

이성 성배우자간 인유두종 바이러스(Human Papillomavirus) 감염 경로에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실
전혜원 · 이효표

=Abstract=

Analysis of the Transmission Route of Human Papillomavirus in Heterosexual Couples

Hye Won Jeon, M.D., Hyo Pyo Lee, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine Seoul National University

Carcinoma of the uterine cervix has been considered to be a sexually transmitted disease(STD) and at present time, particullary human papillomavirus (HPV) is considered as the most likely infectious causative agents of uterine cervical cancer. But less is known about the sexual transmission of HPV and the status of HPV infection of male partner. Therefore, screenng of couples for HPV is very important for understanding HPV infection as a sexually transmitted disease and prevention of cervical carcinoma. The polymerase chain reaction(PCR) was employed to detect HPV 16 and 18 in cytological samples from the uterine cervix of the patients with cervical carcinoma(4 CIS and 34 invasive cervical carcinoma) and from urethral metatus and glans sulcus of their male consorts. The results are as follows;

1. HPV 16 or 18 were detected in 31(81.6%) of 38 patients with cervical cancer(HPV 16; 78.9%(30/38), HPV 18; 28.9%(11/38), HPV 16 and 18; 26.3%(10/38)).
2. HPV 16 was detected in 27(90.0%) of 30 males whose wives were positive for HPV 16. But HPV 18 was detected in only 3(27.3%) of 11 male consorts whose wives were positive for HPV 18. And HPV 18 was detected in all male consorts whose wives were positive for HPV 16. In addition, HPV 16 or 18 were positive in 3 of 7(42.9%) male consorts whose wives were negative for HPV 16 and 18.

Conclusively, these results suggest that HPV might be transmitted by sexual contacts in heterosexual couples.

Key words; Human papillomavirus, heterosexual couple, polymerase chain reaction, cervical cancer, sexually transmitted disease

I. 서 론

자궁경부암은 전세계적으로 여성암 중 유방암 다음으로 빈번하며, 우리나라의 경우는 여성암 중 수위의 발생 빈도를 나타내는 중요한 질환이지만¹⁾, 현

재까지 자궁경부암의 발생 원인은 정확히 밝혀져 있지 않다. 여러 역학 연구에서 자궁경부암의 위험인자로 어릴적부터 시작된 성접촉, 다수의 성배우자 및 고위험 남성배우자과의 노출 등이 알려지면 서²⁻⁶⁾, 자궁경부암 발생에 관한 가설로 성 접촉성 감염질환 모델(sexually transmitted disease model)이 가

장 널리 받아들여지고 있다.

이러한 성적 감염의 원인 미생물로서 과거 *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *cytomegalovirus*가 제시되었으나 증거를 발견할 수 없었다⁷⁾. 하지만 1976년 zur Hausen 등이 처음으로 인유두종 바이러스(Human papillomavirus; HPV)가 자궁경부암의 발생에 중요한 역할을 한다고 보고한 이후 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

현재까지 70 여종의 HPV type들이 발견되고 있는데, 이들 중 약 28종 정도가 항문 및 생식기 감염을 일으키는 것으로 보고되고 있다⁸⁾. 항문 및 생식기를 감염시키는 HPV는 두 군으로 대별할 수 있는데, 첫번째군은 양성의 유두종과 관련이 있으나 암으로의 진행은 드문 저위험군으로 HPV type 6, 11이고, 두번째군은 악성으로 진행될 가능성이 높은 병변이나 자궁경부암과 연관성이 높은 고위험군으로 HPV type 16, 18, 31, 33, 35 나 39이다⁹⁾. 현재 자궁경부암의 원인은 다인적인 것으로 사료되나, 여러 임상연구 및 분자생물학적 연구에 근거하여 볼 때 HPV는 성적으로 감염, 전파되는 인자로서 자궁경부암 발생에 관여하는 중요한 요인으로 인정되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾

HPV는 현재까지 통상적인 혈청학적 검사방법이 가능하지 않고, 시험관내 배양이 어려우므로 hybridization, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR로 약함) 등의 분자생물학적 방법이 이용되어 왔다. International Biological Study on Cervical Cancer group(IBCSC)이 시행한 한 연구에서도 전세계적으로 자궁경부암의 93%에서 HPV가 발견되며, 특히 HPV 16형은 50-60%에서 검출되고 HPV 18형이 14%에서 검출되는 등 HPV 16형이 주된 유전형으로 나타나며 비교적 흔하지 않은 HPV 유전형은 지역에 따라 분포에 차이를 보인다고 보고하였다¹³⁾. 한편 한국 여성의 자궁경부암에서도 HPV 16형이 가장 흔히 발견되는 형으로 알려져 있어 이에 대한 관심이 요구된다^{14,15)}. 여러 역학 연구들의 상반된 결과들은 HPV 검색 방법의 특이도 및 민감도의 문제 및 각 실험실마다의 실험의 재현성 부족, 역학 연구에서 환자군의 수, 대상군 설정, 역학 연구 design이 문제점으로 지적이 되고 있다. 따라서 새로운 검색법과 적절한 환자군을 이용한 역학 연구의

재평가가 절실하다 하겠다.

여성 생식기에서의 HPV의 자연사는 비교적 잘 알려져 있으나 표본 채취의 어려움 때문에 HPV의 감염경로 및 여성으로의 전파에서 남성의 역할에 대해서는 알려진 바가 별로 없다. Rotkin 등은 여성은 숙주이고, 성배우자는 검출되지 않은 전파성 인자의 매개체 역할을 한다고 제안하였다.²⁾

부인이 자궁경부암으로 사망한 남자의 두번째 부인들이 자궁경부암으로 사망할 위험이 세배나 증가한다는 보고^{3,5,6)}가 있어 자궁내 상피종양 및 자궁경부암이 남자들로부터 그들의 성배우자로 전파되는 감염인자에 기인한다고 추정되어 왔다. 또한 penile cancer를 가진 남성의 부인에서 자궁경부암이 증가하는 경향을 보였고¹⁶⁾, 자궁경부암과 밀접한 관계가 있는 HSV와 HPV는 성적 감염이 되는 virus로 분류된다.

