

# Co-nested Polymerase Chain Reaction법과 Hybrid Capture법을 이용한 Cervical Scrape Specimen에서의 인유두종 바이러스 검출

삼성 제일병원 산부인과, 내분비연구실\*\*

홍수정 · 안현경 · 이환건 · 정환옥 · 심재욱 · 박종택 · 박인서 · 문인걸\*\* · 한인권\*\*

= Abstract =

## Detection of Human Papillomavirus in Cervical Scrape Specimens Using Co-nested PCR and Hybrid Capture System

S. J. Hong, M. D., H. K. Ahn, M. D., H. K. Lee M. D., H. W. Chung, M. D., J. U. Shim, M. D.,  
C. T. Park, M. D., I. S. Park, M. D., I. K. Moon, Ph. D.,\*\* I. K. Han, M. D.\*\*

*Department of Obstetrics and Gynecology, Endocrine Research Laboratory,\*\**

*Samsung Cheil General Hospital & Women's Helthcare Center*

Human papillomavirus(HPV) has implicated in the development of cervical cancer. Several studies have suggested a strong correlation between HPV 16, 18 and cervical intraepithelial neoplasia(CIN). Co-nested polymerase chain reaction(Cn-PCR) technique which is more sensitive 2-step PCR than 1-step PCR was developed to simultaneous detection and typing of HPV by using general and nested general primer pairs localized within the L1 region and general and nested 16, 18 type specific primer pairs localized within the E6ORF. This study was performed to determine the validity of the Cn-PCR method for HPV detection and potential clinical uses as screening method for the identification of CIN and compare with Hybrid capture method. Papanicolaou test and Cn-PCR and Hybrid capture test for HPV infection were performed on 298 women visited for cervical cancer screening. Among these cases, 167 cases of persistent atypical squamous cell undetermined significance(ASCUS), cervical erosion and abnormal cytologic result above Low grade squamous intraepithelial lesion(LSIL) were histologically confirmed. Comparing the positive rate of HPV among patients with CIN and cervical cancer, there was a significant positive correlation between the positive rate of HPV type 16, 18 and the degree of histologic malignancy( $P<0.01$ ). The sensitivity of HPV type 16, 18 by using Cn-PCR for CIN grade II,III and cancer was 46%, whereas the corresponding value for the Hybrid capture was 77%. But HPV type 16, 18 were more strongly predictive of high grade CIN. The sensitivity and positive predictive value of combination test with cytology and Cn-PCR

were 90% and 71%, whereas the corresponding values of same test modality with Hybrid Capture were 94% and 41%. Then some combination of the two modalities will produce better performance than either alone, but there was no significant difference in sensitivity between the combination of Cn-PCR and cytology test and same combination with Hybrid capture and the positive predictive value was higher in combination Cn-PCR and cytology test. From these results, We confirmed that Cn-PCR is sensitive and reliable method for the simultaneous detection and typing of HPV. In particular, HPV testing appears to be helpful in determining which women with mildly abnormal smears have high-grade underlying lesions in need of immediate referral for colposcopy.

## I. 서 론

자궁경부암의 발생률 및 사망률은 세포진검사법이 도입된 이후 전 세계적으로 꾸준히 감소하였다.<sup>1-3)</sup> 그러나 세포진검사의 정확도는 보고자마다 차이가 다양하여, 적게는 2%에서 많게는 60%까지 위음성률이 보고되어 있다.<sup>4-7)</sup> 실제로 정기적인 세포진검사로 정상 판정을 받은 여성에서 침윤암이 발견되는 등의 심각한 문제점이 보고되고 있다. 따라서 자궁경부암을 예방의 목적으로 조기에 진단하기 위해서는 세포진검사의 위음성률을 보완할 수 있는 보조적 검사가 필요하다.

지금까지의 연구 결과, 인유두종 바이러스(Human papillomavirus : HPV)는 자궁경부암의 주 요인으로 밝혀졌다. 특히 16, 18형은 고위험 인자로서 자궁경부암의 발생 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀짐에 따라<sup>8-10)</sup> 인유두종 바이러스의 감염 여부, 특히 구체적인 형을 결정하는 것이 환자의 추적<sup>11,12)</sup> 관찰 및 치료에 중요하며, 자궁경부암의 조기진단에 도움을 줄 수 있을 것으로 알려졌다. 현재 많이 사용되고 있는 인유두종 바이러스 검출법에는 크게 Polymerase chain reaction(중합효소 연쇄반응; PCR)법<sup>13)</sup>과 Hybrid capture법<sup>14,15)</sup>이 있다. 이러한 방법들은 자궁경부암의 조기 진단에 이용하는 데 몇 가지 문제점이 있다. PCR법은 인유두종 바이러스의 형을 결정할 수 있는 장점이 있으나 너무 높은 민감도로 인한 높은 위양성률<sup>16)</sup>과 임상에 쉽게 적용하기에는 경제성이 낮다. Hybrid capture법은 적절한 민감도와 간편하고 경제적인 면으로 최근 사용이 점차 증가하고 있으며 인유두종 바이러스를 고위험군과 저위험군을 구별함으로써 환자의 치료 방침을 세우는데 구체적인 방향을 제시하고 있으나 자궁경부암의 위험도를 정확히 반영하기 위하여는 고위험

군이 검출된 경우 구체적인 형을 결정하기 위한 후속 검사를 해야 하는 경제적 부담이 있다.

