

# 자궁상피내암종 및 침윤성 편평상피암에서의 In Situ Hybridization에 의한 Human Papillomavirus DNA의 검색

계명대학교 의과대학 병리학교실 및 경북대학교 자연대학 유전공학과\*

이상숙 · 김기권 · 정재홍 · 진승원\* · 손우익\*

## 서 론

Human papillomavirus(이하 HPV라 함)로 인해 생기는 병소는 대부분 양성으로 wart 또는 condyloma로 나타난다. 그러나 어떤 형의 HPV는 자궁경부, 질(vagina)와 외음부(vulva)에 생기는 암에 밀접하게 관여하고 있음이 밝혀 졌다. Condyloma와 경도의 dysplasia는 HPV형종 6또는 11, 또는 양자를 주로 갖고 있고, 반면에 HPV형 16과 18과 최근에 발견된 형인 31, 33, 35는 자궁 경부에 생기는 상피 내암과 침윤성 암에서 HPV형종 6과 11보다 더욱 많이 발견되어 자궁경부병소내에 포함된 HPV의 형을 알 필요성이 대두하게 되었다<sup>1)</sup>.

최근까지도 한국여성에서 가장 흔히 생기는 암은 자궁경부암으로 수위를 차지하고 있다<sup>2)</sup>. HPV type은 세포진이나 조직학적 검사만으로는 알수 없고 HPV에 대한 antiserum을 이용한 면역조직화학기법이 사용되어 왔으나 이 방법은 항원의 존재와 분포를 알려 주나 모든 병소, 특히 고도의 상피내암과 침윤성암에서 HPV를 거의 발현하지 못한다. 더욱이 이 방법으로는 HPV의 형을 알 수 없다<sup>3,4)</sup>. HPV에 감염된 분명한 증거를 얻기 위해서는 생검조직내 HPV DNA의 존재를 규명하여야 하는데 그 방법으로 nucleic acid hybridization을 하여야 한다. Nucleic acid hybridization기법으로는 filter hybridization(Southern blot 포함)과 in situ hybridi-

zation이 있다. In situ hybridization은 filter hybridization보다 장점이 있는데 그것은 HPV에 감염된 세포의 존재와 위치 뿐 아니라 조직의 형태를 동시에 알 수 있는 점이다<sup>5,6)</sup>. 더욱 최근에는 biotin-labeled DNA probe의 개발로 formalin으로 고정되고 paraffin으로 포매된 조직에도 비교적 간편한 방법으로 조직내에서 HPV DNA의 발현 및 각 형까지도 알 수 있게 되어 자궁경부암의 후향적 연구가 비로서 가능하게 되었다<sup>7,8)</sup>.

아직 한국 여성 자궁경부암의 biotinylated HPV DNA probe를 이용한 연구실적이 미미한 실정이다. 이에 저자들은 본 연구를 통하여 자궁경부암과 HPV와의 관계 특히 각 병소에 따른 HPV 형의 특성과 빈도 및 동반된 condyloma의 특성에 대해 알아 보고자 한다.

## 재료 및 방법

연구대상은 1986년부터 1989년 사이에 행한 자궁경부 생검중 광학현미경 소견상 koilocytotic atypia가 보이는 condyloma 9예, 상피내암 26예와 침윤성 편평상피암 22예를 대상으로 하였다. Paraffin block에서 조직 절편을 얻어 Life technologies사의 Vira type in situ Human Papillomavirus Tissue Hybridization Kit와 Vira type in situ HPV DNA Probes를 이용하여 kit에서 정해진 방법에 따라 염색하여 생검조직내에서 HPV DNA를 발현하여 각병소의 HPV의 발현빈도, HPV의 종류 및 그 분포를 검색하였다. Vira type in situ HPV DNA probes는 5종류로 이루어져 있는데 그 중에는 HPV DNA type 6/11, 16/18, 31/33/35의 mixed probe와 positive와 negative control probe가 포함되어 있었다.

\*본 논문의 요지는 1989년 10월 20일 대한병리학회 제41차 추계학술대회에서 발표되었음.

\*\*이 논문은 1990년도 계명대학교 을종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

In situ hybridization방법을 요약하면 다음과 같다<sup>10,11)</sup>. Paraffin으로 포매된 생검조직을 박절하여 AES(3-aminopropyltriethoxysilane)으로 전처리한 슬라이드위에 부착한 후 56°C에서 하루밤 부란하였다. 탈파라핀과정을 거친 후 조직내에 포함된 고정된 target DNA를 노출시키기 위하여 proteolytic enzyme과 HCl로 37°C에서 15분간 부란하여 digest시켰다. Heating block을 92±2°C로 미리 덩혀 높은 후 각 형의 biotinylated HPV mixed probe를 슬라이드위의 조직 절편위에 놓아 5분간 열을 가함으로써 double stranded HPV DNA probe와 target DNA가 동시에 single strand로 denature되게 하였다. 그후 probe와 target의 homologous sequence간에 hybridization시키기 위해 37°C에 2시간 부란하였다. Hybridization의 detection은 probe와 결합된 alkaline phosphatase conjugate를 사용하여 37°C에서 20분간 부란하고 발색용 substrate로 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)와 NBT (nitroblue tetrazolium)를 사용하여 37°C에서 1시간동안 alkaline phosphatase를

dephosphorylation시켜 HPV DNA hybridization된 probe의 장소에 purplish blue precipitate가 침착되게 하였다. 끝으로 nuclear fast red로 대조염색하여 조직내 target DNA의 발현과 함께 형태적 검사도 가능하게 하였다.

## 성 적

Condyloma군은 9예로 그중 flat condyloma는 2예, papillary condyloma 4예, inverted condyloma 1예, spiked condyloma는 2예였다. Condyloma군의 연령분포는 21세에서 71세사이로 평균 37.9세였다. 상피내암(이하 CIN라 함)군은 26예로 그중 CIN grade II가 5예, CIN grade III가 21예였다. CIN군의 연령분포는 20세에서 60세사이로 평균 41.0세였다. CIN군에서 condyloma의 병소가 24예(92.4%)에서 수반되었는데 각 형별로 보면 flat condyloma는 20예, spiked condyloma는 4예였다. 침윤성 편평상피암군은 총 22예로 연령분포는 28세에서 64세사이로 평균 45.1세였다.