HPV 감염을 형태학적 분류에 근거하여 여성 성생활과 관련시켜 분석한 연구에서는 condylomata가 성생활이 활발한 사람들에서 많이 발생하는 것으로 보고하고 있다¹⁷⁾. 그러나 이 연구에서 이용된 역학 연구 방법 때문에 상대 위험도나 환자군과 정상대조군 사이에 있는 의뢰 양상의 편파성이 결과 분석에 방해되는지를 판단하기엔 어렵다. 또 다른 연구는 표준적인 역학 지침에 따라 시행을 하였고, 저위험 상피내종양으로 구성된 환자군을 포함하였으며, 여성의 성적 접촉을 한 배우자 수에 따라 condylomata와 상피내종양이 발생할 상대위험도가 증가하는 것으로 보고하였지만, 첫 성교를 한 나이와 condylomata와는 상관관계가 없었다고 보고하였다¹⁸⁾. 또 다른 세 연구는 민감한 방법인 핵산교잡법을 이용하여 HPV 검색을 한 광범위 cross-sectional survey를 시행하였으나 성생활과 HPV 감염사이의 연관성을 찾지 못하였다^{10,20,21)}. 그러나 Reeves 등의 filter in situ hybridization으로 검색한 HPV 6/11, 16/18 감염과 성생활과 관련된 변수들간의 상관성을 보려는 이 연구들에서 성배우자 수와 첫 성교한 나이는 HPV 16/18의 감염 상태를 보정하여도 자궁경부암과 독립적으로 상관관계를 보였으며²¹⁾, 최근의 다른 연구에서도 이와 비슷한 결과를 보였다²²⁾. 이론적으로 성적 접촉성 질환 모형에 따르면 자궁경부암 발생 위험의 직접적 원인 인자인 HPV 감염 상태를 보정하면 성생활과 관련된 인자들의 상관성은 없어져

야 하며, 또 다른 측면에서 보면 자궁경부암의 고위험군과 저위험군간에 HPV 감염율이 차이가 있어야 한다.

Villa 등의 연구는 고위험군의 환자군에서 HPV 감염율이 높은 것을 잘 보여주고 있다²³⁾. 그러나 Kjaer 등, Acs 등의 연구를 보면 특정 지역에서는 이와 같은 양상을 보이지 않고 있다^{20,24)}. Campion 등은 penile condyloma가 있는 남자의 성배우자에 있어 자궁경부암의 위험도가 증가하며, HPV 16도 penile lesions에서 66%, 자궁경부조직에서 78% 발견되며, 성배우자의 penile HPV 감염이 여성의 성생활 패턴보다 더 자궁경부암의 발생에 큰 영향을 준다고 보고하였다²⁵⁾. 또한 Ostrow 등이 정액에서 HPV를 검출하여 성적 전파성의 가능성을 제시하였다²⁶⁾. Campion 등은 CIN III인 환자들의 성배우자들의 penile scrapes에서 FISH를 이용하여 65.2% (15/23), penile biopsy에서는 38.9%(7/18)에서 HPV DNA가 검출되었고, 이 중 HPV 16은 각각 10명, 5명씩이었다고 보고하면서 생식기 편평상피암의 발생에 있어 HPV의 reservoir로서 남성의 역할이 중요하다고 보고하였다²⁷⁾. 이후 양성 및 악성 전립선 종양의 전립선 조직에서 높은 HPV 16 검출율이 보고되어 전립선이 HPV 성적 전파의 가능한 reservoir라는 보고도 있었다²⁸⁾. 소변 및 요로 입구에서 면봉법을 이용하여 세포를 채취하여 HPV의 감염여부를 직접 알아봄으로서 성적 접촉에 의한 감염여부를 알아보고자 하는 시도들이 있어 고위험군의 성배우자에서 인유두종 바이러스의 감염빈도가 증가함이 보고되고 있으나 그 대상환자수가 적고, HPV를 검색하는 방법 및 세포를 채취하는 방법에도 차이가 있어 그 관계를 명확히 규명하기에는 부족한 실정이다²⁹⁾.

따라서 본 연구자는 자궁경부 상피내암 및 침윤성 자궁경부암 환자들과 그들의 성배우자에서 HPV 16/18의 검출율을 중합효소 연쇄반응으로 알아보고, 그 일치도를 분석하여 HPV의 감염경로를 확인하고자 하였다.

II. 연구 대상 및 연구방법

1. 연구대상 및 표본채취

1) 자궁경부 도말 표본

1992년 11월부터 1993년 6월까지 서울대학병원 산부인과를 내원한 자궁경부 상피내암 및 침윤성 자궁경부암 환자 38명의 자궁경부에서 면봉으로 외구와 내구를 수 회 돌려서 채취하여 cold PBS 1ml에 suspension 시킨 후 -20 °C에 보관하였다.

2) 성배우자의 표본 채취

대상환자의 성배우자들을 마지막 소변 후 최소 4시간이 지난 후에 요로 입구 및 glans sulcus의 세포를 면봉으로 채취하여 cold PBS 1ml에 suspension 시킨 후 -20 °C에 보관하였다.

3) 세포주

또한 HPV DNA 검색의 양성 대조군으로서는 HPV 16의 감염이 증명되어있는 CaSki 자궁경부암 세포주 및 HPV 18의 감염이 증명되어있는 HeLa 자궁경부암 세포주를 사용하였다. 세포주는 미국의 ATCC(American Tissue Culture Company)로부터 구입하고 fetal bovine serum(FBS) 10 %를 함유한 RPMI 배지에서 배양하여 사용하였다.