본 연구실에서는 기존의 PCR법을 개량한 Co-nested PCR법을 개발하여 자궁경부의 인유두종 바이러스를 검출함과 동시에 16, 18형을 분류할 수 있게 되었다. 본 연구의 목적은 Co-nested PCR법을 이용하여 자궁경부 검체에서 인유두종 바이러스 양성 여부와 세포진검사 및 질확대경하 조직검사 결과를 비교함으로써, Co-nested PCR법이 자궁경부암의 집단 검진을 위한 세포진검사의 보조적 검사로서 유용한 지 알아보려고 하는 것이다.

## II. 대상 및 방법

본 연구는 1995년 4월부터 9월까지 세포진검사를 목적으로 본원 산부인과 외래를 방문한 여성을 대상으로 하였다. 이들 중 과거에 자궁경부 병변과 관련하여 치료받은 경험이 있는 여성을 제외한 총 298명을 분석 대상으로 하였으며, 이 중 세포진검사 결과 저등급 병변(LSIL) 이상이거나, 2회 이상의 비정형 편평세포(ASCUS), 시진상 자궁경부 미란이나 인유두종 바이러스와 연관된 병변을 보이는 167예에서 질확대경검사 및 조직생검을 시행하였다.

인유두종 바이러스 검출을 위해서는 Hybrid capture kit(Digene Co.) 내의 dacron swab을 이용하여, 자궁경부 입구를 1회 회전하고 전체 변형대(Transformation zone)의 세포를 채취한 후 transport medium에 바로 보관한 후 검사실로 보냈다. 자궁경부로부터 채취한 시료 중 일부(200ul)는 PCR법에 사용하기 위하여 분리하였고 그 나머지는 Hybrid capture 법에 이용하였다.

PCR을 위한 시료는 12000rpm에서 1분간 원심분

리하여 상층액을 제거하고 여기에 세포 용해 완충 용액(50mM KCl, 10mM Tris-Cl <pH 8.3>, 0.5% tween 20, proteinase-K 200 $\mu$ g/mg) 100 $\mu$ l를 첨가하여 추출한 DNA를 55°C에서 3시간, 95°C에서 10분간 가열하여 proteinase-K를 불활성화시킨 후 이중 2 $\mu$ l를 취하여 PCR에 사용하였다. Cn-PCR은 모두 2단계의 PCR 과정으로 나눌 수 있는데, 먼저 첫 단계 PCR은 general primer로 L1 유전자 부위의 MY09와 MY11 primer(Table 1)와, HPV16, 18을 검출하기 위한 E6 유전자 부위(E6 open reading frame)의 E6A와 E6B primer(Table 1)를 제작하여 각각 25pmol씩을 PCR 완충용액(10mM Tris-Cl <PH 8.3>, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ M dNTP, 1 unit Dynazyme <Finnzyme Co>)에 혼합하여 95°C에서 50초간 denaturation, 40°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 50초간 extension하는 3단계의 과정을 9600 Thermal cycler(Perkin Elmer Cetus Co.)에서 40회 실시하였다.

2번째 단계는 첫 단계에서 증폭된 PCR 산물 2 $\mu$ l를 이용하였다. 사용한 primer로는 MY09와 MY11 primer의 내측에 위치한 GP5와 GP6 primer(Table 1)와 HPV 16과 HPV 18의 typing을 위하여 E6A와 E6B의 내측에 위치한 16A와 16B, 18A, 18B primer(Table 1)를 사용하여 1 단계와 같은 PCR 완충 용액 조건에서 95°C에서 50초의 denaturation, 42°C에서 30초의 annealing, 72°C에서 50초의 extension 과정을 35회 반복하였다.

이상의 2단계에서 얻어진 PCR 산물은 3% Nu-Sieve agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide solution에 염색하여 UV transillumination 하에 증폭된 DNA band 유무를 확인하고 사진 촬영을 하였다(Fig 1). Hybrid capture법은 Digene corporation의 방법에 따라 시행하였다.

이상의 과정으로 세포진검사 및 조직검사 결과에 따른 자궁경부 인유두종 바이러스의 양성률을 알아 보고 비교 분석은 Pierson's Chi-square test를 이용하였으며 P value가 0.01 이하인 경우를 통계적인 의의가 있다고 판단하였다.