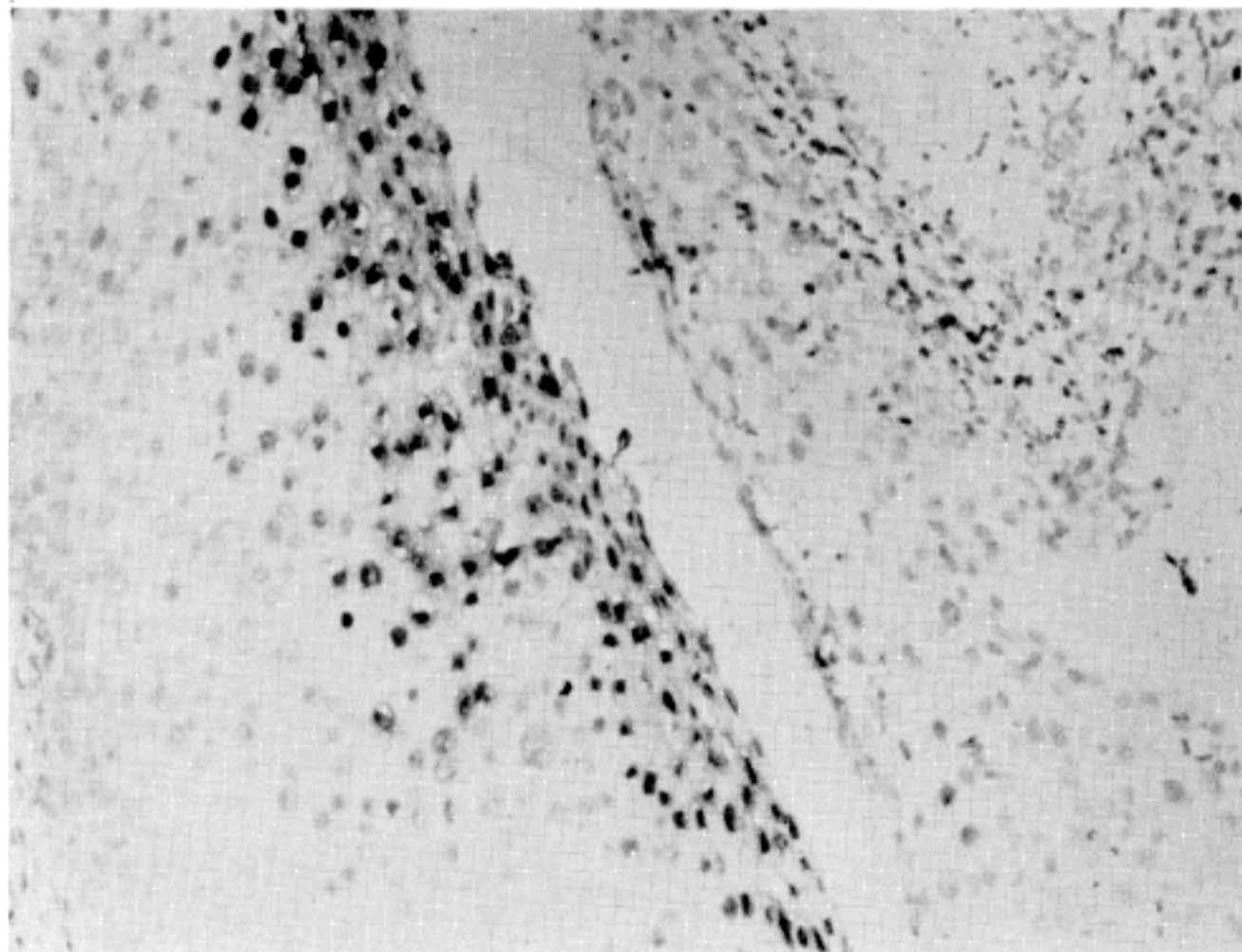


Fig. 1. In situ hybridization of flat condyloma and CIN grade II with a mixed probe of HPV-31/33/35. There is focal staining in the nuclei of the superficial epithelial cells, contrasted by the opposite epithelium(× 100).

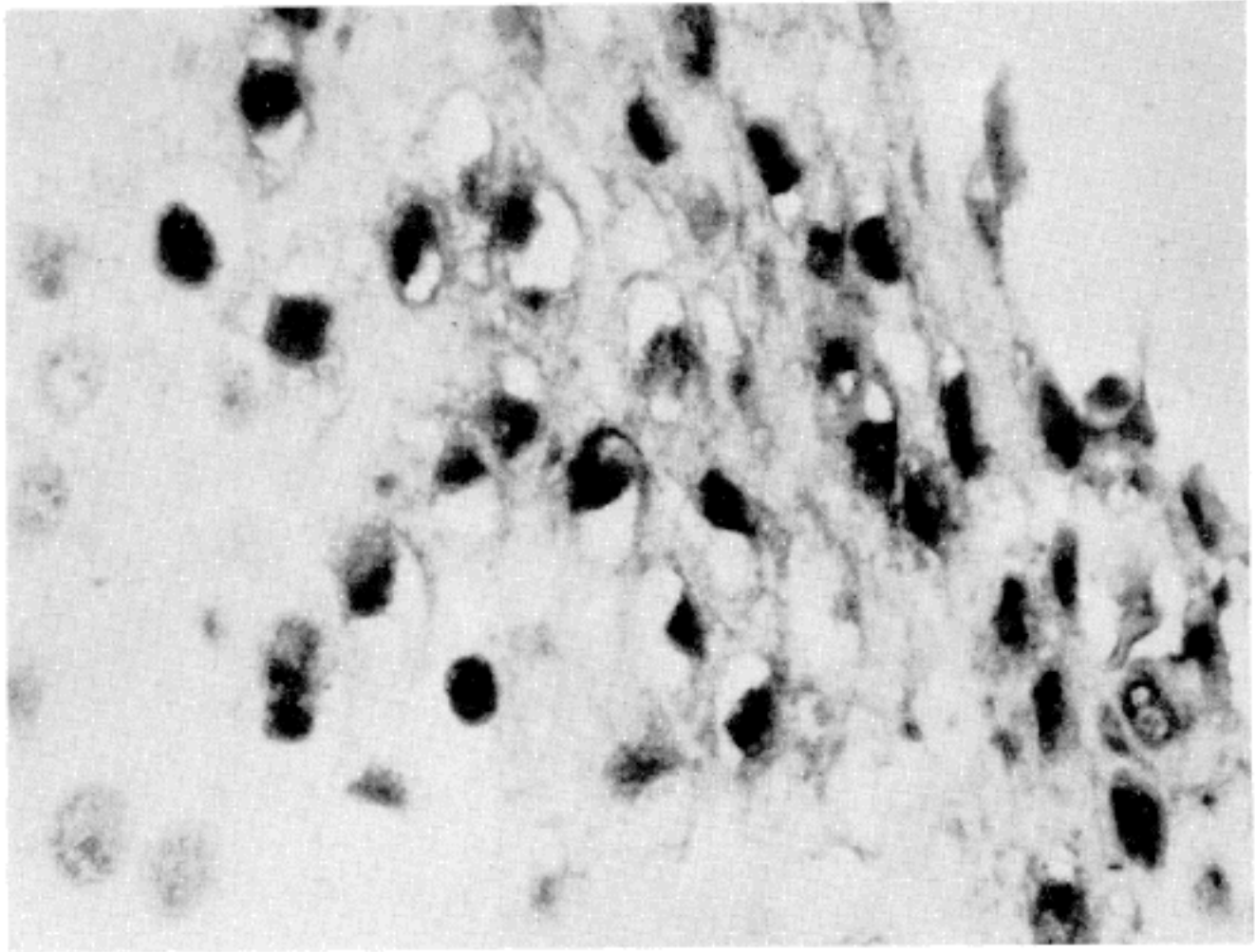


Fig. 2. High power detail of Fig. 1, showing regular distribution of staining in the nuclei of the koilocytes( $\times 400$ ).

