우 28예에서 ISH를 시행하였는데 이중 26예(92.9%)에서 인유두종 바이러스 DNA에 대해 양성 반응을 보였고 이중 24예(85%)는 type 6/11에 대해 양성 반응을 보인 반면 2예(7.1%)에서만 type 16/18에 대해서 양성반응을 보여 항문 침윤 콘딜로마와 type 6/11과의 깊은 연관성을 확인할 수 있었다.

인유두종 바이러스 type 16과 18은 다른 type보다 severe cervical dysplastic lesion이나 자궁경부 편평상피암과 관련이 많으며 항문암은 인유두종 바이러스 type 16과 가장 관련이 많은 것으로 밝혀졌다^{3,17,19)}. Scholefield 등²¹⁾이 82명의 환자를 대상으로 내시경으로 항문 상피조직검사를 시행한 결과를 보면 이중 DNA hybridization으로 인유두종 바이러스 감염이 확인된 23예에서 전구암인 항문 상피내 종양(anal intraepithelial neoplasia)이 있는 것으로 나타났으며 이러한 결과는 남자 동성연애자에서 의의있게 높은 것으로 나타났고 항문 조직에서 인유두종 바이러스 양성인 여성에서는 자궁경부에 상피내종양이 있을 경우에만 항문에서 상피내종양이 발견되었다.

항문암에서 인유두종 바이러스 DNA 발현율은 검사 방법에 따라 다른데 ISH에 의하면 0~33%^{3,9,24)}, Southern blot으로는 56%¹⁹⁾ 그리고 polymerase chain reaction으로는 77.8~100%^{15,16,22,24)}로 보고하고 있다. 저자들의 경우 ISH로 검사할 수 있었던 38예의 항문암중 4예(11.4%)에서 인유두종 바이러스 type 16에 양성반응이었고 PCR을 시행했던 46예중 30예(65.2%)에서 인유두종 바이러스 type 16에 양성반응을 보여 PCR이 ISH보다 훨씬 민감한 검사 방법임을 알 수 있었고 항문암이 인유두종 바이러스중 type 16과 관련이 있음을 알 수 있었다. 항문암의 위치에 따른 차이를 보면 항문주위 편평상피암은 11예중 3예(27.3%)에서 양성반응을 보였고 항문관암은 35예중 27예(77.1%)에서 양성반응을 보여 항문관암에서 높은 반응율을 보였으나 이 결과와 비교할 문헌은 찾아볼 수 없었다.

총배설강암과 인유두종 바이러스 DNA와의 관계는 두 보고가 서로 상반된 결과를 보고하고 있는데 Wolber 등²³⁾에 의하면 14예의 총배설강암 모두 인유두종 바이러스 DNA에 음성인 반면 21예의 항문 편

평상피암중 12예는 양성이었다. 그러나 다른 보고에 의하면 총배설강암 5예중 4예에서 인유두종 바이러스 DNA가 양성이었다²⁾. Daling등⁶⁾은 항문 편평상피암 환자에서는 생식기 침규 콘딜로마의 과거력과 깊은 상관관계를 보인 반면 46명의 총배설강암 환자에서는 생식기 콘딜로마의 과거력이 전혀 없었다고 보고하였다. 저자들의 경우 총배설강암은 13예중 11예(84.6%)에서 인유두종 바이러스 DNA에 대해 양성을 보여 항문관 편평상피암의 72.7%보다 다소 높은 양성율을 보였다.

