

**Fig. 9.** Localization of HPV 6/11 in a few superficial nuclei of verrucous carcinoma of papilloma adjacent to the laryngeal larynx with a biotinylated DNA probe ( $\times 200$ ) and higher magnification (inset;  $\times 1,000$ ).

## 고 안

후두에 생긴 사마귀모양 암종은 회백색의 사마귀 같이 상피위로 돌출하는 종양으로 천천히 자라며 국한성 경부 입과절에는 전이가 되지 않는다. 후두의 사마귀모양 암종의 빈도는 드물어 전후두악성종양의 1~2%이며, 40~69세에 주로 생기고 분명히 남자에서 호발하는 특성을 갖고 있다. 사마귀모양 암종은 수술이 최선의 치료책이며 방사선 치료에 제한된 반응을 보일 뿐 아니라 이로 인해 미분화암으로 전환(transform)되기도 한다고 알려져 있다<sup>2)</sup>. 그러나 아직까지 이 병소의 원인은 불분명하다.

사마귀모양 암종의 종양세포는 조직학적 소견상 정상 입에도 불구하고 핵의 핵산양은 비정상적으로 많다<sup>10)</sup>. 이는 본 증례에서 HPV DNA-35/33/35에 의한 ISH 결과에서 보인 소견과 일치된다고 할 수 있다.

HPV는 50형 이상으로 구성되는 이질적 바이러스군으로 각 형의 HPV가 대개 특정한 부위의 점막 및 상피조직을 잘 침범한다. 예를 들면 HPV 중 6과 11형은 거의 전적으로 후두의 유두종과 대부분의 생식기에 생기는 사마귀 또는 콘딜롬에서 발견된다. 그러나 어떤 형의 HPV는 자궁경부, 질 및 외음부에 생기는 암과 밀접하

게 수반되고 있음이 밝혀졌다. 그중 condyloma와 경도의 이형성(dysplasia)는 HPV 형종 16과 18이, 그리고 최근에 발견된 형인 31, 33, 35는 자궁 경부에 생기는 상피 내암과 침윤성 암에서 HPV 6과 11형보다 더욱 많이 발견되었다<sup>3,4)</sup>. 후두의 병소와 HPV와의 연구는 소수에 불과하다<sup>1~4)</sup>. HPV가 상기도에 감염되어 유두종을 일으키거나 잠복 또는 불현성(subclinical)으로 지속적으로 존재함이 알려져 있다.

후두의 유두종은 비침윤성 종괴로 1차적으로 성대와 후두개에 위치하나 그 밖에 구강, 기도, 폐를 침범할 수 있다. 후두의 유두종에서 1982년 Gissman 등에 의해 HPV 6과 11형이 발견되었다<sup>11)</sup>. 1988년 Corbitt 등은 유년성 유두종에서 HPV 6과 11형을, 성인유두종에서 HPV 6를 발견하였으며 HPV 6이 검출된 성인유두종 중 1예가 그후 편평상피암으로 전환되었다고 보고하였다<sup>12)</sup>. Steinberg 등은 Southern blot hybridization에 의해 후두에 생긴 유두종과 주변의 정상조직, 그리고 임상적으로 완화시기(remission)에 있는 유두종 환자의 후두의 상피에서도 HPV DNA의 존재를 확인하였다<sup>12)</sup>. 1984년 질(vagina)에 생긴 사마귀모양 암종 2예에서 Southern blot DNA hybridization에 의해 HPV genome이 확인되었다<sup>13)</sup>. 이는 HPV가 하부 생식기의 사마귀모양 암종과 강한 상관 관계가 있음을 시사하는

것이다. 1985년에 Abramsom 등은 후두에 생긴 사마귀모양 암종 5예 전부에서 DNA hybridization 기법에 의해 HPV-16-related sequence를 발견하였다<sup>2)</sup>. 그 밖에 zur Hausen에 의해 HPV 30형이 후두암에서 발견되었다고 보고 되었다<sup>3)</sup>. 본 연구에서는 후두의 사마귀모양 암종 부위에서 HPV-16/18과 HPV-31/33/35가 발견되었다. 특히 HPV-31/33/35가 많은 종양세포의 핵에서 발현되었으며 이러한 사실은 흔히 HPV 16, 18, 31, 33, 35형 등이 생식기점막을 감염시켜 이 부위의 악성병소와 강한 연관성을 가진다는 사실을 감안할 때 두경부의 점막도 생식기와 매우 유사한 속성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 그후 Brandsma 등<sup>4)</sup>에 의하여 두경부의 편평상피암을 부위에 따라 HPV-related sequence를 Southern blot hybridization 기법으로 연구한 결과 혀(tongue)에서는 18%, 편도(tonsil)에서는 29%, 인두(pharynx)에서는 13%에서 HPV-16 related sequence가 검색되었다. 그러나 후두에서는 두경부의 타 부위보다 HPV 수반율이 떨어져 단지 5%에서 HPV 11/16-related sequences가 발견되었다.

HPV 형은 세포진이나 조직학적 검사를 통한 형태학적 소견만으로는 알 수 없고 HPV에 대한 항혈청을 이용한 면역조직화학기법이 사용되어왔으나 이 방법은 항원의 존재와 분포를 알려줄 뿐 모든 병소, 특히 고도의(high grade)의 상피내종양과 침윤성암에서 HPV를 거의 발현하지 못할 뿐 아니라 HPV의 형을 알 수 없는 단점이 있다<sup>14)</sup>. HPV에 감염된 분명한 증거를 얻기 위해서는 생검조직내 HPV DNA의 존재를 규명하여야 하는데 그 방법으로 핵산의 hybridization을 이용하여야 한다. 핵산의 hybridization 기법으로는 filter hybridization (Southern blot 포함)과 ISH이 있다. ISH은 filter hybridization보다 장점이 있는데 그것은 HPV에 감염된 세포의 존재와 위치 뿐 아니라 조직의 형태를 동시에 알 수 있다는 점이다<sup>9)</sup>.

