

## Clinical Evaluation of Human Papillomavirus DNA Genotyping Assay to Diagnose Women Cervical Cancer

Sunghyun Kim<sup>1¶</sup>, Dongsup Lee<sup>1,2¶</sup>, Yeun Kim<sup>1</sup>, Geehyuk Kim<sup>1</sup>, Sangjung Park<sup>1</sup>,  
Yeonim Choi<sup>1</sup>, Tae Ue Kim<sup>1</sup>, Kwang Hwa Park<sup>3,†</sup> and Hyeyoung Lee<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju 220-701 Korea,

<sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Hyejeon College, Hongseong,

<sup>3</sup>Department of Pathology, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju 220-701, Korea

In this study, we evaluated the human papillomavirus (HPV) genotyping test called MolecuTech REBA HPV-ID<sup>®</sup> (YD Diagnostics, Seoul, Korea) for 704 women who also had cervical cytological evaluations by Thin Prep. The infection rate of high-risk HPV genotypes was 56.6% in patients with normal cytology, 59.8% in those with benign, low-grade squamous intraepithelial lesions, 51.4% in those with atypical squamous cells of uncertain significance, 92.3% in those with high-grade squamous intraepithelial lesions, and 94.1% in those with squamous cell carcinoma or adenocarcinoma. HPV 16 was the most common genotype detected in any lesion, followed by HPV 53, 58, 33, 52, 45, 31, and 35, in order. The HPV DNA test with PCR-REBA is a very highly sensitive, but less specific, method. The infection rates and HPV genotype distribution of non-Korean people versus people from South Korea showed regional differences.

**Key Words:** Human papillomavirus (HPV), Women cervical cancer, Clinical evaluation, PCR-REBA

### 서 론

자궁경부암은 유방암, 갑상선암에 이어 여성에게 발생하는 암 중 세 번째로 많은 암이며, 연간 전 세계적으로 53만여 명의 새로운 환자가 발생하며, 이로 인해 연간 27만 5천여 명의 사망자가 발생하는 것으로 알려져 있다 (Ferlay et al., 2008).

자궁경부암의 대표적 진단검사법으로 자궁경부에서부터 얻은 탈락세포를 이용해 세포진단학적 검사를 수행하는 자궁경부 세포진검사 (Papanicolaou smear, 이하 Pap

도말검사)가 있으며, 이는 검사방법이 간단하고 비용이 적게 드는 경제적인 이유로 자궁경부암 선별 검사로서 유용성이 높다고 알려져 있지만, 민감도가 약 20~50%로 위음성률이 매우 높다는 단점이 있다 (Hwang et al., 2003; Park et al., 2003). 특히 High-grade squamous intraepithelial lesion (이하 HSIL)에 대한 낮은 민감도와 예측도 (predictive value)가 보고되고 있고, 편평세포암에 비해 선병변 (granular lesion)이나 선암 (adenocarcinoma)에 대한 낮은 선별력으로 인해 자궁경부암의 조기 진단이 어렵다는 등 자궁경부암 진단에 있어 Pap 도말검사의 여러 가지 제한점이 나타나고 있다 (Kim et al., 2001; Kwon et al., 2002; Vizcaino et al., 2008).

자궁경부암으로 발전함에 있어서 인유두종바이러스 (human papillomavirus; 이하 HPV)의 감염이 연관이 있다는 점이 알려지면서 (Hausen, 2000), 자궁경부에서부터 HPV DNA를 검출하는 방법부터 HPV의 캡시드 단백질을 암호화하는 L1 유전자를 기초로 HPV 유전형형을 검사하는 HPV 유전형 검사법 등 HPV DNA 검사법들이 많이 개발되어 상용화 되었고, 현재 이러한 분자진단학적 방법들은 Pap 도말검사의 보조적인 검사로 함께 사용되

\*Received: 2 May, 2012 / Revised: 25 June, 2012

Accepted: 26 June, 2012

¶Co-first author, †Co-corresponding author

†Corresponding author: Hyeyoung Lee. Mi-rae Hall 216, Yonsei University 1 Yonseidae-gil, Wonju, Gangwon-do, 220-710, Korea.

Tel: +82-10-3227-8194, Fax: +82-33-760-2561

e-mail: hyelee@yonsei.ac.kr

†Corresponding author: Kwang Hwa Park. 162 Ilsan-dong, Wonju, Gangwon-do, 220-701, Korea.

Tel: +82-33-741-1552, Fax: +82-33-731-6590

e-mail: Abba@yonsei.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

고 있으며 (Thomas et al., 1999; Fatima and Rodriguez-Iglesias, 2009; Vecchio et al., 2010; Schudel et al., 2011), 그 이용이 국내에서 또한 증가하고 있다 (Choi et al., 2009; Jing et al., 2009; Kang et al., 2009; Cho et al., 2011; Lee et al., 2011; Lee et al., 2011).

