

자궁경부 세포진 검사상 미확정 비정형 편평세포를 보인 환자에서 HPV DNA chip 검사의 유용성

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과¹, 고려대학교 의과대학 안산병원 산부인과²
이원식¹ · 박종택¹ · 이기현¹ · 성석주¹ · 정소은² · 이낙우² · 이규원²

목적 : 자궁경부 세포진 검사상 ASC-US로 밝혀진 환자들에서 최근 개발된 HPV DNA chip 검사법을 이용하여 HPV type을 알아보고 조직학적 검사 결과를 비교하여 미확정 비정형 편평상피세포(Atypical squamous cell of undetermined significance) 환자들의 처치에 있어서 HPV DNA chip의 유용성을 확인하고자 하였다.

연구 방법 : 2004년 7월 1일부터 10월 30일까지 삼성제일병원 산부인과에 직접 내원한 환자 중 자궁경부 세포진 검사에서 ASC-US 결과를 보인 131명의 환자들을 대상으로 하였다. 모든 환자는 HPV DNA chip (My HPV DNA chip[®]) 검사와 질 확대경 검사 및 생검을 시행하였으며, 질 확대경 검사 및 생검에서 CIN II 이상의 소견을 보인 경우 원추절제술을 시행하여 조직학적 진단 결과를 확인하였다. HPV subtype 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68을 고위험군으로 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 70을 저위험군으로 하여 각각의 HPV 아형의 감염여부를 판정하였다.

결과 : 고위험 HPV DNA 양성을 보인 고위험 양성군은 51.1% (67/131)를 나타냈다. 조직검사 결과 CIN II, CIN III, CIS로 밝혀진 환자가 총 12명으로 자궁경부 세포진 검사의 위음성률은 9.2% (12/131)이었다. HPV DNA 고위험군 양성군으로 분류된 67명의 환자들의 조직검사 결과는 정상이 31명(46.3%), 편평콘딜로마가 15명(22.4%), CIN I이 11명(16.4%), CIN II가 5명(7.5%), CIN III가 3명(4.5%), CIS가 2명(3.0%)이었으며, 고위험군 HPV DNA 양성인 경우 다른 경우 보다 더 고위험 병변군이 많이 발생하는 경향을 보였다. 고위험 HPV DNA 양성인 경우 고위험 병변군을 구분해 낼 수 있는 민감도는 83.33%, 특이도는 52.10%로 나타났으며 통계적으로 유의한 결과를 나타냈다($p=0.0416$).

결론 : ASC-US의 자궁경부 세포진 검사 결과를 보인 환자들의 처치에 있어서 HPV DNA chip을 이용한 고위험 HPV DNA의 검출은 CIN II 이상의 고위험 병변군을 예측하고 진단하는데 도움이 되며 고위험 HPV DNA 검사를 병행시행하여 고위험군을 선별적으로 조직검사를 시행하는 것이 불필요한 검사를 줄임과 동시에 CIN II 이상의 고위험 병변을 빨리 발견하여 치료하는 데 유용하다 할 것이다.

중심단어 : 미확정 비정형 편평세포(ASC-US), HPV DNA chip 검사, 자궁경부

서 론

자궁경부암은 전 세계적으로 두 번째로 가장 흔한 여성암이며, 한국에서는 유방암, 위암과 대장암에 이어 네 번째로 많이 발생하는 암으로 매년 약 5,000명 정도의 신환이 발생하고 그 발병률은 인구 100,000명당 15.3명

으로 보고되고 있다.^{1,2}

초기 자궁경부암(cervical cancer)과 전암성 병변(pre-cancerous lesion)을 선별하는 선별검사로서 자궁경부 세포진 검사(Papanicolaou smear)는 1943년 Papanicolaou 등에 의해 자궁경부암의 진단에 이용된 이래 시행의 편리성, 저비용 등의 장점으로 선별검사로 가장 널리 사용되고 있다.³ 하지만 자궁경부 세포의 채취, 고정과 판독과정에서 생기는 오류로 인해 6-55%의 높은 위음성률(false-negative rate)이 문제로 제기되었다.⁴

세포진 검사의 위음성률을 줄이고 표준화시키기 위해 1998년 미국의 국립암연구소(NCI)에서 the Bethesda sys-

논문접수일 : 2005년 10월 25일

교신저자 : 이낙우, 425-707 경기도 안산시 단원구 고잔동 516

고려대학교 안산병원 산부인과

전화 : (031) 412-5978 · 전송 : (031) 412-5067

E-mail : nwlee@korea.ac.kr

tem (TBS)을 제정하였는데 이는 자궁경부의 편평상피세포내 증양(cervical intraepithelial lesion; CIN)을 미확정 비정형 편평상피세포(atypical squamous cell of undetermined significance; ASCUS), 저등급편평상피내 병변(low-grade squamous intraepithelial lesion; LSIL), 그리고 고등급편평상피내 병변(high-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL)으로 나누었고, 2001년 3차로 개정된 TBS에서 미확정 비정형 편평세포를 다시 비정형 편평세포(atypical squamous cell; ASC)란 용어로 사용하기로 하였고 이를 세분하여 ASC-US (atypical squamous cell of undetermined significance)와 ASC-H (atypical squamous cell, cannot exclude HSIL)로 분류하였다. 비정형 편평세포는 관찰되는 세포가 반응성(reactive) 또는 재생성(reparative)변화보다는 그 정도가 나쁘지만 편평상피내 병변(SIL)으로 진단하기에는 미흡한 것으로 정의되고 있으며 일부에서 고위험 자궁경부 병변으로 판명될 수 있기 때문에 그 진단과 치료 방법에 많은 논란이 있어왔다. ASC-US의 경우에는 자궁경부의 병변이 임상적인 의미가 없는 경우가 많기 때문에 정기적인 세포진 검사를 반복하도록 권유하는 것이 일반적이나 일부에서는 CIN II, CIN III 또는 침윤암(invasive cervical cancer) 등으로 판명될 수 있기 때문에 반복적인 세포진 검사만으로는 충분하지 않으며 질확대경검사 및 자궁경부의 조직검사가 함께 시행되는 것이 더욱 합당하다고 할 수도 있으나 질확대경 검사를 모든 ASC-US 환자에게 시행하는 것은 비용이 과다하고 비효율적인 점이 문제점으로 지적되고 있다.

