대부종합보회지 제2권 제1호 1991
KJGOC pp 18~32
Vol. 2, No. 1, Nov, 1991

여성 생식기내의 인유두종 바이러스 양성 여부에 따른 자궁경부암의 발생위험 예측

가톨릭 의과대학 산부인과학교실

한상균 · 김승조

=Abstract=

The Prevalence of Type-Specific Human Papillomaviral DNA in the Female Genital Tract using Self Sampling Device and Its Clinical Significance to Predict the Risk of Cervical Cancer

Sang Kyun Han, M. D., Seung Jo Kim, M. D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Dot blot and Southern blot hybridization techniques using DNA extracted from large pool of exfoliated cervical epithelial cells are widely used to increase the diagnostic accuracy of HPV infection of cervix.

So, to find the better method which can predict the high risk group for cervical cancer we collected the much amount of exfoliated cervical epithelial cells by means of Self sampling device and investigated the positive rate and integraton of HPV subtype 6, 11, 16, 18 DNA using Dot blot and Southern blot hybridization techniques among 280 normal subjects, 32 patients with cervical dysplasia and 63 patients with cervical cancer who visited the Early Detection Clinic of Cervical Neoplasia at Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University Medical College and obtained the following results by comparatively study the relationship between HPV subtype 16, 18 infection of cervix and prediction score for the risk of cervical cancer.

The results were as follows :

1. Human papillomavirus(HPV) type 6/11 was detected in 22(7.9%) of 280 normal subjects, 6(18.8%) of 32 with cervical dysplasia and none of 63 with cervical cancer.

HPV type 16 or 18 was detected in 38(13.6%) of 280 normal subjects, 15(46.9%) of 32 with cervical dysplasia and 39(61.9%) of 63 with cervical cancer which showed significant positive correlation between the degree of histologic malignancy and the detection rate of HPV($P<0.005$).

2. Comparing the positive rate of HPV among patients with cervical dysplasia according to the pathologic grade,

there was a significant correlation between the positive rate of HPV type 16 or 18 and the degree of cervical dysplasia ($P<0.01$).

Among 13 with mild cervical dysplasia, type 6/11 was detected in 4(30.7%) and type 16 or 18 was in 3(23.1%) whereas type 6/11 was detected in 2(22.2%) and type 16 or 18 was in 4(44.4%) among 9 with moderate cervical dysplasia.

Among 10 with severe cervical dysplasia, type 16 or 18 was detected in 8(80.0%) and type 6/11 was in none.

3. Comparing the positive rate of HPV among patients with cervical cancer according to the clinical stage, HPV type 16 or 18 was detected in 17(68.0%) of 25 with stage Ⅰ, 16(59.2%) of 27 with stage Ⅱ, 4(50.0%) of 8 with stage Ⅲ and 2(66.7%) of 3 with stage Ⅳ showing no signifcant correlation between the positive rate of HPV type 16 or 18 and the clinical stage of cervical cancer ($P>0.05$).

4. Sensitivities of detection of HPV type 16 or 18, prediction score system and combination of two methods to predict the high risk group of cervical cancer were 61.9, 54.0 and 85.7% respectively.

Although there was no significant difference in sensitivity between the detection of HPV and the prediction score system, combination of two methods was significantly higher in sensitivity than that of each method ($P<0.01$).

Specificity of the detection of HPV, prediction score system and combination of two methods were 86.9%, 80.0 and 73.2% respectively. Although there was no significant difference in specificity between the detection of HPV and the prediction score system, detection of HPV was significantly higher in specificity than that of combination of two methods ($P<0.01$).

5. Genomic DNAs from 58 patients(23 cases from normal cervical lavages, 12 cases from cervical dysplasia and 23 cases from cervical cancer) which showed strong positive signals to HPV type 16 DNA in Dot blot analysis were further examined by Southern blot hybridization.

When DNAs were digested with Pst Ⅰ restriction enzyme, characteristic fragments of specific HPV type 16(2.8, 1.8, 1.5, 1.1, 0.5, 0.2 kb) were recognized in all cases.

Integration of genomic DNAs of HPV type 16 was observed in 6(26.1%) of 23 with cervical cancer, 2(16.7%) of 12 with cervical dysplasia and none of 23 with normal cervix

From these results, it might be concluded that early detection of HPV type 16 or 18 in high risk group from cervical cancer by means of Self sampling device, Dot blot, Southern blot hybridization is not only useful in early treatment and follow up of patients with HPV infection but also contributory to the reduction of mortality from cervical cancer by predicting the high risk group from cervical cancer.

Ⅰ. 서 론

자궁경부암의 발생요인은 연령, 임신 및 분만횟수, 조기 성적접촉, 다수의 성배우자, 고위험 남성배우자에게의 노출, 흡연, 교육정도, 사회경제적 환경 등을 들 수 있다[1-6].

이러한 자궁경부암의 발생요인중 특히 성적접촉 질병과의 역학적 상관관계에 착안하여 과거 성전파 질환의 일종으로만 생각되었던 인유두종 바이러스 (Human Papillomavirus; HPV)가 높은 역학적 빈도를 갖는 주요 성접촉성 인자로서 대두되기에 이르렀다. 이중 여성 생식기에서 발견되는 특정유형의 인유두종 바이러스 아형은 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 45, 51형 등이 있으며[7] 이들 중 인유두종 바이

러스 아형 6, 11은 양성 콘딜롬에서 주로 발견되는 반면에[8], 16과 18형은 숙주세포내의 핵산에 동화(integration)되어 존재하면서 주위의 암유전자를 활성화시켜 암유발에 고위험 인자로 관여한다[9]. 인유두종 바이러스 감염 여부를 진단하기 위하여 감염부위의 육안적인 형태, 상피 병소의 조직병리, 세포검진시의 특징적인 세포병리, 조직이나 도말표본에서 핵내 바이러스 항원의 출현 및 전자 현미경 소견상 바이러스 입자의 발견 등이 이용되고 있으나, 최근에는 인유두종 바이러스 중 특수한 아형의 바이러스를 분리하기 위하여 분자 생물학적 기법이 사용되고 있다[10].

이중 인유두종 바이러스 검색법인 Dot blot은 탈락세포 DNA를 추출하여 교잡하는 방법으로 위양성을 줄이고 정량적 검사가 가능하고, Southern blot 교잡법은 바이러스의 핵산을 감지하는데 가장 민감한 방법이기는 하지만 시간과 경비가 너무 많이 소요되고 실험량이 많아 임상응용에는 어려움이 있다[11].