이러한 HPV DNA 검사법들은 PCR, PCR-Reverse blot hybridization (PCR-REBA), microarray, pyrosequencing 등 분자진단학적인 검사법을 기초로 함으로써, 그 분석적 민감도는 매우 향상되었지만, 정상인 및 저등급 병변에서도 HPV DNA 양성율이 매우 높게 나타났으며, 본 연구팀의 기존 연구에서도 HSIL, 평편세포암 (squamous cell carcinoma)에서 뿐만 아니라 정상 및 저등급 병변을 가지는 환자에서도 HPV DNA 양성율이 약 60%에 달하는 것을 알 수 있었다 (Lee et al., 2011).

따라서 HPV DNA 검사법은 각 검출방법 따라, 그리고 다양한 임상환자 대상군에 대해 보다 많은 연구를 통해 그 유용성을 평가할 필요성이 있다. 본 연구에서는 현재 국내에서 개발하여 상용화된 HPV DNA 유전자형 검사법인 MolecuTech REBA HPV-ID® (YD Diagnostics, Seoul)를 이용해 정상인부터 자궁경부 고등급 병변을 가진 환자까지 다양한 환자군을 포함하는 704명의 환자를 대상으로 자궁경부암 진단을 위한 HPV DNA 유전자형 검사법의 임상적 유용성을 평가해 보았다.

## 재료 및 방법

### 임상검체

2010년 01월 01일부터 2011년 12월 31일까지 2년간 연세대학교 원주기독병원에서 자궁경부 액상세포검사 (Thin Prep PAP TEST, PreservCyt Solution, Hologic Inc. Marlborough, MA, USA)를 시행한 704명의 환자를 대상으로 하였다. 세포학적 진단에서 비정상적으로 판독된 경우는 모두 질 확대경검사와 조직검사를 시행하였다 (Table 1).

### 액상세포진검사 (Pap 도말검사)

액상세포진검사 (Thin Prep PAP TEST, PreservCyt Solution, Hologic Inc., Marlborough, MA, USA)를 위하여 채취한 검체는 Thin Prep (MA 01752, Hologic Inc.)에서 제공한 프로토콜에 따라 슬라이드를 제작하였고, 이를 세포병리사가 1차 판독하였다. 세포병리사가 정상으로 판독한 슬라이드 10예 중 1예를 무작위로 추출하여 병리의사가 재판독하

였고, 비정상적으로 판독한 모든 예는 병리의사가 확인하여 진단하였다. 세포학적 진단은 2001 Bethesda system을 사용하였다.

### 질 확대경검사 및 조직검사

액상세포진검사를 수행한 704명의 환자 중 비정상적으로 판독된 141명을 대상으로 임상외과에 의해 질 확대경검사가 수행되었다. 질 확대경검사서 자궁경부 고등급 병변부위로 의심되는 부위를 punch biopsy를 통해 병변부위의 조직을 채취하여 수집하였으며, 수집된 조직은 병리의사가 현미경으로 그 병변에 따라 cervical intraepithelial neoplasia, grade 1 (CIN-1), cervical intraepithelial neoplasia, grade 2 (CIN-2), cervical intraepithelial neoplasia, grade 3 (CIN-3), squamous cell carcinoma in situ (CIS)로 판독하여 진단하였다.

### HPV DNA 추출

액상세포진검사를 시행하고 검체 용기에 남아있는 액체를 1.5 mL microtube에 넣어 6,000 × g로 10분간 원심분리하여 세포를 침전시킨 후 상층액을 제거하였다. 그런 다음 MolecuTech REBA HPV-ID® Kit (YD Diagnostics, Seoul)에 포함되어 있는 1× washing buffer를 넣어 진탕하고, 13,000 × g로 5분간 원심분리하여 2회 반복 세척한 후, MolecuTech REBA HPV-ID® Kit (YD Diagnostics, Seoul)에 포함되어 있는 레진 (resin)이 들어있는 DNA 추출 완충용액을 세포의 양에 따라 50~200 μL 넣고 55°C 항온수조에서 15분 이상 처리하였다. 그리고 heating block에서 100°C, 10분간 가열한 후, 13,000 × g로 10분간 원심분리하여 분리된 상층액인 DNA를 HPV DNA 유전형 검사에 사용하였다.

