



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

자궁경부도말에서 세포진 검사와
HPV DNA와의 연관성 고찰



2009년 2월

부경대학교 산업대학원

산업미생물학과

심 경 숙

이학석사 학위논문

자궁경부도말에서 세포진 검사와
HPV DNA와의 연관성 고찰

지도교수 김 군 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2009년 2월

부 경 대 학 교 산 업 대 학 원

산 업 미 생 물 학 과

심 경 숙

이 논문을 심경숙의 이학석사
학위논문으로 인준함

2009년 2월



주심 이학박사 최 태 진 (인)

위원 이학박사 김 영 태 (인)

위원 이학박사 김 군 도 (인)

목 차

Abstract	1
I. 서 론	3
II. 연구 대상	7
III. 연구 방법	8
1. 자궁경부 세포진 검사	8
2. HPV DNA 검사	8
3. 통계 분석	13
IV. 결과	14
1. 연령대별 분포	14
2. 자궁경부 세포진 검사결과	17
3. HPV DNA 검사 결과	20
4. 자궁경부 세포진 검사와 HPV DNA chip test의 결과비교	23
V. 고 찰	29
VI. 요 약	33
VII. 참고문헌	35

List of Table

Table 1. Oligonucleotid probes used HPV DNA chip Microarray	11
Table 2. Results of Pap smear from cervical smple in different age groups	18
Table 3. Result of Pap smear according to the menopausal status	19
Table 4. Results of HPV DNA detection from cervical smple in different age groups	21
Table 5. Result of HPV genotypes in HPV positive cases	22
Table 6. Comparison between cytology and HPV DNA detection to the menopausal status	24

List of Figures

Fig 1. Schematic presentation of Pap's stain & HPV DNA chip test.....	12
Fig 2. Age distribution of cervical sample	15
Fig 3. Distribution of Menopausal status in cervical sample	16
Fig 4. HPV DNA analysis in cervical sample	25
Fig 5. Cervical smear and HPV DNA chip test in HPV 53(+) case	26
Fig 6. Cervical smear and HPV DNA chip test in HPV 6, 56(+)case.....	27
Fig 7. Cervical smear and HPV DNA chip test in HPV 39,44,51(+) case.....	2

**Cytological screening and with HPV DNA comparison
researches from uterine cervical smear.**

Kyong-Sook Shim

*Department of Industrial Microbiology, Graduate School of
Industry Pukyong National University*

Abstract

Cervical cancer and its precursors are caused principally, if not exclusively, by HPV infection and HPV DNA is found in more 90% of cervical cancers. cervical cytology is limited by its false negative and this may be supplemented by other adjunctive as a primary or supplementary screening method and to determine whether HPV typing can be used as a predictor of a lesion's clinical behavior. Human papillomavirus (HPV) has been identified more than 100 HPV subtypes. the distributions of subtypes are different according to nations and regions.

This study was cervical cytology test and HPV DNA chip test for HPV detection were performed in undertaken from October 2006 to December 2007 the sample were collected from the 1,786 asymptomatic women visited Health Care Center in Busan "B" Hospital and none of whom was believed to have current cervical disease.

The Cytology results was classified by The Bethesda System : 1,767(98.9%)

women were classified to normal category, only 19(1.1%) abnormal category, and 1,323(98.8%) Premenopausal women were classified to normal category, only 16(1.2%) abnormal category.

The HPV DNA chip result among the 1,767 women with normal cytology, 287(16.2%) women showed HPV DNA positive. Among the 19 women with abnormal cytology, 13(68.5%) women showed HPV DNA positive. HPV subtypes were detection high risk HPV -16, 53, 58, 18, 54, 33 types in descending order of incidence and prevalence. HPV subtype were detection low risk HPV -70, 6, 11 types in descending order of incidence and prevalence. Mass study and integrated data from large population and various regions in many hospital will be needed. And the supplementary use of HPV DNA chip test may provide clinical usefulness because it can reduce the false negative rate of Pap smear and improve the positive predictive value in the detection of high grade cervical lesion and it enables to decrease the incidence of cervical cancer.

I. 서론

자궁경부암은 우리나라 여성암 중 수위를 차지하고 있으며, 그 발생빈도는 최근 감소하는 추세이나, 한국 중앙 암등록 사업처의 통계 자료에 따르면 2001년 자궁경부암 발생은 전체 여성암중 3위를 차지하였고 이는 전체 여성암의 10.1%를 차지하고 전암 단계인 상피내 암 (Intraepithelial neoplasm)을 합하면 아직도 자궁경부암은 여성에서 발생하는 암중에서 가장 많은 빈도를 차지한다고 한다(1).

자궁경부암 발생의 가장 중요한 원인 인자는 인유두종 바이러스(Human Papilloma Virus : 이하 HPV)로 알려져 있으며, 이의 발병요인으로 성적접촉, 조기 성경험, 다수의 성 상대자 등과의 연관성은 역학조사에 의해 밝혀졌고, 그 외 흡연, 호르몬복용, Herpes simplex virus, Cytomegalovirus 감염 등도 외적 요인으로 보고 되고 있다. 특히 침윤성 편평상피 세포암 환자의 95%가 HPV 양성으로 알려져 있다(2,3,4,5).

HPV가 자궁경부암의 주요원인으로 밝혀진 이후 지금까지 85종에 달하는 유전형(genotype)의 염기서열이 완전히 밝혀져 있으며 120여개의 새로운 HPV 유전형 구조가 부분적으로 보고 되고 있다(6,7). HPV는 병소의 위치와 병변의 진행도에 따라 각각 특이한 HPV 유전형이 선택적으로 발견되어 HPV 감염의 생물학적 특징의 다양성을 인식하게 되었고, 그 정도에 따라 고위험군 HPV(high-risk HPV)인 -16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66, -68, -69와 저위험군 HPV(low-risk HPV)인 -6, -11, -34, -40, -42, -43, -44로 구분(8,9) 할 수 있으며 저위험군 HPV는 일과성 감염으로서 시간이 지나면 저절로 소멸되는 경우가 많지만, 일

부의 고위험군 HPV의 경우 지속적인 감염상태를 유지하여 자궁경부암을 유발시키는 것으로 알려져 있다(10). 자궁경부 전암 병변에서 침윤 암으로의 전환에 주요한 위험인자로는 HPV의 아형과 변형군, 바이러스 부하(load) 등의 바이러스 인자, 흡연, 고출산, 경구 피임약, 성병, 식이 요인 등의 환경인자, 내재성 호르몬, 면역 반응, 유전적 소인 등의 숙주관련 인자가 중요한 보조인자(cofactor) 역할을 하는 것으로 알려져 있다(11).

HPV 감염율은 인종간, 국가간에 차이를 보이며 HPV 18형에 감염된 경우 예후가 가장 불량한 것으로 보고 되고 있다(12,13). 16번과 18번 HPV에 감염되면 HPV DNA 안에 존재하는 발암성분이 체내의 암 억제 유전자와 결합해 억제기능을 파괴함으로써 자궁경부암을 일으키게 된다. HPV 감염 후 3-9개월이 지나면 HPV에 의한 조직학적 변화가 나타나고, 평균 1년 6개월 후에 경증의 이형성증으로 발전하며, 2년 후에는 중증의 이형성증이 나타나며, 자궁 상피내암까지는 약 5-6년이 소요되는 것으로 알려져 있다. 특히 특정 유전형(genotype)의 HPV에 감염된 경우 종양으로 진행할 가능성은 높아진다(14,15).

