

## 자궁경부 병변에서 인형유두종 바이러스의 검출

-면역조직화학적 염색 및 *in situ* hybridization-

전남대학교 의과대학 병리학교실

박창수 · 남종희 · 이재혁 · 김종순 · 오승진

### Detection of Human Papillomavirus in Lesions of Uterine Cervix

-Immunohistochemistry and *in situ* Hybridization-

Chang Soo Park, M.D., Jong Hee Nam M.D., Jae Hyuk Lee, M.D.  
Jong Soon Kim, M.D. and Seung Jin Oh, M.D.

Department of Pathology, Chonnam University Medical School

To evaluate the detection of HPV DNA according to subtype of lesions of uterine cervix and its clinical applicability, *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry for HPV were performed in 189 cases of uterine cervical lesion, including 23 cases of low grade squamous intraepithelial lesion (SIL), 115 cases of high grade SIL and 51 cases of invasive carcinoma. Positive immunostaining, brown precipitate, was mainly noted in the nucleus of koilocytes in the superficial and intermediate layer. Positivity of immunostaining was 21.7% in low grade SIL, 13.0% in high grade SIL and 9.8% in invasive carcinoma. Positive reaction in ISH, red precipitate, was noted in the nucleus of not only koilocytes but also non-koilocytes in the superficial and intermediate layer, and dot precipitate was rarely identified in the nest of squamous cell carcinoma. Based on HPV subtype, 6/11 was 21.7% in low grade SIL, 16/18 was 32.2% and 39.2% in high grade SIL and invasive carcinoma, respectively. With regard to their associated HPV types, low grade SILs were heterogeneous and high grade SILs and invasive carcinomas were related with the high oncogenic risk group only. The correlation of HPV subtypes with panHPV was 91.3% in low grade SIL, 91.3% in high grade SIL and 98.0% in invasive carcinoma. These results suggest that detection of HPV infection by ISH may be a more useful method than immunohistochemistry and application of the HPV subtype probe with the panHPV probe could improve the sensitivity of ISH. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 289-297)

**Key Words:** Uterine cervix, Human papillomavirus, Immunohistochemistry, *In situ* hybridization

## 서 론

우리나라 여성에서 가장 발병율이 높은 자궁경부암의 발생에 관여하는 요소들로 성관계자의 수, 첫 성교의 연령, 초산 연령, 경구피임약 사용, 흡연, 출산경력, 가족관계, 제 2 형 단순포진 바이러스(herpes simplex type II) 및 인형유두종 바이러스 감염(human papillomavirus, HPV) 등이 알려져 있다<sup>1-5</sup>. 이중 HPV 감염은 Zur Hausen<sup>6</sup>이 자궁경부암과의 연관성에 대해 보고한 이래로 자궁경부암의 발생에 가장 중요시되고 있는 원인으로, 많은 다른 자궁경부암 유발인자들과 연관성이 깊으며<sup>7</sup>, 환자 예후와도 연관이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>8</sup>. HPV는 현재까지 70여종 이상의 아형이 알려져 있으며, 이중 20여종이 생식기계 감염을 일으키는 것으로 밝혀져 있다<sup>9</sup>. 이들은 그 아형에 따라 저등급 전암병변이나 고등급 전암병변 또는 침윤암 등에서 감염형의 차이를 보여 그 발병율에 따라 저발암군과 고발암군으로 구별하고 있는데 저발암군으로는 6, 11, 42, 43 및 44형이, 고발암군으로는 16, 18, 31, 33 및 35형이 알려져 있다<sup>10</sup>.

HPV 감염은 과거에는 조직학적 소견상 극세포증(acanthosis), 세포질내 공포변화(cytoplasmic vacuolization), 핵의 비정형성(nuclear atypism), 다핵화(multinucleation)를 보이거나 전자현미경 소견상 virion의 확인을 통하여 검출되었다. 이중 조직학적 변화는 HPV의 감염단계 중 증식기(productive state)에 세포병적 변화(cytopathic effect)를 일으킨 경우 나타나는 소견으로 이러한 세포병적 변화를 일으키지 않은 감염 세포들은 확인할 수 없으며, 전자현미경적 검사는 HPV의 아형(subtype)을 구분할 수가 없고 결과 판독까지 시간이 많이 걸리는 단점이 있다. 근래에 도입된 면역조직화학적 염색은 형태학적 구조가 유지된 상태에서 단시간에 결과 판독을 할 수 있는 장점이 있다. 최근 분자병리학의 발달과 함께 Southern blot, polymerase chain reaction(PCR)과 *in situ* hybridization (ISH) 등이 바이러스 검출에 이용되고 있는데 이중 Southern blot과 PCR은 조직에서 핵산을 추출하여 실험에 이용하기 때문에 인공적인 변화가 일어날 수 있고 종양세포에 비특이적인 염증세포들이 포함될 단점을 가지고 있다. ISH는 probe를 이용하여 염색체나 세포 그리고 조직의 DNA나 RNA의 배열(sequence)을 검출하는 방법으로 Gall등<sup>11</sup>에 의해 처음 소개될 당시에는 방법이 복잡하고 결과를 판

독하는데 많은 시간이 소요되었으나, 그동안 많은 발전을 이루어 현재는 간편한 검사방법이 되었다<sup>12</sup>. ISH의 임상적 응용은 감염성 질환 중 특히 바이러스의 진단에 활용되고 있는데 세포나 조직의 형태학적 구조가 잘 보존된 상태하에서 바이러스를 직접 확인할 수 있어서 특이성이 높은 검사방법으로 알려져 있다. 자궁경부병변에서 HPV를 검출한 국내의 연구결과들은 민감성이 높은 Southern blot이나 PCR을 주로 이용하였으며 ISH를 이용한 보고는 흔하지 않다. 또한 HPV에 대한 면역 조직화학적 염색과 아형(subtype)과 전형(pan type)의 probe를 각각 이용한 ISH의 성적을 비교한 연구는 매우 드물다.

