

자궁경부암 병소에서 Hybrid capture system을 이용한 인유두종 바이러스 검출에 관한 연구

조선대학교 의과대학 산부인과학교실
조상무 · 한세준

= Abstract =

A Study of Detection of Human Papilloma Virus in the Patients with the Uterine Cervical Cancer by the Hybrid Capture System Method

Sang Moo Cho, M.D., Sei Jun Han, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Cho-sun University.

The presence of certain HPV types in the female genital tract was associated with a number of diseases, including condyloma, cervical, vaginal and vulvar intraepithelial neoplasia and carcinoma. It is generally accepted that these viruses are predominantly sexually transmitted.

HPV cannot be cultured in vitro, and immunological tests are inadequate. Indirect evidence of anogenital HPV infection can be obtained through the physical examination and by the presence of characteristic cellular changes associated with viral replication in Pap smear or biopsy specimens. Alternately cervical scrapes can be analyzed by nucleic acid hybridization to directly detect the presence of HPV DNA.

Historically, HPV 16 and HPV 18 have been regarded as high risk cancer associated HPVs and HPV types 6, 11, 42, 43 and 44 as low risk HPVs. Subsequently HPV types 31, 33, 34, 35, 45, 51, 52, 56 and 58 have been demonstrated to have an intermediate association with cancer.

This study was performed for high and intermediate types HPV DNA detection on cervical carcinoma with Virapap[®] Probe B.

HPV DNA were detected 82.3% on cervical carcinoma and 7.1% on control samples. HPV DNA test will be applied as a triage for cervical cancer detecting test.

Keywords: Invasive cervical carcinoma, Human papilloma virus deoxyribonucleic acid, Hybrid capture.

I. 서 론

자궁경부암은 우리나라 여성암 중에서 제1위의

발생 빈도를 보이고 있으며 대부분의 암에 대한 발생 원인이 규명되지 않고 있듯이 자궁경부암의 발생 원인 역시 명확하게 밝혀져 있지 않은 실정이다.

최근 자궁경부암 발생 원인의 가설에서 성접촉성 감염인자 중 인유두종 바이러스(Human Papilloma Virus, HPV)가 자궁경부암의 유발에 비교적 직접적인 연관성을 가지고 있는 것으로 보고되어지고 있다.(Syrijanen K et al., 1983; Anna S et al., 1992; Mark H et al., 1993)

HPV는 Papovavirus계열에 속하는 5×10^6 dalton의 분자 무게를 가진 double stranded DNA virus로 현재 약 67종 이상의 아형들이 발견되었고, HPV 아형 16 및 18형은 자궁경부암과 가장 밀접한 연관성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, HPV 아형 31, 33, 34, 39, 45, 51, 52, 56 및 58 등은 자궁경부암을 일으키는데 중증도의 위험도를 가지는 것으로 알려져 있다.(Table 1)

Table 1. Risk sets of Human Papillomavirus for cervical cancer

Risk	HPV Type
Low	6, 11, 42, 43, 44
Intermediate	31, 33, 34, 39, 45, 51, 52, 56, 58
High	16, 18

이러한 HPV의 아형에 따라 자궁경부암 발생의 위험도나, 병변의 양상에 차이를 보이는 것은 HPV의 E6, E7 단백질이 숙주 세포의 P53, PRB 종양억제 단백질을 어느 정도 효과적으로 결합하여 불활성화 시킬 수 있는지의 생화학적 능력에 달려 있다고 판단 되어지고 있다.

이에 본 연구는 자궁경부암 환자를 대상으로 최근 HPV DNA를 검출하는데 그동안 실험과정 시간상의 지연을 해결하면서 예민도와 특이도에 큰 차이를 보이지 않는 Hybrid capture system을 이용하여 자궁경부암 환자에서 HPV 감염 여부를 판단하고 이의 연관성을 규명해 보기 위해 본 실험을 시행하였다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1994년 6월부터 1995년 11월까지 조선대학교

부속병원 산부인과를 내원한 환자중 조직 검사상 자궁경부상피 내암(n=8)과 자궁경부침윤세포암(n=52)으로 확인된 환자 60명을 연구 대상으로 하였으며, 같은 기간 중에 세포진 도말 검사 및 자궁경부조직검사상 정상 소견을 보이거나(n=25) 양성 의 염증 반응을 나타내는(n=5) 30명을 대조군으로 하여 HPV DNA 검사를 시행하였다.

2. 연구 방법

1) 재료의 수집

대상 환자의 자궁경부에서 면봉으로 가검물을 채집하여 HPV DNA 보관용 시험관에 담아 -20℃에서 냉동보관하여 실험하였다.