자궁경부암의 위험인자로써 성적 배우자의 숫자, 조기 성경험, 흡연, 감염 등이 제시되고 있다. 근래에는 분자생물학적 기술을 이용한 여러 연구에서 자궁경부암 발생에 있어 인유두종바이러스(Human Papillomavirus; HPV)에 의한 감염이 핵심적인 역할을 한다는 사실이 입증되었다.⁵

HPV는 양성종양의 일종인 유두종을 일으키는 저위험군과 상피암종을 일으키는 고위험군의 2개의 소군으로 나뉜다. 현재까지 85종에 달하는 유전형(genotype)의 염기서열이 완전히 밝혀졌으며 이들 중 13여 아형이 자궁경부 증양 발생과 관련이 있는 것으로 알려졌다.^{6,7} HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -58, -59과 -68은 중증의 자궁경부 이형성과 자궁경부암에서 발견

되어 고위험군으로 분류되고 반면 HPV-6, -11, -40, -42, -43과 -44은 저위험군으로 분류되었다.^{7,8}

HPV의 감염은 대부분의 자궁경부 편평상피내 병변의 주된 원인으로 자궁경부암의 중요한 원인으로 생각되며, 편평상피내 병변이 진행될수록 고위험 HPV의 양성률은 증가하는 것으로 알려져 있어 자궁경부 편평상피내 병변과 자궁경부암의 진단과 치료에 HPV검사가 유용하다고 판단된다. HPV DNA를 검사하는 방법으로 HPV DNA hybrid capture II system이 현재 미국식품의약국으로부터 공인된 상태로 이 방법을 이용한 HPV검사의 유용성에 관한 연구가 보고되어 왔다. 이 방법은 정량검사가 가능하다는 장점이 있으나 아형을 알 수 없다는 점이 제한점으로 생각된다. 최근에 개발된 HPV DNA chip 검사는 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 매우 높은 민감도로 HPV 감염을 확인할 수 있고 각각의 아형(type)과 중복감염(multiple infection)도 구분할 수 있는 유용한 검사로 알려져 있으나 이에 관한 국내의 연구 결과는 아직 미진한 실정이다. 이에 본 연구에서는 자궁경부 세포진 검사상 ASC-US로 밝혀진 환자들에서 최근 개발된 HPV DNA chip 검사법을 이용하여 HPV type을 알아보고 조직학적 검사 결과를 비교하여 논란이 되고 ASC-US 환자들의 치료에 있어서 HPV DNA chip검사의 유용성을 확인하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

2004년 7월 1일부터 10월 30일까지 삼성제일병원 산부인과에 직접 내원한 환자 중 자궁경부 세포진 검사에서 미확정 비정형 편평상피세포(ASC-US)의 결과를 보인 131명의 환자들을 대상으로 하였다. 모든 환자에서 HPV DNA chip (My HPV DNA chip[®]) test를 시행하여 HPV 감염여부를 검사하였다. 또한 이들 모든 환자에서 질 확대경 검사 및 생검을 시행하였으며, 질 확대경 검사 및 생검에서 CIN II 이상의 소견을 보인 경우 원추절제술(Leep conization 포함)을 시행하여 조직학적 진단 결과를 확인하였다. 자궁경부 세포진 검사는 cytobrush와 spatula를 이용하였으며 본원에서 시행한 검사 결과를 기준으로 하였다. 자궁경부 세포진 검사와 HPV 검사는 동시에 시행하였고, 조직학적 검사와의 시행 간격은

최대 1개월을 넘지 않았다.

2. HPV DNA chip 검사

HPV DNA chip 검사를 위하여 cytobrush를 이용하여 자궁경부 세포를 채취하였다. HPV oligonucleotide micro-assay test는 My HPV DNA chip[®] kit를 사용하였다. 이 검사를 통하여 고위험 HPV 아형인 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68과 저위험 HPV 아형인 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 70의 감염여부를 판정하였다.

1) 채취된 자궁경부 세포로부터 DNA 정제

인유두종바이러스의 DNA 정제는 My HPV chip[®] kit에 들어있는 추출용액을 사용하였다. 채취한 검체에 xylene 1 ml를 넣고 섭씨 50°C에서 15분 반응시켜 3,000 rpm에서 1분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하였다. 이러한 과정을 1회 반복 후에 100% ethanol 1 ml를 넣고 실온에 15분 방치한 뒤 3,000 rpm에 1분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 건조시켰다. 침전물에 DNA 추출액을 전도 혼합한 후 침전물과 혼합하고 95-100°C에서 20분간 가열하고 실온에서 5분간 방치하여 14,000 rpm에 5분간 원심 분리시켜서 분리된 상층액 100.0µl을 PCR (Polymerase Chain Reaction)에 사용하거나 사용 시까지 냉장고에 보관하였다.