더욱 최근에는 biotinylated HPV DNA probe의 개발로 포르말린으로 고정되고 파라핀에 포매된 조직에도 비교적 간편한 방법으로 조직내에서 HPV DNA를 발현하고 각 형까지도 알 수 있게 되어 저장된 파라핀 블록을 이용한 후향적 연구가 가능하게 되었다<sup>9)</sup>.

본 연구결과 저자들은 47세 남자의 후두에 생긴 사마귀모양 암종에서 HPV DNA 16/18과 HPV DNA 31/33/35 mixed prob로 많은 수의 상피세포의 핵이 양성

으로 염색되어 비정상적으로 많은 양의 HPV가 존재함을 알 수 있었다. 특히 후두의 사마귀모양 암종에서 HPV DNA -31/33/35의 발견은 지금까지 보고된 적이 없는 새로운 사실이다. 저자들의 자궁경부암과 HPV 간의 관계를 알기 위한 ISH결과에서 CIN과 편평상피암에서 HPV DNA-31/33/35가 주된 형임을 고려하면<sup>15)</sup> 후두점막이 생식기 점막과 유사한 속성을 가진 것으로 사료된다. 한편 유두종의 상피세포중 몇몇개의 핵에서 HPV DNA-6/11 related sequence를 발견하여 후두의 유두종의 발생과 HPV DNA-6/11와의 관계를 재확인할 수 있었고, HPV-16/18과 HPV-31/33/35 또한 사마귀모양 암종을 일으키거나 유두종에서 사마귀모양 암종으로 전환하는데 관여하는 것으로 사료된다. 그러나 이는 더욱 많은 예의 추후 연구에 의해 보강되어야 할 것이다.

## 결 론

저자들은 육안적으로나 병리조직소견상 전형적 소견을 보이는 후두에 생긴 유두종을 수반한 사마귀모양 암종 1예를 보고함과 동시에 biotinylated HPV DNA probe를 사용한 ISH을 조직절편에서 실시하여 사마귀모양 암종 병소에서 HPV DNA-16/18과 HPV DNA-31/33/35를, 또 주변의 papilloma 조직에서 HPV DNA-6/11을 발현하여 이에 보고하였다. 후두의 사마귀모양 암종 주변에 전형적인 유두종이 있었고 동시에 ISH에 의해 HPV가 발견되어 이상의 소견을 종합하여 볼때 본 사마귀모양 암종이 유두종과 더불어 HPV와 원인으로 연결됨을 밀발침하는 또 다른 예가 된다고 생각되고 또한 유두종이 사마귀모양 암종으로 전환할 가능성도 시사한다고 생각되었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Kraus FT, Perez-Mesa C: *Verrucous carcinoma. Clinical and pathologic study of 105 cases involving oral cavity, larynx and genitalia.* Cancer 19:26-38, 1966
- 2) Abramson AL, Brandsma J, Steinberg B, Winkler B: *Verrucous carcinoma of the larynx. Possible human papillomavirus etiology.* Arch Otolaryngol 111:709-715, 1985

- 3) zur Hausen H: *Papillomaviruses in human cancer. Cancer* 59:1692-1696, 1987
- 4) 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
- 5) Kurman RJ, Schiffman MH, 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
- 6) Corbitt G, Zarod AP, Arrand JR, Longson M, Farrington WT: *Human papillomavirus (HPV) genotypes associated with laryngeal papilloma. J Clin Pathol* 41:284-288, 1988
- 7) Zarod AP, Rutherford JD, Corbitt G: *Malignant progression of laryngeal papilloma associated with human papilloma virus type 6(HPV-6) DNA. J Clin Pathol* 41:280-283, 1988
- 8) Brandsma JL, Abramson AL: *Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 115:621-625, 1989
- 9) Grody WW, Cheng L, Lewin KJ: *In situ viral DNA hybridization in diagnostic surgical pathology. Hum Pathol* 18:535-543, 1987
- 10) Ferlito A, Antonutto G, Silvestri F, cited by Abramson AL, Brandsma J, Steinberg B, Winkler B: *Verrucous carcinoma of the larynx. Possible human papillomavirus etiology. Arch Otolaryngol* 111:709-715, 1985
- 11) Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulam H, zur Hausen H: *Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. J Virol* 44:393-400, 1982
- 12) Steinberg BM, Topp WC, Schneider PS, Abramson AL: *Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission. N Engl J Med* 308:1261-1264, 1983
- 13) Okagaki T, Clark BA, Zachow KR, Twiggs LB, Ostrow RS, Pass F, Faras AJ: *Presence of human papillomavirus in verrucous carcinoma (Ackerman) of the vagina. Arch Pathol Lab Med* 108:567-570, 1984
- 14) Jenkins D, Tay SK, Maddox PH: *Routine papil-*

*lomavirus antigen staining of cervical punch biopsy specimens. J Clin Pathol* 40:1212-1216, 1987

- 15) 이상숙·김기권·정재홍·진승원·손우익 : 자궁경부암 조직내 *in situ hybridization*에 의한 human papillomavirus DNA의 검색, 대한병리학회지 24(1):16-26, 1990

— Abstract —

**Detection of Human Papillomavirus 16/18, 31/33/35 in Verrucous Carcinoma of the Larynx by In Situ Hybridization with Human Papillomavirus DNA Probes**