항문암과는 달리 직장 및 결장의 선암과 인유두종 바이러스와의 관계에 대해서는 여러 보고들이 서로 다른 결과를 보이고 있다^{5, 14, 11, 22)}. 1990년 Kigran등¹⁴⁾은 면역조직화학염색법을 이용하여 대장의 정상 조직에서 23%, 양성 종양의 60%, 선암의 97%에서 인유두종 바이러스 항원이 발견되었고 ISH법에 의하면 양성 대장 종양의 27%, 선암의 43%에서 인유두종 바이러스 DNA가 발견되었다고 보고하였다. Cheng등⁵⁾도 Southern blot법을 이용하여 대장 선암에서 인유두종 바이러스 DNA를 발견하였다고 보고하였다. 그러나 Higgins등¹¹⁾이 선암을 제외한 41예의 항문암, 6예의 항문선암, 그리고 11예의 직장선암을 대상으로 HPV RNA에 대한 ISH를 시행한 결과를 보면 인유두종 바이러스 RNA는 직장 및 항문의 선암에서는 모두 음성인 반면 선암을 제외한 항문암에서는 73.2%에서 양성 반응을 보였다. Shroyer등²²⁾도 PCR을 이용한 조사결과 항문 편평상피암에서는 모두 인유두종 바이러스 DNA 양성이었다고 보고하였다. 저자들의 경우 25예의 직장 선암을 대상으로 ISH를 시행한 결과 Higgins등¹¹⁾과 Shroyer등²²⁾의 결과와 마찬가지로 전예에서 음성반응을 보여 직장 선암과 인유두종 바이러스와의 연관성을 찾을 수 없었다.

여성에서는 생식기 편평상피암의 조기 발견을 위해 HPV감염이 있거나 자궁경부에 high grade neoplasia가 있는 경우 정기적으로 질이나 외음부에 대한 검사를 시행하지만 이들 환자에서 항문에 대한 검사를 시행하는 경우는 드물다. 하지만 생식기에 HPV감염이 있는 환자에서 항문에도 HPV감염이 동반되어 있는 경우가 많기 때문에^{6, 21)} 이들 환자들, 특히 항후 암 발생의 위험이 높은 type 16, 18에 이환되어 있는 경

우에는 정기적으로 항문에 대한 검사를 시행하여 이상 소견이 보이면 조직검사가 필요할 것으로 생각된다. 최근 Heino등¹⁰⁾은 64명의 항문 유평피암 환자와 정상인 79명을 대상으로 HPV type 16의 capsid에 대한 혈청내 Ig G를 검사한 결과 유평피암 환자에서는 55%에서 양성인 반면 정상인에서는 4%에서만 양성을 보여 HPV type 16의 capsid에 대한 항체가 항문암의 혈청내 종양 표식자로 사용될 수도 있을 것으로 보인다.

결 론

항문암 환자를 대상으로 PCR에 의한 HPV DNA 검사 결과 46예중 30예(65.2%)에서 HPV type 16에 양성을 보여 인유두종 바이러스, 특히 type 16이 항문암의 원인인자로 작용함을 알 수 있었다. 또한 항문주위 편평상피암은 11예중 3예(27.3%)에서 양성반응을 보였고 항문관암은 35예중 27예(77.1%)에서 양성반응을 보여 항문관암에서 훨씬 높은 양성반응율을 보여 항문주위암과 항문관암의 원인인자로서 인유두종 바이러스의 역할에 다소 차이가 있을 가능성을 보였다. 항문관암의 병리학적 분류에 따른 차이는 항문관 편평상피암은 22예중 16예(72.7%), 총배설강암은 13예중 11예(84.6%)에서 양성율을 보여 항문관의 유평피암은 병리학적 분류에 관계없이 인유두종 바이러스와 깊은 관계가 있음을 보였다. 직장선암과 HPV와의 관계는 PCR보다 민감도가 낮은 ISH를 이용하였지만 전예에서 음성을 보여 HPV와의 관련성은 찾아볼 수 없었다.

항문부 침규 콘딜로마는 28예에서 ISH를 시행하였는데 26예(92.9%)에서 인유두종 바이러스 DNA에 대해 양성반응을 보였고 이중 24예(85%)는 type 6/11에 대해 양성 반응을 보였으며 2예(7.1%)에서만 type 16/18에 대해서 양성반응을 보여 항문암을 유발하는 HPV type과 다른 결과를 보였다. 따라서 항문암 환자에서는 생식기 침규 콘딜로마의 과거력이 높다고 하나 모든 콘딜로마가 동일하게 암발생 위험도를 갖는것은 아니며 항문 침규 콘딜로마 환자중 type 16에 이환된 환자에서 다른 type보다 향후 항문암의 발생 가능성이 높을 것으로 보인다. 따라서 다른 type보다 type 16에 이환되어 있는 경우에는 정기적으로

항문에 대한 검사가 필요할 것으로 보인다.