2) Denaturation(DNA의 변성)

각각의 보관된 검체 양성대조군 및 음성대조군 시험관을 준비하여 Denaturation 시약(NaOH)을 보관된 검체 시험관과 1pg/ml의 HPV 16이 들어 있는 양성대조군 시험관에 500μl를 분주하고 1pg/ml의 carrier HPV가 들어 있는 음성대조군에 1ml를 분주한 후 약 5초간 흔들어 혼합하였다. 이때 검체 시험관과 대조군 시험관은 자색을 나타낸다.

3) Hybridization

HPV형 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 56에 반응하는 RNA antibody가 포함된 Virapap® Probe B라는 Hybridization 시험관에 변성된 검체물을 150μl 첨가하여 약 3분간 Rotary Shaker에서 1100 rPm으로 잘 섞어준 후 65℃에서 60분간 방치하였다. 이때 시험관은 노란색을 띄게 된다.

4) Hybrid capture

Hybridization 반응이 끝난 후 5분간 식혀 1ml pipette으로 검체와 대조군을 각각의 RNA DNA hybrid capture 시험관으로 옮기고, Rotary Shaker에서 1100 rPm의 온도로 60분 동안 섞어 주었다.

5) Hybrid detection

Capture 시험관에 검출 시약인 anti RNA- DNA alkaline phosphatase conjugate antibody를 250μl씩 첨가하고 25℃에서 30분간 배양하였다.

6) Washing

capture 시험관의 반응 후 여액을 완전히 제거 후 세척액으로 5회 더 세척하고 수분을 완전히 제거하였다.

7) Signal generation과 판독

검출시약인 Lumiphos® 530(luminol) 250 μ l을 capture 시험관에 분주하고 25℃ 암소에서 30분간 방치하고 시험관을 잘 섞은 후 luminometer 로 측정하여 양성대조군보다 높은 수치가 나타나는 군을 HPV DNA 검사에 양성으로 판정하였다.

8) 통계적 분석

자궁경부암 환자에서 HPV DNA test에 양성을 띄는 유병률의 유의성은 Chi-square test를 이용하였고, HPV 감염에 대한 유무와 자궁경부암으로 이환될 수 있는 가능성의 연관은 95% 신뢰구간의 Odd's ratio를 이용하였다.

III. 연구 성적

자궁경부세포에서 Hybrid Capture System 방법에 의하여 HPV DNA를 검출한 90예 중 정상 대조군은 30예, 자궁경부상피내암은 8예, 자궁경부암 환자는 52예였으며 자궁경부상피내암 및 자궁경부암 환자의 연령은 27세부터 79세 사이로 평균연령은 50.1세였으며, 대조군의 연령은 32세부터 58세 사이로 44.3세였다.

Hybrid Capture HPV DNA 검출 방법으로 정상 대조군은 30예 중 2예에서 양성을 보여 7.1%의 양성률을 보였으며, 자궁경부상피내암 환자에서는 8예 중 4예에서 양성으로 나타나 50%의 양성률을, 자궁경부암환자에서는 52예 중 43예에서 양성을 나타내 82.7%의 양성률을 보였다.(Table 2)

Table 2. Prevelence of HPV in control, carcinoma in situ and cancer of the cervix

	HPV DNA(+)		HPV DNA(-)	
	number	%	number	%
Control	2	7.1%	28	92.9%
# CIS	4	50%	4	50%
Cancer	43	82.7%	9	17.3%

CIS; Carcinoma In Situ. 0.0001

HPV 감염된 환자에서 감염되지 않는 환자에 비해 자궁경부상피내암에 이환될 수 있는 비교위

험도는(Odd's ratio 95% 신뢰구간) 0.8배로 신뢰할 수 없는 값이었으며(Table 3) 자궁경부암으로 이환될 수 있는 비교위험도는 25.5배였다.(Table 4)

Table 3. Odd's ratio for the association between HPV DNA test and Carciroma in situ of the cervix

	CIS [#] (+)	CIS [#] (-)	OR [*] (CI ^{**} 95%)
HPV DNA(+)	4	45	0.8(0.19-3.41)
HPV DNA(-)	4	37	

CIS ; Carcinoma In Situ.

* OR ; Odd's Ratio

** CI ; Confidence Interval

Table 4. Odd's ratio for the association between HPV DNA test and Cancer of the cervix

	Cancer(+)	Cancer(-)	OR [*] (CI ^{**} 95%)
HPV DNA(+)	43	6	25.5(8.24-78.94)
HPV DNA(-)	9	32	

* OR ; Odd's Ratio

** CI ; Confidence Interval

자궁경부암 환자는 52예를 병기별로 구분지어 HPV 감염 정도와 비교해 보았으나 병기의 정도와 HPV 감염 여부와는 통계적으로 유의하지 않았다.(Table 5)