이에 저자는 세포나 조직의 형태학적 구조가 잘 보존된 상태하에서 바이러스 감염 유무를 확인할 수 있는 방법인 면역조직화학적 염색 및 ISH를 시행하여 병변에 따라 발현되는 인형 유두종 바이러스의 종류 및 그 임상적 유용성을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

전남대학교 병원에서 자궁경부 편평상피내병변(squamous intraepithelial lesion, SIL) 및 침윤성암으로 진단받은 검체 중 파라핀 블록의 보관상태가 용이한 189예를 대상으로 HPV에 대한 면역조직화학적 염색 및 ISH를 시행하였다.

### 1. 면역조직화학적 염색

10% 중성 완충 포르말린에 고정된 후 제작된 파라핀 포매체를 5  $\mu$ m 두께로 연속절편을 만들어 probe-on 슬라이드에 부착시키고 충분히 건조시켰다. 염색의 전과정은 probe-on 슬라이드를 맞대어 생기는 capillary action gap의 원리를 이용한 Microprobe system (Fisher)를 이용하여 실시하였다. 파라핀 절편이 부착된 슬라이드는 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 1X Automation buffer(Biomed)에 3분간 부치시켰다. 내재성 peroxidase를 억제할 목적으로 methanol과 periodic acid가 포함된 Auto-blocker(Research Genetics)에 2분간 부치시킨 후 1X Automation buffer로 수세시켰다. HPV에 대한 일차항체(Dako)는 1 : 20으로 희석하여 20분간 부치시킨 후 완충액으로 수세하였다. 일차항체의 검출을 위한 이차항체는 biotin이 부착된 universal secondary antibody (Research Genetics)를 이용하여 10분간 부치시킨 후 완충액으로 수세하고 streptavidin-horseradish에 10분

간 작용시켰다. 발색은 AEC(3-amino-9-ethyl carvasole)를 이용하였으며 헤마톡실린으로 대조염색을 시행하고 universal mount(Research Genetics)로 봉입한 후 검색하였다. 음성대조군은 일차 항체 대신 항체 희석액을 부치시켰다.

**2. HPV DNA *in situ* hybridization**

ISH는 Park등<sup>13</sup>의 실험방법을 변형하여 이용하였으며 절편의 제작 및 실험과정에 이용한 염색기는 면역조직화학적 염색에서와 같이 Microprobe System (Fisher)을 사용하였다. 슬라이드에 부착된 파라핀 절편을 탈파라핀 과정과 한수과정을 기친 후 핵산이 잘 노출될 수 있도록 단백 분해 효소인 pepsin solution(Research Genetics)에 100°C에서 4분간 처리하였다. HPV DNA의 검출을 위하여 nick translated probe인 HPV type 6/11, 16/18, 및 31/33/35 DNA probe(Digene)와 pan HPV DNA probe인 Omniprobe(Digene)를 Hybridization cocktail(Amresco)로 1 : 20으로 희석하여 이용하였다. 핵산과 probe의 변성 및 hybridization은 110°C에서 65°C까지 단계적인 온도에서 heating과 cooling을 반복적으로 실시하였으며 hybridization이 끝난 후 비특이적으로 결합한 probe를 제거하기 위하여 2X SSC로 수세하였으며, 검출제인 streptavidinalkaline phosphatase를 45°C에서 10분간 2회 작용시켰다. 완충액으로 수세한 후 양성반응은 Fast Red TR salt(Research Genetics)를 이용하여 발색시켰으며 헤마톡실린으로 대조 염색 후 Universal Mount로 봉입하였다. 양성대조군으로는 human control genome에 대한 Alu I probe (25 oligomer)를 이용하였고 음성대조군으로는 probe 대신 hybridization cocktail만으로 hybridization을 시행하였다.

**성 적**

본 실험에 이용한 연구대상은 상피내 병변이 138예였고, 침윤암이 51예였다. 상피내 병변은 저등급 상피내 병변과 고등급 상피내 병변으로 구분하였는데 저등급 상피내 병변은 23예였고, 고등급 상피내 병변은 cervical intraepithelial neoplasia(CIN) II병변 29예와 CIN III 병변 86예를 합하여 115예였다.

면역조직화학적 염색상 HPV에 대한 양성 반응은 주로 핵에서 갈색의 과립상으로 관찰되었으며(Fig. 1), 일부 세포에서는 핵주변부의 세포질에서 양성반응을 보였다. HPV단백이 검출된 양성세포들은 주로 자궁경부 상피의 표층 및 중간층에 분포하였으며,