### III. 결 과

1. 세포진검사 결과 및 질확대경하 조직생검결과  
결과 분석은 총 298예를 대상으로 하였으며 이들의 연령 분포는 20-81세였고 평균 43.3세였다. 이들 298예의 세포진검사 결과 분포와 167예의 조직검사 결과는 ASCUS가 41.9%이며 Squamous cell carcinoma(SCC)가 8.7%로 일반 인구집단에 비해 높은 비율을 나타내고 있다(Table 2).

조직 생검을 시행했던 예는 167예로 ASCUS나 LSIL의 10%(10/101)가 조직학적으로 CIN II, III의 병변을 보였다. 또한 CIN II, III 병변에서 66%(25/38)가 세포진검사 결과와 일치하며 약 26%(10/38)가 ASCUS나 LSIL이었다.(Table 3)

Table 1. The Nucleotide sequences of primers for HPV type

	sequence(5' -3')	location	product length
L1 region			
outer(MY11, MY09)	GCACCAGGGATCATAACTAATGG CGTCCACAAGAGGGAATACTGATC	6722-7170	450bp
inner(GP5, GP6)	TTTCTTACTGTGGTAGATAC TGATTACAGTTATTTTTC	6764-6904	142bp
E6ORF	ACCGAAAACGGTTGAACCGAAAACGGT		307bp
Outer(E6A, E6B)	AATAATGTCTATATTCATAATT		
Inner	ATGTTTCAGGACCCACAGGA	104-227	124bp
HPV 16(16A, B)	CCTCAGTCGCAGTAAGTGT ATGGCGCGCTTTGAGGAOCC	106-283	188bp
HPV 19(18A, B)	GCATGCGGTATACTGTCTCT		

Fig 1. PCR analysis on cervical scrapes.

Table 2. Cytology result of studied patient

Cytology	No.of cases	% of total
Normal	71	23.8
ASCUS	125	41.9
LSIL	38	12.8
HSIL	38	12.8
SCC	26	8.7
Total	298	100.0

ASCUS, Atypical squamous cell undetermined significance

LSIL, Low grade squamous intraepithelial lesion

HSIL, High grade squamous intraepithelial lesion

SCC, Squamous cell carcinoma

## 2. 세포진검사 결과에 따른 인유두종 바이러스의 양성률

세포진검사 결과에 따라 Cn-PCR과 Hybrid capture법에 의한 인유두종 바이러스 양성률을 비교한 결과 세포진검사 이상 정도가 높을수록 인유두종 바이러스 양성률도 증가하는 양성의 상관관계를 보이고 있으며( $P < 0.01$ ), 음성률은 세포 이상 정도가 높을수록 낮았다(Table 4, 5).

인유두종 바이러스 16, 18형의 양성률은 Hybrid capture법을 이용한 고위험 인유두종 바이러스의 양성률과 비교할 때 전체적으로 약 30%가 낮다. 16, 18형을 제외한 other type의 인유두종 바이러스 양성률은 LSIL에서 73.6%로서 가장 높았으나 HSIL (High grade cervical intraepithelial lesion)에서 16, 18형의 양성률이 31.8%인 반면, other type이 42.1%로 높은 양성률을 보여 other type의 재분류를 통해 16, 18형 이외의 고위험 인유두종 바이러스

의 연관성을 알아볼 필요가 있다.

## 3. 질확대경하 조직 생검결과에 따른 인유두종 바이러스의 양성률

167예에서 조직검사를 시행한 결과, 병리학적 악성정도가 심할수록 인유두종 바이러스 양성률 역시 증가하는 양성 상관관계를 보이고 있으며( $P < 0.01$ ), 세포진검사에서도 마찬가지로 조직검사 결과에 따라서도 16, 18형 양성률과 고위험 인유두종 바이러스 양성률 간에 약 30%의 차이를 보였다(Table 6, 7).

## 4. 인유두종 바이러스검사, 세포진검사 및 복합 검사시 정확도의 비교

인유두종 바이러스검사가 고도 자궁경부 이형성증 및 침윤암을 발견할 수 있는 집단검진의 수단으로 이용할 때 그 정확도를 비교하면 Hybrid capture법이나 Cn-PCR법에 의한 전체적(general) 인유두종 바이러스 검사의 정확도에는 의미있는 차이가 없었으며, Hybrid capture법에 의한 고위험 인유두종 바이러스 검색시 민감도가 77%, 양성 예측도가 51%이고, 16, 18형은 민감도는 46%이나 양성예측도가 85%이고 특이도 또한 91%로서 인유두종 바이러스 16, 18형은 고도 이형성증과 침윤암을 예측할 수 있는 중요한 인자라 할 수 있다. 또한 세포진검사와 비교하면 인유두종 바이러스 16, 18형이 가장 높은 양성예측도를 나타내고 특이도 또한 세포진검사의 HSIL과 유사한 정도로 높지만 민감도는 낮다.