통상 부인암 검사로 알려진 자궁경부 세포진검사(Pap's stain)는 자궁경부로부터 얻은 검체를 유리 슬라이드에 도말, 고정한 후 염색하고 그들 세포의 형태학적 성상을 광학현미경하에서 체계적 보고양식인 The Bethesda System(TBS)의 분류기준에 의해 세포의 양성, 악성변화와 염증성 변화 등을 감별하여 조기 자궁암의 식별 및 virus 감염 등을 초기에 진단, 치료에 도움을 주는 Screening 검사법이다(16). 이 검사법은 유용한 선별검사이나 검체의 채취방법, 채취자의 숙련도, screening 등의 과정에서 위음성률의 문제가 있으며 도말된 slide 단면만 보여 짐으로 범위가 제한적이다. 이의 단점을 보완하기위해 질 확대경검사, 조직학적 검사 등을 시행하고 있으며, 세포진 검사의 보조적 수단으로 민감도가 뛰어난 분자생물학적 기법의 하

나인 HPV DNA 검사법이 시행되고 있다(17).

HPV를 검출하는 통상적인 방법으로는 Southern & Northern 블로팅 교잡법(Southern & Northern blotting hybridization), 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction), DNA-RNA 교잡법 (DNA-RNA Hybrid Capture)등이 있으나, 이들 방법은 HPV를 고위험군 (high risk group), 저위험군(low risk group)으로만 분류할 뿐 정확한 유전형 판별이 불가능하다(18,19,20,21).

HPV DNA chip 검사법은 Microarray chip을 적용한 것으로 Lysin이 코팅된 유리 슬라이드에 HPV 유전자형별 특이 올리고를 부착시키고 baking과 세척과정을 통해 유전자 칩을 제작하고 올리고 염기와 상보적인 염기서열을 증폭시킬 수 있는 형광물질(Cy5)이 있는 primer를 이용하여 환자의 자궁경부에서 추출된 인유두종 virus의 유전자를 증폭시켜 증폭물과 유리 슬라이드에 부착된 HPV 특이 올리고와 교잡 결합시켜 그 결합유무를 스캐너 장비를 사용하여 측정한다(22,23).

DNA chip 검사는 단순히 하나의 형광물질만을 사용하여 바이러스 감염여부만을 측정하는 정성적 방법으로 24 type을 detection 해줌으로 신속. 정확하게 HPV의 감염 여부와 유전형을 동시에 파악가능하며, 그 외 중복감염여부와 경제성, 신속성, 높은 sensitivity를 갖고 있으며 자궁경부암의 조기 진단 예방 치료에 도움을 주는 검사법으로 경미한 병변 또는 발현도 낮은 병변에서 놓칠 수 있는 심각한 병변을 내포한 환자를 선별해냄으로써 자궁암 검사의 예민도를 증가시킬 수 있다(24,25). 특히 35세 이후의 여성에서 자궁경부세포진 검사와 더불어 HPV 유형검사가 동시에 이루어져 고위험군을 선별해냄으로써 그들에 대한 추적조사 또는 적극적인 치료를 하게하고 나머지 집단에서는 불필요한 치료를 막게 할 수 있다(26,27).

본 연구에서는 건강검진을 위해 내원한 여성을 대상으로 자궁 세포진 검

사와 자궁경부암의 원인 인자로 알려진 HPV 검사를 동시에 시행하여 전구병변의 선별검사로서의 상호 연관성을 규명하고, HPV genotyping을 통한 고위험군과 저위험군을 식별해 봄으로 그 효율성을 고찰하고자 하였다.



II. 연구 대상

2006년 10월부터 2007년 12월까지 부산시 소재 B병원 건강증진센터를 방문한 여성의 자궁 경부 세포진 검사와 인유두종 바이러스(Human Papilloma Virus, HPV)에 대한 DNA chip 검사를 모두 시행한 여성 1,786명을 대상으로 하였다. 특별한 소견없이 건강검진을 위해 내원하였고, 대상자들의 연령 분포는 23세에서 75세로 평균 42세였고, HPV 발병 확률이 높은 30-40대가 주를 이룬다.



III. 연구 방법

본 연구를 위해 자궁경부 찰과물을 이용해 자궁경부 세포진 검사(Pap stain)와 HPV DNA 검사(HPV DNA chip test)를 각각 시행하였고 검사방법을 도해하였다 (Fig. 1).

1. 자궁경부 세포진검사 (Pap's stain)

특수 제작된 Cytobrush를 사용하여 자궁 경부로부터 얻은 검체를 유리 슬라이드에 도말한 후 즉시 95% ethyl alcohol에 담구어 고정하였다. 핵 염색 위해 Harris Hematoxylin I(YD, Korea), Harris Hematoxylin II(YD, Korea) 동량 혼합액에 5분간 처리하였다. 흐르는 물에 10분 세척 후 세포질 염색을 위해 Orange G 6(YD, Korea)와 Eosin Azuer 50(YD, Korea)에 각각 3분씩 처리하였고 탈수, 청명을 거친 후 봉입제(Permount)로 봉입하였다. 판독은 1991년 개정된 The Bethesda System (TBS) 보고 양식으로 분류하였다.

2. HPV DNA chip 검사

(1) DNA 추출

HPV 감염 및 그 아형의 검사를 위해 DNA Extraction Kit (Mygene)를

사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 과정은 Cytobrush를 사용하여 채취한 검체를 collection tube에 넣어 냉장보관 하였고, 실험시 냉장고에서 꺼낸 후 DNA 분리를 위해 tube를 강하게 10초간 vortexing하여 brush로부터 검체를 떼어냈다. 검체를 500~1000 μ l를 취하여 1.5ml 혈청 분리관에 넣어 6000-9000rpm 10분간 원심하여 pellet을 침전시킨 후 상층액을 제거하였다. 1X 세척 완충액 1.0ml를 넣고 vortex로 혼합 후 6000-9000rpm에 5분간 원심시켜 세척하였다. (2회 실시) DNA Extraction buffer (Mygene) 200 μ l를 잘 섞어 넣고, 50 $^{\circ}$ C 항온수조에서 3시간 이상 반응 후 90-100 $^{\circ}$ C에서 20분간 가열했다. 14,000rpm 10분간 원심하여 분리된 상층액을 150 μ l를 취하여 PCR에 사용하였다.

(2) 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

추출된 DNA를 주형으로 하여 HPV의 선별(screening)과 95 $^{\circ}$ C PCR을 수행하기 위해 PCR Kit (Mygene)를 이용하여 2개의 mixture를 준비하였다. β -globulin은 DNA 증폭여부를 판단하기 위해 control로 사용하였으며, probe와 반응할 target DNA는 HPV의 genotyping을 위해 specific oligonucleotid primer를 사용하였다(Table 1).