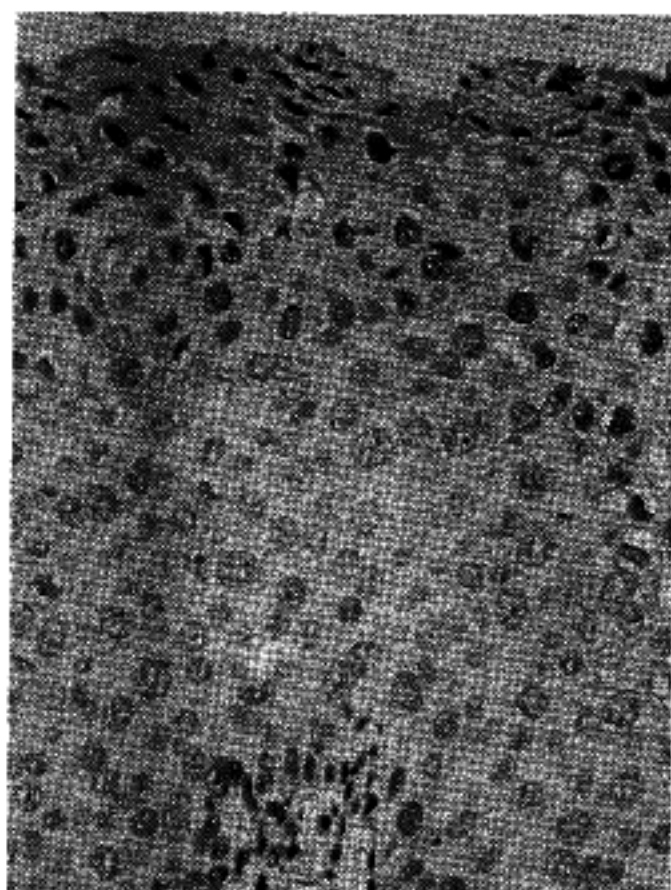


Fig. 1. Positive immunostaining is mainly identified in the koilocyte and in some non-koilocytes of the superficial and intermediate layer. High grade SIL. ×250

Table 1. Immunoreactivity for human papillomavirus(HPV) in squamous intraepithelial lesion(SIL) and invasive carcinoma

	Low grade SIL	High grade SIL	Invasive carcinoma
No. of cases	23	115	51
Positive number (%)	5 (21.7)	15 (13.0)	5 (9.8)

No: Number

심층부에서는 관찰되지 않았다. HPV에 대한 양성반응은 주로 비정형 스폰형 세포(atypical koilocyte)에서 관찰되었다. 면역조직화학적 염색상 양성들은 저등급 편평상피내 병변에서 21.7%, 고등급 편평상피내 병변에서 13.0% 및 침윤암에서 9.8%를 보여, 저등급 편평상피내 병변에서 가장 높았다(Table 1).

HPV DNA에 대한 ISH상 양성반응은 HPV 아형 및 전형 모두 핵에서 갈색의 과립상을 보였으며 핵주변부나 세포질에서는 관찰되지 않았다(Fig. 2~6). 저등급 편평상피내 병변에서 HPV DNA 6/11형은 주

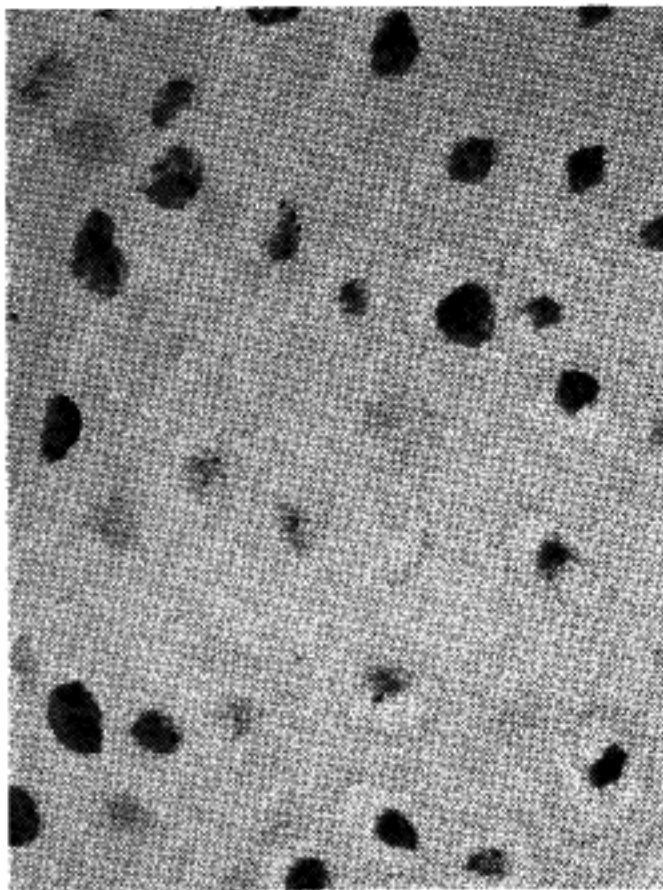


Fig. 2. HPV DNA for 6/11 is detected in the nuclei of koilocytes and non-koilocytes which are located in the superficial and intermediate layer. Low grade SIL  $\times 400$

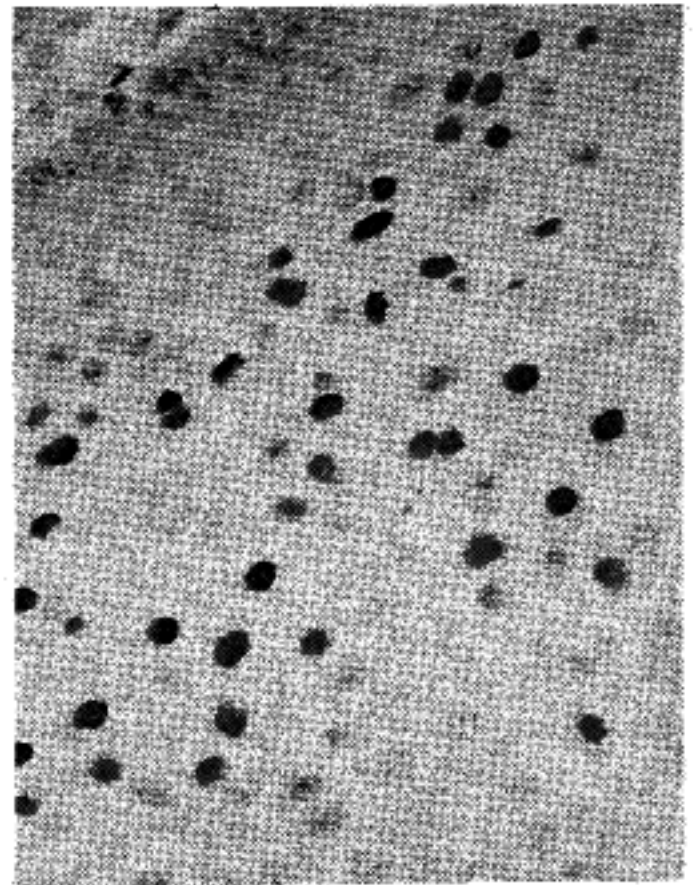


Fig. 3. Positive reaction of *in situ* hybridization for HPV 6/11 is in the deeper layer than that of immunohistochemistry. Low grade SIL  $\times 200$