질세포 자가채취 기구는 환자자신 및 의사가 간편하게 가검물을 채취할 수 있고, 많은 양의 질, 자궁경 세포군집을 얻은 후 이 세포군집에서 분자생물학적 기법에 필요한 충분한 양의 DNA가 추출되므로 인유두종 바이러스의 조기진단에 유용하다.

본 연구에서 저자들은 질세포 자가채취 기구를 이용하여 충분한 양의 질, 자궁경 탈락세포 군집을 얻은 후 DNA를 추출하여 교잡하는 방법인 Dot blot과 Southern blot 교잡법을 이용하여 정상 자궁경부 280예 및 자궁경부 상피이형증 32예, 자궁경부암 63례에서의 인유두종 바이러스 아형 6, 11, 16, 18의 DNA 양성률 및 동화율을 연구하고 고위험 인유두종 바이러스 아형과 자궁경부암의 예측점수제에 따른 위험군과의[1] 관계를 비교평가하여 자궁경부암의 발생위험성을 예측할 수 있는 방법을 발견하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

Ⅱ. 대상 및 방법

1. 연구대상

1990년 3월부터 동년 11월까지 가톨릭의과대학 산부인과 부인암 클리닉에 내원한 자궁경부상피 이형증 환자 32례, 자궁경부암 환자 63례와 부인암 클리닉과 건강진단센터에 가입된 정상부인 280례를 대상으로 하였다.

정상 부인은 세포학적 검사와 질확대경 검사가 모두 음성이었으며 연령에는 특별히 제한을 두지 않았다.

2. 방법

(1) 자궁경부암의 발생위험 예측점수제

자궁경부암의 발생인자인 임신 및 분만횟수, 성행활, 사회경제적환경, 교육정도, 배우자의 성병 감염 등의 정도에 따라 점수를 계산하여 6점-9점은 저위험군, 10점-13점은 중등도 위험군, 14점 이상은 고위험군으로 분류하였다(표 1).

(2) 질세포 자가채취기구

이 기구는 채취액, 캡, 삽입관, 경사부 및 펌프로 구성되었고, 채취액은 10㎖의 증류수에 염화나트륨 0.09g, 에탄올 1.55g, 수산화나트륨 0.024mg과 로졸산 0.5mg으로 구성되어 있다(녹십자의료공업) (Fig. 1).

(3) 질세포 자가채취기구 사용법

부인암 전문의가 채취하는 경우에는 질경으로 자궁경부와 질부위를 충분히 노출시킨 다음 자가채취기구의 채취액을 자궁경부와 후질경부에 집중 세척하였으며 필요시에는 내경관구를 흡입하였다. 피검자 자신이 채취할 경우에는 웅크린 자세 또는 뒤로 반쯤 누운 자세를 취한 후 채취기의 캡을 벗기고 삽입관을 질속 깊숙히 삽입한 다음 펌프를 사용하여 분사와 흡입 동작을 수회 반복함으로써 질내를 충분히 세정한 후 세정액을 기구의 1/3 이상 되도록 회수하여 밀봉하였다.

표 1. Prediction score for the risk of cervical cancer

Variable	Score		
	0	1	2
Marital status	Happy		Unhappy
Status of pregnancy			
Age of first pregnancy	21≥		20≤
Age of first delivery	21≥		20≤
No. of delivery	0-4		5≥
Status of sexual life			
Age of first coitus	21≥		20≤
History of contact bleeding	No		Yes
History of venereal disease	No	Yes	
Social factors			
Socioeconomic condition	Middle & high		Low
Educational level	Middle & high	Low	
Present residence	Urban	Rural	
Husband's factor			
Status of phimosis	No		Yes
History of venereal disease	No	Yes	

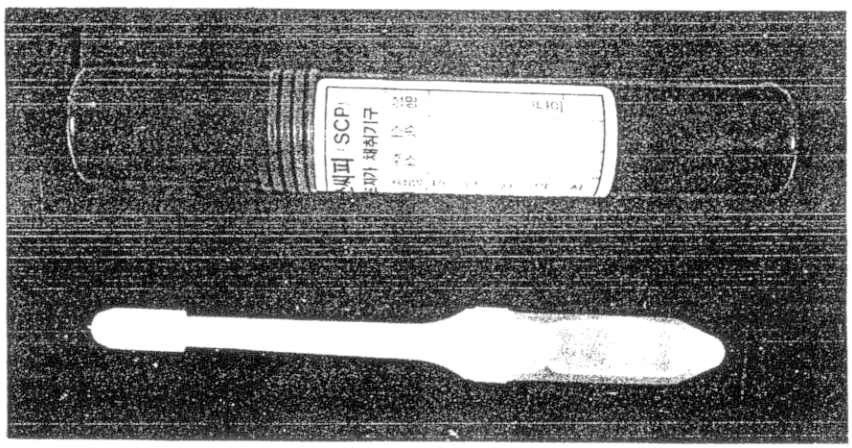

Fig. 1 Self sampling device
1. cap 2. introducing tube 3. neck 4. pump 5. media

(4) 질세포 자가채취 기구에 의한 가검물 처리

가검물 4℃ 1,000rpm(Beckmann IJ-6)으로 세포 침사를 만든 후 상청액을 버리고 6mℓ의 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하였으며, 이때 적혈구, 점액질 등 불순물을 제거하였다. 세척한 시료는 즉시 아래의 방법으로 DNA를 분리하였다.

이 기구로 채취한 가검물은 냉장보관 하였으며, 72시간 이상을 초과하지 않았다.

(5) DNA의 분리

일정량의 세척된 세포침사(1-5×10⁷개)를 15mℓ Falcon tube에 넣은 후 3mℓ의 세포용액 완충액(10mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 2mM EDTA)으로 재부유시킨 후 1mℓ의 proteinase K(1mg/mℓ in 1% SDS/2mM EDTA) 용액 및 200ul의 10% SDS 용액을 넣은 후 16-20시간 반응시킨 후 salting-out 분리법으로 DNA를 분리하였다[12].

Salting out후에 모든 DNA는 phenol/chloroform 추출법을 시행하였으며, DNA 순도는 분광광도계로 흡광도비(A^{260}/A^{280})를 계산하여 측정하였고, 순도가 낮은 경우에는 phenol/chloroform 처리를 다시하여 DNA 순도가 1.7 이상인 것을 실험에 사용하였다. DNA 농도는 DNA 형광계(Hoefer Scientific Instruments, Model TKO 100)를 이용하여 측정하였다.

(6) HPV-DNA 탐색자 준비

pBR 322에 클리닝 되어 있는 HPV 6형과 11형 DNA (The John Hopkins University 제공) 및 HPV 16형과 18형 DNA(Dr. Zur Hansen 제공)를 "random prime DNA 표식방법"(multiprime DNA rabelling kit, Boehringer Mannheim)을 이용하여 [α-^{32}P]-dCTP(Amersham, PB 10205)로 표지하였다.