PCR에 의한 유전자 증폭 과정의 1차 PCR은 0.2ml PCR tube에 분리된 DNA 5.0 μ l 와 premix I (2% agarose 450bp)와 premix III (2% agarose 250bp) 7.0 μ l, Taq polymerase 0.3 μ l, D.W 12.7 μ l을 Total volum 20 μ l되게 섞은 후 PCR machine (Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystems. USA)이용하여 95 $^{\circ}$ C 15분간 predenaturation시킨 후 denaturation (95 $^{\circ}$ C 30초), annealing (55 $^{\circ}$ C 30초), extension (72 $^{\circ}$ C 3분)의 과정을 35주기 수행하였다.

2차 PCR은 1차 PCR에서 얻은 DNA 2.0 μ l와 premix II (2.5% agarose

150bp) 6.5 μ l, Taq polymerase 0.3 μ l, D.W 12.7 μ l을 total volum 23 μ l 되게 섞은 후 PCR machine(Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystems. USA) 이용하여 1차 PCR 과정과 동일한 과정을 20주기 수행하였다. 충분한 증폭을 위해 마지막으로 72 °C에서 3분간 반응한 후 HPV PCR 반응산물 10 μ l와 β -globulin PCR 반응산물 10 μ l를 취하여 0.5g/ml ethidium bromide (EtBr) 용액에 염색하여 2% agarose gel상에서 전기영동한 후 자외선 (UV illuminator, VILBER LOURMAY) 하에서 DNA증폭 산물을 확인하였다(Fig 4).

(3) 교잡반응 및 검출 (hybridization & detection)

HPV PCR 반응산물 10 μ l, β -globulin PCR 반응산물 5 μ l를 취하여 95°C에서 5분간 denaturation 한 후 hybridization buffer Kit (Mygene) 30 μ l를 혼합하여 각 well에 분주하여 Scotch tape로 고정 후 43°C에서 1~3시간 hybridization 하였다.

Hybridization이 끝나면 slid는 hybridization seal을 제거하고 세척 후 실온에서 건조시켜 Laser Scanning (Scanner array lite, Perkin Elmer Life Sciences. USA) 한 후 결과를 분석하였다.

Table 1. Oligonucleotide probes used HPV DNA chip
Microarray

HPV type	Oligonucleotide probes	Location
6	5' GCT AAA TTG TAC GTG GAA GG 3'	548–567
11	5' TGC ATG GAA GAC TTG TTA CC 3'	545–564
16	5' AAA CCC AGC TGT AAT CAT GC 3'	559–578
18	5' AGA CAC CAA TGA AAA ACG AC 3'	487–506
31	5' AAG ACC TCG TAC TGA AAC CC 3'	544–563
33	5' AGA GAA ACT GCA CTG TGA CG 3'	554–573
35	5' GTA GAG AAA CCG AGG TGT AA 3'	555–574
52	5' TGA CCC AAG TGT AAC GTC AT 3'	549–568
58	5' CTG TGC AGT GTG TTG GAG AC 3'	528–547

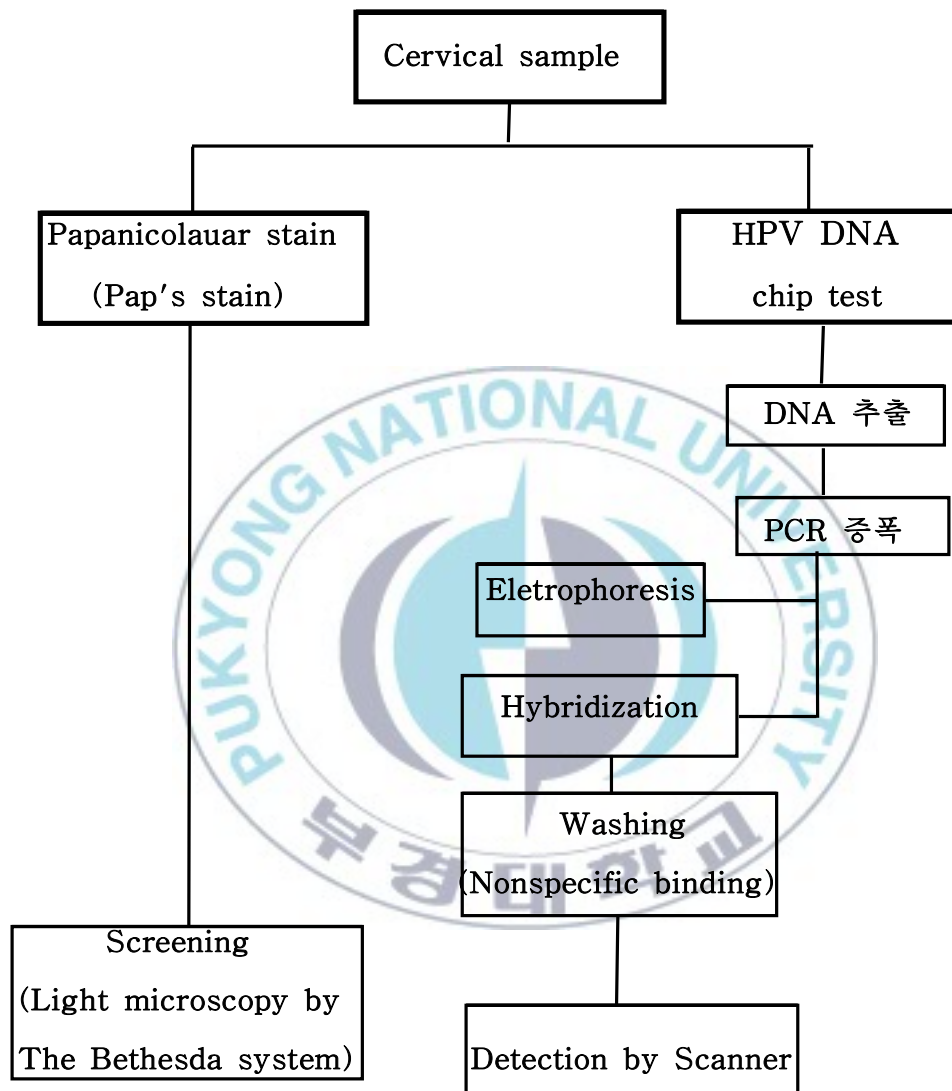


Fig 1. Schematic presentation of Pap's stain & HPV DNA chip test

3. 통계분석

본 연구결과의 통계학적 분석을 위해 MedCalc ®(Version 8.2.0.3)을 사용하였으며, 폐경을 전, 후하여 세포진검사 결과를 정상군과 비정상군 두개의 군으로 분류한 후, 두 군사이의 HPV 검출율을 고위험군 HPV와 저위험군 HPV로 나눠 비교 분석하였으며, 자료는 Cochran Mantel Haenszel chi-square test를 이용하여 통계처리 하였다. P값이 0.05미만인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.