**Ki Kwon Kim, M.D., Sang Sook Lee, M.D.  
and June Sik Park, M.D.\***

*Department of Pathology,  
Keimyung University School of Medicine;  
Department of Otolaryngology,  
Kyungpook National University School of Medicine\**

**Seung Won Jin, and Uik Sohn, P.D.**

*Department of Genetic Engineering,  
Kyungpook National University*

Verrucous carcinoma of the larynx is a distinct and uncommon variant of well-differentiated squamous cell carcinoma. The authors hybridized in situ a case of laryngeal verrucous carcinoma with DNA probes to human papillomavirus (HPV) 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 35. The DNAs from the verrucous carcinoma of larynx hybridized with mixed DNA probes HPV-16/18 and 31/33/35. In addition, there was an evidence of HPV infection based on hybridization with mixed DNA probe HPV-6/11 in the adjacent papilloma tissue. By in situ DNA hybridization techniques, we clearly demonstrated human papillomavirus (HPV-16/18, and 31/33/35)-related sequences in this neoplasm. These findings suggest the role of HPV-6/11 in the development of laryngeal papilloma and HPV-16/18 and 31/33/35 probably on the progression to verrucous carcinoma.

**Key Words:** Human papilloma virus, Verrucous carcinoma, Larynx, In situ hybridization

# 후두의 사마귀모양 암종 (Verrucous Carcinoma) 조직에서 In Situ Hybridization에 의한 인체유두종바이러스 (Human Papillomavirus) 16/18, 31/33/35의 검색

계명대학교 의과대학 병리학교실 및 경북대학교 의과대학 이비인후과\*

김 기 권 · 이 상 숙 · 박 준 식\*

경북대학교 자연대학 유전공학과

진 승 원 · 손 우 익

## 서 론

사마귀모양 암종(verrucous carcinoma)은 분화가 잘 된 편평상피암의 한 드문 유형이다. 1948년 Ackerman에 의해 처음으로 사마귀모양 암종이라는 명칭이 사용되었다. 1963년 Goethals 등이 후두에 사마귀모양 암종이 생길 수 있음을 시사한 후 1966년에 이르러서야 Perez-Mesa에 의해 12예의 후두에 생긴 사마귀모양 암종이 처음으로 보고되었다<sup>1)</sup>. 그 후 1985년까지 총 198예의 후두에 생긴 사마귀모양 암종이 보고되어 있다<sup>2)</sup>.

최근의 HPV(Human Papilloma Virus; 이하 HPV라 함)와 암과의 연관성을 밝히고자 시도된 분자생물학적 연구에 의하면 여성 하부생식기 특히 자궁경부암의 원인인자로서 HPV가 강력히 대두되고 있다<sup>3)</sup>. HPV 형종 6과 11은 첨구콘딜롬(condyloma acuminata)과 낮은 악성도의 자궁경부의 상피내종양(이하 CIN이라 함)과 수반되고, 반면 16과 18형은 모든 grade의 CIN과 침윤성 자궁경부암에서 발견되었다. 특히 HPV 16은 세계적으로 CIN 중례에서 가장 흔히 발견되는 바이러스이며<sup>4)</sup> HPV 18은 CIN 병소가 낮은 악성도에서 높은 악성도로 빨리 진전될 위험성이 높은 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. 그밖에 HPV 31, 33, 35형 등이 자궁경부암과 수반되고 있다고 알려져 있다. 그러나 후두에 생기는 유두종(papilloma)과 악성종양조직에서 HPV를 규명하려는

분자생물학적 연구는 극히 드물었다<sup>6-8)</sup>. 그러나 1985년 Abramson 등에 의해 특히 후두에 생긴 사마귀모양 암종에서 처음으로 HPV DNA-16를 병소에서 발견하여 비로소 HPV가 사마귀모양 암종의 원인적 요소임을 제시하였다<sup>9)</sup>.

이에 저자들은 47세 남자의 후두에 생긴 육안상 전형적인 사마귀모양 암종과 유두종의 병소를 동시에 보이는 한 예를 경험하여 파라핀 블록으로 biotinylated HPV DNA probe 6/11, 16/18, 31/33/35를 이용한 in situ hybridization(이하 ISH라 함) 방법에 의해 후두의 사마귀모양 암종 및 유두종과 HPV와의 관계 특히 HPV DNA형 및 그 분포를 검색하여 보고하고자 한다.

## 증 례 보 고

47세 된 남자환자가 3년간의 애성과 최근 1개월간의 호흡곤란과 경부종괴를 주소로 내원하였다.

과거력을 보면 15~16년간 매일 소주 1병과 담배 1갑 반씩을 상용하였다.

이학적 소견을 보면 좌측 성대에 바깥으로 돌출한 'cauliflower' 모양의 종괴가 동측의 성대상부(supraglottic)와 하부(infraglottic), 좌측 파상연골(arytenoid cartilage)과 반대편 전연합부(anterior commissure)를 침범하였다. 그러나 후두개(epiglottis)와 이자상동(pyriform sinus)은 종양에 의해 침범되지 않았다. 후두암이라는 임상 진단하에 후두 전적출술을 실시하였다.

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



## 재료 및 방법

적출된 후두조직을 육안검사를 시행한 다음 적절한 부위의 조직을 절제하여 포르말린으로 고정하고 파라핀에 포매한 다음 hematoxylin-eosin 염색을 실시하여 광학현미경으로 검정하였다. 같은 파라핀 블록에서 조직절편을 열어 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 각 병소의 HPV의 발현빈도, HPV의 종류 및 그 분포를 검색하였다. Vira type in situ HPV DNA probe는 5종류로 이루어져 있는데 이 속에는 HPV DNA 6/11, 16/18, 31/33/35형의 mixed probe와 양성 및 음성 대조 probe가 포함되어 있었다.