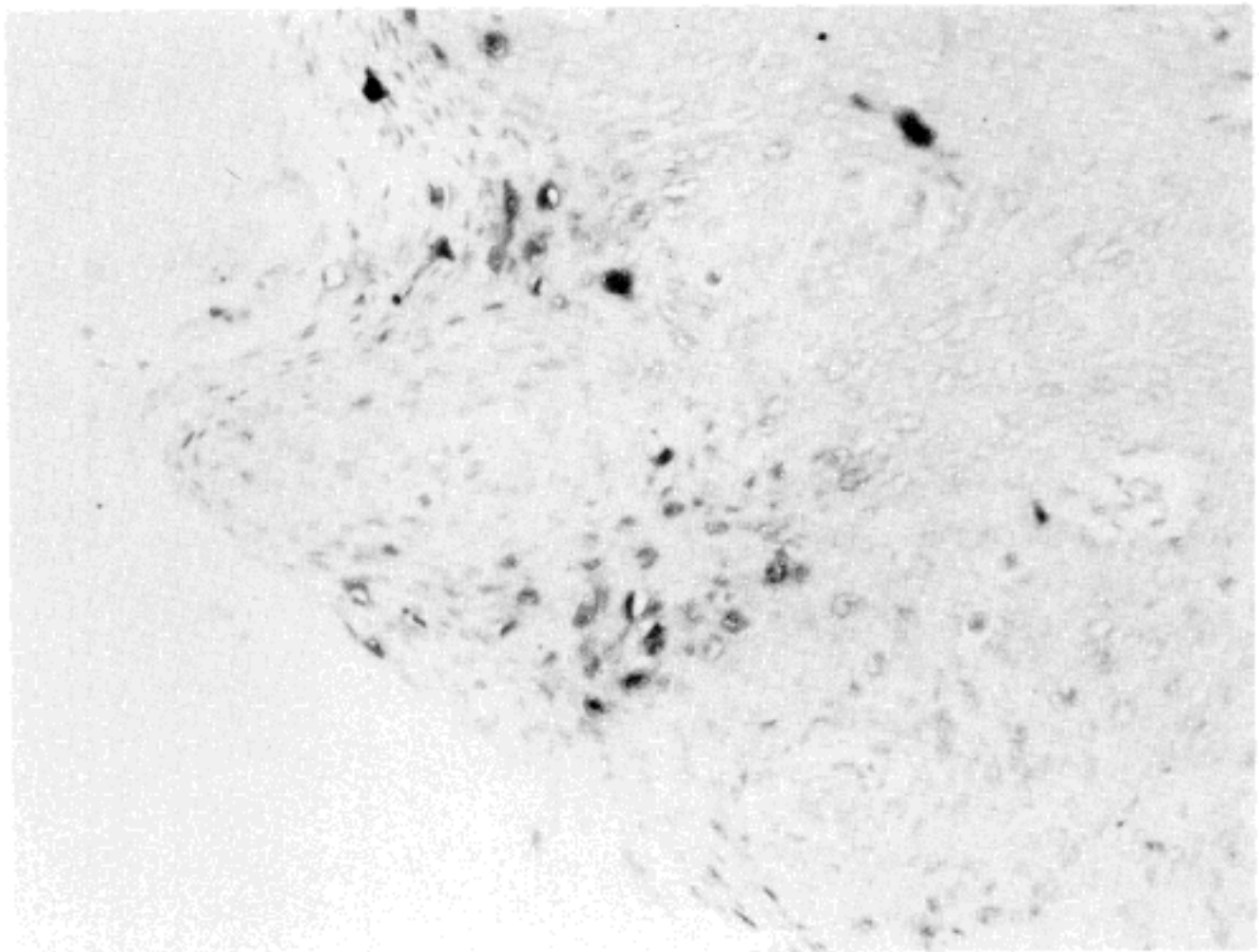


Fig. 3. In situ hybridization of spiked condyloma and CIN grade III with a mixed probe of HPV-16/18, showing patchy distribution of the nuclear staining in the mature cells and koilocytes( $\times 100$ ).

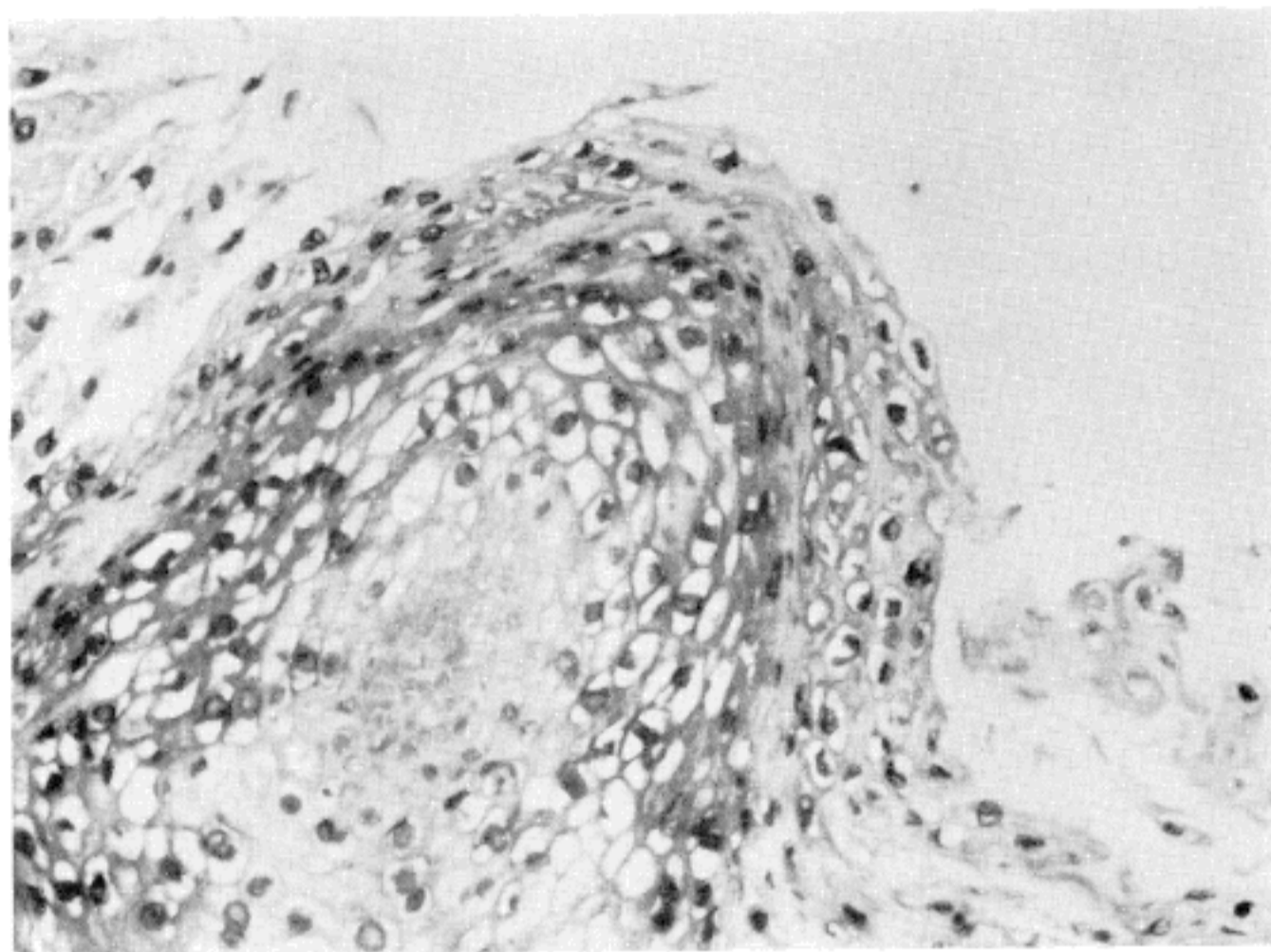


Fig. 4. In situ hybridization of papillary condyloma with a mixed probe of HPV-6/11. There is evenly distributed nuclear staining throughout the upper half of the epithelium( $\times 200$ ).