그러나 두 검사를 동시에 시행할 경우는 세포진 검사상 HSIL의 민감도를 74%에서 90%까지 높일 수가 있다. Hybrid capture법에 의한 고위험 인유두종 바이러스검사는 세포진검사와 병행시 민감도를

Table 3. Correlation between cytology and histology result

Cytology	No. of Cases	Histologic Diagnosis				
		Normal	CIN I	CIN II	CIN III	SCC
Normal	6	6(100.0)	0	0	0	0
ASCUS	76	57(77.0)	11(14.9)	2(2.3)	6( 7.9)	0
LSIL	25	10(41.7)	13(54.2)	1(4.0)	1( 4.0)	0
HSIL	36	3( 8.4)	4(10.8)	2(5.6)	23(63.9)	4(11.1)
SCC	24	0	0	0	3(12.5)	21(87.5)
Total	167	76	28	5	33	25

CIN, Cervical intraepithelial lesion

ASCUS, Atypical squamous cell undetermined significance

LSIL, Low grade squamous intraepithelial lesion

HSIL, High grade squamous intraepithelial lesion

SCC, Squamous cell carcinoma

( ), %

Table 4. Correlation between cytology and HPV type by Cn-PCR method

HPV testing by Cn-PCR	Cytologic diagnosis					No. of cases
	Normal	ASCUS	LSIL	HSIL	SCC	
16/18 type HPV	5( 7.0)	12( 9.6)	4(10.5)	12(31.6)	17(65.4)	50(16.8)
Other type HPV	10(14.1)	62(49.6)	28(73.6)	16(42.1)	8(30.8)	124(41.6)
Negative	56(78.9)	51(40.8)	6(15.8)	10(26.3)	1( 3.8)	124(41.6)
No. of Cases	71	125	38	38	26	298

 $P < 0.01$ ,  $X^2=60.449$ 

ASCUS, Atypical squamous cell undetermined significance

LSIL, Low grade squamous intraepithelial lesion

HSIL, High grade squamous intraepithelial lesion

SCC, Squamous cell carcinoma

HPV, Human papillomavirus

( ), %

94%까지 높일 수 있으나, 16, 18형과의 조합검사보다 유의하게 높지는 않으며 양성 예측도 및 특이도는 각각 41%, 51%로서 16, 18형과 조합했을 때의 71%, 87%에 비해 월등히 낮았다(Table 8).

#### IV. 고 찰

생식기 감염을 일으키는 여러 형의 인유두종 바이러스들 중 특히 16, 18형이 자궁경부암 발생 과정에서 initiator, promoter로서 주된 기능을 하는 것으로 알려져 있으며 전암 병변 및 침윤암의 발생에

밀접한 관련이 있다고 보고되어 있다. 또한 병변의 진행 정도와도 관련이 있어 인유두종 바이러스에 의한 정도의 병변은 대개는 정상화되지만 2년 이내 28%가 중등도 자궁경부 이형성증으로 진행하며<sup>17)</sup> 12-15%까지 침윤암<sup>18)</sup>으로 진행되는 것으로 알려져 있다.

이에 따라 인유두종 바이러스검사의 임상적 이용은 세포진검사의 보조적 기능으로서 오진율을 줄이고 경도의 비정상 세포소견을 보이는 경우 자궁경부암 발생의 고위험군 여성을 분류함으로써 조기진단과 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 보고되어 있다.<sup>19,20)</sup>

Table 5. Correlation between cytology and HPV type by Hybrid capture method

HPV testing by HC	Cytologic diagnosis					No. of Cases
	Normal	ASCUS	LSIL	HSIL	SCC	
High risk HPV	5( 7.0)	49(39.2)	21(55.2)	23(60.5)	25(96.2)	123(41.3)
Low risk HPV	1( 1.4)	9( 7.2)	1( 2.6)	0	0	11( 3.7)
Negative	65(91.5)	67(53.6)	16(42.1)	15(39.5)	1( 3.8)	164(55.0)
No. of cases	71	125	38	38	26	298

$P < 0.01$ ,  $X^2=75.591$

ASCUS, Atypical squamous cell undetermined significance

LSIL, Low grade squamous intraepithelial lesion

HSIL, High grade squamous intraepithelial lesion

SCC, Squamous cell carcinoma

HPV, Human papillomavirus

HC, Hybrid capture

( ), %

Table 6. Correlation between biopsy result and HPV type by Cn-PCR

HPV testing by Cn-PCR	Histologic diagnosis					No. of Cases
	Normal	CIN I	CIN II	CIN III	Cancer	
16/18 type	5( 6.6)	4(14.3)	2(40.0)	12(36.4)	16(64.0)	39(23.4)
Other type	36(47.4)	19(67.9)	3(60.0)	11(33.3)	8(32.0)	77(46.1)
Negative	35(46.1)	5(17.9)	0( 0.0)	10(30.3)	1( 4.0)	51(30.5)
Total	76	28	5	33	25	167