ISH방법을 요약하면 다음과 같다<sup>9)</sup>. 파라핀으로 포매된 생검조직을 박절하여 AES(3-aminopropyltriethoxysilane)으로 전처리한 슬라이드위에 부착한 후 56°C에서 하루 밤 부탄하였다. 탈파라핀과정을 거친 후 조직내에 포함된 고정된 target DNA를 노출시키기 위하여 1 mg/ml 농도와 pepsin과 0.1N 염산으로 37°C에서 15분간 부탄하여 소화시켰다. Heating block을 95°C로 가열한 후 각 형의 biotinylated HPV mixed probe를 슬라이드위의 조직절편위에 놓아 5분간 열을 가함으로써 double stranded HPV DNA probe와 조직절편내 포함된 target DNA가 동시에 single strand로 denature되게 하였다. 그후 probe와 target DNA의 homologous sequence 간에 hybridization시키기 위해 37°C에 2시간 streptoavidin부탄하였다. Hybridization의 탐지는 probe와 결합된 alkaline phosphatase conjugate를 사용하여 37°C에서 20분간 부탄하고 발색용 기질로 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylp-



Fig. 1. Transglottic type verrucous carcinoma in the left side of larynx and adjacent papilloma (open arrow).

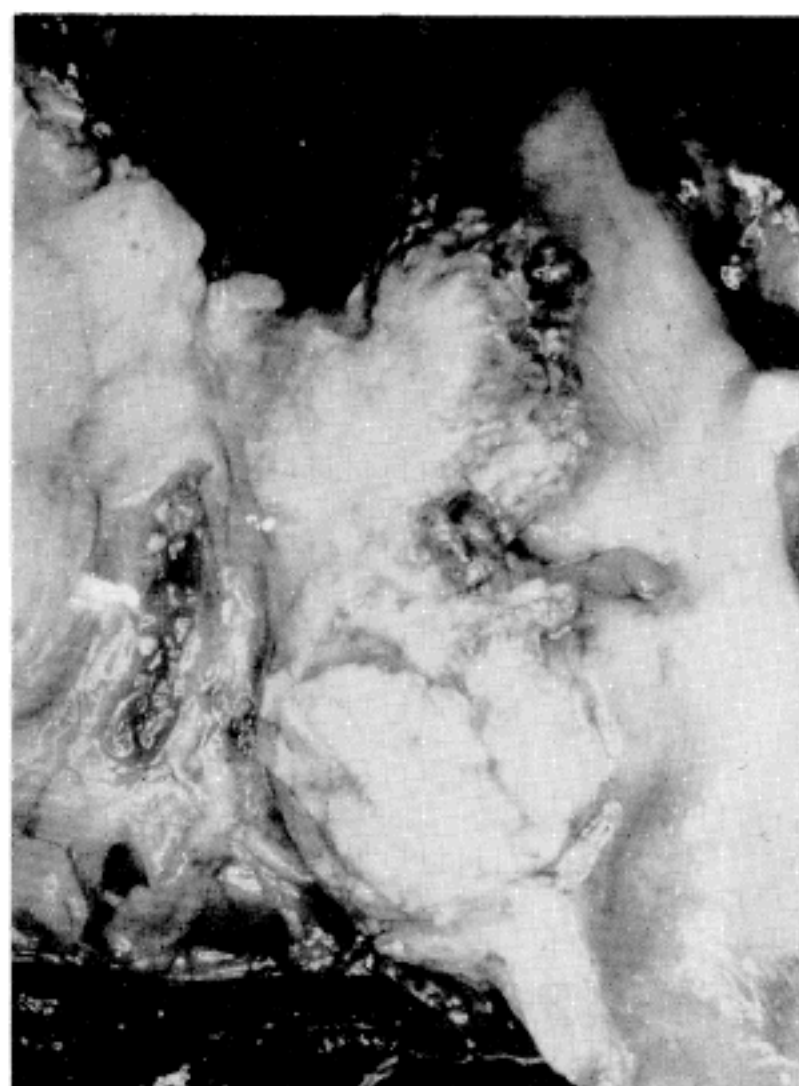


Fig. 2. Sagittal section of verrucous carcinoma of larynx, showing pale white, warty appearance.

phosphate)와 NBT (nitroblue tetrazolium)를 사용하여 alkaline phosphatase를 37°C에서 1시간 dephosphorylation시켜 조직내 존재하는 HPV DNA에 hybridization된 장소에 청자색 침전물이 침착되게 하였다. 끝으로 nuclear fast red로 대조염색하여 조직내 target DNA의 발현과 함께 형태학적 검사도 가능하게 하였다.

## 결 과

육안적 소견은 성대에 궤양이 동반되고 밖으로 돌출된 흰 종괴가 보이고 종양의 좌측면에 전형적인 유두종의 소견이 관찰되었다(Fig. 1). 종양의 절단면을 보면 하얀 색깔의 연한 사마귀 모양의 종괴가 하부조직으로 침윤하