2) 인유두종바이러스 DNA 증폭

PCR amplification은 Nested PCR 방법을 사용하였다. 인유두종바이러스의 진단을 위해 사용한 primer는 MY09/MY11 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'/5'-GCMCA GGGWCATAAAYAATGG-3')와 GP5+/GP6+(5'-TTTGTT A CTGTGGTAGATACTAC-3/5'-Cy3-GAAAAATAAACT GTAAATCATATTC-3')의 두 가지였고 control로서β-globin primer (5'-Cy3-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'/ 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3')를 사용하였다.

검체를 0.6 ml PCR tube에 50µl씩 넣어 PCR 시행 전에 99°C에서 10분, 4°C에서 10분간 방치하여 Pre-denaturation하였다. 10×buffer (100 mM-KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.0 mM MgCl₂) 5µl, 2.5 mM dNTP 4µl, Taq polymerase (5 units) 0.5µl, 10 pmol MY09/MY11 primer 각 1.0µl, template DNA 5µl를 포함하여 50µl가 되게 하였다. 준비된 검체를 95°C에서 50초, 55°C에서 20초,

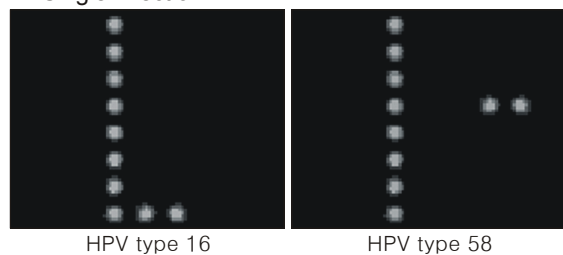
그리고 72°C에서 30초씩 40회를 시행하였다(9700, Applied Biosystems).

두 번째 PCR을 위하여 DNA template 5µl와 10× buffer 5.0µl, 10 pmol GP5+/GP6+primer 각 1.0µl, 2.5 mM dNTP 4.0µl, Taq polymerase (5 units), 10 pmol GP5 +/GP6+ primer 각 1.0µl를 포함하여 총 50µl가 되게 하였다. DNA 증폭은 94°C에서 50초, 55°C에서 20초, 그리고 72°C에서 20초씩 30회를 시행하였다(9,700, Applied Biosystems). PCR 증폭이 끝난 후 각 PCR 생성물은 2.5% agarose gel에 5.0µl를 전기영동하고 image analysis를 시행하였다(Multimage, BioRad).

3) Hybridization

42°C에서 5분간 HPV chip을 warming하고 두 번째 PCR 생성물 5.0µl를 95°C에서 5분, 4°C에서 5분간 반응시킨 후 Hybridization buffer (5×SSC, 0.1% BSA, 0.1% SDS) 35µl로 재혼합하였다. Hybridization buffer와 혼합된 PCR 생성물을 각 well당 1 검체 씩 공기가 들어가지 않도록 조심스럽게 주입하고 well을 sealing tape로 밀봉하여 증발을 방지한 후 42°C 항온 Oven에서 4시간 동안 hybridization하였다. 반응되지 않은 물질을 제거하기 위해 세척 완충액 A (2×SSC)로 5분씩 2회, 세척 완충액 B (0.2×SSC)로 5분씩 2회, 세척 완충액 C (0.1×SSC)에서 5분간 1회 세척하고 실온에 방치하여 습기를 제거하였다.

A. Single infection



B. Multiple infection

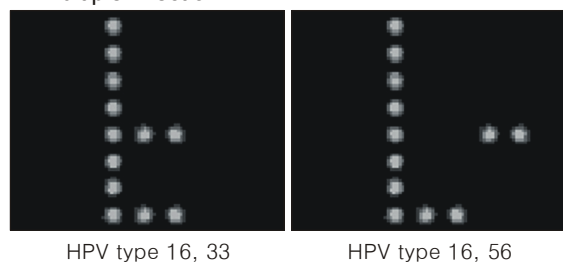


Fig. 1. Results of HPV DNA Chip test.

4) Chip Scanning

Hybridization이 끝난 chip slide는 Chip scanner로 각각의 probe에 결합되었는지를 확인하여 인유두종바이러스 유전자형을 결정하였다(Scanarray4000, GSI Lumonics) (Fig. 1).

3. 연구결과의 분석

131명 환자의 의무기록을 후향적으로 분석하여 나이, 결혼여부, 폐경여부, 자궁경부 세포진 검사, HPV 검사, 질확대경 조준하생검이나 원추절제술을 통한 조직학적 진단결과 등을 분석하였으며 질확대경 조직검사보다 원추절제술에서 더 진행된 병변이 나왔을 경우에는 원추절제술의 결과에 따랐고, 조직학적 진단결과 적극적인 치료보다는 추적관찰을 할 수 있는 저위험병변군(normal or reactive, flat condyloma, CIN I)과 적극적인 검사와 치료가 필요한 고위험병변군(CIN II, CIN III, CIS)으로 나누었다.

HPV DNA chip test 결과에 따라 고위험군양성군과 저위험군양성군으로 나누었는데, 고위험군양성군의 경우 고위험군 단독감염, 고위험군과 고위험군의 중복감염 그리고 고위험군과 저위험군의 중복감염으로 정의하였고, 저위험군양성군은 저위험군 단독감염과 저위험군과 저위험군의 중복감염으로 정의하였다. HPV DNA type의 빈도는 중복감염의 경우 각각의 HPV DNA type을 포함시켜 빈도분석을 시행하였다.

연구결과의 통계학적 분석으로는 SPSS 12.0 for windows를 이용하여 χ^2 test를 실시하였고 p-value가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로

간주하였다.