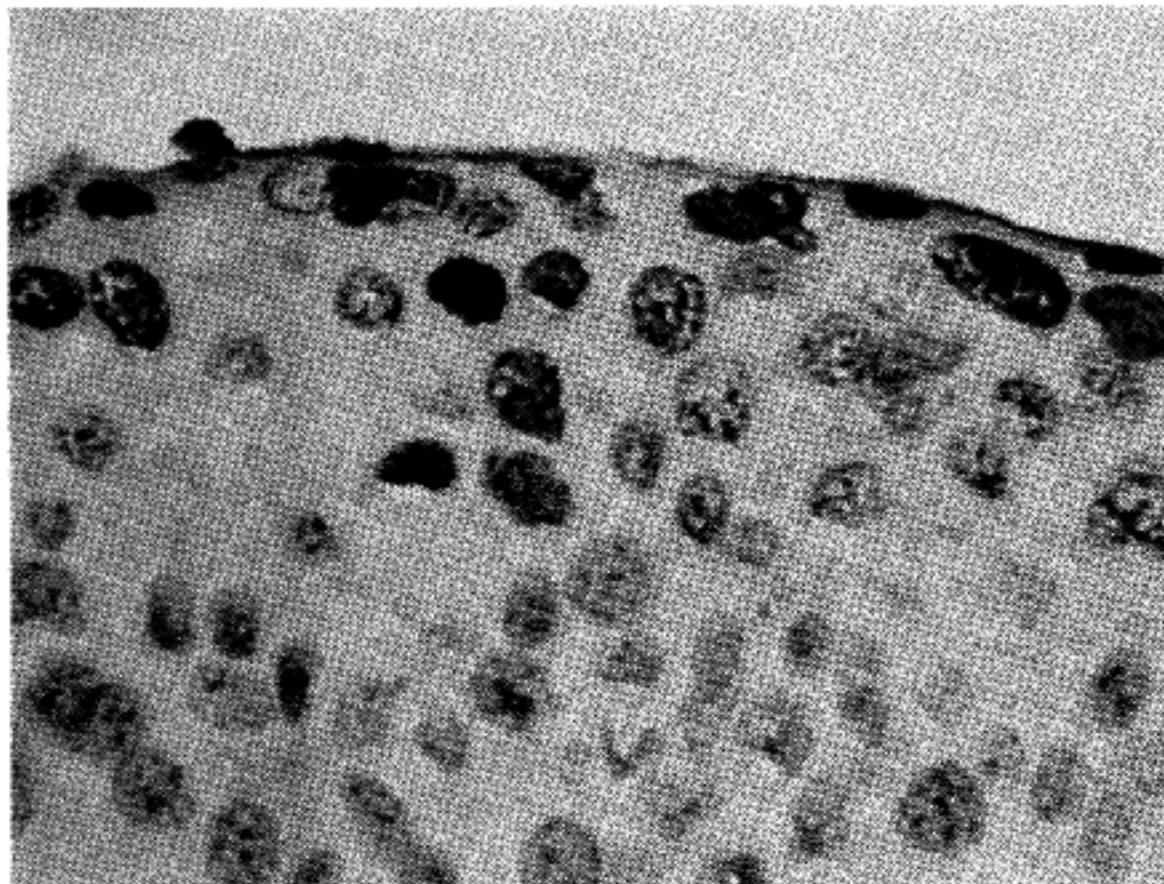
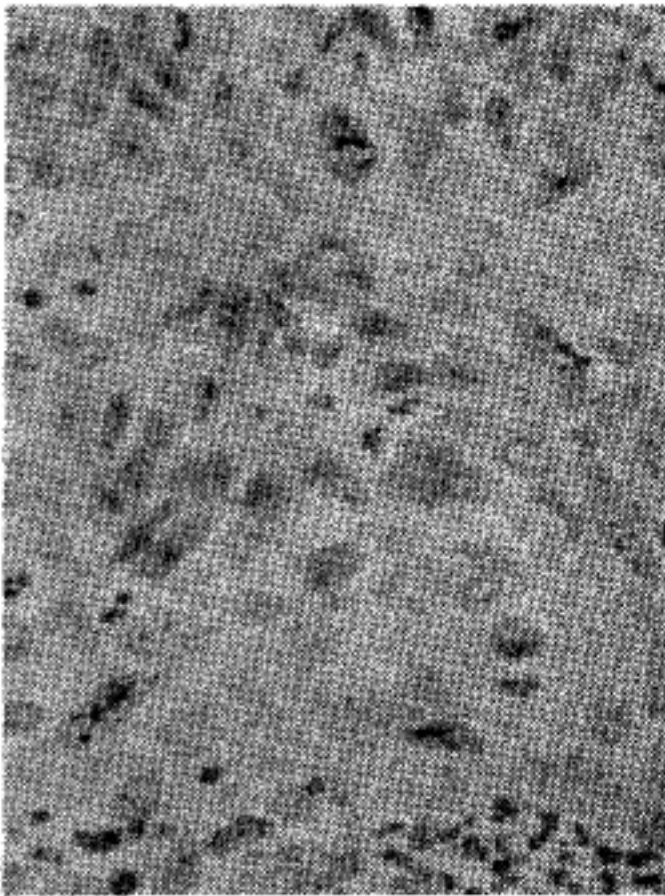