### HPV DNA 유전형 검사

HPV DNA의 유전형 검사를 위해 상용화된 MolecuTech REBA HPV-ID® Kit (YD Diagnostics, Seoul)를 사용하였다. 이 검사키트는 고위험군으로 알려진 HPV 18종 (16/18/26/31/33/35/39/45/51/52/53/56/58/59/66/68/69/73), 고위험군으로 의심되는 HPV 1종 (34) 또한 저위험군 HPV 13종 (6/11/32/40/42/43/44/70/72/81/84/87) 등 총 32종의 HPV 유전자형을 분석할 수 있는 분자진단 키트이다. 이 키트는 HPV의 캡시드 단백질을 암호화 하는 L1 유전자를 타겟으로 하고 있으며, 추출된 DNA를 주형으로 하여 MolecuTech REBA HPV-ID® Kit (YD Diagnostics, Seoul)에

**Table 1.** Cytological and histological findings for 704 women enrolled in the study

	No. of patients (n)	Percentage
<b>Cytological type</b>	<b>704</b>	<b>100.00%</b>
<sup>a</sup> SCC & <sup>b</sup> ADC	34	4.83%
<sup>c</sup> HSIL	65	9.23%
<sup>d</sup> ASC-H	21	2.98%
<sup>e</sup> LSIL	82	11.65%
<sup>f</sup> ASC-US	138	19.60%
<sup>g</sup> N	364	51.70%
<b>Histological type</b>	<b>141</b>	<b>100.00%</b>
Invasive cancer	45	31.91%
<sup>h</sup> CIN-2, <sup>i</sup> CIN-3, or <sup>j</sup> CIS	47	33.33%
<sup>k</sup> CIN-1	27	19.15%
<sup>g</sup> N	22	15.60%
<b>Age group</b>	<b>704</b>	<b>100.00%</b>
< 20	1	0.14%
20~29	49	6.96%
30~39	154	21.88%
40~49	300	42.61%
50~59	200	28.41%

- <sup>a</sup>SCC : Squamous cell carcinoma
- <sup>b</sup>ADC : Adenocarcinoma
- <sup>c</sup>HSIL : High-grade squamous intraepithelial lesion
- <sup>d</sup>ASC-H : Atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion
- <sup>e</sup>LSIL : Low-grade squamous intraepithelial lesion
- <sup>f</sup>ASC-US : Atypical squamous cells of undetermined significance
- <sup>g</sup>N : Normal
- <sup>h</sup>CIN-2 : Cervical intraepithelial neoplasia, grade 2
- <sup>i</sup>CIN-3 : Cervical intraepithelial neoplasia, grade 3
- <sup>j</sup>CIS : Squamous cell carcinoma in situ
- <sup>k</sup>CIN-1 : Cervical intraepithelial neoplasia, grade 1

서 제공하는 프라이머가 포함된 반응용액을 사용, 유전자 증폭을 위해 one-tube nested PCR을 시행하고, PCR 증폭 및 역교잡반응 (reverse blot hybridization assay; REBA)는 제조자가 제공한 사용설명서에 따라 수행하였다. 또 REBA의 결과 분석은 REBA kit에서 제공한 멤브레인 (membrane)과 함께 있는 결과 분석지에 대조선을 맞추고 갈색이나 보라색으로 나타나는 띠의 옆 지표 (index)를 읽어 각 HPV 유전형을 확인하였다. 이때 고위험군 프로브 18개, 고위험군 의심 프로브 1개, 저위험군 프로브 13개가 모두 음성이고, HPV universal 프로브와 REBA 양성 대조군만 나타나는 경우를 HPV other type으로 판정하였으며, HPV universal 프로브는 음성이고 REBA는 양성 대조군만 나타나는 경우는 발색과정 및 발색시약은 이상이 없으나 검체가 HPV가 아니거나 REBA 검사가 성공적으

로 수행되지 않았다고 판정하였다.

## 결 과

### 자궁경부 세포 및 조직병리학적 병변에 따른 HPV 고위험군, 저위험군의 감염분포

총 환자 704명 중 SCC & ADC에 해당하는 환자는 34명으로 4.8%를 차지하였다. HSIL, ASC-H에 해당하는 환자는 각각 65명, 21명으로 9.2%, 3.0%를 차지하였다. LSIL, ASC-US에 해당하는 환자는 각각 82명, 138명으로 11.6%, 19.6%를 차지하였다. 정상군에는 364명이 속해 51.7%를 차지하였다 (Table 1).

총 704명의 환자 중 자궁경부 액상세포검사 (Pap 도말 검사)에서 비정상 소견을 보인 141명에 대해 조직학적 검사를 시행하였다. Invasive cancer에 해당하는 환자가 45명으로 31.9%에 달했다. CIN-2, CIN-3, or CIS에 해당하는 환자는 47명으로 33.3%에 달했다. CIN-1에 해당하는 환자는 27명으로 19.1%에 달했다. 정상군은 22명으로 15.6%였다 (Table 1).