결 과

대상 환자의 평균연령은 39.65세(24-66세)였으며, 13명은 미혼, 5명은 이혼이나 사별로 배우자가 없는 상태였고 113명은 배우자가 있었다. 분만력이 없는 경우가 30명, 1회 분만력이 18명이었고 2회 분만력이 62명으로 가장 많았고 3회가 19명, 4회 이상이 2명이었다. 분만 방법으로는 질식분만이 102명으로 가장 많았으며, 제왕절개가 19명, 제왕절개와 자연분만이 혼재된 경우가 10명이었다. 12명의 여성은 폐경 상태였으며, 나머지 119명은 폐경이전이었다. 피임방법으로는 난관결찰이 18명, 정관결찰이 13명, 콘돔이 8명이었고, 자궁내장치 8명, 피임을 하지 않는 경우가 82명, 경구피임법이 2명이었다.

HPV DNA type의 빈도를 보면 HPV DNA가 총 86회 확인되었으며 그 중 HPV-16의 빈도가 13회(15.1%)로 가장 높았으며 다음으로 HPV-58이 11회(12.8%), HPV-56이 9회(10.5%), HPV-18이 8회(9.3%), HPV-39이 6회(7.0%), HPV-52가 6회(7.0%)의 순으로 나타났으며, 이를 조직검사 결과별로 분류해 보면 Table 1과 같다(Fig. 2, Table 1).

HPV DNA chip 결과 음성을 나타낸 경우가 58명으로 전체의 44.3%를 차지했으며, 양성을 나타낸 경우는 73명으로 55.7%이었다. HPV DNA chip 결과 양성인 경우 HPV type에 따른 위험도에 따라 분류해보면 저위험군양성군은 6명으로 8.2%, 고위험군양성군은 67명으로 91.8%를 나타냈고, 고위험 HPV DNA 양성을 보인 고위험양성군은 전체적으로 51.1% (67/131)를 나타내었다 (Table 2). 단독감염인 경우는 60명으로 82.2%, 이중감염

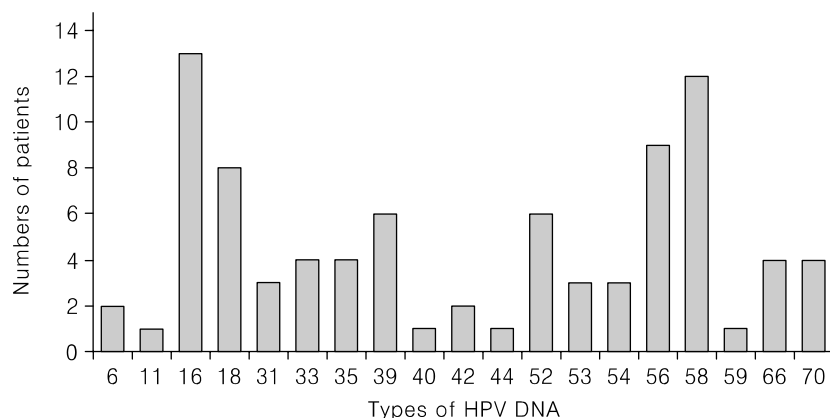


Fig. 2. Numbers of patients infected with individual human papilloma virus (HPV) types. Each type included single and multiple infection. HPV-16 was the most prevalent type in HPV-infected women followed by HPV-58, HPV-56, and HPV-18.

Table 1. Distribution of types of HPV DNA according to cervical histology

Lesion	HPV* positive														HPV Total
	16	58	56	18	39	52	66	33	35	31	53	54	59	L-HPV [†]	
Normal	6	4	5	2	3	4	1	2	3	1	1	2		5	39
Flat condyloma	1	2	3	2	2	2	2			1	1	1		4	21
CIN [‡] I	2	2	1	2	1		1	1		1	1			1	13
CIN II	2	2							1	1					6
CIN III		1						1	1				1		4
CIS [§]	2													1	3
Total (%)	13 (15.1)	11 (12.8)	9 (10.5)	8 (9.3)	6 (7.0)	6 (7.0)	4 (4.7)	4 (4.7)	4 (4.7)	3 (3.5)	3 (3.5)	3 (3.5)	1 (1.2)	11 (12.8)	86 (100)

*Human papillomavirus, [†] Low risk strain of human papillomavirus, [‡] Cervical intraepithelial neoplasia, [§] Carcinoma in situ of cervix

Table 2. Comparison of histologic diagnoses and results of HPV DNA chip test

	Normal or reactive	Flat condyloma	CIN I	CIN II	CIN III	CIS	Total
N-HPV*	53 (91.4%)	4 (6.9%)	–	–	1 (1.7%)	–	58 (100%)
L-HPV [†]	2 (33.3%)	3 (50.5%)	–	–	–	1 (16.7%)	6 (100%)
H-HPV [‡]	31 (46.3%)	15 (22.4%)	11 (16.4%)	5 (7.5%)	3 (4.5%)	2 (3.0%)	67 (100%)
Total	86 (65.6%)	22 (16.8%)	11 (8.4%)	5 (3.8%)	4 (3.1%)	3 (2.3%)	131 (100%)

*Atypical squamous cell undetermined significance, negative for human papillomavirus, [†] Atypical squamous cell undetermined significance, positive for low grade strains of human papillomavirus, [‡] Atypical squamous cell undetermined significance, positive for high grade strains of human papillomavirus

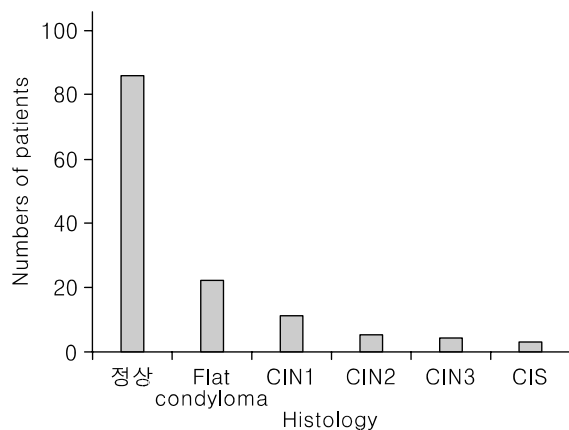


Fig. 3. The numbers of patients according to the histologic results.