IV. 결 과

1. 연령대별 분포

건강 증진센터로 내원한 여성 1,786명을 대상으로 세포진 검사와 HPV DNA chip 검사를 동시에 실시하였다. 이들 대상자의 연령은 23세에서 75세로 다양하였고, 평균 42세였다. 연령별분포는 20대가 58명(3.3%), 30대가 486명(27.2%), 40대가 771명 (43.2%), 50대가 381명(21.3%), 60대 이상이 90명(5.0%)이었고, 주목할 만 한 점은 HPV 발병 확률이 높은 30-40대가 주 층을 이루고 있었다(Fig. 2). 폐경을 전, 후한 대상자의 분포는 폐경 전 대상자가 1339명(75%)이었고, 폐경 후 대상자가 447명(25%)으로 폐경 전 대상자가 주를 이루고 있었다(Fig. 3).

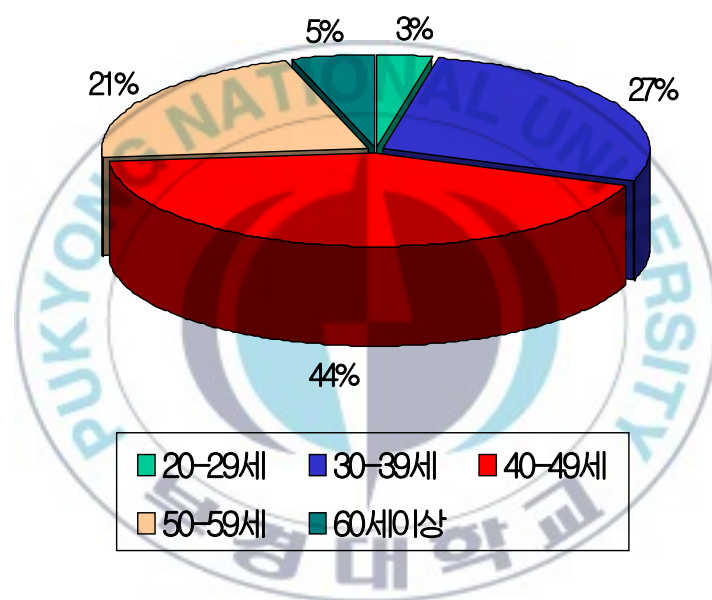


Fig 2. Age distribution of cervical sample

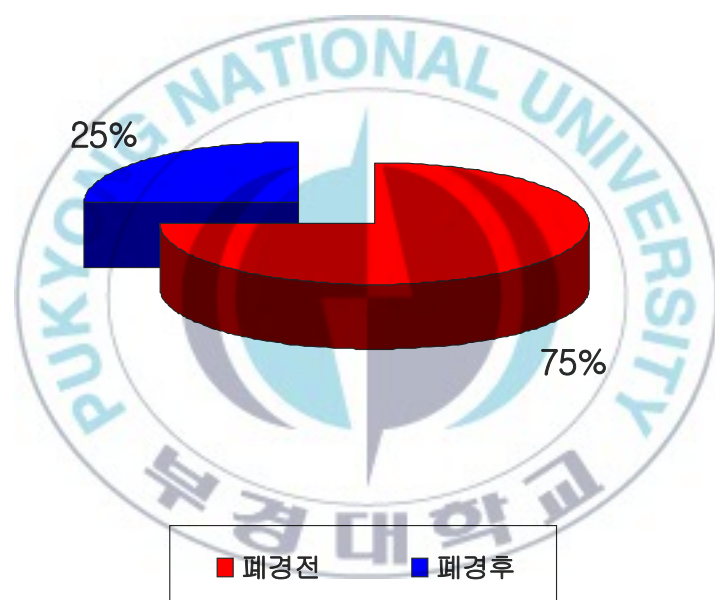


Fig 3. Distribution of Menopausal status in cervical sample

2. 자궁경부 세포진 검사

건강 증진센터로 내원한 여성 1,786명의 세포진 검사 결과는 TBS(The Bethesda System)의 분류체계를 사용하여 판독했으며 전 대상자중 WNL 1,308명(73.2%), BCC 459명(25.7%), ASCUS 7명(0.4%), LGSIL 7명(0.4%), HGSIL 4명(0.2%), SCC 1명(0.1%)이었다(Table 2). 폐경 전 여성 1,339명의 세포진 결과는 정상범주 956명(72.4%), 염증 367명(26.4%), ASCUS 5명(0.4%), LGSIL 7명(0.5%), HGSIL 4명(0.3%) 이었고, 폐경 후 여성 447명의 세포진 결과는 정상범주 342명(76.5%), 염증 102명(22.8%) ASCUS 2명(0.4%), SCC 1명(0.3%)이었다.

이들을 WNL와 BCC(Benigne Cellular Change)을 정상군으로 ASCUS, LGSIL, HGSIL, SCC를 비정상군으로 분류하였으며, 전체 대상자 1,786명 중 정상군이 1,767명(98.9%)이었고, 비정상군이 19명(1.1%)이었다. 폐경을 전, 후한 세포진 결과는 폐경 전 여성 1,339명중 1,323명(98.8%)이 정상군이었고, 16명(1.2%)이 비정상군이었으며, 폐경 후 여성 447명중 444명(99.3%)이 정상군이었고, 나머지 3명(0.7%)이 비정상군이었다(Table 3).

Table 2. Results of Pap smear from cervical smple
in different age groups

Age	WNL	BCC	ASCUS	LGSIL	HGSIL	SCC	Total
20-29	50	8	0	0	0	0	58 (3.3%)
30-39	339	144	1	1	1	0	486 (27.2%)
40-49	563	195	4	6	3	0	771 (43.2%)
50-59	290	88	2	0	0	1	381 (21.3%)
over 60	66	24	0	0	0	0	90 (5.0%)
Total	1,308 (73.2%)	459 (25.7%)	7 (0.4%)	7 (0.4%)	4 (0.2%)	1 (0.1%)	1,786 (100%)

Table 3. Result of Pap's smear according to the menopausal status

Age	Normal group	Abnormal group	Total
Premenopause	1,323(98.8%)	16(1.2%)	1,339(100%)
postmenopause	444(99.3%)	3(0.7%)	447(100%)
Total	1,767(98.9%)	19(1.1%)	1,786(100%)

* Normal Category

- WNL(within normal limit)
- BCC(Benign cellular change)

* Abnormal Category

- ASCUS(atypical squamous cell undetermined significant)
- LGSIL(low grade squamous intraepithelial lesion)
- HGSIL(high grade squamous intraepithelial lesion)
- SCC(squamous cell carcinoma)

3. HPV DNA chip 검사

전체 연구 대상자 1,786명의 HPV DNA chip (24 typing)검사 결과는 HPV 양성 300명(16.8%), HPV 음성 1,486명(83.2%)였으며, 폐경을 전, 후한 HPV 결과는 폐경 전 여성에서 HPV 양성 232명(17.3%), HPV 음성 1,107명(82.7%)였고, 폐경 후 여성에서 HPV 양성 68명(15.2%), HPV 음성 379명(84.8%)였다(Table 4).