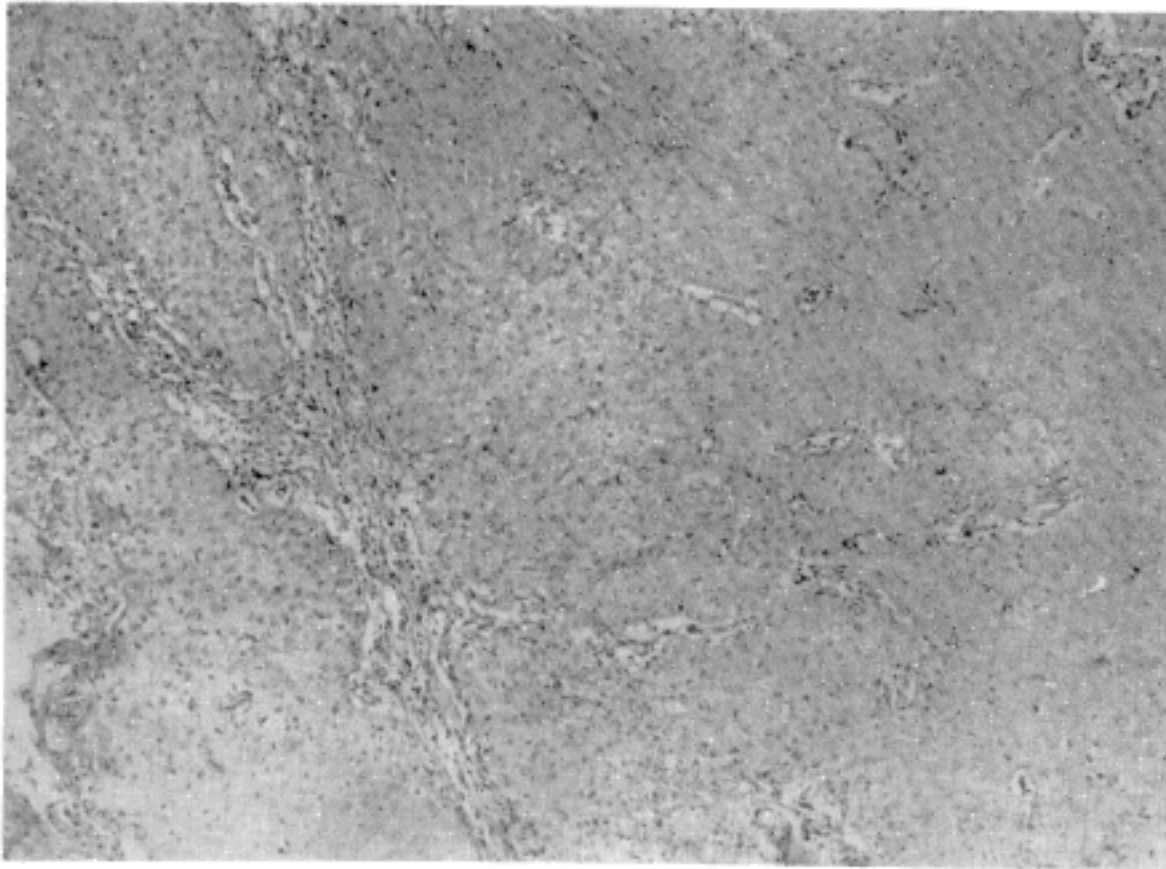


Fig. 3. Bulbous masses of well differentiated squamous epithelial cells growing in "finger like" processes in verrucous carcinoma (H&E, ×40).

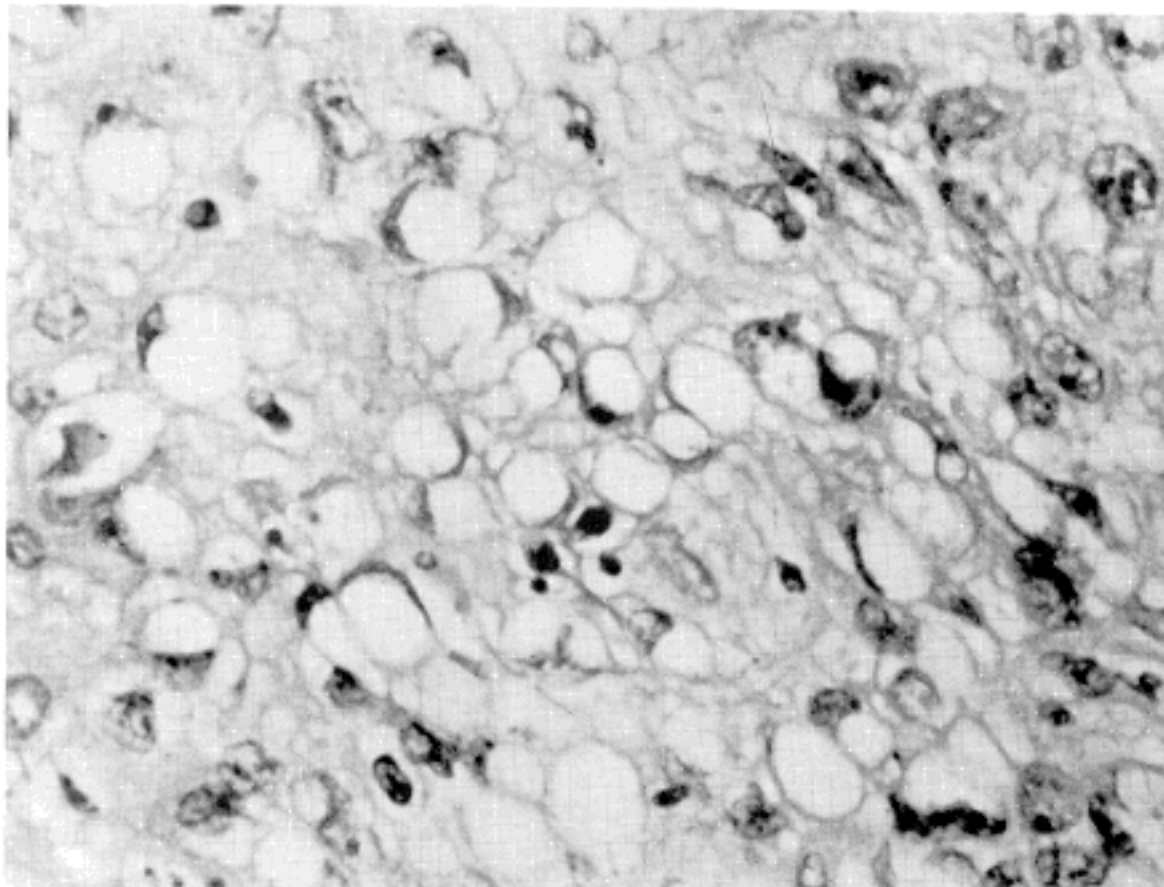


Fig. 4. Koilocytotic atypia suggestive of HPV infection in verrucous carcinoma (H&E, ×400).