2. 연구방법

1) 세포주에서의 DNA 추출

동결된 세포주의 경우 액체질소통에 보관되었던 것을 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 % sodium dodecyl sulfate(SDS), 100 µg/ml proteinase K의 용액에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 용액에 phenol과 chloroform-isoamyl alcohol(24:1, vol/vol)액을 동량 넣고 잘 흔들어 부유액을 만든 다음 5분간 microfuge로 원심분리하여 상층액을 취한 후, 다시 동량의 chloroform-isoamylalcohol 용액을 가하여 부유액을 만들고 원심분리하였다. 이 용액에 50 mg/ml의 RNase A를 첨가하여 RNA를 제거한 후 phenol과 chloroform-isoamylalcohol 용액으로 처리하여 DNA를 정제하고, spectrophotometer로 260 nm과 280 nm의 비가 1.8 근처인 것을 확인하여 농도 및 순도를 결정하였다.

2) HPV DNA의 분리

HPV 재조합 plasmid를 LS/AD 배지(10 g bactotrypton, 5 g yeast extract, 10 g sodium chloride, pH 7.5 50 µg/ml ampicillin)에 OD 600=0.4까지 배양한 후 100 µg/ml로 되게 chloramphenicol을 첨가하여 12

시간 동안 plasmid를 증폭시킨 다음 plasmid를 추출하였다³⁰⁾. 얻어진 plasmid를 spectrophotometer로 확인하여 농도 및 순도를 결정하였다.

3) Oligonucleotides의 합성

Primer는 20 base pair(이하 bp라 약함)로, 증폭될 sequence의 길이는 HPV 16의 경우 120 bp, HPV 18의 경우 100 bp이고(Table 1), 탈락 자궁경부 세포 DNA의 적합성을 보기 위한 β -globin의 경우 260 bp이며 Clontech(Palo Alto, California, USA)사로부터 공급받았다. 이들 primer들은 HPV 16과 HPV 18의 E6 open reading frame³¹⁾³²⁾에서 택하는데, E6 open reading frame 유전자는 인간 자궁경부암 세포주에서 발현(expression)되어 있으며, HPV에 의한 세포의 immortalization과 transformation에 관여하는 것으로 알려져 있다.

4) PCR

100 μ l의 reaction mixture solution을 만들며, 이에 1.0 μ g의 DNA와 1.5-4.5 mM MgCl₂, HPV primer는 각기 0.25 μ M upstream PCR primer, 0.25 μ M downstream PCR primer, β -globin primer는 0.15 μ M upstream PCR primer, 0.15 μ M downstream PCR primer, 100 μ M의 각 dNTP(dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 2.5 unit Taq polymerase, 0.01 % (w/v) gelatin을 포함한다. PCR은 denaturation은 95°C에서 15초간, annealing은 56°C에서 15초간, extension은 72°C에서 1분간 시행하고 전체 30 주기를 시행하였다.

Reaction mixture solution에는 고온에서 시료의 증발을 방지하기 위하여 100 μ l의 mineral oil을 첨가하였고, 반응에는 programmable heat block(Hybrid

thermal reactor: Hybrid Ltd., U. K.)을 사용하여 내장된 프로그램에 의해 각 반응의 온도와 시간이 자동 조절되고 온도의 변화는 0.1°C내외로 하였다.

5) Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PCR이 끝난 DNA 용액중 10 μ l의 시료를 취하여 loading dye와 함께 섞은 다음 8 % polyacrylamide gel에서 20 ampere, 1 시간동안 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝난 polyacrylamide gel은 1 μ g/ml 농도의 ethidium bromide 용액에서 15 분간 염색한 후 UV transilluminator 하에서 증폭된 DNA band 유무를 관찰하고 ASA 감도 3,000의 흑백 polaroid 카메라로 염색된 gel을 촬영하여 즉시 판독하였다.(Fig. 1, Fig. 2)

6) Oligonucleotide의 DIG 3'-end-labelling

PCR로 증폭된 HPV 16과 18 DNA의 확인을 위한 DNA 소식자는 40 bp의 oligonucleotide로, 증폭된 HPV DNA sequence의 upstream primer와 downstream primer 사이의 sequence 중에서 취하였으며(Table 2), Clontech(Palo Alto, California, USA)사로부터 공급받았다. DIG oligonucleotide 3'end labelling kit(BM Biochemica)를 이용하였다. DNA 소식자는 100 pmole 농도로 맞추고 4 μ l reaction buffer solution, 4 μ l CoCl₂ solution, 1 μ l DIG-dUTP/dNTP tailing mixture(10 pmol/l), 1 μ l 50 units terminal transferase를 섞은 후 20 μ l로 volume을 조정한 후 end-labelling을 위해 37 °C에서 15 분간 한번 반응시킨 후 얼음에 보관하였다. 반응을 멈추기 위하여 1 μ l glycogen solution, 200 μ l EDTA 혼합 용액중 2 μ l을 넣었다. 다음으로는 end-labelling된 DNA 소식자의 분리를

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers for HPV 16 and HPV 18

HPV type	Sequence (5'-3')	Genomic location	Size of amplified product (bp)
HPV 16	A: TCAAAAGCCACTGTGTCCTG	E6	120
	B: ACCTTAATGAAAAACGACGA		
HPV 18	A: CGTGTCTTGTATGATCTGCA	E6	100
	B : CGTCGTTGGAGTCGTTCTCTG		
β -globin	A: GAAGAGCCAAGGACAGGTAC		260
	B: CAACCTTCATCCACGTTACCC		

Note: A: upstream primer, B: downstream primer

Fig 1. PCR analysis with HPV 16 and 18 type specific primers and β -globin primer in cervical scrape samples from females(A) and urethral and penile brushing from their male consorts(B). EtBr staining of a 8 % polyacrylamide gel.

A : cervical scrape samples from females
 B : urethral swab and penile brushing from their male consorts
 (Lane M) 123 ladder size marker
 (Lane C) CaSki cell DNA - HPV 16 positive control
 (Lane H) HeLa cell DNA - HPV 18 positive control
 (Lane N) C33A cell DNA - HPV negative control
 (Lane 1-15) sample tissues

위하여 3M NaAc(pH 5.0) 2.5 μ l과 prechilled absolute ethanol 75 μ l로 ethanol down 후 speed vac 으로 말린 후 TE buffer 100 μ l에 녹여 사용하였다.