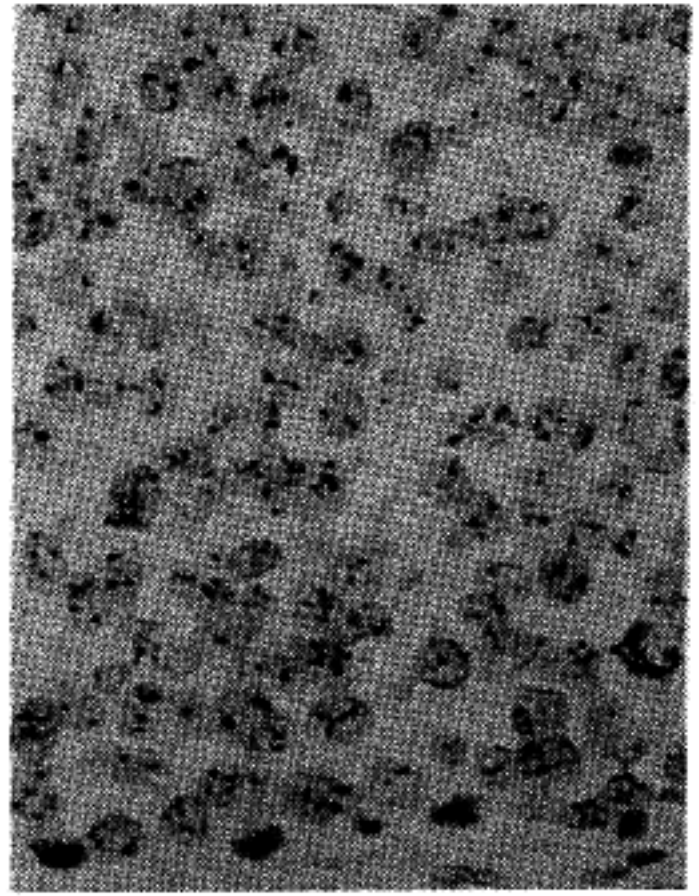
Fig. 4. *In situ* hybridization for HPV 16/18 reveals positive reaction in immature cells of superficial layer. High grade SIL.  $\times 400$

로 스푼형 세포에서 검출되었지만 비스푼형 세포들에서도 검출되었다(Fig. 2). HPV DNA 6/11형이 검출된 세포는 주로 저등급 상피내 병변의 표층 및 중

간층에 분포되어 있었는데, 면역조직화학적 염색 성적과는 다르게 심층에서도 관찰되었다(Fig. 3). 고등급 편평상피내 병변에서는 주로 HPV DNA 16/18형



**Fig. 5.** *In situ* hybridization for HPV 16/18 reveals positive reaction in a few cancer cells. Invasive carcinoma  $\times 400$



**Fig. 6.** *In situ* hybridization for HPV 16/18 reveals dot like positive reaction in the nuclei of cancer cells in cancer nest. Invasive carcinoma  $\times 400$

**Table 2.** Number(%) of human papillomavirus(HPV) DNA positive lesions associated with HPV subtypes in squamous intraepithelial lesion(SIL) and invasive carcinoma

	Total	pan HPV	6/11	16/18	31/33/35	16/18 and 31/33/35
Low grade SIL	23	10(43.5)	5(21.7)	3(13.0)	1( 4.3)	1( 4.3)
High grade SIL	115	50(43.5)	0( 0)	37(32.2)	34(29.6)	25(21.7)
Invasive carcinoma	51	22(43.1)	0( 0)	20(39.2)	15(29.4)	12(23.5)
Total	189	82(43.4)	5(2.6)	60(31.7)	50(26.5)	38(20.1)

( ) : %

이나 31/33/35형이 검출되었는데, 양성반응은 저등급 편평상피내 병변과는 다르게 표층부의 세포들에서 관찰되었다(Fig. 4). 침윤암에서는 고등급 편평상피내 병변에서와 같이 HPV DNA 16/18형이나 31/33/35형이 주로 검출되었는데, 침윤된 일부 암세포들에서 과립상의 양성반응을 보였다(Fig. 5). 침윤암의 일부에서 HPV DNA 16/18형에 대한 양성반응은 통상적으로 나타난 비만성의 입색상과는 다르게 암세포의 핵에서 1개 내지 2개의 점상으로 관찰되었으며,

간질세포에서는 음성반응을 보였다(Fig. 6). 한편 HPV 진형에 대한 양성반응은 이형의 양성반응과 유사하였다.

이형별 양성반응(Table 2)은 저등급 편평상피내 병변에서는 저발암군인 6/11형이 가장 많았으나 저발암군 및 고발암군도 검출되었다. 고등급 편평상피내 병변에서는 저발암군은 검출되지 않았으며, 고발암군 중 16/18형이 더 높게 나타났다. 침윤암에서는 16/18형이 가장 많았는데, 16/18형은 자궁경부 병변 중 침윤

Table 3. Correlation with positivity of pan HPV and HPV subtypes in SIL and invasive carcinoma

	Total	Pan HPV(+)		Pan HPV(-)	
		Subtype(+)	Subtype(-)	Subtype(+)	Subtype(-)
Low grade SIL	23	8(34.8)	2(8.7)	0(0)	13(56.5)
High grade SIL	115	43(37.4)	7(6.1)	3(2.6)	62(53.9)
Invasive carcinoma	51	22(43.1)	0(0)	1(2.0)	28(54.9)

( ): %

Table 4. Correlation with immunostaining and *in situ* hybridization in squamous intraepithelial lesion and invasive carcinoma.