$P < 0.01$ ,  $X^2=39.484$

CIN, Cervical intraepithelial neoplasia

HPV, Human papillomavirus

( ), %

Table 7. Correlation between biopsy result and HPV type by HC method

HPV testing by HC	Histologic diagnosis					No. of Cases
	Normal	CIN I	CIN II	CIN III	SCC	
High risk	28(36.8)	16(57.1)	3(60.0)	22(66.7)	23(92.0)	92(55.1)
Low risk	5( 6.6)	1( 3.6)	2(40.0)	2( 6.1)	0( 0.0)	10( 6.0)
Negative	43(56.6)	11(39.3)	0( 0.0)	9(27.3)	2( 8.0)	65(38.9)
Total	76	28	5	33	25	167

$P < 0.01$ ,  $X^2=26.455$

CIN, Cervical intraepithelial lesion

HC, Hybrid capture

( ), %

Table 8. Validity of HPV test, Cytology, and combined test for CIN II, III and Cancer

Test criterion	Validity (%)			
	sensitivity	specificity	PPV	NPV
<b>Cytology</b>				
Any ctology	100	6	38	100
HSIL	74	93	81	91
<b>CN-PCR method</b>				
HPV 16/18	46	91	85	74
General	85	39	45	82
<b>HC method</b>				
High risk HPV	77	58	51	42
General	82	51	50	80
<b>Combined method</b>				
HPV 16/18	90	87	71	96
and or HSIL				
High risk HPV	94	51	41	96
and or HSIL				

PPV, positive predictive value

NPV, negative predictive value

HSIL, High grade squamous intraepithelial lesion

HPV, Human papillomavirus

HC, Hybrid capture

인유두종 바이러스 검출 방법으로 혈청학적검사는 특이성이 없기 때문에 적당치 않고 또한 시험관내 배양이 불가능하므로 여러 가지 분자생물학적인 방법을 이용하여 왔는데 southern blot hybridization,<sup>22)</sup> dot blot hybridization,<sup>23)</sup> filter in situ hybridization,<sup>24)</sup> tissue in situ hybridization<sup>25)</sup> 등과 같은 방법들 중 southern blot hybridization 방법이 가장 정확한 인유두종 바이러스 검출 방법<sup>26)</sup>으로 알려져 있다. 그러나 이 방법은 비용, 시간, 기술적 어려움, 신선한 세포 및 조직으로부터 많은 양의 DNA가 필요한 문제점으로 인해 집단검진을 위한 실용성 면에서 많은 제약이 따른다. 그 후 1985년 Saiki에 의해 DNA 중합효소를 이용한 중합효소 연쇄반응법이 개발되어 DNA 특정 부위를 선택적으로 증폭시킴으로써 미량의 DNA가 존재하여도 검출이 가능하게 되어 인유두종 바이러스의 검출에 대한 방법이 활성화되기 시작하였다.

중합효소 연쇄반응법에는 처음부터 인유두종 바이러스 DNA형을 직접 알고자 하는 type-specific primer directed PCR법<sup>27)</sup>과 각각의 인유두종 바이

러스를 알 수는 없지만 동시에 여러 종류를 증폭시킬 수 있는 consensus(general) primer directed PCR법<sup>28)</sup>이 있으며, 보다 민감도가 높은 nested PCR법은<sup>29,30)</sup> consensus primer pair와 nested primer pair를 사용하여 중합효소 연쇄반응 과정을 2 단계로 시행함으로써 민감도를 높이고 시간적, 경제적인 장점이 있으나 이 방법 역시 각각의 형을 알아낼 수는 없다. 본 논문에서 소개하고자 하는 Cn-PCR법은 nested PCR법에서 응용한 방법으로 general primer pair와 nested type specific primer pair를 사용하여 여러 종류의 인유두종 바이러스를 검출하면서 동시에 검출하고자하는 인유두종 바이러스 형을 분류할 수 있으므로 일반적 발병률 및 임상과 연관된 정보를 얻을 수 있다.