인 경우는 13명으로 17.8%를 차지했으며, 삼중감염 이상의 중복감염은 보이지 않았다. 이중감염의 경우에 고위험군+고위험군(7명) 또는 고위험군+저위험군(6명)의 조합으로 나타났으며 저위험군+저위험군의 조합은 나타나지 않았다.

조직검사 결과는 정상이 86명(65.6%), 편평콘딜로마가 22명(16.8%), CIN I이 11명(8.4%), CIN II가 5명(3.8%), CIN III가 4명(3.1%), CIS가 3명(2.3%)이었으며 침윤성 자궁경부암으로 진단된 경우는 없었다(Table 2, Fig. 3) 총 131명의 환자 중 조직검사 결과 HSIL 이상인 CIN II, CIN III, CIS로 나온 환자가 총 12명으로 자궁경부 세포진 검사의 위음성율은 9.2% (12/131)이었다.

각 조직검사 결과 별 고위험 HPV DNA 결과를 분석해

Table 3. Sensitivity of HPV DNA chip test for the detection of cervical intraepithelial neoplasia II or worse

High risk strains of HPV+ DNA	Pathologic diagnosis		
	≤CIN [†] I	≥CIN II	Total (%)
Negative	62 (52.1%)	2 (16.7%)	64 (48.9)
Positive	57 (47.9%)	10 (83.3%)	67 (51.1)
Total	119 (100%)	12 (100%)	131 (100)

*Human papilloma virus, [†] Cervical intraepithelial neoplasia

보면 조직검사결과 정상인 경우 36.0%에서 양성, 64.0%에서 음성이었으며 편평콘딜로마의 경우 양성은 68.2% 음성은 31.8%이었고 CIN II 이상의 고위험병변군에서는 83.3%이었다. 즉, 조직검사 결과 조직의 악성도가 증가할수록 고위험 HPV DNA의 검출률도 증가함을 알 수 있었다.

HPV DNA 음성으로 분류된 58명의 환자들의 조직 검사 결과는 정상이 53명(91.4%) 편평콘딜로마가 4명(6.9%) CIN III가 1명(1.7%)이었다. HPV DNA 저위험군 양성군으로 분류된 6명의 환자들의 조직검사 결과는 정상이 2명(33.3%), 편평콘딜로마가 3명(50.0%), CIS가 1명(16.7%)이었으며, HPV DNA 고위험군 양성군으로 분류된 67명의 환자들의 조직검사 결과는 정상이 31명(46.3%), 편평콘딜로마가 15명(22.4%), CIN I이 11명(16.4%), CIN II가 5명(7.5%), CIN III가 3명(4.5%), CIS가 2명(3.0%)이었다. 즉, HPV DNA 양성인 경우 다른 경우보다 고위험병변군이 더욱 많이 발생하는 경향을 보였다(Table 2).

HPV DNA chip 검사상 고위험 HPV DNA 양성인 경우 CIN II 이상의 고위험 병변에 대한 민감도와 특이도를 알아보기 위하여 조직 검사 결과 적극적인 치료보다는 추적관찰을 할 수 있는 저위험병변군(normal or reactive, flat condyloma; CIN I)과 적극적인 검사와 치료가 필요한 고위험병변군(CIN II, CIN III, CIS)으로 나누었다. 저위험병변군에서는 고위험 HPV DNA 양성률은 47.9% 음성률은 52.1%이었으며, 고위험병변군에서의 고위험 HPV DNA 양성률은 83.3% 음성률은 16.7%이었다. 즉 HPV DNA 검사 결과 고위험 HPV DNA 양성인 경우 고위험병변군을 구분해 낼 수 있는 민감도는 83.33%, 특이도는

52.10%, 위양성률은 47.9%, 위음성률은 16.67%로 나타났으며 통계적으로 유의한 결과를 나타냈다($p=0.0416$) (Table 3).

고 찰

ASCUS는 비정상 세포가 반응성(reactive) 또는 재생성(reparative)변화보다는 나쁘지만 SIL (squamous intraepithelial lesion)의 기준을 양적 또는 질적으로 만족하지 못하는 경우를 의미한다. ASC-US는 여러 가지 원인에 의한 변화로서 염증, 재생, SIL에 동반되거나 그보다 먼저 나타나는 변화로서 정확한 원인을 알 수 없는 경우이며, 자궁경부 세포진 검사의 2-11%에서 진단되고 있고⁹ 한국에서도 2.4-8.4%로 다양한 빈도로 보고되고 있다.^{10,11}

최근 분자생물학의 발전으로 인유두종 바이러스가 자궁경부암의 중요한 원인으로 대두되었다. HPV는 양성 종양의 일종인 유두종을 일으키는 저위험군과 상피내종양을 일으키는 고위험군의 2개의 소군으로 나뉜다. 현재까지 85종에 달하는 유전형(genotype)의 염기서열이 완전히 밝혀졌으며 이들 중 13여 아형이 자궁경부 종양 발생과 관련이 있는 것으로 알려졌다.^{6,7} HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -58, -59과 -68은 중증의 자궁경부 이형성과 자궁경부암에서 발견되어 고위험군으로 분류되고 반면 HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44은 저위험군으로 분류되었다.^{7,8}