	Total	Positive immunostaining				Negative immunostaining			
		Pan HPV		HPV subtype		Pan HPV		HPV subtype	
		P	N	P	N	P	N	P	N
Total	189	25(13.2)	0(0.0)	22(11.6)	3(1.6)	57(30.2)	107(56.6)	55(29.1)	109(57.7)
LG SIL	23	5(21.7)	0(0.0)	4(17.4)	1(4.3)	5(21.7)	13(56.5)	4(17.4)	14(60.9)
HG SIL	115	15(13.0)	0(0.0)	13(11.3)	2(1.7)	35(30.4)	65(56.5)	33(28.7)	67(58.3)
IC	51	5(9.8)	0(0.0)	5(9.8)	0(0.0)	17(33.3)	29(56.9)	18(35.3)	28(54.9)

P: positive N: negative

LG SIL: low grade squamous intraepithelial lesion

HG SIL: high grade squamous intraepithelial lesion

IC: invasive carcinoma

( ): %

암에서 가장 높은 발현율을 나타냈다. 한편, 16/18형 및 31/33/35형에 대해 모두 양성반응을 나타낸 경우는 저등급 편평상피내병변 1예(4.3%), 고등급 편평상피내 병변 25예(21.7%), 침윤암 12예(23.5%)로 고등급 편평상피내 병변과 침윤암에서 높게 관찰되었다. pan HPV에 대한 양성률은 저등급 및 고등급 편평상피내 병변이나 침윤암에서 각각 43.5%, 43.5% 및 43.1%로 비슷하였다.

전형(pan) HPV와 아형 HPV의 반응이 일치할 보인 경우는 저등급 편평상피내 병변에서는 양자 모두 양성인 8예(34.8%)와 양자 모두 음성인 13예(56.5%)를 합하여 21예(91.3%), 고등급 편평상피내 병변에서는 양자 모두 양성인 43예(37.4%)와 양자 모두 음성인 62예(53.9%)를 합하여 105예(91.3%), 침윤암에서는 양자 모두 양성인 22예(43.1%)와 양자 모두 음성인 28예(54.9%)를 합하여 50예(98.0%)로써 높은

일치율을 나타냈다. pan HPV 양성인면서 6/11형, 16/18형 및 31/33/35형 등의 HPV아형에 음성 반응을 보인 경우는 총 9예로써 저등급 편평상피내 병변 2예(8.7%) 및 고등급 편평상피내 병변 7예(6.1%)에서 관찰되었고, 16/18형이나 31/33/35형에 대해 양성인면서 pan HPV에 대해 음성인 경우는 총 4예로써 고등급 편평상피내 병변 3예(2.6%) 및 침윤암 1예(2.0%)에서 관찰되었다(Table 3).

면역조직화학적 염색과 ISH를 비교하여 보면(Table 4) 면역조직화학적 염색상 양성반응을 보인 25예는 모두 전형 HPV에 양성 반응을 나타냈고, 아형별로는 22예에서만 양성반응을 보였는데, 음성인 경우는 저등급 편평상피내 병변 1예와 고등급 편평상피내 병변 2예였다. 면역조직화학적 염색과 ISH간의 일치율을 보인 경우는 전형(pan) HPV의 경우에는 양자 모두 양성인 25례와 양자 모두 음성인 107례를 합

하여 132례(69.8%), 아형 HPV의 경우에는 양자 모두 양성인 22례와 양자 모두 음성인 109례를 합하여 131례(69.3%)로 비교적 높았다. 그러나 면역조직화학적 염색상 양성율(13.2%)은 전형(pan) HPV를 이용한 ISH에 의한 검출률(43.4%) 및 아형 HPV를 이용한 ISH에 의한 검출률(40.7%)에 비해 현저하게 낮았다.

## 고 찰

HPV는 감염시 편평상피의 기저세포를 침범하여 잠복상태로 있으면서 HPV DNA는 episome상태로 세포에 존재하게 된다<sup>13,14</sup>. HPV의 잠복감염(latent infection)은 특징적인 세포병리학적인 변화를 동반하지 않기 때문에 조직학적으로 검색하기 힘들다. DNA의 복제활동이 왕성해지면 감염된 세포들은 성숙해지면서 표층으로 이동하면서 세포병리학적인 변화인 스펀형 세포가 주로 표층부에서 출현하게 된다. 스펀형 세포는 HPV 감염시 조직학적 소견상 특징적으로 관찰되는 소견으로서 핵주위의 공포의 형성과 핵의 농축 등이 관찰된다. 그러나 HPV는 이러한 스펀형 세포 뿐만 아니라 비스폰형 세포에서도 검출되기 때문에 조직학적 검색과 아울러 면역조직화학적 검색 및 ISH 등을 이용하여 감염 여부를 확인하고 있다.