자궁경부의 조직병리학적 병변에 따른 HPV 고위험군, 저위험군, HPV 음성의 분포를 본 결과 침윤암 (invasive cancer)에서는 HPV 고위험군 86.7%, 저위험군 4.4%의 감염률을 보였으며, 8.9%에서 HPV 음성이었다. 전암단계의 고등급 병변인 Cervical intraepithelial neoplasia (CIN)-2, CIN-3, Squamous cell carcinoma in situ (CIS)에서는 HPV 고위험군 85.1%, 저위험군 4.3%의 감염률을 나타냈으며, 10.6%의 HPV 음성률을 보였다 (Table 2).

CIN-1에서는 HPV 고위험군 66.7%, 저위험군 7.4%로 나타났고, 25.9%에서 HPV 음성을 나타냈다. 정상군에서는 HPV 고위험군 68.2%, 저위험군 9.1%의 감염률을 보였으며, 22.7%에서 HPV 음성을 보였다 (Table 2).

자궁경부의 세포진단학적 병변에 따른 HPV 고위험군, 저위험군, HPV 음성의 분포를 본 결과 Squamous cell carcinoma (SCC)와 Adenocarcinoma (ADC)에서는 HPV 감염률이 고위험군 94.1%, 저위험군 2.9%로 나타났으며, 약 2.9%에서 HPV DNA 음성을 나타냈다. High-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)에서는 HPV 고위험군 92.3%의 감염률을 나타냈으며, 7.7%에서 HPV 음성을 나타냈다. Atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H)에서는 HPV 고위험군 81.0%로 나타났고, 14.3%가 HPV DNA 음성이었다 (Table 3).

**Table 2.** Incidence of the high and low risk HPV genotypes according to the histological diagnosis

Histological interpretation	No. of samples (n)	High-Risk HPV group infection		Low-Risk HPV group infection		Undetermined		HPV DNA negative	
		No. of samples (n)	Percentage	No. of samples (n)	Percentage	No. of samples (n)	Percentage	No. of samples (n)	Percentage
Invasive cancer	45	39	86.7%	2	4.4%	0	0.0%	4	8.9%
<sup>a</sup> CIN-2, <sup>b</sup> CIN-3, <sup>c</sup> CIS	47	40	85.1%	2	4.3%	0	0.0%	5	10.6%
<sup>d</sup> CIN-1	27	18	66.7%	2	7.4%	0	0.0%	7	25.9%
<sup>e</sup> N	22	15	68.2%	2	9.1%	0	0.0%	5	22.7%
Total	141	112	79.4%	8	5.7%	0	0.0%	21	14.9%

<sup>a</sup>CIN-2: Cervical intraepithelial neoplasia, grade 2

<sup>b</sup>CIN-3: Cervical intraepithelial neoplasia, grade 3

<sup>c</sup>CIS : Squamous cell carcinoma in situ

<sup>d</sup>CIN-1: Cervical intraepithelial neoplasia, grade 1

<sup>e</sup>N : Normal

**Table 3.** Incidence of the high and low risk HPV genotypes according to the cytological diagnosis

Cytological interpretation	No. of samples (n)	High-Risk HPV group infection		Low-Risk HPV group infection		Undetermined		HPV DNA negative	
		No. of samples (n)	Percentage	No. of samples (n)	Percentage	No. of samples (n)	Percentage	No. of samples (n)	Percentage
<sup>a</sup> SCC & <sup>b</sup> ADC	34	32	94.1%	1	2.9%	0	0.0%	1	2.9%
<sup>c</sup> HSIL	65	60	92.3%	0	0.0%	0	0.0%	5	7.7%
<sup>d</sup> ASC-H	21	17	81.0%	0	0.0%	1	4.8%	3	14.3%
<sup>e</sup> LSIL	82	49	59.8%	7	8.5%	4	4.9%	22	26.8%
<sup>f</sup> ASC-US	138	71	51.4%	7	5.1%	4	2.9%	56	40.6%
<sup>g</sup> N	364	206	56.6%	9	2.5%	10	2.7%	139	38.2%
Total	704	435	61.8%	24	3.4%	19	2.7%	226	14.1%

<sup>a</sup>SCC : Squamous cell carcinoma

<sup>b</sup>ADC : Adenocarcinoma

<sup>c</sup>HSIL : High-grade squamous intraepithelial lesion

<sup>d</sup>ASC-H : Atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion

<sup>e</sup>LSIL : Low-grade squamous intraepithelial lesion

<sup>f</sup>ASC-US: Atypical squamous cells of undetermined significance

<sup>g</sup>N : Normal

Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL)에서는 HPV 고위험군 59.8%, 저위험군 8.5%의 감염률을 나타냈으며, 26.8%에서 HPV 음성을 나타냈다. 또한 Atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US)에서는 HPV 고위험군 51.4%, 저위험군 5.1%의 감염률을 나타냈고, 40.6%에서 HPV 음성을 보였다. 정상군에서 HPV 고위험군 56.6%, 저위험군 2.5%의 감염률을 보였으며, 38.2%에서 HPV 음성을 보였다 (Table 3).