7) DNA hybridization 및 면역학적 발색반응

PCR product에 0.3 M NaOH를 혼합하고 95 ° C에서 2분간 끓여 denaturation 시켜 형성된 single strand DNA를 slot-blotting 방법에 따라 Nylon membrane (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany)에 옮긴 후 0.4 M NaOH용액에서 DNA를 고정시켰다. 이 membrane을 2X SSC(20X SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Na₃ Citrate · 2H₂O, pH 7.0)에서 washing한 후 seal-N-save 봉지 안에 넣고 prehybridization 및 hybridization을 실시하였다.

Fig. 2. Slot blot hybridization confirming of specificity for HPV 16 and 18 DNA with non-radioisotope labelled HPV type 16 and 18 probe and then the immunological color reaction done.

A : cervical scrape samples from females
 B : urethral swab and penile brushing from their male consorts
 (Lane C) CaSki cell DNA - HPV 16 positive control
 (Lane H) HeLa cell DNA - HPV 18 positive control
 (Lane 1-10) sample tissues

Prehybridization은 5X SSC, 1%(w/v)의 blocking agent, N-laurylsarcosine 0.1 %(w/v), 0.02 % SDS(w/v) 존재 하에서 60 ° C에서 2 시간 수행하였다. 이후 prehybridization solution을 제거하고 prehybridization solution 2.5 ml, labelled probe 100 pmole/10x10 cm를 혼합한 후 60 ° C에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 membrane을 hybridization solution으로부터 조심스럽게 제거하고, 실온에서 2X SSC와 0.1 % SDS의 세척용액(washing solution)속에서 20분간 두번 세척하였다. 면역학적 검사를 이용한 발색반응은 DIG nucleic acid detection kit(BM Biochemica) 설명서대로 시행하였으며 발색반응은 20 시간 동안 시행한 후 판독하였다.

Table 2. Sequences of oligonucleotide probes for HPV 16 and HPV 18

HPV type	Sequence(5'-3')	Genomic location
HPV 16	GACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGA	461-500
HPV 18	TACCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCATTCGTGCTGCAA	493-532

8) 탈색과 DNA-DNA rehybridization

50 °C에서 dimethyl formamide 용액으로 서서히 탈색반응을 유도한 후, 37 °C에서 0.2 M NaOH/0.1 % SDS(sodium dodecyl sulfate) 용액에 30분간 probe를 없앤 후 rehybridization을 전술한 바와 같이 시행하였다.

9) HPV 유형에 따른 성배우자간의 감염 일치도에 관한 연구

대상환자 38명과 이들의 배우자의 urethral meatus 및 glans sulcus에서 swab한 표본을 중합효소 연쇄반응을 이용하여 각각에 대한 HPV DNA 검색을 하도록 함으로서, 성적감염여부를 직접적으로 확인하고 성배우자간의 감염 일치도를 알아보았다.

III. 결 과

1. 대상환자의 특성

1992년 11월부터 1993년 8월까지 서울대학교 병원 산부인과에 내원하여 수술 받은 자궁경부 상피내암 및 자궁경부암 환자 42명을 대상으로 하였다. β -globin의 증폭유무에 따라 DNA의 유용성을 판단하여, 자료분석을 한 환자의 수는 자궁경부 상피내암 4예와 침윤성 자궁경부암 34예로 총 38예이었다. 연령은 30-69세 사이로 평균연령은 44.5세이었다. 환자의 임상 병리학적 소견은 Table 3에서 보는 바와 같았다.

2. PCR을 이용한 HPV의 검출 및 DNA의 Slot-blot hybridization을 이용한 HPV 16, 18 DNA의 확인

HPV 16/18 검출의 양성대조군으로 HPV 16의 감염이 증명된 CaSki 세포주 DNA 0.1 pg과 HPV 18의 감염이 증명되어 있는 HeLa 세포주 DNA 0.1pg를 각각 넣고 중합효소 연쇄반응을 시행한 후 증폭된 DNA를 gel에 걸어 전기영동한 결과 HPV 16은 120bp 크기의 band(Fig 1, lane C)를, HPV 18은 100bp 크기의 증폭된 DNA의 band(Fig. 1, lane H)를 자외선 조명하에 관찰할 수 있었다. 음성대조군으

로는 C33A 세포주의 DNA를 이용하였는데, 여기에서는 120 bp와 100 bp의 증폭된 HPV 16, 18 DNA의 band가 모두 관찰되지 않았다(Fig. 1, lane N). 본 연구에서는 size marker는 DNA 123을 Hae III 제한효소로 처리한 것을 이용하였다(Fig. 1, lane M). Fig. 1의 lane CH는 HPV 16과 18 DNA를 동시에 중합효소 연쇄반응 시킨 경우로 120 bp의 band와 100 bp의 band가 같이 확인되었다. 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 DNA가 HPV DNA임을 알기 위해 slot blot hybridization방법에 따라 증폭된 DNA를 Nylone membrane(Boehringer Mannheim Biochemica, Germany)에 옮긴 후 HPV 16의 DIG-labelled DNA probe를 이용하여 DNA-DNA hybridization 및 발색반응을 시행한 결과, Fig. 1에서 120 bp의 band를 보인 lane C와 lane CH에 일치하여 발색반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 2, A). 한편 HPV 18의 경우 Fig. 1에서 100bp의 band를 보인 lane H와 lane CH에 일치하여 발색반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 2, B). 따라서 PCR으로 증폭된 DNA는 HPV 16, 18 DNA임을 확인할 수 있었다.

PCR을 시행하여 증폭된 DNA를 전기영동한 gel에 나타나는 band가 애매할 경우에는 이와 같이 DIG-labelled probe를 이용한 DNA-DNA hybridization 및 발색반응에서 HPV 16, 18 DNA 검출을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 PCR의 민감도로는 0.1pg의 HPV DNA를 검출할 수 있었다.