Table 5. Relationship between HPV DNA test and clinical stage of cervica cancer

Clinical Stage	HPV DNA(+)		HPV DNA(-)	
	number	%	number	%
I	18	72.0%	7	28.0%
II	22	91.7%	2	8.3%
III	2	100.0%	0	0.0%
IV	1	100.0%	0	0.0%

(P > 0.05)

IV. 고 찰

인유두종 바이러스는 papovavirus의 계열에 속하는 double stranded DNA virus로 우리나라 여성암 중 제1위를 차지하는 자궁경부암의 발생인자 중 하나로 생각되어 최근에 관심이 높아지고 있고, 또 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

1970년대 이전까지는 인유두종 바이러스의 세포 배양에 의한 증식이 불가능하였던 까닭에 과학적인 탐구가 지연되었으나 1970년대 분자 생물학의 발달로 인하여 Zür Hausen 등에 의하여 바이러스를 분리하여 구조를 밝히게 되었으며, 현재 67종 이상의 HPV 아형들이 발견되었고, 이중 약 20종의 아형이 생식기관의 감염에 관여하고 있음을 알게 되었다.

HPV 6형과 11형은 대부분 생식기의 침형 콘딜로마에서 발견되는 반면(Kurman RJ et al., 1986) HPV 16형과 18형은 자궁경부암의 약 70%에서 발견되며(Doll R et al., 1986) HPV 31, 33, 35 그리고 39형 등을 포함하면 자궁경부암의 90% 이상에서 HPV가 발견되는 것으로 보고되고 있다.(Barnes W et al., 1988; Giradi F et al., 1992; Mark H et al., 1993)

HPV 감염이 임상적으로 중요한 이유는 특정한 HPV 종류에 의해 감염된 자궁경부 세포들이 악성화 변형을 하게 되며 이러한 악성화의 기전으로는 1) HPV 유전자 E6, E7 등의 암화과정에 관여하는 것으로 추정되는 유전자 일부가 숙주 세포에 융합이 되어 E6, E7 발현의 변화가 발생하는 경우, 2) 암유전자의 활성화, 3) 암억제 유전자의 불활성화, 4) 면역 검색 기능의 소실 등이 제시되고 있다.(송용상 등, 1995; Dyson N et al., 1989)

HPV 감염의 세포학적 진단시는 Koilocytosis와 dyskeratosis가 특징적으로 나타나는데 hyperchromatic한 비정형핵, 큰 Cavity를 함유한 Koilocyte와 세포질의 각질화가 있는 dyskeratotic cell을 관찰할 수 있다.

최근 HPV 진단에 많이 이용되는 분자 생물학적 방법에는 Southernblot hybridization, in situ hybridization 등이 있고, Hybrid capture System은

dot blot hybridization 과정을 변형시킨 soluble hybridization 방법으로 RNA-DNA hybrid에 대한 1차 면역항체를 시험관에 부착시킨 후 RNA-DNA hybrid에 대한 2차 면역항체를 부착시켜서 나타나는 양성 반응을 상대적인 양으로 표시하는 방법으로 일반 실험실에서 실험할 수 있도록 단순화시켰고, 예민도와 민감도에서도 다른 실험 방법에 큰 차이가 없는 방법이다.(Xiao W et al., 1995)

Syrjanen 등(1995)은 전향적 추적 연구를 토대로 하여 HPV type 16과 18에 감염된 자궁경부병변이 CIN(Cervical Intraepithelial Neoplasia) 및 CIS (Carcinoma In Situ)를 통하여 침윤성 자궁경부암으로 이행해 가는 직접적인 증거를 얻어낼 수 있었다.

환자의 병기별 HPV DNA test는 병기의 정도와 HPV 감염 여부와는 통계적인 유의성을 발견하지 못하였으며, Laurel 등(1989)은 자궁경부암 환자 47명을 대상으로 병기별로 HPV 감염 여부를 비교한 후 특이한 사항을 발견할 수 없었고, 이는 HPV가 자궁경부암의 진행에 관여한다기보다는 자궁경부암의 발생인자로 관여한다고 하였다.

또한 Barbara 등(1995)은 자궁경부암 환자의 예후인자 중 암의 병기와 환자의 연령 관계 등 이외에도 HPV 18형에서 수술적 치료 후 재발률이 감염되지 않는 환자에 비해 약 4.7배 높다고 하였다.

본 실험에서는 정상 대조군(n=30)의 7.1%에서 HPV DNA test에 양성을 보인 반면, 자궁경부암 환자(n=52)에서는 82.3%에서 양성으로 나타났으며, HPV에 이환된 환자가 자궁경부암에 이환될 가능성은 HPV에 감염되지 않는 환자에 비해 25.5배(CI 95%: Confidence Interval) 높은 것으로 나타났다.