전체 HPV 양성 300예의 HPV DNA genotyping은 218예가 고위험군 HPV로 72.6%였고, 34예가 저위험군 HPV로 11%였으며, 48예가 미분류 HPV로 16.4%였다. 이중 42예는 중복감염(double, triple)이 포함되어 있다(Fig. 5, 6, 7). 폐경 전 여성의 HPV 양성 232예의 HPV genotyping은 고위험군 HPV가 169예(72.8%), 저위험군 HPV가 30예(12.5%), 미분류 HPV가 33예(14.7%)였으며, 폐경 후 여성의 HPV 양성 68예중 고위험군 HPV가 49예(72%), 저위험군 HPV가 34예(5.9%), 미분류 HPV가 15예(22.1%)였다. 특히 고위험군 HPV의 genotype중 예후가 가장 불량한 HPV 16 type이 59예로 가장 많았고, 53, 58, 18, 54, 33 순으로 많았으며, 저위험군 HPV의 genotyping은 70, 6, 11 순으로 많았다(Table 5).

Table 4. Results of HPV DNA detection from cervical smple in
different age groups

Age	HPV positive	HPV negative	Total
20-29	15	43	58(3.2%)
30-39	70	416	486(27.2%)
40-49	143	628	771(43.2%)
50-59	60	321	381(21.3%)
over 60	12	78	90(5.1%)
Total	300(16.8%)	1,486(83.2%)	1,786(100%)
Premenopause	232(17.3%)	1,107(82.7%)	1,339(100%)
Postmenopause	68(15.2%)	379(84.8%)	447(100%)

Table 5. Result of HPV genotypes in HPV positive cases

HPV Genotyping	premenopause (n=232)	postmenopause (n=68)	Total (n=300)
High risk HPV	169(100%)	49(100%)	218
HPV16	42(24.9%)	17(34.7%)	59
HPV53	25(14.8 %)	6(12.2%)	31
HPV58	21(12.4%)	5(10.2%)	26
HPV18	20(11.8%)	4(8.2%)	24
HPV54	12(7.1%)	3(6.1%)	15
HPV33	11(6.5%)	2(4.1%)	13
Other	38(22.5%)	12(24.5%)	50
Low risk HPV	30(100%)	4(100%)	34
HPV70	15(30%)	1(25%)	16
HPV6	6(20%)	1(25%)	7
HPV11	5(16.7%)	0(0%)	4
Other	4(13.3%)	2(50%)	6
미분류 HPV	33	15	48

*High risk HPV : -16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66,
68, 69 type

Low risk HPV : -6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 70 type

미분류 HPV : Mygene HPV DNA chip kit - detection type 24종
이외의 type

4. 자궁경부 세포진 검사와 HPV DNA chip test의 결과 비교

세포진 검사와 HPV DNA chip 검사의 결과를 비교 분석하면, 세포진 검사에서 정상군(WNL, BBC)에 속한 1,676명의 폐경을 전, 후한 결과를 보면 폐경 전 여성 1,323명의 HPV DNA 결과는 HPV 양성이 222예(16.8%), HPV 음성이 1101예(83.2%)였고, HPV 양성에 중 고위험군 HPV가 161예로 72.5%를 차지하였다. 폐경 후 여성 444명의 HPV DNA 결과는 HPV 양성이 65예(14.6%), HPV 음성이 379예(85.4%)였으며, HPV 양성에 중 고위험군 HPV가 46예로 70.8%를 차지하였다.

세포진 검사에서 비정상군(ASCUS 이상)에 속한 19명의 폐경을 전, 후한 결과를 보면 폐경 전 여성 16명의 HPV DNA 결과는 HPV 양성이 10예(62.5%), HPV 음성이 6예(37.5%)였으며, HPV 양성에 중 고위험군 HPV가 8예로 80%를 차지하였고, 폐경 후 여성 3명의 HPV DNA 결과는 모두 HPV 양성이었으며, 고위험 HPV로 밝혀졌다(Table 6).

Table 6. Comparison between Cytology and HPV DNA detection to the menopausal status

HPV Genotyping	Cytologic Screening			
	Normal (n=1,676)		Abnormal (n=19)	
	premenopause (1,323)	postmenopause (n=444)	premenopause (n=16)	postmenopause (n=3)
HPV(+)	222(16.8%)	65(14.6%)	10(62.5%)	3(100%)
High risk HPV	161(72.5%)	46(70.8%)	8(80%)	3(100%)
low risk HPV	29(13.1%)	4(6.1%)	1(10%)	0(0%)
Unknow HPV	32(14.4%)	15(23.1%)	1(10%)	0(0%)
HPV(-)	1101(83.2%)	379(85.4%)	6(37.5%)	0(0%)

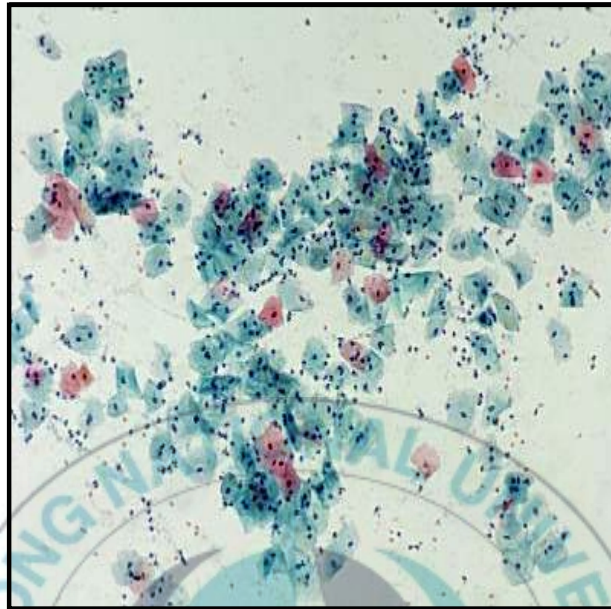


Fig 4. HPV DNA analysis in cervical sample

M : DNA size marker , β -globin (250bp)

Lane 1 to 17 : HPV DNA product (1, 12, 13 positive)

A



B

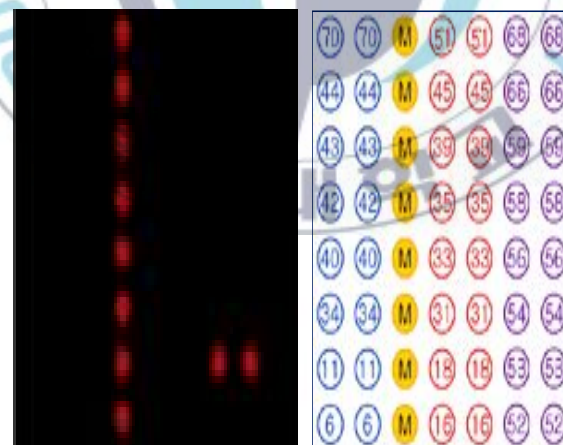
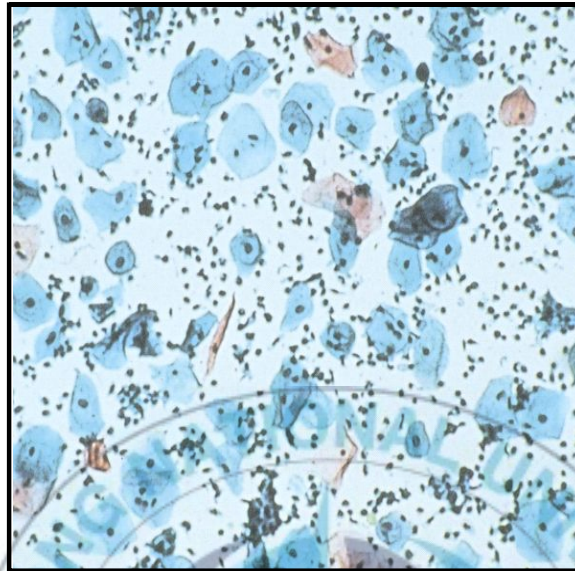