인유두종바이러스를 검출하는 방법은 분자생물학적인 방법이 주를 이루고 있어 PCR법, In situ hybridization, Hybrid capture II법 등이 주로 연구 목적이나 임상 검사에 이용되고 있다. 이 중 PCR법은 높은 민감도가 장점이 있으나 조직의 분쇄로 인해서 시각적 진단과 병행하기 어렵고 위 양성의 가능성이 있으며 다양한 고위험군을 진단하기 위하여 적절한 primer를 여러 번에 걸쳐 사용하여 하므로 대량의 검체를 처리하는 임상에 이용하기에 어려운 점이 있다. In situ hybridization은 조직병변을 그대로 유지하면서 세포내의 특정핵산을 인식하는 방법이므로 다른 조직과 비교가 가능하며 높은 특이도가 장점이나 민감도가 떨어지는 것이 단점이다. 최근에 널리 사용되는 Hybrid capture system은 검사 방법이 kit화 되어 있어 간단히 외래에서 채취한 검체를 쉽게 진단할 수 있는 장점이 있어 임상에서 HPV DNA 검사의 주

류를 이루고 있다. 또한 적절한 민감도를 갖고 있어 위 양성이나 위음성의 가능성을 줄여 임상적 사용에 적절하다고 판단되나 이 방법은 감염된 아형을 구분할 수 없는 단점을 갖고 있어 각각의 아형에 따른 암 발생 위험 요인을 구분하기 위해서는 다시 추가 검사를 수행해야 하는 단점이 있다. 본 연구에서 이용한 HPV DNA chip 검사 방법은 PCR법의 민감도를 유지하면서 다양한 아형을 간편하게 진단 할 수 있다는 장점이 있으므로 임상적 적용 및 각각의 아형에 대한 위험성을 연구하는데 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

일반적으로 HPV-16, -18이 자궁경부암과 가장 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 HPV 아형의 분포는 지역별로 많은 빈도의 차이를 보이고 있으며, 일본의 경우 HPV-16이 가장 많은 빈도를 차지하였고, HPV-31, -33, -35, -52, -58이 자궁경부암과 관련이 있음이 밝혀졌다. Hwang 등의 연구에 의하면 2,470명의 한국 여성을 대상으로 DNA chip 검사를 시행한 결과 전체 환자의 44.8%에서 HPV DNA 양성의 결과가 나왔으며 미확정 비정형 편평상피세포의 경우 52.6%에서 HPV DNA 양성의 결과가 나왔다고 보고하였다. 또한 전체적으로 HPV-16, -52, -58이 가장 흔하게 발견되었으며 HPV-16은 정상, ASCUS와 HSIL (High grade squamous intraepithelial lesion)의 경우에서 가장 흔하였다.¹² Park 등의 보고에 의하면 조직검사상 LSIL (Low grade intraepithelial lesion)의 결과를 보인 환자 58명 중 50명에서 HPV DNA가 검출되어 73.5%의 양성률을 나타내었고, 전체적으로 HPV-16이 가장 흔하였다. 그 다음으로는 HPV-18과 -58의 순이었다고 보고하였다.¹³ 본 연구에서도 총 131명의 환자 중 73명의 환자에서 HPV DNA 양성이 나타났으며 55.7%의 양성률로 다른 연구들과 비슷한 결과를 나타냈으며 가장 흔한 HPV DNA type은 HPV-16으로 전체의 15.1%, 그 다음으로는 HPV-58 (12.8%), -56 (10.5%), -18 (9.3%)의 순으로 나타났다. 또한 CIN II 이상의 병변이 확인된 고위험 병변군에서는 1예를 제외하고는 모든 경우에서 HPV DNA 양성을 나타냈으며, HPV-16과 -58이 가장 흔하게 발견되어 각각 28.6%를 차지하였다.

ASCUS의 경우 자궁경부의 병변이 임상적으로 의미가 없거나 적은 경우가 많기 때문에 반복적인 자궁경부 세포진 검사를 권유하는 것이 일반적이다. 하지만 일정 기간 후 자궁경부 세포진 검사만을 재검하였을 경우

5-13%에서 CIN II, CIN III 및 침윤암등 고위험 자궁경부 병변으로 판정될 수도 있기 때문에 단순히 세포진 검사만으로는 안전하지 않을 수 있다는 견해도 있다.¹⁴ Yalti 등의 보고에 의하면, 자궁경부세포진 검사상 ASCUS로 판명된 119명을 대상으로 조직학적 진단을 시행한 결과 LSIL, HSIL 또는 침윤성 자궁경부 병변이 23.5%에서 발견되었다고 보고하면서 자궁경부세포진 검사에서 ASCUS로 판명된 경우 추가적인 검사가 필요하다고 하였다.¹⁵ 본 연구에서도 131명의 자궁경부 세포진 검사상 ASCUS를 보인 환자들의 조직 검사 결과를 보면 CIN II, CIN III 및 CIS로 확인된 고위험 병변군의 환자가 총 12명으로 9.2%를 나타냈으며, Lee 등은 ASCUS의 조직검사에서 중등도 자궁경부 이형증 이상인 환자수가 48명 중 9명으로 약 18.8%를 차지한다고 하였다.¹⁶ 따라서 ASCUS의 처치에 있어서 고위험병변을 놓치지 않기 위한 질확대경하 생검 전의 중간단계의 검사방법의 필요성이 대두되었으며 그 방법으로 HPV DNA 검사의 유용성이 보고되어왔다.