고 있는데 종양연은 밀고 있는 양상을 보였다(Fig. 2).

현미경 소견을 보면 잘 분화된 편평상피가 증식되어 사마귀모양으로 돌출되어 표면에는 괴양을 보이고 있었다(Fig. 3). 곳에 따라 HPV 감염을 시사하는 koilocytosis(Fig. 4)와 현저한 각화(keratinization)가 관찰되었다(Fig. 5). 개개의 종양세포는 잘 분화되어 일반적 편평상피암에서 볼 수 있는 핵 또는 세포질의 소견이 결

여되어 있었다(Fig. 6). 주변 조직에 있는 유두종은 현미경소견상 유두상 구조를 가진 양성 편평상피로 이루어져 있었다.

ISH에 의한 염색결과를 요약하면 table 1과 같다. HPV는 사마귀모양 암종을 구성하는 상피의 전층에 걸쳐 HPV DNA-16/18과 HPV DNA-31/33/35 mixed probes에 의해 많은 수의 세포의 핵에 검은 청보라빛으

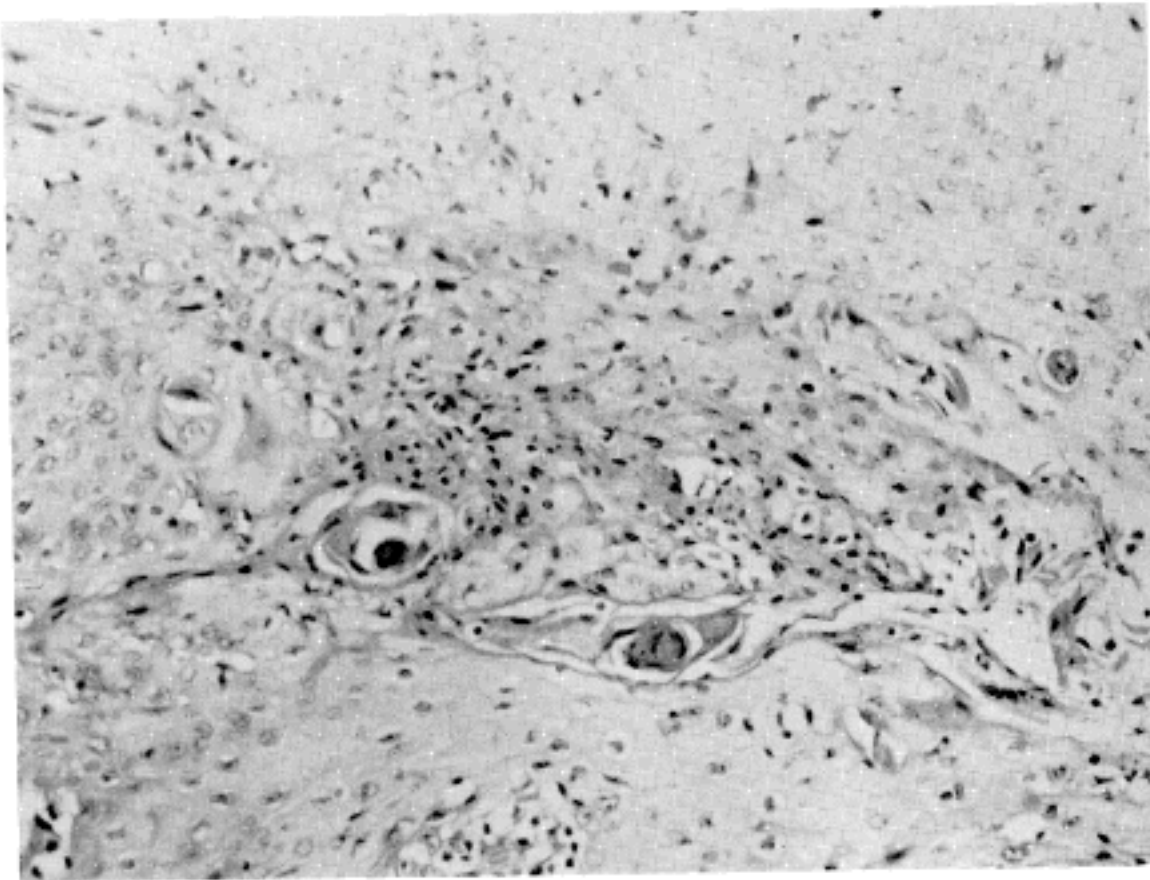


Fig. 5. Prominent keratin pearl formation in verrucous carcinoma (H&E, ×400).