Fig 5. Cervical smear and HPV DNA chip test in HPV 53(+) case

A : ASCUS(HPV-related) of cervical smear

B : HPV DNA chip test with single infection(genotype 53)

A



B

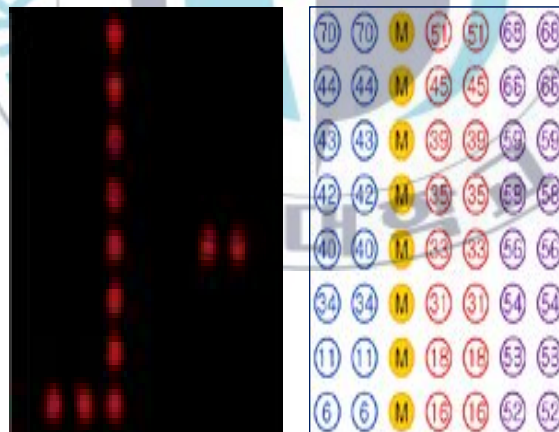
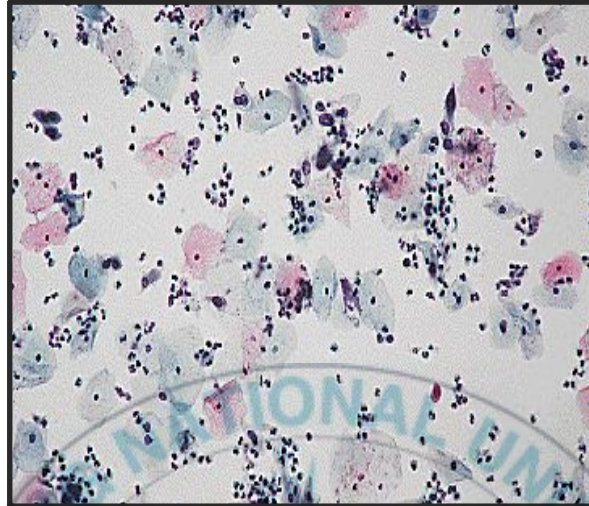


Fig 6. Cervical smear and HPV DNA chip test in HPV 6,56(+) case

A : ASCUS(HPV-related) of cervical smear

B : HPV-DNA chip test with double infection (genotype 6, 56)

A



B

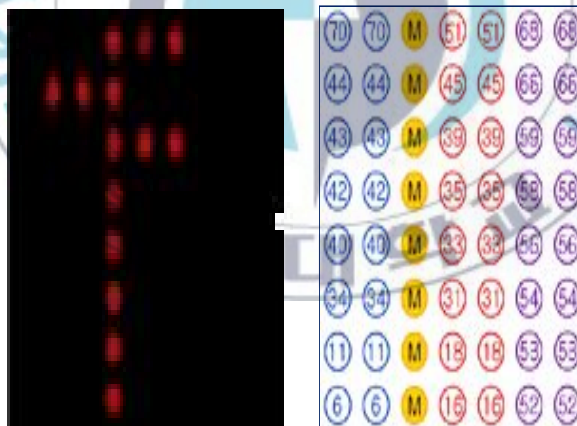


Fig 7. Cervical smear and HPV DNA chip test in HPV 39,44,51(+)

Case

A : ASCUS(HPV-related) of cervical smear

B : HPV DNA chip test with triple infection(genotype 39,44,51)

V. 고 찰

인유두종 바이러스는 침윤성 자궁경부암 환자의 95%에서 검출되었고, 자궁경부암이나 그의 전구병변의 발생 단계에 거의 필수적으로 나타난다. 또 현재 자궁경부 내에 병변은 없으나 HPV에 감염되었다면 향후 자궁경부암이 발생할 위험이 높아진다. 세포진 검사법은 자궁경부암의 선별 검사 중 가장 간단한 진단법으로 만족할만한 결과를 임상에 제공해줌으로 그 신뢰성이 높다 하겠다. 이들 세포진 검사법은 세포를 채취, 염색하여 상피세포의 특징적 변화를 그 판정 기준에 따라 진단하는 방법이다. 판정 기준은 세계적으로 통용되고 있는 보고체계인 TBS(The Bethesda System)에 기준하며, 본 연구에서는 분류 기준상 정상범주(With in normal limit), 양성 세포변화(Benign Cellular Change) - 트리코모나스, 진균류 등의 감염성 질환 및 위축, 방사선치료, 자궁내 피임 장치 등에 의한 반응성변화 - 를 정상군으로 하였고, ASCUS(Atypical Squamous Cell of undetermined), LGSIL, HGSIL, SCC를 비정상군으로 하여 두개 군으로 나눠 조사하였다. 인유두종 바이러스(Human Papilloma Virus : HPV)를 분자 생물학적으로 증명하는 방법으로는 지금까지 알려진 Southern & Northern 블로팅 교잡법(Southern & Northern blotting hybridization), 중합효소연쇄반응법(Polymerase Chain Reaction), DNA-RNA 교잡법(DNA-RNA Hybride Capture)등의 방법들이 있으나, 이들 방법은 HPV가 고위험군(high risk group), 저위험군(low risk group)으로만 분류할 뿐 정확한 유전형 판별이 불가능하다. 본 연구에 사용된 방법은 이들 방법과는 달리 한 장의 유리판 위에 수만 종류의 유전자를 동시에 검사할 수 있는 유전자 칩(DNA chip)을 이용하여 수십 종의 HPV 유전자형(24 type)을 동시에 검사하고 분석