3. 자궁경부조직에서 HPV 검출율

자궁경부암 환자에서 HPV 16/18의 감염분포는 각각 78.9%(30/38), 28.9%(11/38)이었으며, HPV 16/18이 모두 음성인 환자는 18.4%(7/38)이었다. 또한 HPV 16과 18이 동시에 검출된 경우는 26.3%(10/38)이었다(Table 3).

4. 성배우자간의 HPV 감염일치도

대상환자 38예의 성배우자들에서 HPV 16의 양성율은 90.0%(27/30)(Table 4), HPV 18 양성율은 27.3%(3/11)(Table 5)으로 HPV 18이 검출된 예에서는 모두 HPV 16이 모두 검출되었다. 음성인 7예 중 성배우자의 HPV 16 혹은 HPV 18 검출율은 42.9%

Table 3. Patients Profile and PCR Detection of Human Papillomavirus Type 16 and 18 in Cytological Samples from Females with Cervical cancer

Diagnosis	No. of cases	PCR positive for		
		HPV 16	HPV 18	HPV 16 or 18
CIS	4	4(100%)	2(50%)	4(100%)
Invasive ca. (SCCA)	34	26(76.5%)	9(26.5%)	27(82.1%)
Total	38	30(78.9%)	11(28.9%)	31(81.6%)

PCR : Polymerase Chain Reaction

CIS : Carcinoma in situ

SCCA : Squamous Cell Carcinoma

HPV : Human Papillomavirus

Table 4. Correlation between PCR Detection of HPV 16 in Female Patients and Their Male consorts

Female Patients	No. of cases	Male consorts	
		HPV16(+)	HPV 16(-)
HPV 16 (+)	30	27(90.0%)	3(10.0%)
(-)	8	3(37.5%)	5(62.5%)

(Fisher's exact test : $p < 0.05$)

(3/7) 이었다. HPV 16은 성배우자간에 상관관계가 있었으나($p < 0.05$), HPV 18은 상관관계가 없었다.

IV. 고 찰

자궁경부암은 전세계적으로 여성암 중 두번째로 빈번하고, 1년에 45만명 내지 50만명이 이 질환으로 사망한다고 보고되고 있으며, 한국 여성암 중 제 1위의 발생 빈도를 나타내는 중요한 질환이지만, 현재까지 자궁경부암의 발생 원인은 정확히 밝혀져 있지 않다. 현재 자궁경부암 발생에 관한 가설로서 성적 접촉성 질환 모형(sexually transmitted disease model)이 가장 널리 받아들여지고 있으며, 이러한 성적 감염의 원인 미생물로서 최근 10년간은 HPV가 주목되어 이에 대한 연구가 주로 이루어지고 있지만, 자궁경부암의 oncogenesis에서의 HPV의 역할은 아직 잘 알려져 있지 않다.

자궁경부암의 발생 원인으로서 HPV의 가능성을 뒷받침하는 근거로서 다음과 같은 관찰들이 보고되

Table 5. Correlation between PCR Detection of HPV 18 in Female Patients and Their Male consorts

Female Patients	No. of cases	Male consorts	
		HPV 18(+)	HPV 18(-)
HPV 18 (+)	11	3(27.3%)	8(72.7%)
(-)	27	7(25.9%)	20(74.1%)

(Fisher's exact test : $p > 0.05$)

고 있다. 첫째, 가축과 토끼에서 papillomavirus는 그것이 감염된 숙주 편평상피의 악성 변형(malignant transformation)을 유발하며³³⁻³⁵, HPV DNA가 시험관 내에서 쥐의 세포를 형태학적으로 변형시키는 것으로 보고되고 있다³⁶. 둘째, 양성 자궁경부질환의 경우 HPV는 대부분 유리상태(episomal state)로 존재하나, 자궁경부암의 경우 대부분 염색체(cellular genome) 내에 융합(integration)되어 있는 것으로 알려져 있다³⁷. 셋째, HPV 6과 HPV 11이 콘딜로마 등 양성 자궁경부 병변에서 주로 발견되는 반면³⁸, 자궁경부암 및 자궁경부 상피내종양에서는 HPV 16, HPV 18이 주로 발견되며 정상대조군에 비하여 높은 빈도로 발견되는 것으로 보고되고 있다³⁹. 넷째, 전향적 역학 조사 결과 자궁경부 조직이 HPV 16 및 HPV 18에 감염된 경우 HPV 6 및 HPV 11의 경우보다 자궁경부 상피내종양 및 자궁경부암으로 발전할 가능성이 대조군보다 높은 것으로 보고되고 있다⁴⁰. 다섯째, 암유전자와 인유두종 바이러스를 동시에 숙주 세포에 삽입했을 때 정상세포가 악성세포로의 형질변환이 빠르다⁴¹. 여섯째, HPV E6, E7 단백질이 reti-

noblastoma나 p53 같은 암억제유전자의 최종산물과 결합하여 분해함으로써 억제기능을 잃는다⁴²⁾. 이상의 관찰에 근거하여 어떤 특정 type의 HPV와 자궁경부암이 관련이 있다는 일련의 증거가 있으며 HPV 6, 11은 여성생식기의 양성병변인 침윤 콘딜로마(condyloma accuminatum)에서 검출되어 자궁경부암 발생의 저위험군(low risk group)으로, HPV 16, 18, 31, 33, 35 등은 자궁경부 상피내종양(cervical intraepithelial neoplasia: CIN) 및 자궁경부암에 주로 관련되어 검출되므로 자궁경부암 발생 고위험군(high risk group)으로 분류되고 있다. 전세계적으로 HPV 16형은 침윤성 자궁경부암의 50-60%에서 검출되어 주된 유전형으로 보고되고 있으며¹³⁾, 한편 한국 여성의 자궁경부암에서도 HPV 16형이 가장 흔히 발견되는 형으로 알려져 있어 이에 대한 관심이 요구된다^{14,15)}. 이처럼 PCR을 이용한 인유두종 바이러스의 검출율에 차이가 있는 것은 지역적, 환자군 선택의 문제 등이 지적되고 있으나, 특히 검색 방법 자체의 민감성에 기인하는 것으로 믿어지고 있다.