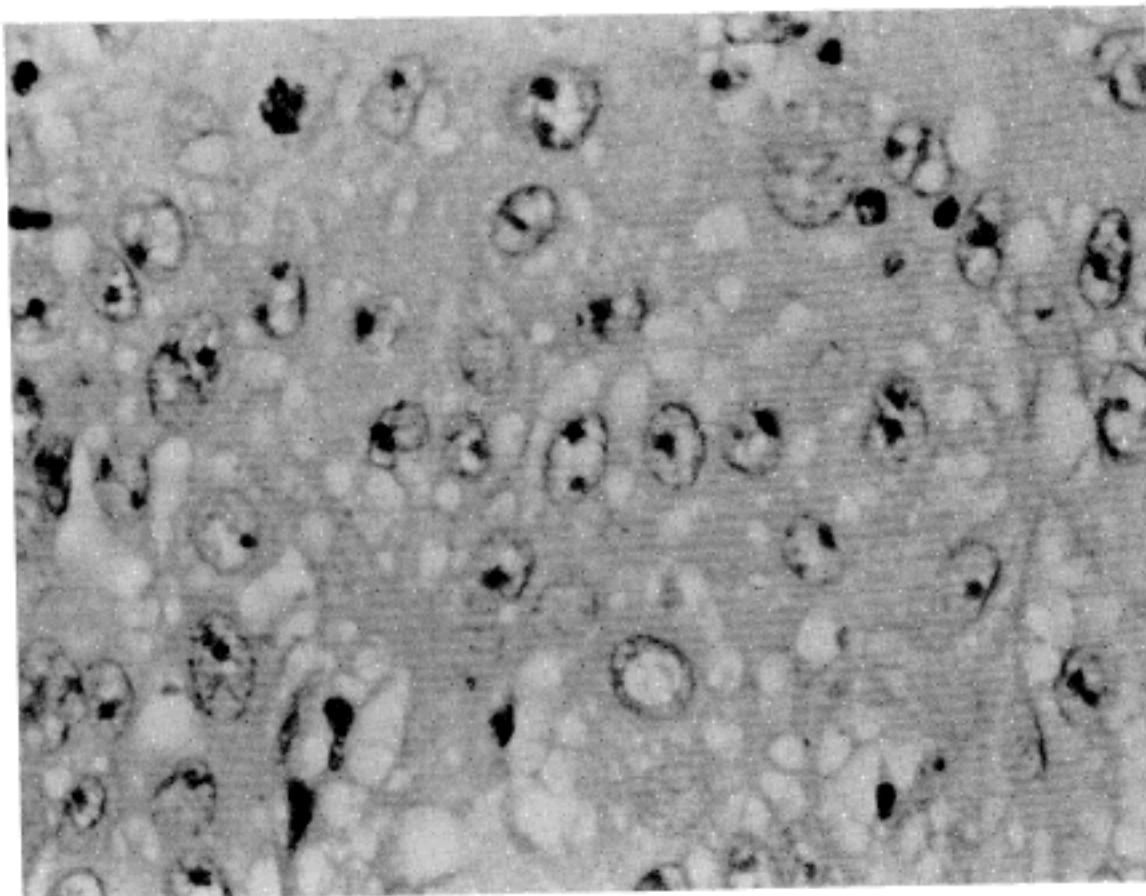


Fig. 6. Well-differentiated tumor cells with pleomorphic nuclei, prominent nucleoli and occasional mitotic figures (H&E ×400).