가능한 Kit을 사용하였고, 이는 한 번의 실험으로 보다 간편하고 정확하게 HPV 감염 여부와 유전형을 동시에 파악할 수 있다는 장점을 갖고 있어 자궁경부암이나 전암병변의 연관성에 관한 연구 등에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 무증상 건강 검진 환자를 대상으로 하여 선별검사인 세포진검사와 HPV DNA 검사를 동시에 시행하였고 두 검사법간의 유용성을 비교해 보고자 하였다. 연구 대상자 1,786명을 폐경을 전, 후하여 두부류로 나눠 조사하였으며, 세포진 검사에서 정상 혹은 양성 핵 변화(Benign cellular change) 보이지만 HPV DNA 검사에서 양성으로 검출되는 비율을 비교해 보고, 고위험 HPV 유전형들을 규명하였다. 조사 대상 연령층은 23세에서 75세로 다양했으며, 평균연령이 42세로 자궁암으로의 진행 초기병변으로서의 그 의미가 크며, HPV 발병 확률이 높은 30-40대가 주를 이루었고, 이들 대부분은 임상 증상 없었으며, 자궁암 및 HPV 감염여부, 조기예방을 위해 내원하였다. 본 연구의 세포진 검사 결과는 전체 대상자 1,786명중 1,767명(98.9%)이 정상군에 속하였으며 비정상군은 19명으로 단지 1.1%였다. 또 폐경 전 여성 1,339명중에서도 1,323명(98.8%)이 정상군이었으며, 소수인 16명이 비정상군으로 1.2%만이 속해 임상적 의의 없음을 보여주었다. 이는 또 다른 측면에서 볼 때 세포진 검사의 함정인 검체 채취시 숙련도 미숙으로 인해 병변을 간과하였거나, 현미경 판독시 HPV 감염 등으로 인한 경미한 세포변화의 인지불능 등으로 인해 위 음성의 결과를 산출하였을 가능성을 배제할 수 없음을 보여주었다. 그러므로 자궁경부암에 대한 선별검사로서의 세포진 검사는 편리함, 낮은 비용, 높은 특이도 등 여러 가지 면에서 그 유용성이 인정되나 반면에 주관적인 판독, 높은 위 음성율로 인하여 전암 단계의 병변을 놓침으로 문제점을 야기하기도 하였다. 세포진 검사는 자궁경부암에 대한 민감도가 60-80%인데 비해 HPV 검사는

민감도가 92%이고, 이들 방법을 병행하였을 때는 민감도가 95-100%라는 보고에서 보듯이 세포진 검사에 대한 보조적 수단으로 HPV 감염 여부를 밝히는 것이, 임상적인 위음성을 줄이는 최선의 방법이라 하겠다.

HPV DNA chip 검사 결과는 전체 대상자 1,786명중 300명(16.8%)이 HPV 양성 반응 보였고, 세포진 검사결과에서 정상군에 속한 1,767명중 287(16.2%)예가 HPV 양성 반응 보였고, 세포진검사결과 비정상군 19명중 13(68.4%)예가 양성 반응 보였다. 이는 세포진 검사가 위음성의 결과를 내포함을 시사한다 하겠다. 또 폐경을 전, 후한 HPV 결과는 폐경 전 여성에서 세포진 검사결과 정상군 1323명중 HPV 양성이 16.8%, 세포진 검사결과 비정상군 16명중 HPV 양성이 62.5%였다. 폐경 후 여성에서 세포진 검사결과 정상군 444명중 HPV 양성이 14.6%, 세포진 검사결과 비정상군 3명 모두는 HPV 양성으로 밝혀졌다. 위에서 폐경 전 여성에서 폐경 후 여성에서 보다 HPV 양성율이 다소 높게 나타남을 알 수 있었고, 특히 폐경 후 여성의 세포진 결과 비정상군 모두에서 HPV 양성소견 보임을 알 수 있었다. 이는 자궁경부암으로 진행에 HPV가 주요함을 다시 한번 보여준다 하겠다.

위 연구 결과로 볼 때 세포진 검사 후 HPV DNA 검사를 보완적으로 시행하면, 세포진 검사시 검체 채취시 숙련도 미숙, 주관적 판독, 경미한 세포 변화에 대한 인지불등 등으로 인한 위음성율을 감소시키고 불필요한 생검을 줄일 수 있다. 세포진 검사를 보완하기위한 보조적 선별검사로서의 HPV DNA 검사의 이용은 앞으로 지속적인 연구가 되어야 하겠지만 본 연구에서 자궁경부암의 선별검사로 세포검사만 하게 된다면 높은 위음성율 때문에 상당수의 고등급 병변을 간과할 가능성이 높아지는 반면 HPV DNA 검사를 보조적으로 시행하여 고위험군 HPV를 검출한다면 신속한 진단 및 적절한 처치로 자궁경부암을 낮추는데 유용성이 있다고 생각된다.

또한 HPV DNA chip 검사에서 HPV 양성 300예 중 고위험군 HPV가 218(72.6%)예로 의의 있게 검출되었으며, 아형들의 분포와 감염빈도를 조사한 결과에서 HPV -16형이 59예로 가장 많았다. HPV -16형이 전 세계적으로 가장 많은 빈도인 것은 국내, 외 여러 보고들에서와 일치를 보였지만 그다음 빈도부터는 상당한 차이를 나타내었다. 본 연구의 HPV 아형 결과에서는 HPV -53, 58, 18, 54, 33형 순으로 많았고, 이것은 전 세계적으로 알려져 있는 HPV -16, 18, 31, 33형의 빈도순과는 상당한 차이를 보였다. 국내 HPV 아형 빈도에 관한 연구에서 Kim등은 자궁경부의 고등급 병변 이상의 군에서 HPV -16, 58형의 순이었고, Park등은 모든 표본에서 HPV -16, 18, 58형의 빈도로, Hwang등은 다양한 자궁경부 조직에서 HPV -16, 58, 18, 33, 31, 52형 순으로 검출되었다고 하였다.

본 연구결과로 세포진 결과상 정상군에 속하더라도 HPV DNA 검사를 보조적으로 시행하면 세포진 검사에서의 높은 위음성율을 낮추고, HPV의 아형을 밝혀 고등급 병변에 대한 예측 및 신속한 처치가 가능하여 궁극적으로 자궁경부암의 발생율을 줄이는데 효과적일 것으로 생각된다. 그러나 높은 검사 비용의 문제가 선결되어야 할 과제로 이에 관한 연구가 계속적으로 수행되어야 할 것이다.

VI. 요약

자궁경부암은 여성암중 수위를 차지하고 있으며, 자궁경부암 발생의 가장 중요한 원인인자로서 인유두종 바이러스(Human Papilloma Virus)가 알려져 있다. 자궁경부암의 1차적인 선별검사로 널리 알려진 세포진 검사는 유리 Slide라는 한정된 범위에서의 screening으로 인해 경미한 병변 또는 발현도 낮은 병변 등에서 놓칠 수 있는 심각한 병변을 내포한 환자를 선별해 보고자 세포진 검사(Pap's Stain)와 HPV DNA chip 검사를 동시에 실시하였고 이들 결과를 비교 분석해보았다.

본 연구 대상자 1,786명을 폐경 전, 후를 기준하여 두 부류로 나눠 조사하였고, 세포진검사결과 폐경 전 대상자 1,339명중 정상군인 예는 1,323명, 비정상군인 예는 16명이었고, 폐경 후 대상자 447명중 정상군인 예가 444명, 비정상군인 예가 3명이었다. HPV DNA chip 검사결과는 폐경 전 대상자 1,339명중 HPV 양성인 232명, HPV 음성인 1,107명이었고 폐경 후 대상자 447명중 HPV 양성인 68명, HPV 음성인 379명이었다. 이들 결과를 토대로 두 검사간의 연관성을 비교해보면 세포진검사상 정상군 1,767명의 HPV 양성인 287예, 음성이 1,480예였으며, HPV 양성 보인 287예중 고위험군 HPV가 218예, 저위험군 HPV가 33예, 미분류 HPV가 49예로 검출되었다. 또 비정상군인 19예중 HPV 양성인 13예, 음성이 6예였으며, HPV 양성 13예 중 고위험군 HPV가 9예, 저위험군 HPV가 1예, 미분류 HPV가 3예로 검출되었다.