모든 ASC-US 환자에서 질확대경 검사 및 조직 검사를 시행하는 경우 침습적이고 비용이 과다하다는 점이 문제점으로 지적되고 있고, ASC-US를 질확대경하 조준 생검을 하였을 때 5.5-16.6%에서 CIN II 및 CIN III의 병변이 발견되었으며 자궁경부암의 위험인자를 가지고 있거나 재검진에서 ASCUS로 확인된 경우 육안적으로 경부의 이상이 의심스러운 경우 등에서 질확대경하 생검을 시행한 경우 CIN II 및 CIN III의 병변이 발견될 확률은 10-28%였다.^{10,17}

2002년 Americal Society for Colposcopy and Cervical pathology에서 발표한 내용을 보면, ASCUS의 경우 반복 세포진 검사, 질확대경 검사 및 조직검사 후 처치, HPV DNA 검사 후 처치 등으로 그 처치방법을 제시하고 있으며, 현재는 HPV DNA 검사결과에 따라 질확대경 검사 여부를 결정하는 방법이 많이 이용되고 있고 추적관찰이 어렵거나 SIL의 위험이 높은 환자들의 경우에는 바로 질확대경 검사를 시행하는 것이 비용효과적인 측면에서 바람직하다고 할 수 있다.^{18,19} 또한 2003년 The National Cancer Institute of America initiated the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS)의 보고에 의하면, 자궁경부세포진 검사상 ASCUS로 판명된 환자들을 대상으로 즉각적인 질확대경 및 생검, HPV DNA 검사와 반복적인 세포진 검사 등을 시행하고 필요한 경우 조직학적 진단을 시행

하였고 2년 후 질확대경 및 조직 검사를 시행하였다. 이때 즉각적으로 질확대경 검사를 시행한 군에서는 CIN III 이상의 고위험병변을 찾아낼 수 있는 민감도는 53.5%, HPV DNA 검사를 시행한 군에서는 72.3%이었으며 반복적인 세포진 검사를 시행한 군에서는 54.6%이었다. 결국 HPV DNA 검사는 50% 이상에서 질확대경 검사를 시행하게 되지만 CIN III 병변을 92.4%에서 알아낼 수 있으면서 질확대경 검사와 효과가 비슷하였다고 보고하여, ASCUS의 처치에 있어서 HPV DNA 검사의 유용성을 밝혔고, 현재 미국 FDA에서는 ASCUS 환자의 처치에 있어서 HPV DNA 검사를 승인하여 실제로 임상에서 사용되고 있다.²⁰ Levi 등의 연구에 따르면 자궁경부 세포진 검사상 ASCUS로 나온 환자들을 즉각적으로 HPV DNA 검사를 시행하여 고위험 HPV DNA 양성인 경우와 음성인 경우로 나누었는데, 고위험 HPV DNA 양성인 경우 22%에서 고등급상피내 병변(HSIL)으로 밝혀졌으며, 고위험 HPV DNA 음성인 경우에는 96%에서 반응성 병변(reactive)으로 밝혀졌다. 따라서 저자들은 ASCUS 환자의 처치에 있어서 질확대경 및 생검은 HPV DNA 양성인 경우에 한하여 시행되어야 한다고 주장하였다.²¹ 본 연구에서도 고위험 HPV DNA 양성군의 17.4%에서 CIN II 이상의 고위험 병변이 나타났으며 고위험 HPV DNA 음성군의 96.9%에서 CIN I 이하의 저위험 병변을 보였으며, 고위험 HPV DNA 양성인 경우 민감도는 83.3% 특이도는 52.1%이었다.

ASCUS의 자연경과를 추적 관찰한 보고에 따르면 약 46.2%가 지속적으로 ASCUS를 나타냈으며 53.8%에서는 정상으로 퇴행(regression)하였다고 보고되었다.²² Dalsein 등은 Hybrid Capture II 방식으로 ASCUS환자를 2년 동안 추적 관찰한 결과 CIN II 이상의 고위험 병변군으로의 이행은 반복적으로 high-risk HPV DNA에 양성반응을 보이는 경우이며 high-risk HPV DNA 음성군이나 반복검사에서 음성으로 전환된 경우에는 추적관찰 동안 CIN II 이상의 병변으로의 이행은 없었다고 보고하였다.²³ 또한 Schlecht 등은 자궁 경부세포진 검사상 ASCUS로 판명된 경우 추적관찰에서 LSIL 이상으로 진행(progression)하거나 ASCUS에서 정상 세포진 검사로 퇴행되는 기간은 고위험 HPV 감염 여부와 연관이 있다고 하였다. 즉 고위험 HPV에 감염된 경우 ASCUS의 진행은 빨라지며 퇴행은 늦어진다는 결과를 보여 고위험 HPV의

감염여부가 ASCUS의 경과에 영향을 미친다는 사실을 밝혔다.²⁴

결국 자궁경부세포진 검사상 ASC-US를 보이는 환자의 처치에는 HPV DNA 검사를 시행하여 고위험 HPV DNA 양성을 나타내는 경우 질확대경 검사를 시행하는 방법이 옳바를 것이라고 판단이 되며, HPV 감염의 유병률이 50%를 넘는 경우에는 HPV DNA 검사상 음성으로 판명이 되면 추가적인 검사를 시행하지 않고 추적관찰을 하여도 된다고 할 수 있다.²⁵

결론적으로 ASCUS의 자궁경부 세포진 검사 결과를 보인 환자들의 처치에 있어서 HPV DNA chip을 이용한 고위험 HPV DNA의 검출은 CIN II 이상의 고위험병변군을 예측, 진단하는데 도움이 되며 고위험 HPV DNA 검사를 병행 시행하여 고위험군을 선별적으로 조직검사하는 것이 불필요한 검사를 줄임과 동시에 CIN II 이상의 고위험병변을 빨리 발견하여 치료하는데 유용하다 할 것이다.