이를 0.5mℓ Eppendorf tube를 사용한 Sephadex G-50(Pharmacia) minicolumn을 통과시켜 유리 [α-^{32}P]-dCTP를 제거하여 2-3×10cpm/ug DNA의 특이 방상능을 갖도록 하였다[13].

(7) Dot blot DNA 교잡

5ug에 해당하는 DNA 용액을 1/10 부피의 3M NaOH 용액으로 65℃에서 1시간 변성(denaturation) 시킨 후 동량의 2M ammonium acetate(pH 7.0)로 탈변성(renaturation)시켜 nitrocellulose 여과지가 정착되어 있는 slot blot 기구(Schleicher & Schuell, Minifold Ⅱ)의 홈에 넣고 흡인기를 사용하여 nitrocellulose 여과지에 DNA를 흡착시켰다. 이때 양성 대조군으로 HPV DNA를 음성대조군으로 salmon sperm DNA를 사용하였다.

"blotting"된 여과지는 30분간 실온에서 건조시킨 후 80℃ 건조기 내에서 2시간 구운 후 교잡용액(5× SSPE, 5×Denhardt, 0.2% SDS, 10% Dextran, 150ug/ml salmon sperm DNA)에서 68℃로 2시간 전교잡하였다.

전교잡에 사용한 용액을 모두 버린 후 새로운 교잡용액(50μl/㎠)과 [^{32}P]HPV 탐색자를 넣고 68℃에서 20시간 교잡하였다. 세척과정은 다른 HPV 아형과의 교차반응을 줄이기 위해 엄격히 하였으며, 1× SSPE/0.1% SDS로 65℃에서 30분간 2회, 0.1×SSPE로 실온에서 1분간 1회 세척하였다. 이 여과지를 AGFA CURIX 필름에 고속증강 스크린(intensifying screen)을 이용하여 -75℃에서 2-4일간 노출시킨 후 현상하였다.

이때 필름에 나타난 음영을 양성 및 음성 대조군과 비교하였으며 HPV DNA 10pg 이상의 음영을 양성으로 판정하였다.

(8) Southern blot DNA 교잡

Dot blot에서 강한 양성 음영을 보이는 genomic DNA 10ug을 Pst 1 제한효소(3unit/ug DNA)로 37℃에서 12시간 이상 반응시킨 후 gel loading buffer(0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol, 15% Ficoll 400)와 혼합한 후 0.8% agarose gel(15±15cm 크기)에 "Lamda DNA/Hind Ⅲ fragments(BRL)"와 함께 20-50 volt, 50mA로 전기영동 하였다(비젼과학, KMC-103).

이 gel을 자외선 투과기(서린과학, transilluminator TR-302) 위에서 전기영동 결과를 확인한 후, 1.5M NaCl/0.5M NaOH로 1시간 동안 변성시킨 후 1M Tris (PH 8.0)/1.5M NaCl 용액으로 1시간 동안 탈변성 시켰다. 이 gel로부터 Nylon 여과지(Hybond-N, Amersham)에 10×SSC로 삼투현상을 이용하여 Southern blot한[15] 후 Dot blot과 같은 방법으로 교잡하였다.

(9) 통계방법

자궁경부 조직소견이 악성화 정도에 따른 인유두종 바이러스 양성률의 증가 추세는 Bartholomew 검정을 이용하였고, 각 검사방법의 민감도와 특이도를 계산하여 비교하였고, 이들 검사방법 간의 민감도와

특이도의 차이는 z-검정으로 알아보았다.

Ⅲ. 결 과

정상 자궁경부와 자궁경부 상피이형증 및 자궁경부암에서의 인유두종 바이러스 양성률을 비교해보면(표 2), 대상군 총 375례중 인유두종 바이러스 6, 11, 16, 18형의 양성을 120례(32.0%), 음성은 255례(68.0%)였다.

인유두종 바이러스 아형별 빈도는 6/11형이 정상여성 280례중 22례(7.9%), 자궁경부 상피이형증 32례중 6례(18.8%)에서 양성이었고, 자궁경부암 63례에서는 모두 음성으로 나타났다.

16과 18형은 정상여성 280례중 38례(13.6%), 자궁경부 상피이형증 32례중 15례(46.9%), 자궁경부암 63례중 39례(61.9%)에서 양성으로 나타나서 자궁경부 조직소견의 악성화 정도가 심할수록 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률은 증가 추세를 보였다($P<0.005$) (Fig. 2-4).

자궁경부 상피이형증의 병리학적 등급에[16] 따른 인유두종 바이러스 양성률을 비교하면(표 3), 경도 이형증 13례중 인유두종 바이러스 6/11형이 4례(30.7%), 16과 18형이 3례(23.1%)에서 양성이었고, 중등도 이형증 9례중 6/11형이 2례(22.2%), 16과 18형이 4례(44.4%)에서 양성이었다.

중증 이형증 10례중 16과 18형이 8례(80.0%)에서 양성이었고, 6/11형은 나타나지 않았다. 자궁경부 상피이형증에서 병리학적 등급에 따른 악성화 정도가 심할수록 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률은 증가 추세를 보였다($P<0.01$).

자궁경부암 환자군을 FIGO 분류법[17]으로 분류하여 임상병기에 따른 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률을 조사한 결과(표 4), Ⅰ기 25례중 17례(68.0%), Ⅱ기 27례중 16례(59.2%), Ⅲ기 8례중 4례(50.0%), Ⅳ기 3례중 2례(66.7%)에서 양성으로 나타났다. 자궁경부암의 임상적병기에 따른 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률은 뚜렷한 추세가 없었다($P>0.05$).

정상 여성, 자궁경부 상피이형증 환자 및 자궁경부암 환자를 자궁경부암의 발생위험 예측점수제(표 1)에 따라 고위험군, 중등도 위험군, 저위험군으로 분류해보면(표 5), 고위험군은 정상 여성 280례중 56례(20.0%), 자궁경부상피이형증32례중13례(40.6%), 자궁경부암 63례중 34례(54.0%), 중등도 위험군은 정상 여성 280례중 71례(25.4%), 자궁경부 상피이형증 32례중 11례(34.4%), 자궁경부암 63례중 21례(33.3%), 저위험군은 정상여성 280례중 153례(54.6%), 자궁경부 상피이형증 32례중 8례(25.0%), 자궁경부암 63례중 8례(12.7%)로 나타나서 자궁경부 조직의 악성화 정도가 심할수록 고위험군은 증가 추세를 보였다($P<0.01$).