#### 자궁경부암에서 고빈도 감염률을 나타내는 HPV 유전형 아형의 자궁경부 병변 별 분포

세계적으로 자궁경부암에서 고빈도 감염률을 나타내는 HPV 16, 18, 31, 33, 45 유전형과 국내 및 주변국 (일본, 중국 등)에서 고빈도 감염률을 나타내는 HPV 35, 52, 53, 58 유전형에 대한 자궁경부 병변별 분포율을 조사해 보았다.

그 결과 HPV 16형은 SCC와 ADC에서 38.5%, HSIL에서 34.7%, ASC-H에서 29.2%, ASC-US에서 30.1%에서 가장 높은 감염률을 보였으며, LSIL에서 21.4%, 정상에

**Table 4.** Distribution of high prevalent HPV genotypes according to the cervical lesions

HPV Genotype	Cytological Interpretation												Total (No. of signals)
	<sup>a</sup> SCC & <sup>b</sup> ADC (signal)	Percentage	<sup>c</sup> HSIL (signal)	Percentage	<sup>d</sup> ASC-H (n)	Percentage	<sup>e</sup> LSIL (signal)	Percentage	<sup>f</sup> ASC-US (n)	Percentage	<sup>g</sup> N (n)	Percentage	
16	20	38.5%	26	34.7%	7	29.2%	18	21.4%	41	30.1%	150	30.4%	262
18	10	19.2%	18	24.0%	5	20.8%	21	25.0%	37	27.2%	170	34.4%	261
31	2	3.8%	1	1.3%	1	4.2%	1	1.2%	3	2.2%	5	1.0%	13
33	7	13.5%	6	8.0%	2	8.3%	8	9.5%	18	13.2%	39	7.9%	80
45	0	0.0%	2	2.7%	1	4.2%	3	3.6%	3	2.2%	12	2.4%	21
35	0	0.0%	3	4.0%	2	8.3%	1	1.2%	0	0.0%	2	0.4%	8
52	3	5.8%	4	5.3%	1	4.2%	1	1.2%	8	5.9%	12	2.4%	29
53	5	9.6%	6	8.0%	1	4.2%	18	21.4%	15	11.0%	60	12.1%	105
58	5	9.6%	9	12.0%	4	16.7%	13	15.5%	11	8.1%	44	8.9%	86
Total (No. of signals)	52	100.0%	75	100.0%	24	100.0%	84	100.0%	136	100.0%	494	100.0%	865

<sup>a</sup>SCC : Squamous cell carcinoma

<sup>b</sup>ADC : Adenocarcinoma

<sup>c</sup>HSIL : High-grade squamous intraepithelial lesion

<sup>d</sup>ASC-H : Atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion

<sup>e</sup>LSIL : Low-grade squamous intraepithelial lesion

<sup>f</sup>ASC-US: Atypical squamous cells of undetermined significance

<sup>g</sup>N : Normal

서 30.4%로 두 번째로 높은 감염률을 보였다. HPV 18형은 LSIL에서 25.0%, 정상에서 34.4%로 가장 높은 감염률을 보였으며, SCC와 ADC에서 19.2%, HSIL에서 24.0%, ASC-H에서 20.8%, ASC-US에서 27.2%로 두 번째로 높은 감염률을 보였다. HPV 31형은 SCC와 ADC에서 3.8%, HSIL에서 1.3%, ASC-H에서 4.2%, LSIL에서 1.2%, ASC-US에서 2.2%, 정상군에서 1.0%의 감염률을 보여 정상부터 전체적인 병변에서 낮은 감염률을 나타냈다. HPV 33형은 SCC와 ADC에서 13.5%, ASC-US에서 13.2%로 HPV 16, 18형에 이어 세 번째로 높은 감염률을 보였고, HSIL에서 8%, ASC-H에서 8.3%, LSIL에서 9.5%, 정상에서 7.9%로 중간 정도의 감염률을 보였다. HPV 45형은 SCC와 ADC에서는 검출이 되지 않았으며, HSIL에서 2.7%, ASC-H에서 4.2%, LSIL에서 3.6%, ASC-US에서 2.2%, 정상에서 2.4%로 다소 낮은 감염률을 보였다. HPV 35형은 SCC와 ADC, 그리고 ASC-US에서 검출되지 않았으며, HSIL에서 4%, ASC-H에서 8.3%, LSIL에서 1.2%, 정상에서 0.4%로 전체적으로 낮은 감염률을 나타냈다. HPV 52형은 SCC와 ADC에서 5.8%, HSIL에서 5.3%, ASC-H에서 4.2%, LSIL에서 1.2%, ASC-US에서 5.9%, 정상에서 2.4%로 전체적으로 다소 낮은 감염률을 보였다. HPV 53형은 LSIL에서 21.4%, ASC-US에서 11.0%, 정상에서 12.1%로