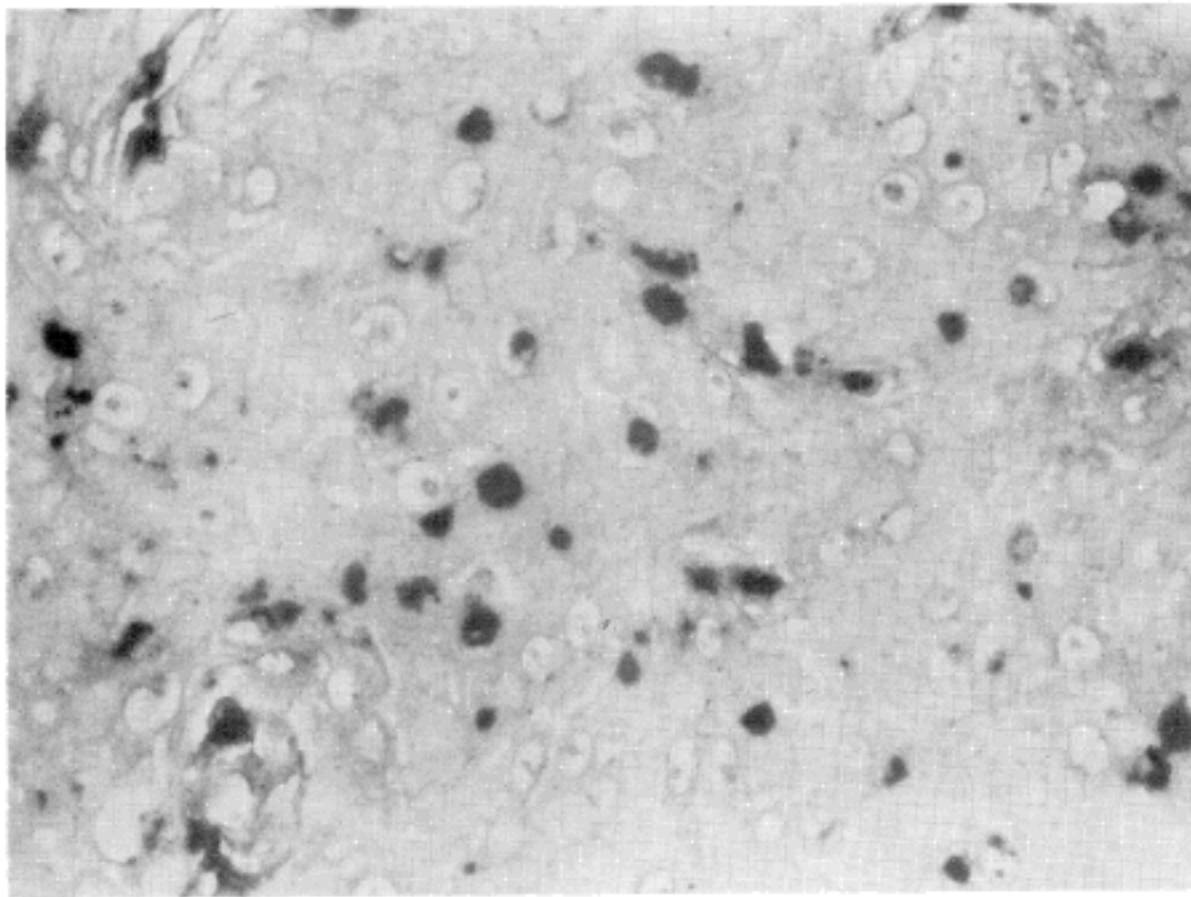


Fig. 7. Localization of HPV 31/33/35 in many nuclei of verrucous carcinoma of larynx with a biotinylated DNA probe (x200).

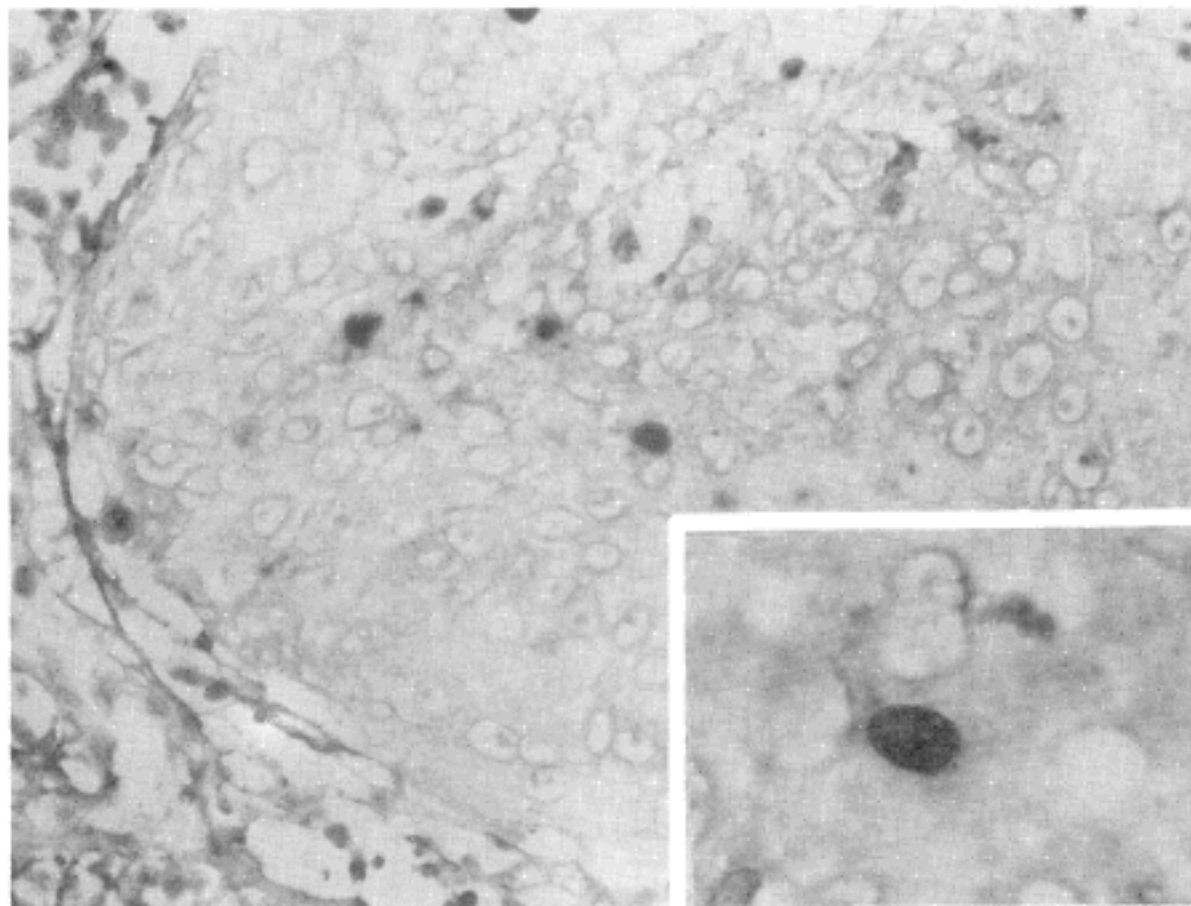


Fig. 8. Localization of HPV 16/18 in several nuclei of verrucous carcinoma of larynx with a biotinylated DNA probe (x200) and higher magnification (inset; x1,000).

Table 1. In situ hybridization results of a case of laryngeal verrucous carcinoma

	HPV DNA Probes Tested		
	HPV-6/11	HPV-16/18	HPV-31/33/35
Verrucous carcinoma	-	+	++
Papilloma	+	-	-
Normal	-	-	-

로 염색되었다. 그중 HPV-31/33/35에서 더욱 많은 수의 세포가 더욱 진한 색깔로 염색되었다(Fig. 7, 8).

병소의 부위에 따라 염색되는 세포의 수와 염색의 강도가 다양하였다. 유두종의 상피상층에 있는 소수의 핵이 HPV-6/11에 의하여 염색되었다(Fig. 9). 정상상피에서는 염색되지 않았다.