정상 부인을 자궁경부암의 발생위험 예측점수제에

표 2. Detection of type-specific Human Papillomaviral DNA in each cervical specimen

DNA hybridization	HPV subtype-positive	HPV subtype-positive			No. of each case
Group	6/11	16	18	subtotal*	
Normal	22(7.8%)	31	7	38(13.6%)	280(100%)
CIN	6(18.8%)	12	3	15(46.9%)	32(100%)
Cervical cancer	0(0.0%)	32	7	39(61.9%)	63(100%)
Total	28(7.5%)	75	17	92(24.5%)	375(100%)

* Bartholomew's test for trend

$X^2=74.19$, $P<0.005$

HPV : Human papillomavirus

CIN : Cervical intraepithelial neoplasia

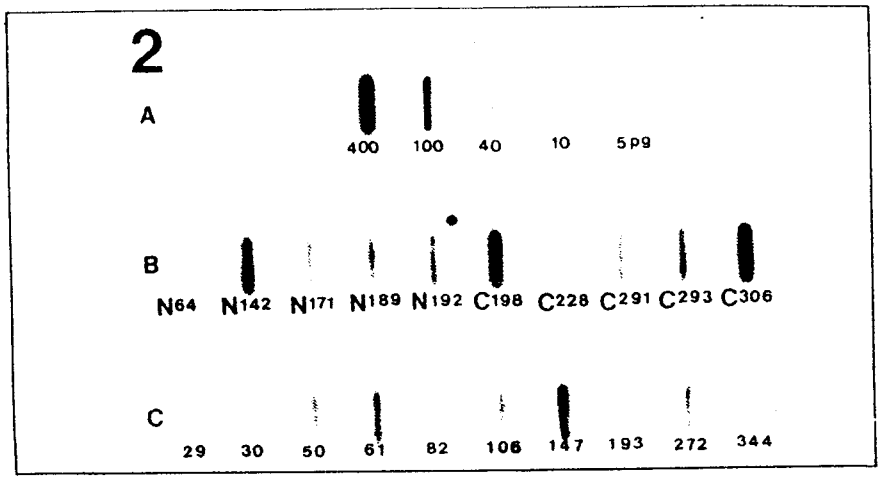

Fig. 2 Dot blot hybridization to ^{32}P-labelled HPV 16 DNA of extracted DNA from cervical lavages using self sampling device in normal cervix, CIN and cervical cancer.
A. HPV 16 control DNA B. CIN(N) & cervical cancer(C) C. normal cervix

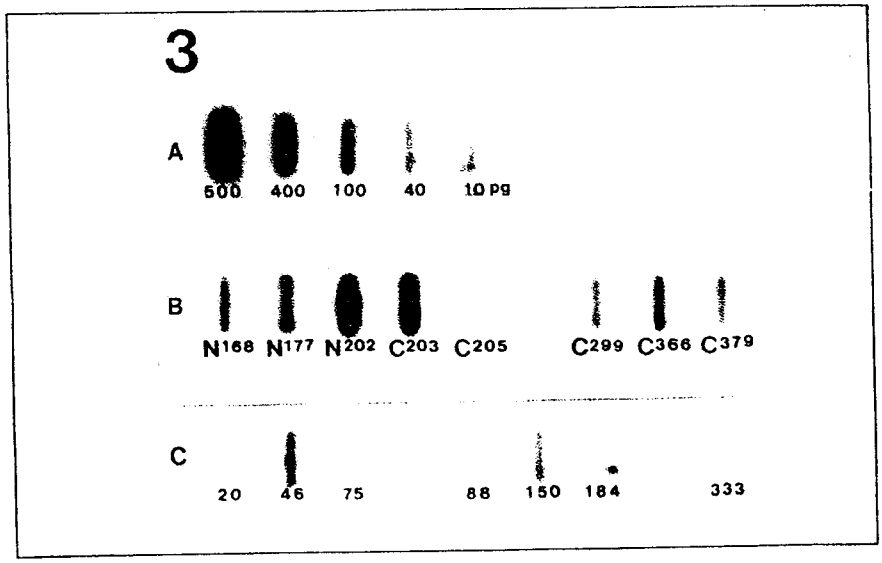

Fig. 3 Dot blot hybridization to ^{32}P-labelled HPV 18 DNA of extracted DNA from cervical lavages using self sampling device in normal cervix, CIN and cervical cancer.
A. HPV 18 control DNA B. CIN(N) & cervical cancer(C) C. normal cervix

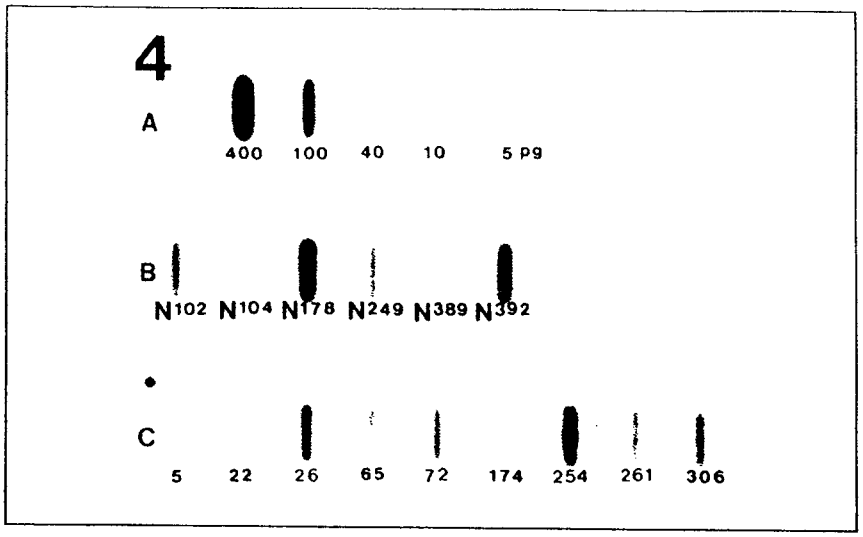

Fig. 4 Dot blot hybridization to ^{32}P-labelled HPV 6/11 DNA of extracted DNA from cervical lavages using self sampling device in normal cervix and CIN. A. HPV 6/11 control DNA B. CIN(N) C. normal cervix

표 3. Detection of type-specific Human Papillomaviral DNA within each pathologic grade of CIN

DNA hybridization	HPV subtype-positive	HPV subtype-positive			Total
Group	6/11	16	18	subtotal*	
CIN I	4(30.7%)	2	1	3(23.1%)	13(100%)
CIN II	2(22.2%)	3	1	4(44.4%)	9(100%)
CIN III	0(0.0%)	7	1	8(80.0%)	10(100%)
Total	6(18.8%)	12	3	15(46.9%)	32(100%)

* Bartholomew's test for trend

X^2=7.38, P<0.01

HPV : Human papillomavirus

CIN : Cervical intraepithelial neoplasia

따라 고위험군, 중등도 위험군, 저위험군으로 분류하여 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률을 조사한 결과(표 6), 저위험군 153례중 11례(7.2%), 중등도 위험군 71례중 8례(11.3%), 고위험군 56례중 19례(34.0%)에서 양성으로 나타났다.