다소 높은 감염률을 나타냈으며, SCC와 ADC에서 9.6%, HSIL에서 8%, ASC-H에서 4.2%로 중간 정도의 감염률을 보였다. HPV 58형은 HSIL에서 12.0%, ASC-H에서 16.7%, LSIL에서 15.5%로 다소 높은 감염률을 보였으며, SCC와 ADC에서 9.6%, ASC-US에서 8.1%, 정상에서 8.9%로 중간 정도의 감염률을 나타냈다 (Table 4).

HPV 16 (n=262), 18 (n=261)형이 모든 병변에 걸쳐 가장 많이 검출되었으며, 이어서 HPV 53, 58, 33, 52, 45, 31, 35형 순으로 검출되었다. 16형 (n=46)의 감염이 자궁경부 고등급 병변인 SCC와 ADC, 그리고 HSIL에서 가장 많았으며, 이어서 HPV 18, 58, 33, 53, 52, 31/35, 45형 순으로 감염률이 나타났다 (Table 4).

#### 자궁경부 병변 별 HPV 유전형 아형의 분포

자궁경부 병변 별 HPV 유전형 아형의 분포를 조사하기 위해 자궁경부 병변을 정상부터 저등급, 고등급 병변으로 구분하였으며, 각각의 병변에 따라 가장 많이 감염된 HPV 유전형 상위 세 가지 아형을 조사해 보았다. SCC에서는 HPV 16, 18, 33형 순으로 많이 감염되었으며, HSIL에서는 HPV 16, 18, 58, ASC-H에서는 HPV 16, 18, 58, LSIL에서는 HPV 18, 16/53, 58, ASC-US에서는 HPV 16, 18, 33, 정상군에서는 18, 16, 53순으로 HPV 유전형 아형