REFERENCES

- 1) American Joint Committee on Cancer: *Manual for staging of cancer. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1992*
- 2) Aparicio-Duque R, Mittal KR, Chan W, et al: *Cloacogenic carcinoma of the anal canal and associated viral lesions: An in situ hybridization study for human papillomavirus. Cancer 68: 2422, 1991*
- 3) Beckman AM, Acker R, Christiansen AE, et al: *Human papillomavirus infection in woman with multicentric squamous cell neoplasia. Am J Obstet Gynecol 165: 1431, 1991*
- 4) Chada MC, Rosenblatt EA, Malamud S, et al: *Squamous-cell carcinoma of the anus in HIV-positive patients. Dis Colon Rectum 37: 861, 1994*
- 5) Cheng JY, Meng CI, Chao CF, et al: *Human papillomavirus type-related DNA and c-myc oncogene alterations in colon cancer cell lines. Dis Colon Rectum 34: 469, 1991*
- 6) Daling JR, Weiss NS, Hislop TG, et al: *Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. N Engl J Med 317: 973, 1987*
- 7) Daling JR, Weiss NS, Klofenstein LL, et al: *Correlation of homosexual behavior and the incidence of anal cancer. JAMA 247: 1988, 1982*
- 8) Daling JR, Sherman KJ, Hislop TG, et al: *Cigarette smoking and the risk of anogenital cancer. Am J Epidemiol 135: 180, 1992*
- 9) Duggan MA, Borrás VF, Inoue M, et al: *Human papillomavirus DNA determination of anal condylomata, dysplasias, and squamous carcinomas with in situ hybridization. Am J Clin Pathol 92: 16, 1989*
- 10) Heino P, Eklund C, Fredriksson-Shanazarion V, et al: *Association of serum immunoglobulin G antibodies against human papillomavirus type 16 capsids with anal epidermoid carcinoma. J Natl Cancer Inst 87: 437, 1995*
- 11) Higgins GD, Uzelin DM, Phillips GE, et al: *Differing characteristics of human papillomavirus RNA-positive and RNA-negative anal carcinoma. Cancer 68: 561, 1991*
- 12) Holly E, Whittemore AS, Aston DA, et al: *Anal cancer incidence: Genital warts, anal fissure or fistula, hemorrhoids, and smoking. J Natl Cancer Inst 81: 1726, 1989*
- 13) Howley PM: *On human papillomaviruses (editorial). N Engl J Med 315: 1089, 1986*
- 14) Kirgan D, Manalo P, Hall M, et al: *Association of human papillomavirus and colon neoplasms. Arch Surg 125: 862, 1990*
- 15) Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N, et al: *Detection of human papillomavirus in formalin fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. Am J Surg Pathol 13: 221, 1989*
- 16) Morson BC, Sobin LH: *Histologic typing of intestinal tumours. Geneva: World Health Organization, 1976: 62*
- 17) Palefsky JM, Gonzales J, Greenblatt RM, et al: *Anal intraepithelial neoplasia and anal papillomavirus infection among homosexual males with group IV HIV disease. JAMA 21: 2911, 1990*
- 18) Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, et al: *Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. Cancer Res 51: 1014, 1991*
- 19) Palmer JG, Scholefield JH, Coates PJ, et al: *Anal cancer and human papillomavirus. Dis Colon Rectum 32: 1016, 1989*
- 20) Peters RK, Mack TM: *Patterns of anal carcinoma by gender and marital status in Los Angeles County. Br J Cancer 48: 629, 1983*
- 21) Scholefield JH, Sonnex C, Talbot IC, et al: *Anal and cervical intraepithelial neoplasia: possible parallel. Lancet 2: 765, 1989*
- 22) Shroyer KR, Kim JG, Michele Manos M, et al: *Papillomavirus found in anorectal squamous carcinoma, not in colon adenocarcinoma. Arch Surg 127: 741, 1992*
- 23) Wolber R, Dupuis B, Thiyagaratnam P, et al: *Anal cloacogenic and squamous carcinomas: Comparative histologic analysis using in situ hybridization for human papillomavirus DNA. Am J Surg Pathol 14: 176, 1990*
- 24) Zaki SR, Judd R, Coffield LM, et al: *Human papillomavirus infection and anal carcinoma: Retrospective analysis by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. Am J Pathol 140: 1345, 1992*