자궁경부암 환자를 자궁경부암 발생위험 예측점수제에 따라 고위험군, 중등도 위험군, 저위험군으로 분류하여 인유두종 바이러스 양성률을 비교해 보면(표 7), 저위험군 8례중 5례(62.5%), 중등도 위험군 21례중 15례(71.4%), 고위험군 34례중 19례(55.9%)에서 양성으로 나타났다.

자궁경부암의 발생위험을 예측하는데는 인유두종 바이러스 16과 18형의 검색과 자궁경부암 발생위험 예측점수제의 두가지 방법이 있다. 이 두 방법을 최종 확진 검사소견에 비교하여 정확도를 계산하였다(표 8). 자궁경부암의 발생위험을 예측하기 위한 상기 2가지 방법, 각각의 민감도(sensitivity)는 인유두종 바이러스 검색시 61.9%, 자궁경부암 발생위험 예

표 4. Detection of type-specific Human papillomaviral DNA within each clinical stage of cervical cancer

DNA hybridization	HPV subtype-positive			No. of each case
Clinical stage	16	18	subtotal*	
Stage Ⅰ	13	4	17(68.0%)	25(100%)
Stage Ⅱ	14	2	16(59.2%)	27(100%)
Stage Ⅲ	3	1	4(50.0%)	8(100%)
Stage Ⅳ	2	0	2(66.7%)	3(100%)
Total	32	7	39(61.9%)	63(100%)

* Batholomew's test for trend

X^2=0.79, P>0.05, Not-significant

HPV : Human papillomavirus

표 5. Three risk groups by prediction score for the risk of cervical cancer in each cervical specimen

Risk groups Groups	Low	Moderate	High*	No. of each case
Normal	153(54.6%)	71(25.4%)	56(20.0%)	280(100%)
CIN	8(25.0%)	11(34.4%)	13(40.6%)	32(100%)
Cervical cancer	8(12.7%)	21(33.3%)	34(54.0%)	63(100%)
Total	169(45.0%)	103(27.5%)	103(27.5%)	375(100%)

* Bathalomew's test for trend

X^2=33.01, P<0.01

Prediction score of low risk group : 6-9

Prediction score of moderate risk group : 10-13

Prediction score of high risk group : ≥14

CIN : cervical intraepithelial neoplasia

표 6. Type-specific HPV infection in normal women according to prediction scoring group for the risk of cervical cancer

DNA hybridization	HPV subtype-negative	HPV subtype-positive			Total
Risk group	16 or 18	16	18	subtotal	
Low	142(92.8%)	9	2	11(7.2%)	153(100%)
Moderate	63(88.7%)	7	1	8(11.3%)	71(100%)
High	37(66.0%)	15	4	19(34.0%)	56(100%)
Total	242(86.4%)	31	7	38(13.6%)	280(100%)

HPV : Human papillomavirus

표 7. Type-specific HPV infection in cervical cancer according to prediction scoring group for the risk of cervical cancer

)NA hybridization	HPV subtype-negative	HPV subtype-positive			Total
Risk groups	16 or 18	16	18	subtotal	
Low	3(37.5%)	4	1	5(62.5%)	8(100%)
Moderate	6(28.6%)	13	2	15(71.4%)	21(100%)
High	15(44.1%)	15	4	19(55.9%)	34(100%)
Total	24(38.1%)	32	7	39(61.9%)	63(100%)

HPV : Human papillomavirus

표 8. Validity of three procedures to predict the risk of cervical cancer

Procedures	Sensitivity(%)	Specificity(%)
Detection of HPV 16 or 18 DNA	61.9	86.4
Prediction by scoring system	54.0	80.0
Combined procedures	85.7	73.2
Difference of sensitivity and specificity between each procedures by Z-test		
Procedure	Sensitivity(%)	Specificity(%)
Detection of HPV 16 or 18 DNA vs Prediction by scoring system	NS	NS
Prediction by scoring system vs Combined procedures	**	NS
Detection of HPV 16 or 18 DNA vs Combined procedures	**	**

** : P<0.01

NS : Not-significant

측점수제는 54.0%, 상기 두가지 방법 병용시에는 85.7%였다. 여기서 민감도는 자궁경부암 환자의 경우 자궁경부암이 예측된 비율이다.

각 검사간의 민감도 비교에서는 두가지 방법 병용시가 가장 의의있게 높았고(P<0.01), 인유두종 바이러스 검색과 자궁경부암 발생위험 예측점수제와는 의의있는 차이가 없었다.

특이도(specificity)는 인유두종 바이러스 검색시 86.9%, 자궁경부암 발생위험 점수제는 80.0%였고, 상기 두가지 방법 병용시에는 73.2%였다. 여기서 특이도는 정상인의 경우 정상으로 예측된 비율이다. 각 검사간의 특이도 비교시에는 인유두종 바이러스 검색이 두가지 방법 병용시보다 의의있게 높았으며(P<0.01), 인유두종 바이러스 검색과 자궁경부암 발생위험 예측점수제와는 의의있는 차이가 없었다.

2-3회 Dot blot검사 결과 인유두종 바이러스 16형

에 강한 양성을 보인 정상 여성 23례, 자궁경부 상피이형증 12례, 자궁경부암 23례를 Pst I 제한효소로 처리한 후 Southern blot을 시행한 결과, 특히 표식띠인 2.8, 1.8, 1.5, 1.1, 0.5, 0.2kb 위치에서 모두 양성 표식띠가 관찰되었으며, 자궁경부암 6례(26.1%), 자궁경부 상피이형증 2례(16.7%)에서 HPV 16 특이표식띠외의 양성표식띠가 보이는 점으로 보아 인유두종 바이러스 16형 DNA가 유전자내에 동화된 것을 관찰할 수 있었다(그림 5). 그러나 정상 여성 23례 모두에서는 동화현상이 관찰되지 않았다.