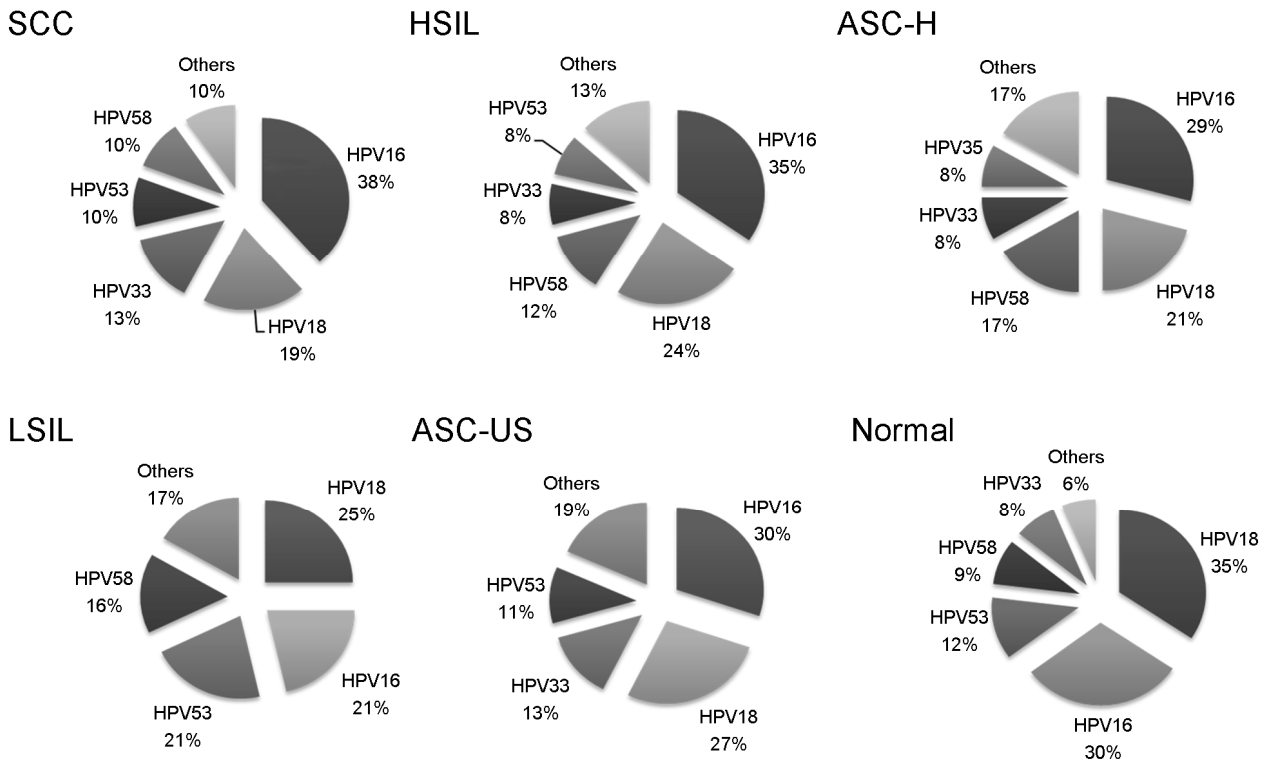


Fig. 1. Incidence of the HPV genotypes according to the cytological diagnosis.

SCC, Squamous cell carcinoma; HSIL, High-grade squamous intraepithelial lesion; LSIL, Low-grade squamous intraepithelial lesion; ASC-H, Atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion; ASC-US, Atypical squamous cells of undetermined significance.

의 감염률이 높은 것으로 나타났다 (Fig. 1). 모든 병변에서 HPV 16형과 18형의 감염률이 가장 높았으며, 병변에 따라 나머지 HPV 유전형은 다른 감염률을 보였다.

## 고 찰

HPV DNA 유전자형 검사는 Pap 도말검사의 보조적 검사로 사용되고 있다. 연구결과 자궁경부의 세포병리학적 으로 SCC, HSIL에서의 HPV 고위험군의 감염률이 약 92% 이상으로 검출되었고, HPV 저위험군의 감염률은 약 3% 미만으로 나타났으며, 또한 조직병리학적 고등급 병변인 Invasive cancer, CIN-2, CIN-3, CIS에서의 HPV 고위험군의 감염률이 약 85% 이상으로 검출되었고, HPV 저위험군의 감염률은 약 4% 미만으로 나타났기 때문에 고 등급 병변에서의 HPV DNA 유전자형 검사법의 분석적 민감도나 임상적 특이도가 모두 뛰어남을 알 수 있었다 (Table 2, 3).

세포병리학적으로 저등급 병변인 LSIL, ASC-US에서의

HPV 고위험군의 감염률이 약 51~58%에 달하고, HPV 저위험군 감염률이 약 5~8%에 달했으며, HPV DNA 음성결과도 약 26~40%에 달하는 것을 확인하였고, 조직병리학적 저등급 병변 (CIN-1)에서의 HPV 고위험군의 감염률이 66%에 달하고, 저위험군의 감염률이 7%에 달했으며, HPV DNA 음성결과도 약 26%로 나타난 것으로 보아 저등급 병변에서도 HPV 고위험군의 감염률이 고등급 병변에서 보다는 낮지만, 매우 높게 나타나는 것을 알 수 있었다 (Table 2, 3). 따라서 분석적 민감도는 매우 뛰어나지만, 실제로 자궁경부암을 직접 진단하는 데에는 HPV DNA 유전자형 검사법만으로는 기존의 방법들 (Pap 도말검사, 질 확대경검사)을 대체할 수는 없을 것으로 보여 임상적 특이도는 부족한 것으로 보인다.

하지만 분석적 민감도가 매우 높기 때문에 HPV DNA 유전자형 검사법을 현재와 같이 기존의 검사법들과 함께 통용하여 사용한다면, 현재의 임상적 병변상태와 현재 HPV 유전형 감염상태를 동시에 알 수 있기 때문에 자궁경부암으로 발전할 수 있는 예후를 미리 판단하고 예방

할 수 있는 도구로는 유용할 것으로 보인다. 또한, 정상 군에서의 HPV 고위험군의 감염률이 세포병리학적으로는 약 56%, 조직병리학적으로는 약 68%로 매우 높은 감염률을 보였으며, HPV 저위험군 감염률이 세포병리학적으로 약 3%, 조직병리학적으로 약 9%로 나타났으며, HPV DNA 음성률이 세포병리학적으로 약 38%, 조직병리학적으로 약 23%로 나타났다 (Table 2, 3).