HPV 감염과 자궁경부암으로의 진행간의 밀접한 관계는 최근 분자생물학적 방법에 의하여 HPV의 아형 구분까지 가능해짐으로써 앞으로 자궁경부암의 병태 생리기전을 연구하고 이해하는데 더욱 이바지할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

HPV 감염은 자궁경부 병변 발생기전에 중요한 역할을 담당하며 병변의 악성화 경향은 HPV 아

형에 따라 정도의 차이가 있다. 본 실험은 자궁경부암(n=52), 자궁경부상피내종양(n=8), 정상 대조군(n=30) 등 90예의 자궁경부 검체물에서 Chemiluminescent Hybrid Capture system을 이용하여 HPV DNA 검사를 시행하여, 정상대조군에서는 7.1%의 양성률을 자궁경부상피내종양에서는 50%의 양성률을 자궁경부암에서는 82.3%의 양성률을 보여 자궁경부암과 HPV 감염이 밀접한 연관성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.($P < 0.0001$)

HPV 감염 환자에서 감염되지 않은 군에 비하여 자궁경부암에 이환될 가능성(Odd's ratio; 95% 신뢰 구간)이 25.5배 높게 나타남으로 이는 자궁경부암 발생기전에 HPV 감염 여부를 선행 선별 검사함으로써 자궁경부암으로의 이환율을 줄일 수 있을 것으로 사료된다. HPV 감염은 즉 자궁경부암의 병기와는 통계적 유의성을 찾아 볼 수 없는 것으로 보아($P > 0.05$) 이는 HPV가 자궁경부암 병소의 진행 단계 관여보다는 자궁경부암의 발생기전에 관여하리라고 판단되며, 이로써 HPV DNA 검사법은 자궁경부암 환자의 발견보다 선행되어, 자궁경부세포진 도말 검사와 함께 선별검사법으로 사용함으로써 자궁경부암 환자의 이환율을 줄여 줄 수 있을 것으로 확신 하는 바이다.

- References -

1. 송용상, 이효표, 장윤석: "자궁경부암에서 인유두종 바이러스 16, 18형 감염 여부에 따른 P53 유전자 변이 및 발현에 관한 연구", J. Korean Obstet and Gynecol 1995;38:1259-1277.
2. Anna S, Robert J, Diane B: "Biologic Characteristics of Specific Human Papillomavirus Types Predicted From Morphology of Cervical Lesions", Human Pathology 1992;23:1262-1269.
3. Barbara R. Rose, Carol H, Judy M et al.: "Human papillomavirus deoxyribonucleic acid as a prognostic indicator in early-stage cervical cancer; A possible role for type 18." Am J Obstet and Gynecol 1995; 173:1461-1468.
4. Barnes W, Delgado G, Kurman RJ: "Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer." Gynecol Oncol 1988;29:267-273.
5. Ciuffo G: "Innesto positive con filtrado di verrucal volgare. Giora Ital Mal Venercal 1907;48:12.
6. Doll R: "Implications of epidemiological evidence for future progress In ; Peto R, Zur Hausen H, eds, viral etiology of cervical cancer." Banbury Rep 1986;21-321.
7. Dyson N, Howky PM, Manger K et al.: "The human papillomavirus E6 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene produit," Science 1989;243:934-937.
8. Giradi F, Fuchs PG, Hass J: "Prognostic importance of human papilloma virus type 16 DNA in cervical cancer," Cancer 1992;69:2502-2504.
9. Kurman RJ, Bennett J, Lancaster WD: "Papillomaviruses and cervical neoplasias. Reflections on the past perceptions of the present and speculations for the future. In Howley PM. Broker TR; Papillomaviruses. Molecular and Clinical Aspects. New York, Alan R Liss 1986;93.
10. Laurel A, Toru T, Leo B et al.: "Prognostic significance of the Presence of Human Papilloma virus DNA in Patients With Invasive Carcinoma of the Cervix." Cancer 1989;63:897-900.
11. Mark H, Heidi M, Robert N: "Epidemiologic Evidence Showing That Human Papillomavirus Infection Causes Most cervical Intraepithelial Neoplasia." J NCI 1993;85:958-964.
12. Pfister H: "Biology and biochemistry of papilloma viruses." Physiology Biochemistry Pharmacology 1984;99:112.
13. Syrjanen K.: "Human Papilloma virus Lesions in Association with Cervical Dysplasias and Neoplasias." J Obstet and Gynecol 1983;62:617-624.
14. Syrjanen K, de Villiers EM, Vayrynen mantyjärvi R et al.: "Cervical papillomavirus infection progressing to invasive cancer in less than two yers." Lancet 1985;1:510.
15. Xiao-Wei San, Alex Ferenczy, Daniel J et al.: "Evaluation of the Hybrid capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection test," Am J Obstet and Gynecol 1995;173:1432-1437.
16. Zür Hausen H: "Papilloma virus in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers." Cancer Res 1989;49:4677-4681.