Ⅳ. 고 찰

자궁경부암의 발생인자에 대한 역학적 조사는 오래전부터 시도되어 왔으며, Terris 등은 결혼연령, 결혼상태, 초임연령, 결혼횟수, 성상대자수, 임신 및 분만횟수, 교육정도 등이 자궁경부암의 관련인자라고 보고하였고, 최형락 등은[1] 자궁경부암의 발생인자를 가지고 자궁경부암을 예측할 수 있는 점수제를 고안하여 고안된 예측점수상 6-9점은 저위험군, 10-13점은 중등도 위험군, 14-20점은 고위험군으로

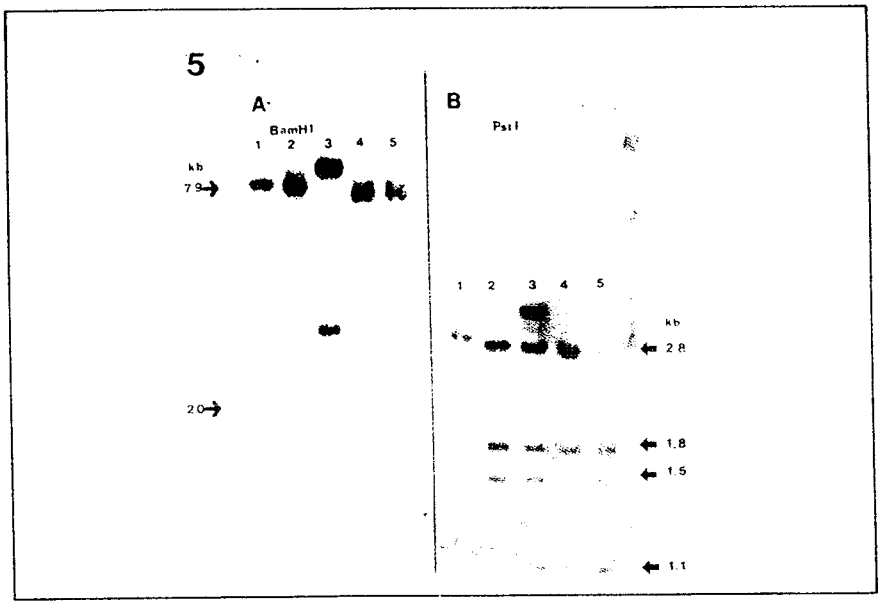

Fig. 5 Southern blot hybridization to ^{32}P-labelled HPV 16 DNA of Pst I and BamHI cleaved DNA from cervical lavage using self sampling device in normal cervix, CIN and cervical cancer.
A. ^{32}P-labelled HPV 16 DNA of BamHI cleaved DNA
B. ^{32}P-labelled HPV 16 DNA of Pst I cleaved DNA
lane 1, 2 : cervical cancer
lane 3 : integrated form of cervical cancer
lane 4 : CIN
lane 5 : normal cervical lavages
: HPV 16 specific fragment length
: Lamda DNA/Hind Ⅲ fragment length

분류하여 위험도가 높은 부인에서는 집중적인 관리가 요망된다고 하였다.

그러나 최근에는 바이러스 감염과 자궁경부암의 관계에 대한 연구가 활발하여 생식기 단순포진 바이러스(Genital herpes simplex virus type Ⅱ)와 인유두종 바이러스(Human Papillomavirus) 등이 자궁경부암의 원인바이러스로 주목되고 있다. 특히 자궁경부암의 형성과정에서 생식기 단순포진 바이러스를 "initiator"로 인유두종 바이러스를 "promoting agent"로 내세우기도 하였다[19]. 그리고 인유두종 바이러스와 단순포진 바이러스는 자궁경부암의 발생인자인 조기성교와 성교대상자가 다수인 경우에 감염빈도가 높다고 한다[20]~[22].

인유두종 바이러스 종류는 Gissmann 등[8]이 인유두종 바이러스 아형 1, 2, 3, 4를 처음 발견한 이후 현재는 57종류의 아형이 발견되었다.

Yoshikawa 등[23]은 양성 콘딜롬의 95%에서 인유두종 바이러스 아형 6과 11을 발견했고, Lorincz 등[24][25]은 자궁경부암과 전암병변에서 인유두종 바이러스 아형 16, 18, 31, 33, 35를 발견했다. 과거에는 인유두종 바이러스와 자궁경부 상피이형증 및 자궁경부암과의 관계를 규명하는데에는 제한점이 있었다. 즉 인유두종 바이러스는 바이러스 감염의 일반적인 진단방법인 혈청검사나 세포배양을 통해서는 바이러스 검출이 어려운 실정이며 간혹 전자현미경[26], 면역조직화학법 등[27]에 의해 검출하기도 했으나 민감도가 떨어지고 악성과 양성의 병변과 관계있는 인유두종 바이러스 아형을 구별할 수 없고, 숙주세포의 핵산내에 동화된 고위험 인유두종 바이러스 감염을 발견할 수 없는 단점이 있다. 최근에 핵산 DNA 재조립 기술의 발달로 순수한 DNA의 많은 양을 분리하거나 생산해 낼 수 있게 되었고, 이에는 Filter in situ, Dot blot, Southern blot 교잡법 및 중합체효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 이용하여 DNA를 증폭시킴으로써 민감도를 증가시키는 방법이 있다.

Filter in situ 교잡법은 탈락세포를 직접 사용하므로 비용이 적게들고 간단하지만 위양성이 많고 정확도가 낮다[29]. Dot blot은 세포에서 DNA를 추출하여 교잡하는 방법으로 위양성을 줄이고 집단검진이 가능하다. 그리고 Southern blot 교잡법은 가장 정확하고 예민한 방법이지만 시간과 비용이 필요하다는 어려움이 있다[29].

저자들은 질세포 자가채취 기구를 사용하여 많은 양의 질, 자궁경부 탈락세포를 군집하고 이 세포군집에서 DNA를 추출한 후에 집단검진에 용이한 Dot blot 교잡법을 시행하였고, 정확하고 예민한 Southern blot 교잡법을 병행하여 실험의 정확도를 높였다.

Schneider 등[30]은 정상 자궁경부의 세포군집에서 인유두종 바이러스 6/11형의 양성률은 14%, 16과 18형의 양성률은 25.6%였고, 자궁경부 상피이형증에서 6/11형의 양성률은 12.5%, 16과 18형의 양성률은 45.8%라고 보고하였다. 본 연구에서도 정상 자궁경부의 세포군집에서 인유두종 바이러스 6/11형의 양성률은 7.9%, 16과 18형의 양성률은 46.9%로 나타났다. 이러한 검출률의 차이는 첫째 연구대상에 따라 인유두종 바이러스 DNA의 이환율이 다르다는 것과, 둘째 자궁경부에서 세포군집을 채취하는 방법의 차이에 있다고 한다[31].

본 연구에서는 면봉이나 spatula를 사용하는 방법보다 많은 양의 세포군집을 채취하고 정확한 진단을 내리기 위하여 질세포 자가채취 기구를 사용하였다.