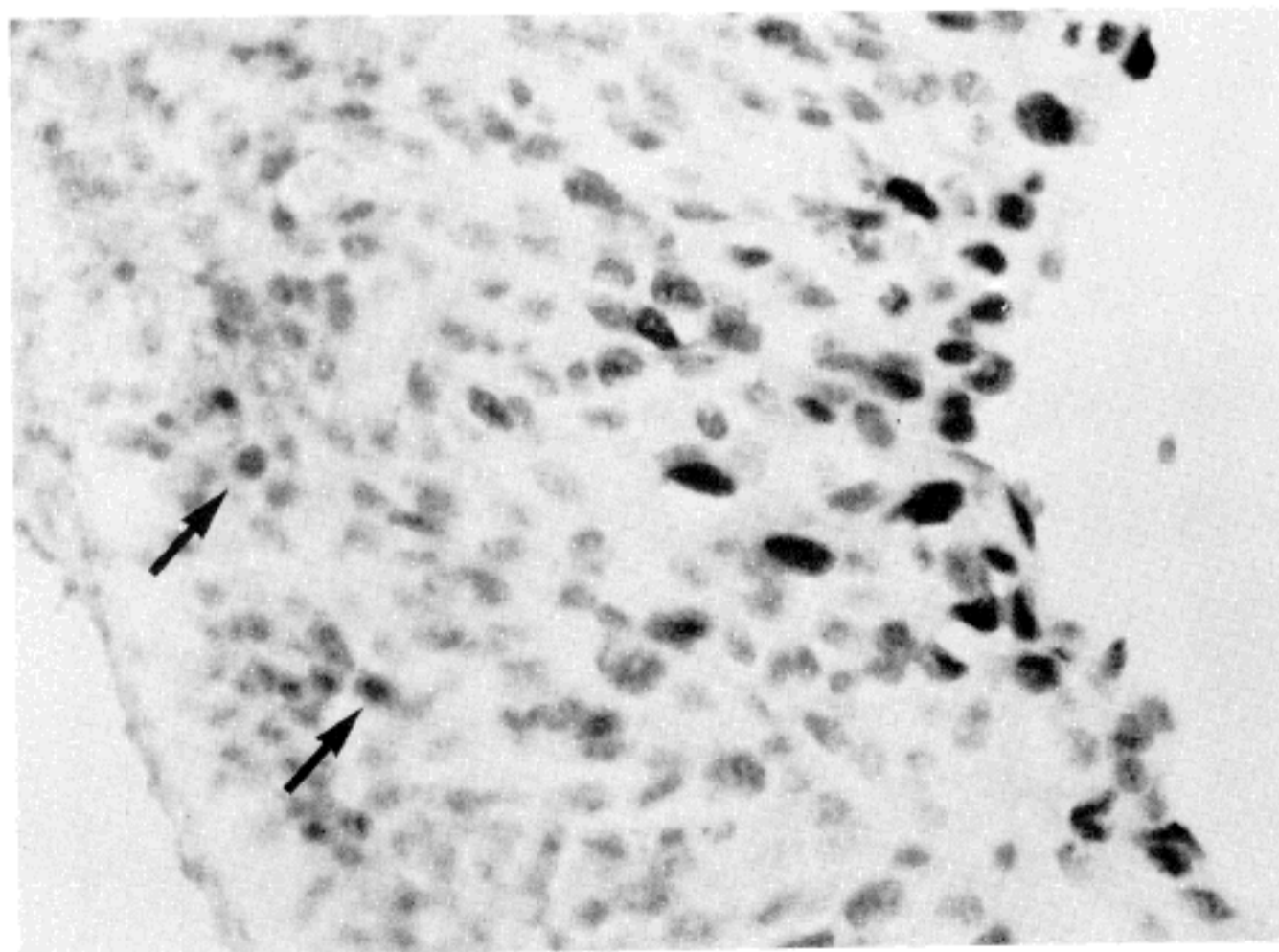
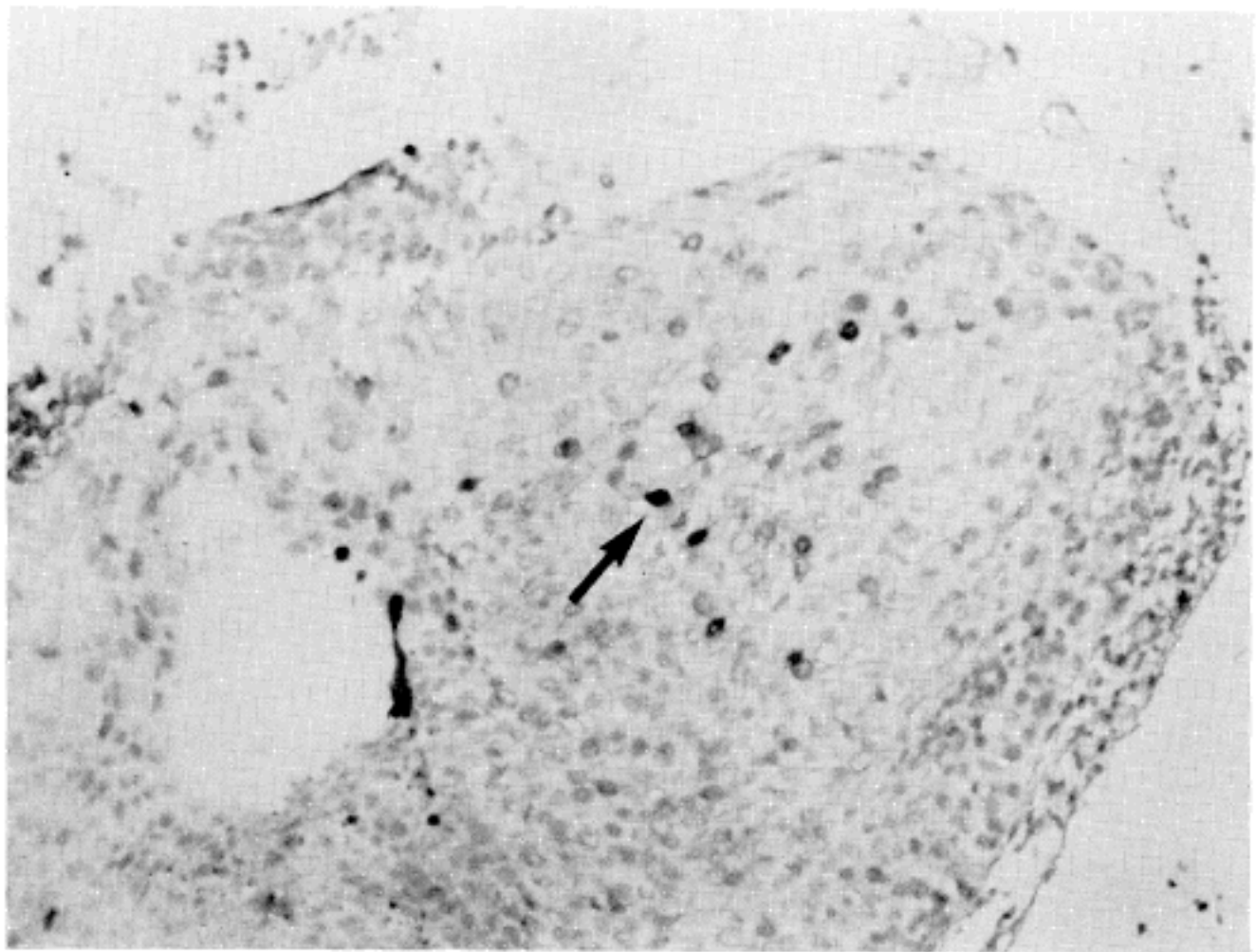


Fig. 5. In situ hybridization of flat condyloma and CIN grade III with a mixed probe of HPV-31/33/35. Staining is strongest in the superficial epithelial cells, and some staining is present in the nuclei near the basal cell layer(arrows)( $\times 400$ ).