항문암, 항문 침규 콘딜로마 및 직장암과 인유두종 바이러스 감염과의 관계

전남대학교 의과대학 외과학교실, 소화기외과분과

김영진 · 주재환 · 김형록 · 김동의

= Abstract =

Human Papillomavirus Infection in Anal Carcinoma, Anal Condylomata and Rectal Carcinoma

Young Jin Kim, M.D., Jae Hwan Joo, M.D., Hyung Rok Kim, M.D.
and Dong Yi Kim, M.D.

*Division of Gastroenterologic Surgery, Department of Surgery,
Chonnam University Medical School*

In order to examine the association of human papilloma virus(HPV) infection with anal carcinoma, the authors used polymerase chain reaction(PCR) and in situ hybridization technique to detect HPV DNA in formalin fixed, paraffin-embedded tissues from 46 anal carcinoma patients. At the same time, 28 condyloma accuminata specimens and 25 rectal adenocarcinomas were examined for HPV DNA with in situ hybridization(ISH).

By PCR analysis, using type specific primers and probes for HPV 6, 11, 16, 18 and 33, HPV type 16 DNA was demonstrated in 30(65.2%) of 46 anal carcinoma specimens, but HPV type 6, 11, 18 or HPV type 33 was not identified. HPV DNA positivity was different according to the site of the anal carcinoma. In anal marginal squamous cell carcinoma, 3 (27.3%) of 11 contained HPV DNA but 27(77.1%) of 35 anal canal carcinoma contained HPV DNA. Among the anal canal carcinomas, the cloacogenic carcinoma contained HPV DNA in 11(84.6%) of 13 and squamous cell carcinoma contained in 16(72.7%) of 22 specimens. Two of six local recurrences and three of nine lymph node metastases had HPV-16 DNA. When the anal carcinomas were analysed using ISH technique for HPV type 6, 11, 16, 18, the frequency of positivity decreased to 4(11.4%) of 35 and stained only for HPV type 16/18.

Among the 28 condyloma accuminata specimens, 24(85.7%) contained HPV DNA type 6/11 and only 2(7.1%) contained type 16/18 by ISH technique. In contrast to anal carcinoma, male was predominant in condyloma accuminata patient(82.1% of 28) and 6 patients were homosexual man. HPV DNA was not demonstrated in all the cases of rectal adenocarcinoma by ISH.

We conclude that HPV infections are associated with the development of anal canal carcinoma but are not associated with adenocarcinoma of the rectum. In anal carcinomas, anal canal carcinoma is more closely associated with HPV infection than anal marginal carcinoma. Among the HPV types studied, type 16, 18 are more closely linked with malignant transformation.

Key Words: Human papillomavirus, Anal cancer, Condyloma accuminata, Rectal cancer