인유두종 바이러스 31, 33형을 포함한 몇몇 형들도 자궁경부암이나 전암병변의 원인 인자로 알려져 있으나 주로 16, 18형이 연관되어<sup>31)</sup> 있으므로 본 연구에서도 16, 18형만을 분류하기로 하였고 그 외는 other type으로 분류하였다. 16형 인유두종 바이러스의 양성률은 정상군에서 40-84%,<sup>13,32-36)</sup> 자궁경부 상피내종양에서 46-100%,<sup>34,36-38)</sup> 침윤암의 경우 40-100%<sup>34-38)</sup>까지 보고되어 있다. 본 연구 결과에서 16, 18형의 양성률은 정상군에서 6.6%, 자궁경부 상피내종양의 약 40%, 침윤암의 경우 64%였다. 또한 nested-PCR법을 이용한 경우 자궁경부 세포진검사상 정상인 여성에서 전체적인 인유두종 바이러스 양성률은 1단계 PCR에 의해 5.6%, 2단계 PCR에 의해서는 19.2%이며, ASCUS 이상의 비정상 소견을 보인 여성에서는 각각 26.3%, 84.2%로서 보다 민감도를 높일 수 있다고 보고<sup>32)</sup>하였는데, 본 연구에서는 정상 군에서 21.1%, 비정상군에서 약 70%였다. 이러한 검출률의 차이는 지역 및 세포진검사를 채취하는 방법이나 DNA 검사법, 연구 대상에 따라 인유두종 바이러스 이환률이 다른 것에 기인한다고 한다.<sup>38)</sup>

Hybrid Capture법과 Cn-PCR법을 비교하면 Cn-PCR법이 보다 민감한 방법이지만 Hybrid Capture법에 의한 고위험 인유두종 바이러스와 Cn-PCR법에 의한 16, 18형 인유두종 바이러스의 검출률이 약 30%의 차이를 보이는데, 고위험 인유두종 바이러스에는 16, 18형 이외에 33,31형 등도 포함이 되어 있으므로 집단 검진의 수단으로 사용할 때 검사 방법에 따라 정확도에 차이를 줄 수 있다.

J. Cuzick 등에 따르면 중등도 이행성증에서 인유

두종 바이러스 31과 33형의 검출률은 각각 31%, 13%로서 16형 다음으로 많이 검출되지만 자궁경부암과 연관하여 그렇게 특이하지는 않으며 집단검진 방법으로서 세포학적 검사를 보완하는데 그 가치는 아직 불분명하다고 밝히고있다.<sup>39)</sup> 또한 이들은 중증도 이형성증에 대한 예측 인자로서의 인유두종 바이러스에 대한 연구를 통해 16형이 가장 예측도가 높으며(79%) 세포진검사와 병행했을 때 세포진검사의 정확도를 향상시킬 수 있다고 하였다.

Cox 등<sup>40)</sup>은 Hybrid Capture법을 이용한 연구를 통해 고위험 인유두종 바이러스의 양성 예측도 47%, 민감도 86%로서 세포진검사의 양성 예측도 73%, 민감도 38%를 두 방법을 병행함으로써 양성 예측도 46%, 민감도 88%로 향상시켰다. 본 연구에서는 16, 18형의 중증도 이형성증에 대한 양성예측도가 85%로서 예측인자로서 가장 가치가 있었으며 역시 74%의 세포진검사 민감도를 90%까지 향상시켰다. 또한 Hybrid Capture법에 의해서는 세포진검사의 민감도를 94%까지 향상시켜 Cn-PCR과 비교하여 높기는 하지만 특이도 및 양성예측도가 51, 41%로서 Cn-PCR법에 의한 경우보다 월등히 낮았다. 그러나 ASCUS와 LSIL 101예 중 10예가 CIN II, III로서 연구 대상 예가 적기는 하지만 이들을 분석한 결과 4예가 16, 18형 인유두종 바이러스 양성인 반면, 9예가 고위험 인유두종 바이러스 양성으로, 이들 비정상 세포군에서 인유두종 바이러스 16, 18형의 검사만으로 암발생의 고위험 여성을 구별하기에는 여전히 부족한 점이 있을 것으로 사료된다.

또한 중합효소 연쇄반응법은 임상적으로 의의가 없는 미량의 DNA까지 검출할 수 있는 방법으로서 실제로 인유두종 바이러스 DNA 양과 자궁경부암의 발생 관계에 대한 많은 연구에서 DNA 양이 많을수록 발생률이 더 높은 것으로 밝히고 있다. 따라서 기존의 중합효소 연쇄반응법보다 더 미량의 DNA를 검출할 수 있는 nested-PCR법이 과연 임상과 연관하여 유용한지는 재조명되어야 한다.