**Fig. 6.** In situ hybridization of invasive squamous cell carcinoma with a mixed probe of HPV-31/33/35. There are several pale nuclear stainings in the invasive nests of tumor cells (arrow) ( $\times 200$ ).

이 군에서 condyoma의 병소가 9예(40.9%)에서 보였는데 flat condyloma는 3예, papillary condyloma 3예, inverted condyloma 1예, spiked condyloma는 2예였다.

In situ hybridization에 의해 HPV DNA는 주로 국소적(focal)이고 다발성(multicentric)으로 존재하였는데 주로 상피의 상층에 있는 세포의 핵에 검은 청보라빛으로 염색되었다(Fig. 1~3). 염색되는 강도는 다양하였다. 그러나 papillary condyloma 1예에서 HPV-6/11에 상피의 상 1/2에 해당하는 거의 모든 세포의 핵에 고르게 진한 청보라빛으로 염색되었다(Fig. 4). 곳에 따라서 상피의 기저층이나(Fig. 5) 간질로 침범하고 있는 종양세포소(nest)에서도 드물게 발견되었다(Fig. 6). HPV DNA는 H & E 염색상 koilocyte의 양상을 보이거나 maturation을 보이는 세포의 핵에 주로 존재하였다. 같은 병소내에서도 koilocytosis가 뚜렷한 부위가 그렇지 않은 부위보다 더욱 많은 수의 핵에서 더욱 진하게 염색되어 koilocytosis를 보이는 세포의 핵에서 훨씬 많은 양의 HPV DNA를 갖고 있음을 알 수 있었다.

**Table 1.** Incidence of HPV infections in cervical biopsies

|              | No. of biopsies | % Total | % Positive |
|--------------|-----------------|---------|------------|
| Positive     | 42              | 73.7    | —          |
| HPV-6/11     | 13              | 22.8    | 31.0       |
| HPV-16/18    | 23              | 40.4    | 54.8       |
| HPV-31/33/35 | 29              | 50.9    | 69.0       |
| Mixed        | 18              | 31.6    | 42.9       |
| Negative     | 15              | 26.3    |            |
| Total        | 57              | 100.0   |            |

Due to a number of multiple infection, the total of biopsies tested (n=57) is lower than the sum of positive and negative cases.

HPV-16/18과 HPV-31/33/35등 두가지 이상의 HPV 군에 양성을 보이는 경우 대체적으로 HPV-31/33/35는 HPV-16/18, HPV-6/11에 비하여 더욱 많은 세포에서 더욱 진한 색깔로 염색되었다.

HPV DNA는 총 57예중 43예(75.4%)에서 발견되었다. 그중 HPV-6/11은 13예(22.8%), HPV-16/18는 23예(40.3%), HPV-31/33/35는 32예(56.1%)였다

Table 2. Distribution of HPV types in different cervical lesions

| HPV type detected | Condylomas |      | CIN II |     | CIN III |      | Invasive SCC* |      |
|-------------------|------------|------|--------|-----|---------|------|---------------|------|
|                   | No         | %    | No     | %   | No      | %    | No            | %    |
| Positive          | 6          | 66.7 | 3      | 60  | 17      | 81.0 | 19            | 86.4 |
| HPV-6/11          | 3          | 33.3 | 1      | 20  | 5       | 23.8 | 4             | 18.2 |
| HPV-16/18         | 3          | 33.3 | 0      | 0   | 10      | 47.6 | 10            | 45.5 |
| HPV-31/33/35      | 3          | 33.3 | 2      | 40  | 13      | 61.9 | 13            | 59.1 |
| Mixed             | 2          | 22.2 | 1      | 20  | 9       | 42.9 | 6             | 27.3 |
| Negative          | 3          | 33.3 | 2      | 40  | 4       | 19.0 | 3             | 13.6 |
| Total             | 9          | 100  | 5      | 100 | 21      | 100  | 22            | 100  |

\* SCC : Squamous cell carcinoma

Table 3. Incidence of multiple HPV infection in different cervical lesions

| HPV type detected                   | Condylomas | CIN II | CIN III | Invasive SCC* | Total |
|-------------------------------------|------------|--------|---------|---------------|-------|
| HPV-6/11 + HPV-16/18                | 0          | 0      | 1       | 1             | 2     |
| HPV-6/11 + HPV-31/33/35             | 0          | 1      | 0       | 0             | 1     |
| HPV-16/18 + HPV-31/33/35            | 1          | 0      | 4       | 3             | 8     |
| HPV-6/11 + HPV-16/18 + HPV-31/33/35 | 1          | 0      | 4       | 2             | 7     |
| Total                               | 2          | 1      | 9       | 6             | 18    |

Table 4. Types of condyloma associated with different cervical lesions

|                      | Flat Condyloma | Papillary Condyloma | Inverted Condyloma | Spiked Condyloma | Total |
|----------------------|----------------|---------------------|--------------------|------------------|-------|
| No atypia (n=9)      | 2              | 4                   | 1                  | 2                | 9     |
| CIN II (n=5)         | 4              | 0                   | 0                  | 1                | 5     |
| CIN III (n=21)       | 16             | 0                   | 0                  | 3                | 19    |
| Invasive SCC* (n=22) | 3              | 3                   | 1                  | 2                | 9     |
| Total                | 25             | 7                   | 2                  | 8                | 42    |

(Table 1).

2종류이상의 HPV probes에 양성인 경우는 18예 (31.6%)로 HPV-16/18과 HPV-31/33/35가 함께 공존하는 경우가 14예 (24.6%), HPV-6/11, HPV-16/18과 HPV-31/33/35의 3종류가 함께 공존하는 경우가 9예 (15.8%)로 대부분을 차지하였다(Table 2).

각 질환별로 보면 condyloma는 HPV 양성율이 66.7%, CIN는 69.2%(CIN grade II가 40.0%, CIN grade III는 76.2%), 침윤성 편평상피암은 86.4%로 병소가 진행됨에 따라 더욱 높은 양성율을 보였다. Condyloma만 있는 경우 HPV 각형간의 빈도 차이가

없으나 CIN과 암병소에는 HPV-31/33/35가 가장 많고 그 다음이 HPV-16/18, HPV-6/11의 순이었다(Table 3).

단독으로 존재하거나 다른 병소에 수반된 condyloma의 유형별로 보면 flat condyloma는 CIN에 수반되는 주된 형으로 90.9%를 차지하고 있다. Papillary condyloma는 57.1%이 양성이나 그 나머진 42.9%은 침윤성 편평상피암과 수반되었다. 반면 spiked condyloma는 75.0%에서 CIN 또는 편평상피암과 동반되었다(Table 4).