본 연구에서 시행한 면역조직화학적 검색상, 저등급 편평상피내 병변에 비해 고등급 편평상피내 병변과 침윤암에서 양성률이 낮았던 점은 단백 형성 과정과 연관성이 있을 것으로 생각되었으며, 이는 저등급 편평상피내 병변과 침윤암에서 많은 양의 단백질이 형성되고 고등급 편평상피내 병변이나 침윤암에서는 합성된 단백질이 적었다는 보고<sup>15</sup>와 일치하였다. 또한 본 연구에서 ISH상 HPV DNA 양성세포들이 중간층 및 표층에서 주로 관찰되었던 점은 바이러스 DNA양이 많은 증식성 감염기의 감염세포들에서 검출되었던 것으로 생각되었고, 면역조직화학적 검색에 비해 심층에서 양성세포들이 관찰되었던 점과 조직학적인 변화가 일어나지 않은 많은 비스폰형 세포들에서 양성반응을 보인 점은 ISH와 같은 분자병리학적인 방법이 면역조직화학적 검색보다 HPV 검출에 유용함을 나타내 주는 소견으로 생각되었다. 대부분의 양성반응은 핵에서 미만성으로 관찰되었는데, 일부 침윤암의 병소에서 점상(dot)의 양성 반응을 보였던 점은 low gene copy의 HPV DNA가 검출된 것으로 추측되었으며 이는 본

연구에 사용된 ISH법이 통상적인 colorimetric ISH법에 비하여 민감한 검사방법임을 시사해 준 소견으로 생각되었다.

HPV는 현재 70여종의 아형이 알려져 있는데 이들은 피부와 구강을 주로 침범하는 점막피부군(mucocutaneous group), 우체상 표피이형성증(epidermodysplasia verruciformis)관련군 및 항문생식기(anogenital organ)침범군으로 구별되고 있다<sup>9</sup>. 이중 항문생식기 침범군은 그 병변 특이성에 따라 6, 11, 42, 43, 44형과 같은 저발암군과 16, 18, 31, 33, 35형과 같은 고발암군으로 구별하고 있다<sup>10</sup>. 본 연구에서는 이 중 저발암군인 6/11형과 고발암군인 16/18형, 31/33/35형에 대한 검출을 시도하였는데, 검출율은 40.7%로서 Bergeron등<sup>16</sup>의 Southern blot에 의한 68.6%나 Riou등<sup>8</sup>의 PCR에 의한 84%에 비해 낮았으나 Bergeron등<sup>16</sup>의 ISH에 의한 양성률 40.8%와는 유사하여 만족할 만한 양성률로 생각되었다. 아형별 검출율을 보면 저등급 편평상피내 병변에서는 6/11형이 21.7%, 고등급 편평상피내 병변 및 침윤암에서는 16/18형이 각각 32.2% 및 39.2%로 가장 높아서, 저등급 편평상피내 병변에서 저발암군이 많고 고등급 편평상피내 병변에서 고발암군이 많았다는 다른 보고들<sup>16-18</sup>과 일치하였다. 또한 저등급 편평상피내 병변에서 저발암군인 6/11형 뿐만 아니라 고발암군인 16/18(3예)형 및 31/33/35(1예)형이 검출되어 저등급 편평상피내 병변은 감염형들이 다양하며 임상적 변화 또한 다양할 것임을 예견해 주는 소견으로 생각되었는데, 이러한 성적은 저등급 상피내 병변에서 6/11형 뿐만 아니라 16형, 18형 및 다른 아형들이 검출되었다는 보고들<sup>16,17</sup>과 일치하였다. 고등급 편평상피내 병변 및 침윤암에서 저발암군인 6/11형은 검출되지 않았고, 고발암군인 16/18형 및 31/33/35형이 주로 검출되어 고등급 상피내 병변 및 침윤암에서 고발암군의 아형 검출율이 높다는 다른 보고들<sup>16-18</sup>과 일치하였다. 본 연구에서 16/18형과 31/33/35형이 동시에 검출되는 율 즉 여러 아형이 동시에 관찰되는 경우(multiple detection)는 저등급 편평상피내 병변에서는 1예에서만 나타났고, 고등급 편평상피내 병변 및 침윤암에서는 각각 21.7% 및 23.5%를 나타내어 저등급 편평상피내 병변에서 9%<sup>16</sup>와 22%<sup>17</sup>, 고등급 편평상피내 병변에서 4%<sup>16</sup>와 7%<sup>17</sup>였다는 다른 보고들과는 상이하었는데 이는 16/18형과 31/33/35형 probe의 교차반응의 가능성과 실제로 여러가지 아형이 함께 검출될 가능성을 생각할 수 있지만 추후 한가지 아형만을 검출하는 probe를 이용하여 검색을 시행해

보아야 할 것으로 사료되었다.

한편 본 연구에서 아형별 검출 뿐만 아니라 전형 (pan HPV) 검출을 시도해 보았는데 전형과 아형이 일치할 보인 경우가 저등급 편평상피내 병변 91.3%, 고등급 편평상피내 병변 91.3% 및 침윤암 98.0%로 일치율이 높았다. 비교적 낮은 비율이었지만 전형에 양성인 6/11형, 16/18형, 31/33/35형등 아형에 음성인 9예가 있었던 점은 본 연구에 이용했던 아형 이외의 다른 아형에 의한 감염이 있음을 시사해주는 소견으로 추측되었고, 또 저등급 편평상피내 병변에서 8.7%, 고등급 편평상피내 병변에서 6.1%로 관찰되어 이들에게서 감염형의 다양성이 더 높을 것임을 시사해 준 것으로 생각되었다. 따라서 ISH를 이용한 HPV 검출은 아형 및 전형의 probe를 함께 이용한다면 좀 더 유의한 성적을 얻을 수 있을 것으로 추측되었다. 본 연구에서는 침윤암에서 16/18형, 31/33/35형 이외의 다른형은 관찰되지 않았는데 이는 추후 더 많은 예의 생검조직을 대상으로 하여 확인해 보아야 할 것으로 사료되었다. 또한 16/18형이나 31/33/35형에 양성인 전형에 음성인 경우가 4예에서 관찰되었는데 이는 검사방법의 기술적인 결함이나 전형 probe의 염기배열이 아형 probe에 비해서 길기 때문에 나타난 위음성으로 추측되었다. 본 면역조직화학적 염색상 양성을 보였던 25예 중 ISH상 전형 검출에서는 전예에서, 아형별 검출에서는 22예에서 양성을 나타내어 그 특이성은 높았지만, 양성률이 13.2%로 ISH의 43.4% 및 40.7%에 비해 상대적으로 낮았던 점 때문에 HPV의 검출방법으로는 부적절한 방법임을 알 수 있었다.