인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률은 지역적으로 차이가 있다. 침윤성 자궁경부암에서 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률은 파나마에서 70%[32], 영국 66%[33], 미국 56%[34], 일본 39.6%[23]였고 본 연구에서 우리나라의 침윤성 자궁경부암에서 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률은 61.9%로 나타났다.

질세포 자가채취 기구로 채취한 가검물에서 24시간 이내에 DNA를 추출하면 인유두종 바이러스 감염빈도가 증가하리라 본다. 자궁경부 상피이형증의 병리학적 등급에 따라 인유두종 바이러스 6/11, 16, 18형의 양성률을 비교해보면 경도이형증은 6/11형이 4례(30.7%), 16과 18형이 3례(23.1%)에서 양성이었고, 중등도 이형증은 6/11형이 2례(22.2%), 16과 18형은 4례(44.4%)에서 양성이었다. 중증이형증은 16과 18형이 8례(80.0%)에서 양성이었고, 6/11형은 나

타나지 않았다.

자궁경부 상피이형증중에서 조직소견의 악성화 정도가 심할수록 16과 18형의 양성률은 의의있게 증가하였고, 6/11형은 의의있게 감소하지 않았다.

Reid 등[35]도 자궁경부 상피이형증중에서 이형증이 심할수록 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률은 증가하고 6/11형의 양성률은 감소한다고 보고하였다.

자궁경부암의 임상병기에 따른 인유두종 바이러스의 양성률은 Ⅰ기 17례(68.0%), Ⅱ기 16례(59.2%), Ⅲ기 4례(50.0%), Ⅳ기 2례(66.7%)로 임상병기에 따른 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률은 뚜렷한 추세가 없었다. 실험대상군이 더 많아질수록 이 문제는 해결할 수 있으리라 본다.

저자들의 연구에서 자궁경부암 발생위험을 예측하는데의 민감도는 인유두종 바이러스 검색시 61.9%, 자궁경부암 발생위험 예측점수제는 54.0%, 상기 두가지 방법 병용시에는 85.7%로 두가지 방법을 병용할 경우에 민감도가 가장 의의있게 높았다.

특이도에서는 인유두종 바이러스 검색시 86.4%로 두가지 방법 병용시 73.2%보다 의의있게 높았으며, 인유두종 바이러스 검색과 자궁경부암 발생위험 예측점수제와는 유의한 차이가 없었다.

그러므로 자궁경부암 발생위험을 예측하고 고위험 인유두종 바이러스 16과 18형을 조기 진단하기 위하여 자궁경부암 발생위험 예측점수제와 인유두종 바이러스 검색을 동시에 시행하면 자궁경부암의 예방 및 조기치료의 가능성을 높일 것으로 사료된다.

Dot blot에서 인유두종 바이러스 16형에 강한 양상을 보인 정상 여성 23례, 자궁경부 상피이형증 12례, 자궁경부암 23례에서 Pst Ⅰ 제한효소를 사용하여 Southern blot을 시행한 결과 모두에서 인유두종 바이러스 16형의 특이 양성 표식띠(2.8, 1.8, 1.5, 1.1, 0.5, 0.2 kb)가 관찰되었다.

숙주 세포내에서 인유두종 바이러스 16형 DNA의 동화 현상은 자궁경부암 6례(26.1%), 자궁경부 상피이형증 2례(16.7%)에서 관찰되었고, 정상 여성 23례 모두에서는 관찰되지 않았다.

고위험 인유두종 바이러스 16과 18형의 DNA의 동화 현상이 자궁경부암과 밀접한 연관성을 가지고 있으며[33][36], 앞으로 더 광범위한 연구로 자궁경부암 발생에 관한 인유두종 바이러스 역할이 규명되어야 한다.

이상의 관찰로 미루어보아 환자자신 및 의사가 간편하게 가검물을 채취할 수 있고 많은 양의 질, 자궁경 세포군집을 얻을 수 있는 질세포 자가채취 기구사용과 분자생물학적기법 및 자궁경부암 발생위험 예측점수제를 병행하여 고위험군 부인에서 고위험 인유두종 바이러스 16과 18형을 조기진단하여 계속적인 추적관리를 함으로써 자궁경부암의 예방 및 조기치료의 가능성을 높여 자궁경부암으로 인한 사망률을 감소시킬 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

저자들은 자궁경부암의 발생위험성을 미리 예측할 수 있는 방법을 발견하기 위하여 가톨릭의과대학 산부인과 부인암 클리닉을 방문한 환자중 DNA가 추출된 정상 여성 280례, 자궁경부 상피이형증환자 32례, 자궁경부암 환자 63례를 대상으로 질세포 자가 채취 기구를 이용하여 다량의 자궁경부 탈락세포를 채취하고 Dot blot과 Southern blot 교잡법을 병용하여 인유두종 바이러스 6, 11, 16, 18 DNA의 양성률과 동화현상을 관찰한 후 고위험 인유두종 바이러스 16, 18형의 감염과 자궁경부암의 예측점수제에 따른 위험군과의 관계를 비교 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 자궁경부 조직소견이 악성화 정도가 심할수록 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률은 증가추세를 보였다.

2. 자궁경부 상피이형증에서 병리학적 등급에 따른 악성화 정도가 심할수록 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률은 증가추세를 보였다.

3. 자궁경부암의 임상적 병기에 따른 인유두종 바이러스 16과 18형의 양성률에는 뚜렷한 차이가 없었다.

4. 자궁경부암 발생위험을 예측하기 위한 인유두종 바이러스 16과 18형의 검색과 자궁경부암 발생위험 예측점수제 각각의 민감도에서의 차이는 상기 두 가지 방법 병용시 가장 의의있게 높았고, 인유두종 바이러스 검색과 자궁경부암 발생위험 예측점수제의 민감도는 의의있게 차이가 없었다.

각 검사간의 특이도 비교에서는 인유두종 바이러스 검색이 두가지 방법 병용시보다 의의있게 높았으며, 인유두종 바이러스 검색과 자궁경부암 발생위험 예측점수제의 특이도는 의의있는 차이가 없었다.

5. Dot blot에서 인유두종 바이러스 16형에 강한 양성을 보인 정상 여성 23례, 자궁경부 상피이형증 12례, 자궁경부암 23례에서 Pst I 제한효소를 사용하여 Southern blot을 시행한 결과 모두에서 인유두종 바이러스 16형의 특이 양성표식띠(2.8, 1.8, 1.5, 1.1, 0.5, 0.2 kb)가 관찰되었다.