## 고 찰

본 연구에서 저자들은 자궁경부 생검중 HPV 감염의 특징적 소견을 보이는 condyloma 9예, CIN 26예와 침윤성 편평상피암 22예의 상피에서 biotin-labeled HPV DNA probe를 사용한 in situ hybridization에 의해 HPV DNA sequence의 분포를 검색하여 condyloma 병소의 66.7%, CIN 병소의 69.2%, 침윤성 편평상피암의 86.4%에서 HPV DNA sequence를 발견하였다. HPV DNA는 전예의 73.7%에서 발현되었는데 그중 HPV-31/33/35가 56.1%로 가장 많았고 그 다음이 HPV-16/18로 40.3%에서, HPV-6/11은 22.8%순이었다. 2종류 이상의 probe에 양성인 경우가 31.6%였다.

Recombinant DNA technology 분야의 급격한 발전으로 병리적출물에서 DNA probe를 사용하여 특정한 핵산의 sequence를 인지함으로써 질병을 진단하는데 이용하게 되었다<sup>12)</sup>. 본 연구에서 사용한 in situ hybridization은 biotin-labeled, single-stranded DNA probe가 연구대상의 조직내에 있는 target DNA의 complementary sequence와의 특수한 결합에 의해 positive signal를 나타 내어 특정 DNA의 존재를 알게 된다. 그리고, in situ hybridization에서는 immunohistochemistry에서 문제가 되는 paraffin 포매시 열처리, formalin고정, 또는 trypsinization 같은 과정에서 핵산 구조를 파괴한다든지 nucleotide sequence를 변경시킨다는 증거가 없어 실제로 formalin으로 고정되고 paraffin으로 포매된 조직 절편에도 적용이 가능하다<sup>7)</sup>. Beckman<sup>8)</sup>에 의해 생식기에 생기는 condyloma의 조직 절편에서 HPV DNA probe를 이용한 in situ hybridization을 실시하여 immunohistochemistry에 의해 발현된 viral capsid antigen에 대한 양성반응을 보인 세포보다 더 많은 수의 세포에서 양성반응을 보여 in situ hybridization이 더욱 감수성이 높음이 밝혀 졌다. Jenkins<sup>4)</sup>에 의하면 immunohistochemistry로 단지 productive HPV 감염과 수반되는 조직학적 변화만을 아는데 도움을 줄뿐 감수성이 떨어져 세포진 검사나 조직검사의 진단적 보조용으로는 미흡함을 지적하였다. 그러나 in situ hybridization이 Southern blot hybridization보다 HPV sequence를 인지하는데 훨씬더 감수

성이 적음이 큰 결점으로 들수 있다. Biotin-labeled probe를 사용한 in situ hybridization으로 HPV DNA sequence를 검출할 수 있는 sensitivity는 한 세포당 존재하는 DNA가 약 800 copy 이상으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 연구 대상 조직내 충분한 copy수의 gene이 존재하거나 gene의 transcribed messenger RNA가 있어야만 probe와 결합되어 in situ hybridization에 의해 양성 반응을 나타나게 된다. 그러나 Southern blot hybridization으로는 평균 한 세포당 0.5 copy이상이 있으면 HPV DNA sequence를 검출할 수 있다고 한다<sup>13)</sup>. 이론적으로 HPV DNA가 매우 고르게 분포되거나 세포당 800개 보다 적은 수의 DNA copy를 갖는다면 in situ hybridization으로는 발현되지 않을 것이다. 본 연구에서 형태적으로 HPV 감염을 제시하는 형태적 소견이 보임에도 in situ hybridization으로 전체의 26.3%에서 어느 종류의 HPV DNA에도 염색되지 않았다. 이와 같이 HPV에 염색되지 않는 경우는 아마 조직체취시의 다양함이나 HPV sequence의 copy수가 적기 때문으로 사료되지만, 아직 발견되지 않은 형의 HPV의 감염도 그 요인으로 배제하지 않을 수 없다.

자궁 경부암의 원인 인자로서 HPV가 강력히 대두되고 있다<sup>1,3,6,8)</sup>. HPV는 약 800 base pair크기의 double-stranded circular DNA molecule을 갖는 icosahedral viral particle로 protein capsid에 의해 둘러 싸여 있다<sup>14)</sup>.

HPV는 피부나 점막에 감염되어 지속적으로 존재하면 상피의 세포수를 증가시키거나 keratinocyte의 수명을 연장시켜 상피증식으로 유발하나 어느 정도 자라면 많은 예에서 저절로 없어진다. 특히 자궁경부의 squamocolumnar border에 있는 상피세포가 HPV에 쉽게 노출되어 HPV 감염의 90%는 이 부위에서 생긴다<sup>15)</sup>.

상피세포는 그들의 분화 초기에는 HPV 증식이 쉽게 이루어 지지 않으나 분화가 진행됨에 따라 점점 더 HPV에 용이하게 감염되어 in situ hybridization에 의해 viral DNA는 상피의 전 층에 걸쳐 존재하나 HPV virion은 단지 상피의 상피층에 나타나게 된다. Virus에 의한 세포의 손상이 상피의 과립층에서 가장 눈에 띄이는데 생식기 점막에 HPV가 감염되면 흔히 koilocytotic atypia를 유발한다. 자궁경부에서 koilocytotic atypia의 개념은 Koss<sup>16)</sup>에 의해 처음 정의가 내려졌다.

이 병소의 특성은 큰 상피세포가 세포의 1/2만큼 차지하는 큰 핵을 가지고 핵의 chromatin의 clumped되고 핵 주변에 텅빈 halo를 갖는 세포질로 포위된다. 세포막과 핵막도 매우 불규칙적이다. 그 밖에 핵이 둘 이상일 경우도 많다. 이런 koilocytotic atypia에 수반되는 핵과 세포질의 변화는 처음 중간층의 세포들에서 생기고 점차 변화가 상피의 표면으로 연장된다. Viral capsid antigen과 particle이 koilocyte에 주로 존재한다<sup>17,18)</sup>.

본 연구에서 대상을 생검조직내 koilocytotic atypia의 소견이 있는 예를 대상으로 하였는데 73.7%의 많은 예에서 HPV DNA의 발견되어 HPV DNA의 존재를 가늠하는 감수성이 높은 형태적 표지자가 됨을 알 수 있었다. 각기 다른 HPV형에 따른 병소간의 분명한 조직학적 차이점은 발견할 수 없었다. In situ hybridization으로 HPV DNA는 대부분 상피세포의 표면에 있는 광학현미경소견상 koilocytotic atypia 또는 maturation을 보이는 세포의 핵에 주로 국소적으로 여러 군데 존재하였다. 그러나 몇몇 예의 CIN에서는 상피의 전 층에 걸쳐 HPV DNA가 고르게 존재하였는데 상부기저층에서도 드물게 관찰되었다. 이와 같이 HPV DNA가 CIN 병소에서 상피의 기저층 가까운 핵에서 발현됨은 이 지역에 국소적(focal), 세포 성숙 전단계와 관련되는 듯하다. 즉 HPV는 대체로 상피의 기저세포를 감염하는데 이 기저세포가 HPV가 증식되기 좋은 환경을 제공한다든가 설을 지지하는 한 소견이 된다고 생각된다<sup>19)</sup>.