결과적으로 집단검진을 위한 일반인과 조직생검을 통해 확진된 보다 많은 대상을 통해, 더욱 연구가 되어야겠지만 본 연구에서 소개한 Conested polymerase chain reaction(Cn-PCR) 검사법은 전반적인 인유두종 바이러스를 검출하면서 동시에 specific primer pair를 사용하여 형결정이 가능한 방법으로서 특히 16, 18형은 자궁경부 이형성증의 예측인자로서 의미가 있고 비정상 세포 결과를 보이는

환자에서 즉각적인 후속 검사를 요하는 선별검사로써 가치가 있고 세포진검사의 위음성률을 줄일 수 있는 보조적 수단으로서 가치가 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

저자들은 인유두종 바이러스의 전체적 검출과 동시에 형(Type)을 분류할 수 있는 Cn-PCR을 소개하고, Hybrid capture법을 함께 시행하여 자궁경부 세포진검사와 조직검사에 따른 그 양성률을 비교하여 집단검진의 수단으로서 자궁경부암의 고위험군을 분류하고, 세포진검사의 한계점을 보완하는 수단으로서 유용한지 알아보기 위해 1995년 4월부터 9월까지 세포진검사를 위해 본원 산부인과 외래를 방문한 여성중 과거 자궁경부 병변과 관련하여 치료 받은 경험이 있는 여성을 제외한 298예와 이들 중 질확대경하 조직검사로 확진을 받은 167예를 대상으로 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 연구 대상 298예의 세포진검사 결과 분포는 정상 71, ASCUS 125, LSIL 38, HSIL 38, SCC 26 예였으며, 조직생검을 시행했던 167예의 조직진단별 분포는 정상 6, CIN I 28, CIN II 5, CIN III 33, SCC 25예였으며 ASCUS와 LSIL의 10%가 CIN II, III였으며 CIN II, III의 66%가 세포진단과 상관관계가 있었다.

2. Cn-PCR법에 의한 16, 18형 인유두종 바이러스 양성률은 세포진검사 결과에 따라 정상 7%, ASCUS 9.6%, LSIL 10.5%, HSIL 31.6%, SCC 65.4%로 등급에 따라 양성률이 증가하였으며( $P < 0.01$ )였으며, 조직검사 결과에 따라서는 정상 6.6%, CIN I, II, III 각각 14.3%, 40%, 36.4% SCC는 64%로 역시 양성 상관관계를 보였다( $P < 0.01$ ).

3. Hybrid Capture법에 의한 고위험 인유두종 바이러스 양성률은 세포진검사 결과에 따라 정상 7%, ASCUS, LSIL, HSIL, SCC 각각 39.2%, 55.2%, 60.5%, 96.2%였고 조직검사 결과에 따라서는 정상 36.8%, CIN I, II, III 각각 57.1%, 60%, 66.7%, SCC가 92%로 양성 상관관계를 보였으며( $P < 0.01$ ) 전반적으로 16, 18형보다 약 30%의 높은 양성률을 보였다.

4. 중증도 이형성증 및 침윤암에 대한 정확도를 비교하면 인유두종 바이러스 16, 18형은 민감도는



46%이나 특이도, 양성 예측도가 각각 91%, 85%이며 Hybrid capture법을 이용한 고위험 인유두종 바이러스는 민감도가 77%로 높지만 특이도, 양성 예측도가 58%, 51%로 나타나 중등도 이형성증과 침윤암의 예측 인자로서 16, 18형이 더욱 의미가 있으며 세포진검사와 복합 시행했을 때 민감도는 90%까지 향상 되었다.

결론적으로 Cn-PCR법은 인유두종 바이러스의 검출 및 분류가 동시에 가능한 방법이며, 세포진검사상 ASCUS, LSIL의 이상 소견을 보이는 여성에서 암발생의 고위험군을 예측하고 세포진검사의 위음성률을 줄이는 보조 수단으로서 유용할 것으로 사료된다.