본 연구결과로 전형 HPV probe를 이용한 인형유두종바이러스의 검출은 그 민감성 및 특이성이 비교적 높다고 판단되었으며 특히 여러가지 종류의 아형을 검출하기 위해 소모되는 경비 및 시간을 절약할 수 있고 비교적 많은 아형인 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35형 이외의 다른 아형들의 유무를 검색할 수 있다는 점에서 유용성이 높다고 생각되었다. 저등급의 편평상피내 병변에서 아형의 다양성이 높았는데 추적조사를 통하여 저발암군과 고발암군간의 암로의 발전유무를 확인한다면 자궁경부암의 발생과정을 이해하는데 많은 진전이 있을 것으로 생각되었으며, Riou등<sup>8</sup>과 DeBritton등<sup>19</sup>은 HPV 양성암에 비해 예후가 더 좋다고 하였고, King등<sup>20</sup>은 HPV감염과 환자에후와는 연관성이 없다고 하였는데, HPV 양성예들에 대한 추적조사를 통하여 그 예후를 관찰한다면 자궁경부암환자의 예후판정에 많

은 도움을 줄 수 있으리라 생각되었다.

## 결 론

자궁경부의 저등급 편평상피내 병변 23예와 고등급 편평상피내 병변 115예 및 침윤암 51예를 대상으로 HPV에 대한 면역조직화학적 염색 및 *in situ* hybridization을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

면역조직화학적 염색상 양성 반응은 주로 표층 및 중간층의 스펀형 세포의 핵에서 갈색의 과립상으로 관찰되었다. 양성률은 저등급 21.7%, 고등급 13.0% 및 침윤암 9.8%로써 저등급 편평상피내 병변에서 가장 높았다.

ISH상 양성반응은 주로 표층 및 중간층의 스펀형 세포핵에서 적색의 과립상으로 관찰되었으며 일부에서는 심층부의 비스폰형 세포에서도 관찰되었다. 아형별 양성반응은 저등급 편평상피내 병변에서는 6/11형이 21.7%, 고등급 편평상피내 병변 및 침윤암에서는 16/18형이 각각 32.2%, 39.2%로서 많이 관찰되었고, 저등급 편평상피내 병변은 저발암군과 고발암군이 모두 관찰되어 그 감염형이 다양했던 반면 고등급 편평상피내 병변과 침윤암은 고발암군만 관찰되었다.

HPV의 전형과 아형이 일치할 보인 경우는 저등급 91.3%, 고등급 편평상피내 병변 91.3% 그리고 침윤암 98.0%로 높은 일치율을 나타냈다.

이상의 소견으로 미루어 형태학적 측면에서 HPV의 검출은 면역조직화학적 검색에 비하여 ISH가 유용하였으며 전형과 아형의 probe를 함께 이용한다면 좀더 민감한 성적을 얻을 수 있을 것으로 사료되었다.

## 참 고 문 헌

1. Devesa SS. Descriptive epidemiology of cancer of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 605-12.
2. Herrero R, Brinton LA, Reeves WC et al. Sexual behavior, venereal diseases, hygiene practices and invasive cervical cancer in a high risk population. *Cancer* 1990; 70: 136-46.
3. Jones CJ, Brinton LA, Hamman RF et al. Risk factors for *in situ* cervical cancer: results from a case-control study. *Cancer Res* 1990; 50: 3657-62.
4. Hildesheim A, Mann V, Brinton LA, Szklo M, Reeves WC, Rawls WE. Herpes simplex virus type 2: a



- possible interaction with human papillomavirus types 16/18 in the development of invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 1991; 49: 335-40.
5. Gram IT, Macaluso M, Stalsberg H. Cigarette smoking and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 40-4.
  6. Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977; 78: 1-30.
  7. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN. Epidemiologic evidence that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958-64.
  8. Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Doussal VL, Orth G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet* 1990; 335: 1171-4.
  9. DeVilliers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989; 63: 4898-903.
  10. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 79: 328-37.
  11. Gall JF, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 63: 378-83.
  12. Park CS, Brigati DJ, Manahan LJ. Automated molecular pathology. One hour in situ hybridization. *J Histo-technol* 1991; 14: 219-29.
  13. zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancer. *Cancer* 1987; 59: 1692-6.
  14. zur Hausen H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991; 184: 9-13.
  15. Firzlaff IM, Kiviat NB, Beckmann AM. Detection of human papillomavirus capsid antigens in various squamous epithelial lesions using antibodies directed against the L1 and L2 open reading frames. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 164: 467-77.
  16. Bergeron C, Barrasso R, Beaudenon S, Flamant P, Croissant O, Orth G. Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 641-9.
  17. Lungu O, Sun XW, Felix J, Richart RM, Silverstein S, Wright TC Jr. Relationship of human papillomavirus type to grade of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 1992; 267: 2493-6.
  18. Franquemont DW, Ward BE, Andersen WA, Crum CP. Prediction of high-risk cervical papillomavirus infection by biopsy morphology. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 577-82.
  19. DeBritton RC, Hildesheim A, deLao SL, Brinton LA, Sathya P, Reeves WC. Human papillomaviruses and other influences on survival from cervical cancer in Panama. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 19-24.
  20. King LA, Tasc T, Twiggs LB et al. Prognostic significance of the presence of human papillomavirus DNA in patients with invasive carcinoma of the cervix. *Cancer* 1989; 63: 897-900.
-