자궁경부에 생기는 condylomatous 병소의 존재가 넓게 인정된 후로 HPV 감염에 수반된 자궁경부 병소의 병리조직소견을 관독할 때 실제 예후에 영향을 미치는 것을 수반하고 있는 dysplasia의 정도이다. 이와 함께 병소내에 있는 HPV의 형의 결정이 환자의 치료, 예후를 결정하는데 가장 넓은 정보를 제공하는 것이 된다<sup>17)</sup>. Molecular hybridization 연구에 의하면 dysplasia에는 여러개의 HPV형이 다양하게 존재하지만 침윤성 편평상피암에서는 단지 소수의 HPV형만이 존재한다고 밝혀졌다. Gissman등<sup>19)</sup>에 의하면 HPV 형중 6과 11이 정도의 dysplasia에 생기고 드물게 침윤성 암병소에 생기나 16과 18은 고도의 dysplasia와 침윤암에서 발견되어 dysplasia병소의 발암잠재력(potential)이 HPV형에 달려 있음이 시사하였다. 그러나 Brecia<sup>20)</sup>에 의하면 정도의 dysplasia에서 HPV-6/11이외에도 16과 31형도 상당수 발견되었다고 보고하였다. 반면 HPV형중 16,

18과 31는 고도의 dysplasia, 상피내암 및 침윤성 암에서 보여 대부분의 정도의 dysplasia는 “low-risk” HPV형인 6, 11등을 가져 암으로 될 가능성은 적거나 없으나 반면 소수의 정도의 dysplasia는 암전구체로 될 수 있는 “high-risk” HPV형인 16과 31을 갖는데 이는 “high-risk” HPV형은 정도의 dysplasia로부터 전파됨을 나타낸다.

HPV 16은 세계적으로 CIN증례에서 발견되는 가장 흔한 virus이고<sup>13)</sup> HPV 18은 정도의 CIN에서 고도로 진행될 위험성을 나타낸다고 최근 알려져 있다<sup>21)</sup>. 그 밖에 HPV형중 31, 33과 35가 자궁경부암에서 발견된 HPV의 20%를 차지하였다고 보고되었다<sup>22~24)</sup>.

본 연구에서 각 질환별로 보면 condyloma는 HPV 양성율이 66.7%, CIN는 69.2%(CIN grade II가 40.0%, CIN grade III는 76.2%), 침윤성 편평상피암은 86.4%로 병소가 진행됨에 따라 높은 양성율을 보였다. Condyloma만 있는 경우 HPV 각형간의 빈도 차이가 없으나 CIN과 암병소에는 HPV-31/33/35가 가장 많고 그 다음이 HPV-16/18, HPV-6/11의 순이었다.

Syrjanen<sup>25)</sup>에 의하면 전 자궁경부생검조직의 55.6%가 HPV 감염의 병소가 상피의 이형성(atypia)가 동반되어 관찰되었는데 flat과 inverted condyloma에서 papillary condyloma보다 더욱더 심한 dysplasia가 수반되었다. 자궁경부에서는 flat condyloma가 가장 많고 그 다음으로 papillary와 inverted type이다<sup>18)</sup>. 그리고 전형적인 유두상의 condyloma acuminatum은 자궁경부에서는 드물다고 한다<sup>26,27)</sup>. 본 연구에서 단독으로 존재하거나 다른 병소에 수반된 condyloma의 유형별로 보면 flat condyloma는 CIN에 수반되는 주된 형으로 90.9%를 차지하고 있다. Papillary condyloma는 57.1%이 양성이나 그 나머지인 42.9%은 침윤성 편평상피암과 수반되었다. 반면 spiked condyloma는 75.0%에서 CIN 또는 편평상피암과 동반되었다.

HPV형중 6과 11은 관계가 밀접하여 high stringency의 조건하에서 25%의 cross hybridization을 보인다. 전체적인 nucleotide homology는 82%이다. HPV형 중 16과 18은 더욱더 유사하여 약 35%에서 cross hybridization을 보이고 nucleotide homology는 90% 근처이다. 그러나 HPV형 중 33과 16과는 관계가 멀어 구별하는데 어려움이 없다. HPV형 18과 HPV 32 사이에 10%의 cross hybridization을 보이나 HPV형



18과 35는 서로 긴밀한 관계가 없다고 알려져 있다<sup>15)</sup>. 그러므로 HPV형 중 6과 11, 16과 18의 혼합 감염을 판정할 때 신중해야 함을 시사한다 하겠다.

본 연구에서 같은 환자가 동일조직내 2가지 이상의 mixed probe에 양성으로 발현된 예가 18예(31.6%)로 의외로 많았다. 그중 HPV-16/18과 HPV-31/33/35가 함께 공존하는 경우가 14예(24.6%), HPV-6/11, HPV-16/18과 HPV-31/33/35의 3종류가 함께 공존하는 경우가 9예(15.8%)로 대부분을 차지하였다.

Syrjänen<sup>28)</sup>에 의하면 HPV와 자궁경부 편평상피암 발생을 연결하는 요인을 다음과 같이 요약하고 있다. (1) 자궁경부내 HPV 감염은 성적으로 전염되는 질병이다. (2) 자궁 경부내 HPV 병소는 CIN과 유사한 임상양상을 보인다. 즉 상피내암 으로 진행될 잠재력을 가진다. (3) 악성 이행여부는 HPV의 형에 달려 있으며 이는 HPV DNA가 숙주의 세포 DNA에 integration됨에 의해 조정된다. (4) 악성 이행은 아마 virus와 화학적 혹은 물리적 암유발인자, 또는 다른 감염균 간의 synergistic effect를 필요로 하는 것 같다. (5) 유전적 체질이 HPV에 의한 악성이행과정에 중요한 작용을 하는 것 같다. (6) 숙주의 면역방어 기전이 아마 자궁경부의 HPV감염의 경과를 변경시킬 수 있다고 제시하였다.

본 연구의 결과를 종합하면 HPV감염이 자궁병소에 생기는 상피내암 및 침윤성 암의 발생에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 이미 알려진 HPV-16/18보다 HPV-31/33/35이 더 높은 빈도를 발견되어 HPV-31/33/35가 HPV-16/18보다 더 큰 암으로 변할 잠재력을 시도하였다. 그리고 지금까지 알려진 HPV 감염의 형태적 표지자로 koilocytotic atypia가 유의함과 동시에 자궁경부조직내에 flat 또는 spiked condyloma의 병소가 있으면 적어도 CIN이상의 병소가 있을 가능성을 높게 암시하는 소견이 됨을 또한 알 수 있었다. 자궁경부의 CIN 및 침윤성 편평상피암의 보다 정확한 HPV의 감염율 및 유형을 알기 위해서는 치밀한 사전 계획하에 많은 예의 자궁경부조직을 이용한 Southern nucleic acid hybridization도 같이 검해야 할 것으로 사료된다.

### 결 론

저자들은 HPV 감염의 특징적 현미경 소견을 보이는 자궁경부생검 57예를 선택하여 조직 병리학적으로

condyloma, CIN grade II, III와 침윤성 편평상피암으로 분류하는 한편, 다른 조직절편에서 biotinylated HPV DNA-6/11, 16/18 및 31/33/35의 3종류의 mixed probe를 사용한 in situ hybridization 방법에 의해 HPV DNA를 발현하여 각 병소에 따른 HPV DNA의 형과 분포양상을 검색하였다.