숙주 세포내에서 인유두종 바이러스 16형의 DNA의 동화 현상을 자궁경부암 6례(26.1%), 자궁경부 상피이형증 2례(16.7%)에서 관찰되었고, 정상 여성 23례 모두에서는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 자궁경부암의 발생위험이 높은 고위험군 부인에서 질세포 자가채취 기구 사용과 Dot blot, Southern blot 교잡법을 병용하여 고위험 인유두종 바이러스 16과 18형을 조기진단하면, 인유두종 바이러스 감염의 조기 치료 및 추적관리에 도움을 줄 뿐만 아니라 자궁경부암의 발생위험성을 미리 예측하여 우리나라 자궁경부암의 사망률을 감소시키는데 큰 기여를 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 최형락 · 유태건 · 남궁성은 · 이헌영 · 김승조: 자궁경부암의 발생위험 예측점수. 대한산부인과학회지 1979;22:631-642
2. Zunzunegui MV, King MC & Coria CF: Mole influences in cervical cancer risk. Am J Epidemiol 1986;123:302-207
3. Elizabeth A, Nichalas L, Nina F & Dorien L: Mutagenic mucus in the cervix of smokers. J Natl Cancer Inst 1986;76:983-986
4. Ruth K, Duncan T, Donald G, Thomas M & Brian E: Risk factors for invasive cervical cancer among Latinas and non-Latinas in Los Angeles country. J Natl Cancer Inst 1980;77:1063-1077
5. Jacques B, Michel R, Michel F, Celine B & Alexandre M: Condyloma and intraepithelial neoplasia of the uterine cervix: A case-control study. Am J Epidemiol 1987;128:337-342
6. Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, Brenes M & Tenorio F: Invasive cervical cancer and smoking in Latin America. J Natl Cancer Inst 1989;81:205-211
7. Ritter DB, Kadish A, Vermund SH, Romney SL, Villari D & Burk RD: Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in exfoliated cervicovaginal cells as a predictor of cervical neoplasia in high-risk population. Am J Obstet Gynecol 1988;159:1517-1525
8. Gissmann L, Pfister H, Zur Hausen H: Human papillomavirus (HPV): Characterization of four different isolates. Virology 1977;76:569-580
9. Durst M, Croce CM & Gissmann L: Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:1070-1074
10. Sklar J: DNA hybridization in diagnostic pathology. Human Pathol 1985;16:654-656
11. Schneider A & Grubert T: Diagnosis of HPV infection by recombinant DNA technology. Clin Obstet Gynecol 1989;32:127-140
12. Miller SA, Dykes DD & Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl Acids Res USA 1988;16:1215
13. Feinberg AP & Vogestein B: Technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragment II high specific active. Anal Biochemistry 1984;137:266-267
14. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H & Zur Hausen H: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy sample from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci USA 1983;80:3812-3815
15. Southern CM: Detection of specific sequences among DNA fragment seperated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975;

98:503-517

16. Buckley CH, Butler EB & Fox H: Cervical intraepithelial neoplasia. J Clin Pathol 1982;35:1-13
17. Novak ER, Jones HW, Wentz AC, Burnett LS: Gynecology. Baltimore. p.689, The Williams & Wilkins Co. 1988
18. Terris M & Oalmann MC: Carcinoma of the cervix. An epidemiologic study. J. A. M. A. 1960;174:1847-1851
19. Zur Hausen H: Human genital cancer; Synergism between two virus infection or synergism between a virus infection and initiating events. Lancet 1982;2:1370-1372
20. Stavraky KM, Rawls WE, Donner AP & Wanklin JM: Sexual and socioeconomic factors affecting the risk of past infections with herpes simplex virus type 2. Am J Epidemiol 1983;118: 109-121
21. Donnan SPB, Wong FWS, Ho SC & Kawana T: Reproductive and sexual risk factors and human papillomavirus infection in cervical cancer among Hong Kong Chinese. Int J Epidemiol 1989;18:32-36
22. Kjaer SK, Enghalm G, Teisen C, Haugaard BJ, Lynge E & Christensen RB: Risk factors for cervical human papillomavirus and herpes simplex virus infections in Greenland and Denmark: A population-based study. Am J Epidemiol 1990; 131:669-682
23. Yoshikawa H, Matsukura T & Yoshiike K: Human papillomavirus DNA in female condylomata. Nippon Sanka Fujinka Gakkal Zasshi 1985;37:1225-1230.
24. Lorincz AT, Quinn AP, Lancaster WD & Temple GF: A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine biopsy. Virology 1987;159:187-190
25. Lorincz AT, Lancaster WD & Temple GS: Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a women with dysplasia of the uterine cervix. J Virol 1986; 159:187-190
26. Stanbridge CM, Matger J, Curry A & Butler EB: Demonstration of papillomavirus particle in cervical and vaginal scrapes material. J Clin Path 1981;34:524-531
27. Kurmann RJ, Jenson AB & Lancaster WB: Papillomavirus infection of the cervix. Relationship to intraepithelial neoplasia based on the presence of specific viral structure proteins. Am J Surg Pathol 1983;7:39-52
28. Wagner D, Ikenberg H, Boehm N & Gissmann L: Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization. Obstet Gynecol 1984; 64:167-772
29. Kautsky LA, Galloway DA & Holmes KK: Epidemiology of genital human papillomavirus infection. Epidemiol Rev 1988; 10:122-163
30. Schneider A, Sawada E, Gissmann L & Shah K: Human papillomavirus in women with a history of abnormal papanicolaou smears and in their male partners. Obstet Gynecol 1987;69:554-562
31. Vermud SH, Schiffmann MH & Goldberg GL: Molecular diagnosis of genital human papillomavirus infection: Comparison of two methods used to collect exfoliated cervical cell. Am J Obstet Gynecol 1989;160:304-308
32. Reeves WC, CAussy D & Brinton LA: Case control study of human papillomavirus and cervical cancer in Latin America. Int J Cancer 1987;40:450-454
33. Meanwell CA, Cox MF, Blackledge G & Maitland NJ: HPV 16 DNA in normal and malignant cervical epithelium: Implications for the aethiology and behaviour of cervix neoplasia. Lancet I 1987;703-707
34. Munoz N, Bosch X & Kaldor JM: Does human papillomavirus cause cervical cancer? The state of the epidemiologic evidence. Br J Cancer 1988;57:1-5
35. Reid R, Greenberg M, Jenson AB, Husain M & Willet J: Sexual transmitted papillomaviral infection: The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. Am J Obstet Gynecol 1987; 156:212-222
36. Diluca D, Pilotti S, Stefanon B & Rotola A: Human papillomavirus type 16 DNA in genital tumors; A pathological and molecular analysis. J Gen Virol 1986;67:583-589