서 론

항문암은 드문 질환으로 대장직장암의 1~4%를 차지하고 있으며 원인인자로는 항문의 만성 염증성 질환, 남성 동성연애자, 흡연, 항문의 침구 콘딜로마(condyloma accuminata), 그리고 면역억제 등을 보고하고 있다²⁰⁾. 최근에는 인유두종 바이러스(human papillomavirus)가 항문암의 원인인자로서 대두되고 있으며⁶⁾ 인유두종 바이러스 중 특정 type이 항문 및 생식기의 편평상피암의 발생과 관련이 있다는 증거가 증가하고 있다¹³⁾. 인유두종 바이러스 type 16과 18은 주로 자궁경부, 외음부, 음경 그리고 항문의 high grade intraepithelial neoplasm 및 invasive squamous cell carcinoma 관련이 있는 반면에 인유두종 바이러스 type 6과 11은 생식기 침구 콘딜로마와 low grade intraepithelial neoplasm에서 더 많이 발견된다¹⁷⁾. 항문의 총배설강암 인유두종 바이러스와의 관계에 대해 보고자에 따라 상반된 결과를 보이며^{23,2)} 항문 및 직장의 선암과 인유두종 바이러스와는 논란이 많았지만 관계가 없는 것으로 보고하고 있다^{11,22)}. 인유두종 바이러스 DNA를 발견하는 방법은 여러가지가 있으며 In situ hybridization(ISH)은 조직표본에서 병변과의 관계를 직접 볼 수 있으나 민감도가 떨어지며 polymerase chain reaction(PCR)은 발견하고자 하는 DNA를 증폭시키기 때문에 민감도가 높은 방법으로 많이 사용되어 왔다. 최근에는 이들 두 가지 방법의 장점을 살린 In situ PCR 보급되고 있으나 보편화 되지는 못한 실정이다.

이에 저자들은 PCR과 ISH을 이용하여 항문암, 항문 침구 콘딜로마 및 직장암과 인유두종 바이러스 감염과의 관계를 알아보고 항문암의 원인 인자로 알려진 항문 침구 콘딜로마와 항문암에서의 인유두종 바이러스 type의 차이를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1) 조직 표본

뉴욕 Cornell 의과대학 병리학교실에서 50예의 항문암 환자의 원발성종양 50개, 암이 전이된 림프절 6개 및 국소재발을 보인 조직 9개와 32예의 항문 침구

콘딜로마 환자의 파라핀 조직괴를 얻었는데 항문암은 편평상피암이나 총배설강암만을 대상으로 하였고 흑색종이나 선암은 제외하였다. 직장암은 전남의대 외과학교실에서 수술을 시행했던 25예의 직장선암 환자의 파라핀 조직괴를 대상으로 하였다. 각각의 파라핀 조직은 hematoxylin-eosin 염색을 하여 병리학자의 도움을 얻어 조직학적으로 병변이 가장 저명한 부분을 선택하여 절편을 만들어 PCR과 ISH을 시행하였다. ISH로 검증한 HPV type은 항문 침구 콘딜로마와 관련이 높은 type 6, 11외에 항문암과 가장 관련이 높은 것으로 알려진 type 16, 18만을 대상으로 하였다. PCR로 검증한 HPV type은 보편적으로 항문암과 관련이 많은 것으로 알려진 type 16, 18, 33과 항문 침구 콘딜로마와 항문암의 관계를 보기 위해 항문 침구 콘딜로마와 관련이 많은 것으로 알려진 type 6, 11을 대상으로 하였다. 항문암은 총 50예중 46예에서 PCR을 시행하였고 35예에서 ISH를 시행하였다. 침구 콘딜로마는 총 32예중 28예에서 ISH를 시행하였으며 ISH결과 HPV DNA 발현율이 높았기 때문에 PCR은 시행하지 않았고 직장암은 ISH를 시행한 결과 전예에서 음성을 보여 HPV와 관련이 없는 것으로 보여 PCR은 시행하지 않았다. 또한 환자의 의무기록과 병리기록을 후향적으로 검토하여 이들 결과와 비교 검토하였다.

2) 항문암의 해부병리학적 분류

항문의 해부학적 구분은 AJCC¹¹⁾의 규정에 따라 항문관(anal canal)은 항문직장륜(anorectal ring)으로부터 항문연(anal verge)까지, 항문주위(anal margin)는 항문연으로부터 반경 5cm 이내로 하였다. 임상적 병기분류는 AJCC(1992)의 TNM 병기¹¹⁾에 의해 분류하였고 항문암의 병리조직학적 분류는 WHO분류법¹⁶⁾에 따라 분류하였다.