HPV에 감염된 자궁경부 조직의 예후에 대하여는 현재로서 거의 알려진 바가 없으며 이들 보고도 일치되어 있지 못하다. Barnes 등은 Southern blot hybridization에 의하여 HPV 18 DNA를 검색하여 HPV 18 과 자궁경부암의 예후인자들과의 관계에 대해 HPV 18에 감염된 경우는 종양의 미분화도가 유의하게 높으며 나이는 적고 임파선 전이가 높은 경향을 띤다고 하였다⁴³⁾. 그러나 최근 Walker 등은 HPV 18에 감염된 자궁경부암의 경우에는 임상 병기(stage)나 종양의 분화도 등과는 관계없이 2년내 재발율이 높고 진단 이전의 자궁경부도말이 정상이었던 경우가 높아 아마도 병의 진행이 빠른 것이라고 주장하였다⁴⁴⁾. 국내에서는 이 등이 임상적으로 쉽게 얻을 수 있는 자궁경부 탈락세포를 PCR하여 자궁경부 이형증 및 대조군 환자에 있어 HPV 16, 18의 감염 빈도를 조사하고 자궁경부암 발생의 단계별 감염의 의의에 대하여 평가하여 HPV 16의 발현 빈도는 정상대조군이 19.1(13/68)%, 자궁경부 이형상피내 종양 I, II, III는 각각 38.8(19/49), 57.1(28/49), 75.9(22/29), 자궁경부암 환자군이 88.9(24/27)이었다. HPV 18의 발현빈도는 정상대조군이 4.4(3/68), 자궁경부 이형상피내 종양 I, II, III는 각각 8.2(4/49), 12.2(6/49), 13.8(4/29), 자궁경부암

환자군이 18.5(5/27)이었다.⁴⁵⁾

이상의 내용들을 요약해 보면 자궁경부암의 원인 인자로서 HPV 감염이 의심이 되기는 하나, HPV 감염과 자궁경부암 발생 고위험 인자의 상관성에 관한 역학 연구자료는 일치를 안하고 있거나 부정적이다. 여러 역학 연구들의 상반된 결과들은 HPV 검색 방법의 특이도 및 민감도의 문제 및 각 실험실마다의 실험의 재현성 부족, 역학 연구에서 환자군의 수, 대상군 설정, 역학 연구 design이 문제점으로 지적이 되고 있다. 따라서 새로운 검색법과 적절한 환자군을 이용한 역학 연구의 재평가가 절실하다 하겠다.

이에 본 연구에서는 자궁경부 상피내암 및 자궁경부암 환자 38명의 자궁경부 탈락세포에서 PCR을 이용하여 HPV 16은 78.9%(31/38)와 HPV 18은 28.9%(11/38)가 검출되었으며, HPV 16과 18이 모두 검출된 경우는 26.3%(10/38) 이었고, 이는 국내외의 이미 보고된 결과와 유사하다. 자궁경부암이 성적 접촉성 질환 모형에 따르면 그 원인 인자로 생각되는 HPV가 검출된 환자의 성배우자에서도 HPV가 검출되리라 생각되어 성배우자에서 소변 혹은 요로 입구에서 면봉법을 이용하여 세포를 채취하여 HPV의 감염여부를 직접 알아봄으로서 성적 접촉에 의한 감염여부를 알아보고자 하는 시도가 있었으며, 고위험군의 성배우자에서 인유두종 바이러스의 감염빈도가 증가함이 보고되고 있다.^{29,46)}

HPV 감염이 다른 성적 전파성 질환들처럼 성배우자로부터 직접 감염된다면 이를 screening, 치료하여 자궁경부암의 예방이 가능하리라 사료되어 이에 대한 연구가 활발히 시행되고 있다.

본 연구에서는 대상 환자의 성배우자에게서 요로 입구 및 glans sulcus에서 면봉법으로 세포를 채취하였다. 대상환자의 성배우자들에서 HPV 16은 78.9%(30/38), HPV 18은 26.3%(10/38)이 검출되었고 이들의 type 양성 일치도는 HPV 16은 90.0%(27/30), HPV 18은 27.3%(3/11)이었다. HPV 16은 높은 일치도를 보였으며, 통계적으로 유의한 상관관계가 있었지만 ($p < 0.05$), HPV 18은 통계적으로 유의하지 않았다 ($p > 0.05$). 또한 HPV 16과 18이 모두 검출되지 않은 7명에 있어도 HPV 16은 42.9%(3/7), HPV 18은 28.6%(2/7)이 검출되었으나 그 대상수가 적어 성급한 결론을 내기 어렵다고 사료된다.