참고문헌

1. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL. Cancer incidence in five continents. Compatibility and Quality of Data. IARC Sci Publ 1992; 120: 45-173.
2. Annual Report of Gynecologic Cancer Registry Program in Korean for 2002 (Jan. 1st, 2002-Dec. 31st, 2002). Korean J Obstet Gynecol 2004; 47: 1029-70.
3. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. JAMA 1989; 261: 737-43.
4. Soost HJ, Lange HJ, Lehmacher W, Ruffing-Kullmann B. The validation of cervical cytology sensitivity, specificity and predictive values. Acta Cytol 1991; 35: 8-14.
5. zur Hausen H. Are human papillomavirus infections not necessary or sufficient causal factors for invasive cancer of the cervix? Int J Cancer 1995; 63: 315-6.
6. Bernard H, Chan S, Manos MM, Ong C, Villa LL, Delius H, et al. Identification and assesment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. J Infect Dis 1994; 170: 1077-85.
7. Lorincz A, Reid R, Jenson A, Greenberg M, Lancaster W, Kuman R. Human papillomavirus infection of the cervix. Relative risk association of fifteen common anogenital types. Obstet Gynecol 1992; 79: 328-37.
8. Bauer H, Hildesheim A, Schiffman MH. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women Portland, Oregon. Sex Transm Dis 1993; 20: 274-8.

9. Pearlstone AC, Grigsby PW, Mutch DG. High rates of atypical cervical cytology: occurrence and clinical significance. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 191.
10. Nam JH, Kim JH, Gong GY, Huh JR, Kim YM, Kim YT, et al. Management of ASCUS, AGUS and LSIL. *Korean J Obstet Gynecol* 1997; 40: 1436-49.
11. Kim CJ, Chio EA, Ro DY, Shin JW, Park JS, Bae SN, et al. Clinical implication and evaluation and management of women with low-grade cytologic abnormality (ASCUS/LSIL). *Korean J Obstet Gynecol* 1997; 40: 349-59.
12. Hwan HS, Park M, Lee SY, Kwon KH, Pang MG. Distribution and prevalence of human papillomavirus genotypes in routine pap smear of 2,470 Korean women determined by DNA chip. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 2153-6.
13. Park TC, Kim CJ, Koh YM, Lee KH, Yoon JH, Kim JH, et al. Human papillomavirus genotyping by the DNA chip in the cervical neoplasia. *DNA Cell Biol* 2002; 23: 119-25.
14. Jones HW. Impact of the Bethesda system. *Cancer* 1995; 76 Suppl 10: 1914.
15. Yalti S, Gurbuz B, Bilgic R, Cakar Y, Eren S. Evaluation of cytologic screening results of the cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 292-4.
16. Lee JR, Lee JH, Kim SR, Park JH, Hwang SO, Koh SK, et al. Clinical significance of HPV DNA test for management of patients with diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesions. *Korean J Obstet Gynecol* 2003; 46: 268-75.
17. Schiffman M, Adriaenza ME. ASCUS-LSIL triage study. Design, methods and characteristics of trial participants. *Acta Cytol* 2000; 44: 726-42.
18. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287: 2114-9.
19. Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; 287: 2120-9.
20. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 1381-2.
21. Levi AW, Kelly DP, Rosenthal DL, Ronnett BM. Atypical squamous cells of undetermined significance in liquid-based cytologic specimens: results of reflex human papillomavirus testing and histologic follow-up in routine practice with comparison of interpretive and probabilistic reporting methods. *Cancer* 2003; 99: 191-7.
22. Montz FJ, Monk BJ, Fowler JM, Nguyen L. Natural history of minimally abnormal Papanicolaou smear. *Obstet Gynecol* 1992; 80(3 Pt 1): 385-8.
23. Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Carval KLB, Sautiere JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003; 106: 396-403.
24. Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JCM, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *N Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1336-43.
25. Cuschieri KS, Cubie HA. The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *J Clin Virology* 2005; 32(Suppl 1): S34-42.

The efficacy of HPV DNA chip test in the atypical squamous cell of undetermined significance

Won Sik Lee¹, Jong Taeg Park¹, Gi Heon Lee¹, Seog Ju Seong¹,
So Eun Jung², Nak Woo Lee², Kyu Wan Lee²

*Department of Obstetrics and Gynecology¹, Samsung Cheil Hospital and
Women's Healthcare Center, Sungkyunkwan University School of Medicine,
Department of Obstetrics and Gynecology², College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea*

Objective : This study was performed to investigate the efficacy of DNA chip method for detecting and genotyping of human papillomavirus (HPV) and screening of high-grade CIN (cervical intraepithelial neoplasia) or invasive cancer in the patients with atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US).

Methods : This study was based on 131 cases to be revealed ASC-US by Pap smear for the cervical cancer screening from July 2004 to October 2004. They were evaluated by HPV DNA chip test, Cervical colposcopy and directed biopsy, and cone biopsy. The results of type 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66 and 68 in HPV DNA chip test were categorized as high risk HPV. We evaluate the detection rate of the high-grade CIN and invasive cancer by HPV DNA chip test.

Results : The incidence of high risk HPV DNA was 51.1% (67/131). Twelve of 131 (9.2%) were diagnosed as high-grade CIN or CIS on histology. The detection rate of high risk HPV DNA in high-grade CIN and invasive cancer was 83.3% (10/12). The detection rate of high risk HPV DNA was 36.0% (31/86) in normal or reactive, and 83.3% (10/12) in CIN II or above on histology. Higher the grade of biopsy, more the detection rate of high risk HPV DNA by HPV DNA chip test.

Conclusion : The use of HPV DNA chip test in patients with ASC-US may be useful in detection of high-grade CIN or invasive cancer.

Key Words : Atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), HPV DNA chip test, Uterine cervix