3) In situ Hybridization

파라핀 포매괴로부터 6 μ m의 두께로 절편을 잘라 amipropyltriethoxysilane(APES)로 코팅된 슬라이드(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)에 놓은후 xylene으로 10분 동안 파라핀을 제거하고 점차 저농도의 알코올로 가수하였다. 이 절편을 4% paraformaldehyde로 1분간 재 고정후 phosphate buff-

ered saline(PBS)으로 5분간 씻어내고 DNA를 고정시키기 위해 0.2N HCl에 20분, proteinase K (25 µg/ml)에 15분, 0.25% acetic anhydride 와 0.1M triethanolamine으로 10분간, 그리고 4% paraformaldehyde로 1분간 처리하였다. 슬라이드를 다시 세척한후 점차 고농도의 알코올로 탈수후 건조시켰다. 250 µl의 SSPE(0.9M sodium chloride, 50mM sodium phosphate, 5 mM EDTA, pH20), 200 µl의 10% dextran sulfate, 10 µl의 10 mM dithiothreitol, 150 µl의 250 µg/ml salmon sperm DNA, 그리고 500 µl의 50% formamide로 hybridization mixture를 만들고 여기에 인유두종 바이러스 type 6, 11, 16, 18에 대한 125I-labeled nick translated probe를 2×10⁷ c.p.m./ml 섞었다. 이 혼합물의 정제액을 조직절편에 유치시킨후 cover slip으로 덮고 가장자리는 rubber cement로 봉합하고 슬라이드를 hot-plate로 5분 동안 90°C까지 가열하였다. 이 슬라이드를 42°C의 humidity chamber에서 16시간 hybridization후에 조직절편을 0.5배 농도의 SSC(standard saline citrate)로 37°C와 50°C에서 각각 40분간 씻어내고 점차 고농도의 알코올로 탈수후 37°C에서 건조시켰다. 암실에서 슬라이드를 50% NTB-3(Kodak, Rochester, NY, U.S.A)와 50% 0.6 M sodium acetate로 코팅후 2~8°C에 48시간 노출시켰다. 슬라이드를 50% D-19 (Kodak), 2% acetic acid, E-4 fixer로 현상후 hematoxylin eosin으로 염색하고 현미경으로 관찰

하였다.

4) Polymerase chain reaction

PCR에 사용한 oligonucleotide primer는 HPV 6, 11, 16, 18, 33의 E6 ORF를 증폭시키기 위하여 DNA합성기 (Operon, Inc., Alameda, CA, U.S.A)로 제작하여 사용하였다.

먼저 파라핀 조직괴를 7 µm 두께로 절편을 두개 만든 다음 한개의 Eppendorf관에 넣고 500 µl의 xylene으로 파라핀을 제거하고 95% 알코올로 2회 세척한후 xylene을 원심분리하여 제거하고 건조시켰다. primer로 사용한 oligonucleotide는 HPV 6, 11, 16, 18, 33의 E6 ORF 부분을 증폭시키기 위해 DNA synthesizer로 만들어 사용하였다. 여기에 2.5 mM MgCl₂, 0.5% Tween 20, 50 mM KCl, 10 mM Tris(PH 8.3), 0.01% gelatin을 포함하는 100 µl의 buffer solution과 1 mM dNTP, HPV 6, 11, 16, 18, 33에 대한 primer 20 µM, 50 unit/ml Taq DNA polymerase(Perkin Elmer, Norwalk, CT, U.S.A)를 가한후 10분간 끓이고 이 용액에서 35 µl의 정제액을 추출하여 50번 증폭시켰다. 증폭후 표본을 실내온도에서 10분간 배양한 다음 20 µl의 반응액을 취하여 ethidium bromide로 염색하였다. 이 용액을 8.5% polyacrylamide gel에 전기영동을 실시한 다음 HPV 6, 11, 16, 18, 33 DNA발현을 측정하였다.

Table 1. Patient characteristics of anal cancer

	Margin(n=11)	Canal (n=35)		Total
		SCC*(n=22)	Cloacogenic(n=13)	
Sex ration(male: female)	6:5	8:14	6:6	20:26
Mean age	58.2	63.8	60.2	61.4
(range)	(30~75)	(45~86)	(45~78)	(30~86)
Stage CIS	1	2	1	4
I	5	0	1	6
II	5	11	7	23
III	0	8	3	11
IV	0	1	1	2

*squamous cell carcinoma