Campion 등은 CIN III인 환자들의 성배우자들의 penile scrapes 에서 FISH를 이용하여 65.2% (15/23), penile biopsy에서는 38.9%(7/18)에서 HPV DNA가 검출되었고, 이 중 HPV 16은 각각 10명, 5명씩이었다고 보고하면서 생식기 편평상피암의 발생에 있어 HPV의 reservoir로서 남성의 역할이 중요하다고 보고하였다²⁷⁾. Nakazawa 등은 자궁경부암 환자 성배우자들의 소변에서 PCR을 이용하여 HPV 16, 18을 검색하여 25%(2/8)만이 같은 type의 HPV가 검출되었고, HPV 음성인 환자의 성배우자 중 한 명만이 HPV 양성을 보였다고 보고하였으며²⁹⁾, 1992년에는 HPV 16 양성인 여성(6 정상경부조직, 3 CIN, 3 자궁경부암) 12명의 성배우자의 정액에서 4예에서 양성을 보였으며 HPV음성인 환자의 성배우자에서는 한 명도 HPV DNA를 검출할 수 없었다고 보고하였다⁴⁷⁾. 그러나 정액에서의 HPV 검출은 spermatozoon과 직접 관련된 것보다 요로의 표피 세포가 떨어져 나와 검출된 것으로 설명하고 있으며 이는 남성의 소변에서 HPV 검출도 설명하고 있다⁴⁸⁾. van Doornum 등은 다수의 성배우자를 가진 남성 65명, 여성 111명을 대상으로 PCR를 사용하여 HPV type 6/11, 16, 18 과 33 DNA를 검출하였다⁴⁹⁾. 남성 distal urethral의 17%, 여성 자궁경부조직의 14%에서 HPV DNA가 검출되었고, 양성에서 모두 높은 잠복 감염을 보였으며(남성 72%, 여성 80%), 남성의 요로 입구가 잠복 감염의 중요 장소로 여성의 자궁경부암의 원인 인자의 성적 전파에서의 남성인자의 중요성을 보고하였다. 동시에 항문 점막에 HPV 음성인 환자들에서 직장점막에서 HPV DNA가 검출됨을 보고하며 비성적 전파성(non-sexual transmission)의 가능성도 제시하였다. 한편 Sexual Transmitted Disease Clinic을 방문한 환자들을 대상으로 HPV type에 따른 성배우자간의 일치도를 조사한 경우 24쌍 중 67%(by PCR)-82%(by dot blot hybridization)이었다고 보고하였다. 이 연구에서는 penile brushing과 urethral swab을 이용하였었다.

이처럼 대상환자수와 세포 채취 방법에 따라 일치도에 차이가 있음을 알수 있었고, 소변보다 직접 penile and urethral swab한 경우 높은 일치도를 보였다.

이에 정상대조군이나 비교적 성적 감염이 있다고 생각되는 HPV 6/11과의 비교연구가 필요하리라 생

각된다.

또한 HPV의 감염이 남성 성배우자로부터 여성에게 감염된다면 이를 미리 screening, 치료하여 자궁경부암의 발생을 감소시키고, 나아가 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구자는 1992년 12월부터 1993년 6월까지 서울대학교 병원 산부인과를 내원한 자궁경부 상피내암 및 자궁경부암 환자 38명과 그들의 성배우자를 대상으로 기존의 방법보다 민감한 중합효소 연쇄반응을 이용하여 자궁경부조직 탈락세포와 성배우자의 요도입구 및 glans sulcus에서 채취한 세포에서 HPV 16, 18의 DNA를 검출하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대상환자에서 HPV 16/18의 감염분포는 각각 78.9%(30/38), 28.9%(11/38)이었으며, HPV 16/18이 모두 음성인 환자는 18.4%(7/38)이었다. 또한 HPV 16과 18이 동시에 검출된 경우는 26.3%(10/38)이었다.
2. 대상환자 38예의 성배우자들에서 HPV 16/18의 검출율은 78.9%(30/38)이었으며 각 type 별 일치도는 HPV 16은 90.0%(27/30), HPV 18은 27.3%으로 HPV 18이 검출된 예에서는 모두 HPV 16이 모두 검출되었다. 음성인 7예 중 성배우자의 HPV 16 혹은 HPV 18 검출율은 42.9%(3/7)이었다. HPV 16은 성배우자간에 상관관계가 있었으나 ($p<0.05$), HPV 18은 상관관계가 없었다.

이상의 결과로 보아 민감한 PCR을 이용한 본 연구의 HPV 16, 18의 검출율이 기존의 다른 분자생물학적 방법에 의한 기왕의 검출율보다 높아 기존의 hybridization 방법에 의해 HPV DNA 검출한 data를 이용한 연구들을 재평가해야 할 필요성이 있다. 둘째, 성배우자에서 세포 채취시 소변보다는 직접 성기에서 세포를 얻는 것이 더 높은 검출율을 보였다. 셋째, HPV 양성인 경우 성배우간에 HPV 감염 일치도는 88.9%로 비교적 일치하며 특히 HPV 16인 경우 높은 일치도를 보여 HPV의 감염 경로로서 성적 전파의 가능성을 제시하고있다. 그러나 HPV 음성인 환자에서도 성배우자에서 높은 HPV 양성률을

보여 정상대조군이나 비교적 성적 감염이 있다고 생각되는 HPV 6/11과의 비교연구가 필요하리라 사료된다.