### - References -

1. Beiby JOW, Broune R, Gulleband J, Steele ST : Paired cervical smear : a method of reducing the false negative rate in a screening population. *Obstet Gynecol* 1982;60:40-48.
2. Hakama M : Trends in incidence of cervical cancer in the Nordic countries : Causes and Practical Implications : 279-292. Hemisphere : New York.
3. IARC WORKING GROUP : Screening for squamous cervical cancer : Duration of low risk after negative results of cervical cytology and its implication of screening policies. *Br. Med. J*;293:659-664.
4. van der Granf Y, Vooijs GP : False negative rate in cervical cytology. *J. Clin. Pathol* 1987;410-437.
5. Yobs AR, Swanson RA, Lamotte LC : Laboratory reliability of the Papanicolaou smear. *Obstet Gynecol* 1985;65:235-243.
6. August N : Cervicography for evaluating the atypical Papanicolaou smear. *J. Repord Med* 1991;23: 1-4.
7. Giles JA, Hudson E, Crow J, Williams D, Walker P : Colposcopic assessment of the accuracy of cervical cytologic screening. *Br. Med. J* 1988;296:1099-1102.
8. Schneider A, Sawadda E, Gissmann L : Human papillomavirus in women with history of abnormal Papanicolaou smears and in their male partners. *Obstet Gynecol* 1987;69:554-562.
9. Wagner D, Ikenberg H, Boehm N : Identification of human papillomavirus nucleic acid in situ hybridization. *Obstet Gynecol* 1984;64:762-772.
10. Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ : Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCL* 1987;79:671-677.
11. Mitcell H, Drake M, Medley G : Prospective evaluation of cervical cancer after cytologic evidence of human papillomavirus infection. *Lancet* 1986;1:573.
12. Ryo Konno, Shinji Sato, Akita Yajima : Progression of squamous cell carcinoma of uterine cervix from cervical intraepithelial neoplasia infected with human papillomavirus : A retrospective follow-up study by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Int. J. of Gynecol Pathol* 1992;293:487-491.
13. Saiki RK, Glefand DH, Stoffel S : Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
14. Cox JT, Loricz AT, Schiffman MH, Sharman M, Kurman R : An evaluation of the use HPV testing in triage of women with ASCUS cytology to colposcopy. *Gynecol Oncol* 1993;in press.
15. A Farting, P Masterson, W P Mason, K H Vousden : Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. *J Clin Pathol* 1994;47: 649-652.
16. Pao CC, Lin CY, Maa JS, et al : Human papillomaviruses in cervicovaginal cells using polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1990;161:112-115.
17. Koutsky LA, Hilmes KK, Crutchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM : A cohort study of the relative risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N. Engl J Med* 1992;327:1272-1278.
18. Nastell K, Roger V, Nastell M : Behavior of mild cervical dysplasia during long term follow up. *Obstet Gynecol* 1986;67:665.
19. Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sharman M, Hussain M, Kurman R : An evaluation of human papillomavirus testing as part of referral to colposcopy clinic. *Am J Obstet Gynecol* 1992;80:389-395.
20. Reid R, Greenberg MD, Lorincz AT, Jenson AB, et al : Should cervical cytologic testing be augmented by cervicography or human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection? *Am J Obstet Gynecol* 1991;

- 164:1461-1471.
21. Mejer CJLM, van den Brule AJC, Snijders PJF : Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology : Possible implications for cervical cancer screening. Oxford University Press, New York. 1992;271-281.
22. Zur Hausen H, Meinhof W, Schreiber W, et al. : Attempts to detect virus specific DNA sequences in human tumors : Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. Int J Cancer 1974;13:650-656.
23. Kafatos FC, Jones CW, Estratiadis A : Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentration by a dot blot procedures. Nucleic acids Res 1979;7:1541.
24. Wagner D, Ikenberg H, Boehm N : Identification of human papillomavirus in cervical swabs by DNA in situ hybridization. Obstet Gynecol 1984;64:767-772.
25. Gupta J, Gendelman HE, Naghshfar Z, et al. : Specific identification of human papillomavirus type in cervical smears and paraffin sections by in situ hybridization with radioactive probes. Int J Gynecol Pathol. 1985;4:211-218.
26. Schneider A, Grunbert T : Diagnosis of human papillomavirus infection by recombinant DNA technology. Clin Obstet Gynecol 1989;127-140.
29. Anna-Lise Williamson, Edward P, Rybicki : Detection of genital human papillomaviruses by PCR amplification with degenerate nested primers. J Med Virol 1991;33:165-171.
30. Magnus E, Karin E, Elisabeth B, et al. : Comparison of a one-step and two-step PCR with degenerate general primers in population based study human papillomavirus infection in young Swedish women. Clinic Microbiol 1992;987-992.
31. Nagai N : Uterine cervical precancerous lesion with human papillomavirus. Obstet Gynecol Prac 1995;40: 449-455.
32. Young LS, Bevan IS, Jihson MA, et al. : The polymerase chain reaction : A new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. Br Med J 1989;298:14-18.
33. Tidy JA, Mason WP, Farrell PJ : A new and sensitive method of screening for human papillomavirus infection. Obstet Gynecol 1989;74:410-414.
34. 김승철, 김학순, 송주철 : 자궁경부종양(Cervical neoplasia)의 scrape 표본에서 중합 효소연쇄반응을 이용한 Human papillomavirus DNA의 검출. 충북의대학술지 1991;1:55-75.
35. 김재욱, 김동규, 오기석, 송찬호, 최의목 : 중합효소연쇄반응을 이용하여 정상 자궁경부 상피내 종양 및 침윤성 자궁경부암의 조직에서 Human papillomavirus DNA의 검출. 대한산부회지 1993;36:1864-1874.
36. 손효돈, 조영래, 전상식, 이택후, 유봉재, 정한일, 김문규 : 자궁경부 종양에서 중합효소 연쇄반응 기법을 이용한 인유두종 바이러스 Type 16 및 Type 18의 검출률과 예후인자와의 상관관계. 대부종결포회지 1994;3: 19-28.
37. Pasetto N, Sesti F, De Santis L, et al. : Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. Am J Surg Pathol 1989;13:221-224.
38. 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.
39. J Cuzick, G Terry, L Ho, et al. : Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. J Cancer 1994;69:167-171.
40. Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, et al. : Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. Am J Obstet Gynecol 1995;172 : 946-954.