1) HPV DNA는 주로 상피의 상층에 있는 H&E 염색상 koilocytotic atypia 및 maturation의 소견을 보이는 세포의 핵에 검은 청-보라빛으로 염색되었다. 곳에 따라서는 상피의 기저층이나 간질로 침윤하고 있는 종양 세포에서도 드물게 발견되었다.

2) 총 57예중 42예(73.7%)에서 HPV DNA가 발현되었다. 그중 HPV-31/33/35가 50.9%로 가장 많았고 그다음이 HPV-16/18로 40.4%, HPV-6/11은 23.8%였다. 두 종류이상의 mixed probe에 31.6%가 양성으로 염색되었다.

3) Condyloma는 HPV 양성율이 66.7%, CIN이 69.2%(CIN II가 40%, CIN III는 76.2%), 침윤성 편평상피암은 86.4%였다.

4) Flat condyloma는 CIN과 공존하는 주된 형으로 90.9%를 점하였다. Papillary condyloma의 42.9%와 spiked condyloma의 75.0%에서 CIN 또는 암과 수반되었다.

### 참 고 문 헌

- 1) Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, Zur Hausen: Papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographical regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3812-3815, 1983
- 2) 한국인 암등록 조사자료 분석보고서(1982. 7. 1-1987. 6. 30). 대한암학회지 21:187, 1989
- 3) Jenkins D, Tay SK, McCance DJ, Campion MJ, Clarkson PK, Singer A: Histological and immunocytochemical study of cervical intraepithelial neoplasia(CIN) associated with HPV6 and HPV16 infections. *J Clin Pathol* 39:1177-1180, 1986
- 4) Jenkins D, Maddox P, Tay SK: An evaluation of routine HPV common antigen staining of colposcopic cervical biopsies. *J Clin Pathol* 40:1212-1216, 1987
- 5) McDougall JK, Myerson D, Beckmann AM: Detec-

- tion of viral DNA and RNA by in situ hybridisation. *J Histochem Cytochem* 34:33-37, 1986
- 6) Stoler MH, Broker TR: *In situ hybridisation detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma. Hum Pathol* 17:1250-1258, 1986
  - 7) Grody WW, Cheng L, Lewin KJ: *In situ viral DNA hybridization in diagnostic surgical pathology. Hum Pathol* 18:535-543, 1987
  - 8) Beckmann AM, Myerson D, Daling JR, Kivat NB, Fenoglio CM, McDougall JK: *Detection and localization of human papillomavirus DNA in human genital condylomas by in situ hybridization with biotinylated probes. J Med Virol* 16:265-273, 1985
  - 9) Toki T, Yajima A: "HPV score", a scoring system for histological diagnosis of human papillomavirus infection in dysplasia of the uterine cervix. *Acta Pathol Jpn* 37:449-455, 1987
  - 10) Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, Spalholz B, Travis SZ, Fong CKY, Hsiung GD, Ward DC: *Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. Virology* 126:32-50, 1983
  - 11) Syrjänen S, Syrjanen K: *An improved in situ DNA hybridization protocol for detection of human papillomavirus (HPV) DNA sequences in paraffin-embedded biopsies. J Virol Method* 14:293-304, 1986
  - 12) Southern EM: *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol* 98:503-517, 1975
  - 13) Crum CP, Nagai N, Levine RU, Silverstein S: *In situ hybridization analysis of HPV 16 DNA sequences in early cervical neoplasia. Am J Pathol* 123:174-182, 1986
  - 14) Matthews REF, cited by Pfister H: *Human papillomaviruses and genital cancer. Adv Cancer Res* 48:113-147, 1987
  - 15) Pfister H: *Human papillomaviruses and genital cancer. Adv Cancer Res* 48:113-147, 1987
  - 16) Koss LG, Durfee GR: *Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: Cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. Ann NY Acad Sci* 63:1245-1261, 1956
  - 17) Komorowski RA, Clowry LJ: *Koilocytotic atypia of the cervix. Obstet Gynecol* 47:540-544, 1976
  - 18) Meisels A, Fortin R, Roy M: *Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. Acta Cytol* 21:379-390, 1977
  - 19) Gissman L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, Zur Hausen H: *Presence of human papillomaviruses in genital tumors. J Invest Dermatol* 83:26S-28S, 1984
  - 20) Brescia RJ, Jenson AB, Lancaster WD, Kurman RJ: *The role of human papillomaviruses in the pathogenesis and histologic classification of precancerous lesions of the cervix. Hum Pathol* 17:552-559, 1986
  - 21) Kurman RJ, Schiffman MJ, Lancaster WD, Reid R, Jenson AB, Temple GF, Lorincz AT: *Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: A possible role for type 18 in rapid progression. Am J Obstet Gynecol* 159:293-296, 1988
  - 22) Lorincz AT, Quinn AP, Lancaster WD, Temple GF: *A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. Virology* 159:187-190, 1987
  - 23) Beaudenon S, Kremsdorf D, Croissant O, Jablonska S, WainHobson S, Orth G: *A novel type of papillomavirus associated with genital neoplasms. Nature* 321:246-249, 1986
  - 24) Lorincz AT, Lancaster WD, Temple GF: *Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. J Virol* 58:225-229, 1986
  - 25) Syrjänen KJ: *Human papillomavirus lesions in association with cervical dysplasias and neoplasias. Obstet Gynecol* 62:617-622, 1983
  - 26) Woodruff JD, Peterson WF: *Condyloma acuminata of the cervix. Am J Obstet Gynecol* 75:1354-1361, 1958
  - 27) Meisels A, Roy M, Fortier M, Morin C, Casas-Cordero M, Shah KV, Turgeon H: *Human papillomavirus infection of the cervix. The atypical condyloma. Acta Cytol* 25:7-16, 1981
  - 28) Syrjänen KJ: *Human papillomavirus (HPV) infections of the female genital tract and their associations with intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. Pathol Annu* 21:53-89, 1986

— Abstract —

**Detection of Human Papillomavirus DNA  
by In Situ Hybridization using Biotinylated  
DNA Probes in Cervical Intraepithelial  
Neoplasias and Squamous Cell Carcinomas**

Sang-Sook Lee, M.D., Ki-Kwon Kim, M.D.  
Chai-Hong Chung, M.D. Seung-Won Jin\*  
and Uik Sohn, Ph.D\*

*Department of Pathology, Keimyung University School  
of Medicine and Department of Genetic Engineering,  
Kyungpook National University\**

The authors examined 9 condylomas, 26 cervical intraepithelial neoplasms(CIN) and 22 invasive squamous cell carcinomas for the presence of human papillomavirus(HPV) DNA sequences by DNA-DNA in

situ hybridization. In situ hybridization revealed target HPV DNA sequences mostly in the nuclei of the superficial cells from epithelium which contained either maturation or koilocytotic atypias. With the use of biotinylated HPV DNA probes 6/11, 16/18 and 31/33/35, 42 of the 57(73.7%) were positive with any HPV DNA mixed probes, 13 of which were positive with HPV-6/11, 23 with HPV-16/18, 32 with HPV-31/33/35 and 18 with two or more mixed probes. HPV-31/33/35 was the most prevalent in CIN and invasive squamous cell carcinomas, followed by HPV-16/18. The incidence of HPV DNA increased from 66.7% to 86.4% with increasing severity of the lesions from condylomas to invasive squamous cell carcinomas. Flat condyloma was most frequently accompanied by CIN.

---

**Key Words:** HPV, CIN, Squamous cell carcinoma of cervix, In situ hybridization, Biotinylated HPV DNA probes