-참고문헌-

1. 보건사회부. 한국인 암등록 조사자료 분석보고서 (1982.7.1-1987.6.30). 대한암학회지. 1989, 21:151-216.
2. Rotkin DA Comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res.* 1973, 33:1353-67.
3. Kessler II. Venereal factors in human cervical cancer. *Cancer.* 1977;39:1912-19
4. Harris WC, Brinton A, Cowdell RH, et al. Characteristics of women with dysplasia or carcinoma in situ of the uterine cervix. *Br J Cancer.* 1980;42:359-61
5. Buckley JD, Doll R, Harris RWC, et al. Case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix. *Lancet.* 1981, ii:1010-5.
6. Zunzunegui MV, King MC, Coria CF. Male influences in cervical risk. *Am J Epidemiol.* 1986, 123:302.
7. Larsem PM, Vetner M, Hansen K, Fey SJ. Future trends in cervical cancer. *Cancer Lett.* 1988, 41:123-37.
8. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. : Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms (see comment citation in Medline). *J. Infect Dis* 1994; 170:1077-85.
9. 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. *Obstet Gynecol* 1992; 79:328-7.
10. Reeves WC, Brinton LA, Garcia M, et al. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Engl J Med.* 1989, 320:1437-41.
11. zur Hausen. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 1989;49:4677-81.
12. Munoz N, Bosch FX, De Sanjose S, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer.* 1992;52:743-9.
13. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer : a worldwide perspective. *J Natl Can Ins.* 1995;87:796-802.
14. Park JS, Chee YH, Namkoong SE, et al. Human papillomavirus detection in cervical carcinoma tissues and paraaortic lymph nodes by polymerase chain reaction. *Gynecol Oncol.* 1994;553:344-51.
15. 김승철, 이효표. 자궁경부암에서 human papillomavirus type 16/18의 검출 및 human papillomavirus E6 유전자의 발현에 관한 연구. *대한산부회지.* 1995; 38:656-84.
16. Martinez I. Relationship of squamous cell carcinoma of cervix uteri to squamous cell carcinoma of the penis among Puer torican women married to men with penile carcinoma. *Cancer* 1969;24:777-80.
17. Syrjanen K, Varynen M, Castren O, Yliskoski M, Manttyjarvi R, Pyrhonen S, Saarikoski S. Sexual behavior of women with human papillomavirus(HPV) lesions of the uterine cervix. *Br J Vener Dis.* 1984, 60:243-8.
18. Brisson J, Roy M, Fortier M, Bouchard C, Meisels A. Condyloma and intraepithelial neoplasia of the uterine cervix: a case control study. *Am J Epidemiol.* 1987, 128:337-42.
19. Villa LL, Franco EL. Epidemiologic correlates of cervical neoplasia and risk of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil. *J Natl Cancer Inst.* 1989, 81:332-40.
20. Kjaer SK, Engholm G, Teisen C, Haugaard BJ, Lyng E, et al. Risk factors for cervical human papillomavirus and herpes simplex virus infections in Greenland and Denmark: a population-based study. *Am J Epidemiol.* 1990, 131:669-82.
21. Reeves WC, Brinton LA, Garcia M, Brenes MM, Guerrero R et al. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Engl J Med* 1989, 320:1437-41.
22. Donnan SPB, Wong FWS, Ho SC et al. Reproductive and sexual risk factors and human papilloma virus infection in cervical cancer among Hong Kong Chinese. *Int J Epidemiol.* 1989, 18:32-6.
23. Kjaer SK, de Villiers EM, Haugaard BJ, et al. Human papillomavirus, herpes simplex virus and cervical cancer incidence in Greenland and Denmark. A population-based cross-sectional study. *Int J Cancer.* 1988, 41: 518-24.
24. Acs J, Hildesheim A, Reeves WC et al. Regional distribution of human papillomavirus DNA and other risk factors for invasive cervical cancer in Panama. *Cancer Res.* 1989, 49:5725-9.
25. Campion MJ, McCance DJ, Cuzick J, et al. Progressive potential of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic, and virological study. *Lancet.* 1986, 8501:237-40.
26. Ostrow RS, Manias DA, Clark BA, et al. Detection of

- human papillomavirus DNA in invasive carcinomas of the cervix by in situ hybridization. *Cancer Res.* 1987, 47:649-53.
27. Campion MJ, McCance DJ, Singer A, et al. Subclinical penile human papillomavirus infection and dysplasia in consorts of women with cervical neoplasia. *Genitouron Med.* 1988, 64:90-9
 28. McNicol PJ and Dodd JG. High prevalence of human papillomavirus in prostate tissues. *J Urol.* 1991;145:850.
 29. Nakazawa A, Inoue M, Fujita M, et al. Detection of human papillomavirus type 16 in sexual partners of patients having cervical cancer by polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res.* 1991, 82:1187-1190
 30. Birnboim HC and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;24:1513-23.
 31. Seedorf KC, Krammer M, Durst S, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology.* 1985, 145-81.
 32. Cole ST, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. *J Mol Biol.* 1987, 193:599-608.
 33. Kreider JW, Bartlett GL. The Shope papilloma-carcinoma complex of rabbits: A model system of neoplastic progression and spontaneous regression. *Adv Cancer Res.* 1981, 35:81-109.
 34. Lancaster WD, Olson J. Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev.* 1982, 46:191-207.
 35. Campo MS, Jarrett WFH. Papillomavirus infection in cattle: Viral and chemical cofactors in naturally occurring and experimentally induced tumors. *Ciba Found Symp.* 1986;120:117-35.
 36. Kafatos FC, Jones CW, Estratiadis A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentration by a dot blot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res.* 1979;7:1541
 37. Lehn H, Krieg P, Sauer G. Papillomavirus genomes in human cervical tumors: Analysis of their transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82:5540-4
 38. Gissmann L, Diehl V, zur Hausen H. Molecular cloning and characteristics of human papillomavirus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virology.* 1982, 44:393-400.
 39. Lorincz AT, Lancaster WD, Kurman RJ, et al. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol.* 1986, 58:225-9.
 40. Schneider A, Schuhmann R, de Villiers EM, et al. Klinische Bedeutung von human Papilloma-Virus-(HPV)-Infektionen im unteren Genitaltrakt. *Geburtsch Frauenheill.* 1986, 6:261-6.
 41. Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J.* 1987, 6:3635-40
 42. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990, 248:76-9.
 43. Barnes WG, Delgado RJ, Kurman ES, et al. Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 1988, 29:267-73.
 44. Walker J, Bloss JD, Liao SY, et al. Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1989;74:781.
 45. 이효표, 백승규, 송용상 등. 정상 자궁경부, 이형상피증 및 암에서 탈락 자궁경부세포의 중합효소 연쇄반응을 이용한 고위험 인유두종 바이러스 16, 18 의 검색. 대한 암학회 추계 학술 대회지. 1992.
 46. 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. *Obstet Gynecol* 1992; 79:328-7.
 47. Nakazawa A, Inoue M, Fujita M, et al. Human papillomavirus type 16 in semen of partners of women with HPV infection. *Lancet.* 1992, 339:1114-5
 48. Melchers WJ, Schiff R, Stoltz E, et al. Human papillomavirus detection in urine samples from male patients by the use of PCR. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1711-14.
 49. von Doornum GJJ, Hooykaas C, Juffermans LHJ, et al. Prevalence of human papillomavirus infections among heterosexual men and women with multiple sexual partners. *J Med Virol.* 1992, 37:13-21