본 연구의 결과에서 세포진검사상 정상군의 16.2%에서 HPV 양성 보였으며, 이들 HPV 양성 대상자의 72%가 고위험군 HPV가 검출되었다. 또 비정상군의 68%가 HPV 양성 보였으며, 이들 HPV 양성 대상자중 70%가 고

위험군 HPV 가 검출되었다. 본 연구에서 자궁경부암의 전구병변의 진단에 HPV DNA 검사가 선별검사로서 유용하게 사용됨을 알 수 있었고, 세포진 검사와 HPV DNA 검사를 동시에 시행하여 발현도 낮은 병변에서의 위 음성의 결과를 배제하고, 자궁경부암의 예방 및 조기치료에 유용할 것으로 생각된다.



VII. 참고문헌

1. 보건사회부, 한국 부인암 등록 사업 조사 보고서. 대한산부인과학회지, 2006. 49. 762-812
2. Brinton LA, Hamman RF, and GR Huggin. Sexual and reproductive risk factor invasive squamous cell cervical cancer. J. Natl cancer Inst, 1987. 79. 23-30
3. Carr. J. and Gyorfi. T. Human Papillomavirus : Epidemiology, Transmission. pathogenesis. Clinics in Laboratory Medicine. 2000. 20 (2). 235-256
4. Schiffman, M.H., H.M. Bauer, R.N. Hoover, A.G. Glass, D. M. Cadell, B.B. Rush, D.R. Scott, M.E. Sherman, R.J. Kurman, S. Wacholer, C.K. Stanton, and M.M. Manos. 1993
5. Munger K, basile JR, Duensing S. et al. Biological activities and molecular targets of the Human papillomavirus E7 Oncoprotein. *Oncogene* 2001. 20. 7888-98
6. Scheurer ME, torto-Luna G, Alder-Storthz-K. Human papillomavirus infection : biology epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol cancer* 2005. 15. 727-46

7. Epidemio-logic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical interepithelial neoplasia. J. Natl. Cancer Inst, 1993. 85. 958-964
8. Eluf-neto, J., M. Booth, N. Munoz, F.X. Bosch, C.J.L. M. Meijer, and J.M.M. Walboomers. 1994. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. Br.J. Cancer. 1994. 69. 114-119
9. Toshiyuki sasagawa et al. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. Cancer Epidemiology 2001. 10. 45-52
10. McLachlin. C. M. Human Papillomavirus in Cervical Neoplasia : Role, Risk Falmplication. Clinics in Laboratory Medicine. 2000. 20 (2). 257-270
11. Reid R, Greenberg M, Jenson AB, et al : Sexually transmitted papiilomavirus infection. I. The anatomical distribution and pathologic grade of neoplastic lesion associated with different viral type. Am J Obstet Gynecol 1987. 156. 212-221
12. Dust M, Gissman L, Ikenberg H, zur Hausan. H: papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from differant gergraphic region. Proc Natl Acad Sci USA, 1983. 80. 3812-3815

13. Keng-Ling Wallin et al. Type specific persistence of human papilloma virus DNA before the development of invasive cancer. NEJM 1999. 341. 1633-1638
14. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000. 92. 690-698
15. Krane JF, Granter SR Trask CE, Hogan CL, Lee KR. Papanicolaou smear sensitivity for the detection of adenocarcinoma of the cervix: a study of 49 cases. Cancer 2001. 93. 8-15
16. Wick, M. J. Dignosis of Human Papillomavirus Gynecologic infections. Clinics Laboratory Medicine. 2000. 20 (2). 271-288
17. Lorinz AT, Reid R, Jenson AB, et al : Human papillomavirus infection of the cervix : relative risk association of 15 common anogenital types. Obstet Gynecol 1982. 79. 328-334
18. Cox JT, Lorincz AT, Schiffman HD, 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 on Gynicol 1995. 172. 946-950

19. Sun XW, Ferenczy A, Johnson D, et al : Evaluation of the hybrid Capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection test Am'J Obstet Gynecol 1995. 173. 1432-1437
20. Cox. JT, Schiffman MH, Winzelberg AJ, et al : An evaluation of human papillomavirus testing as part of referral to colposcopy clinics. Obstet Gynecol 1992. 80. 389-393
21. Kiviat NB, Koutsky LA, Crichtlow, et al : Comparison of Southern transfer hybridization for detection of cervical human papillomavirus infection with type 6, 11, 16, 18, 31, 33, and 35. Am J Clin Pathol 1990. 94. 561-571
22. Kim CJ, Jeong JK, Park M, Park TS, Park TC, Namkoong SE, et al. HPV oligonucleotid micrarray-base detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesion. Gynecol Oncol 2003. 89. 210-217
23. Cox. J. T. Evaluation of Abnormal Cervical Cytology. Clinics in Laboratory Medicine. 2000. 20 (2). 303-344
24. 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 2004. 23 (2). 119-125
25. Franco, E. L. Statistical Issues in Human Papillomavirus Testing

and Screen.. Clinics in Laboratory Medicine. 2000. 20 (2). 345-368

26. 김희숙 : Squamous cell lesion of the uterine cervix: The Bethesda system and cytopathology. 대한 세포병리학회 춘계학술대회원록, 1993

27. Sidawy MK, Tabbara SO: Reactive change and atypical squamous cell of undetermined significance in Papanicolaou smears: A cytohistologic correlation. *Diagn Cytopathol* 1993. 9. 423-429



감사의 글

많은 사람들의 도움이 있었기에 이 작은 결실을 이룰 수 있었습니다. 몇 번을 망설임 끝에 늦각으로 입문한 저에게 넉넉하고 편안한 웃음으로 격려해주고 지도해주신 김군도 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 교수님을 뵈는 때마다 항상 활기찬 에너지를 느낄 수 있어 좋았고 매순간 힘이 되었습니다. 또한 부족한 논문을 면밀히 살펴주시고 조언해주신 김영태 교수님, 최태진 교수님께도 깊이 감사드립니다. 항상 인자하신 이원재 교수님, 학교생활의 많은 부분들을 다독여 주신 이명숙 교수님, 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 송영환 교수님께도 감사드립니다.

항상 어려운 부탁에도 밝게 웃으며 기꺼이 도와주었던 이혜진 조교생께도 감사의 맘 전합니다. 2년을 동고동락하며 서로에 힘이되어 주었던 동기생 민영, 지혜, 선미에게도 따뜻한 맘을 전합니다.

오랜 나의 직장 동료들께도 항상 감사하다는 말 전하며, 어려운 여건 속에 세심하게 배려해주신 양영일 과장님과 논문을 위해 도움주신 인제 의대 강미선 교수님, 교실의 김정샘, 진숙씨 모두 고맙습니다.

끝으로 나의 소중한 가족들에게도 고마운 맘을 전하며, 영원히 사랑합니다.