이를 통해 HPV 고위험군의 감염률은 자궁경부의 정상 소견을 포함해 모든 병변에 걸쳐 매우 높은 비율로 나타났지만, 병변의 정도가 정상에 가까울수록 HPV 고위험군의 감염률이 함께 소폭 감소하는 것으로 보이며, HPV 저위험군의 경우 감염률이 증가함을 알 수 있었다. 이 결과는 자궁경부의 고등급 병변에서 뿐만 아니라 정상에서도 HPV 고위험군의 감염률이 매우 높음을 보여주고 있다. 따라서 자궁경부암과 HPV 고위험군 감염과의 연관성에 관해서는 향후 보다 집중적인 연구가 필요할 것으로 생각되며, 자궁경부암 진단을 위한 새로운 바이오마커 및 검사법의 필요성이 있음을 시사한다고 생각된다. 또한, HPV DNA 음성률도 고등급 병변에서 저등급 병변, 정상으로 갈수록 높아지는 것을 알 수 있었다.

현재 전 세계적으로 자궁경부암에서 높은 빈도로 검출된 HPV 유전형은 HPV 16, 18, 31, 33, 45였고, 국내 및 주변국 (일본, 중국)에서는 추가적으로 35, 52, 53, 58의 감염률이 매우 높게 나타난다.

이전의 국내 및 주변국들에서 수행한 연구들과 마찬가지로 본 연구결과에서도 자궁경부의 고등급 병변 (SCC, HSIL)에서 HPV 16, 18형 및 58, 33, 53형의 순으로 고위험군 HPV가 검출되어, 이들 바이러스가 자궁경부암의 원인체로 중요함을 알 수 있었다. 하지만, HPV 31형과 45형의 경우에는 여타 연구들에서는 검출률이 높은 반면, 본 연구에서는 검출 빈도가 낮게 나타났다. 따라서, 국가나 대륙별로 자궁경부 고등급 병변을 유발하는 HPV 원인바이러스의 유전자형이 다를 수 있음을 시사하는 것으로 생각된다. Oh 등 (2010)의 연구에 의하면, 국내 자궁경부암 환자에서 HPV 58, 53형에 비해 HPV 33형의 감염 빈도가 높은 것을 보여 본 연구와는 상이한 결과를 나타냈다. 반면에 HPV 58, 53형의 경우 이전의 국내 및 주변국들의 다른 연구그룹들의 결과와 마찬가지로 고등급 병변에서 높은 감염률을 나타냈고, 이 결과는 Oh 등 (2010)과 Rhee 등 (2010)의 연구결과에서와 마찬가지로 HPV 58형의 경우 세계적 분포도는 높지 않은 반면 국내에서는 그 분포도가 상대적으로 다른 유전형에 비해 높게

나타나는 결과의 일치도를 보였다. 반면, 본 연구에서 HPV 35형, 52형의 경우 다소 낮은 감염률을 나타냈고, 이 결과는 Oh 등 (2010)과 Rhee 등 (2010)의 연구결과와 동일하였다 (Oh et al., 2010; Rhee et al., 2010). 따라서, 이는 Lee 등 (2011)의 연구에서와 마찬가지로, 국가와 국가 간 뿐만 아니라 국가 내에서도 지역에 따른 HPV 유전자형의 분포도 차이가 있음을 시사한다.

본 연구의 결과들을 미루어 보았을 때, 본 연구에서 사용한 HPV DNA 유전자형 검사법인 MolecuTech REBA HPV-ID® (YD Diagnostics, Seoul)는 기존의 다른 연구결과들과 유사한 결과를 도출해 냈으므로, 그 검사의 신뢰성이 높음을 확인할 수 있었고, 검사의 분석적 민감도 또한 매우 높은 것을 알 수 있었다. 하지만, 너무 높은 분석적 민감도 때문에 임상적 병변에 따른 임상적 특이도가 낮아지는 한계점을 나타냈다. 본 연구에서 나타난 높은 민감도는 HPV DNA 유전자형 검출키트의 민감도 향상을 위해 one-tube nested PCR을 수행한 점과 nested PCR 과정 후 과정으로 교잡반응을 이용함으로써, 멤브레인에 부착된 올리고 뉴클레오타이드 프로브의 역할이 더해져 생긴 원인으로 일반적인 PCR 및 real-time PCR에 비해 높은 분석적 민감도를 나타낸 것으로 사료된다. 또한 이를 통해 분석적 민감도 극대화가 감염질환의 진단에 있어서 꼭 임상적 특이도를 높일 수 있는 필수 사항이 아니라는 것을 알 수 있었다.

## REFERENCES

- Cho EJ, Do JH, Kim YS, Bae S, Ahn WS. Evaluation of a liquid bead array system for high-risk human papillomavirus detection and genotyping in comparison with Hybrid Capture II, DNA chip and sequencing methods. *J Med Microbiol.* 2011. 60: 162-171.
- Choi JJ, Kim C, Park H. Peptide Nucleic Acid-Based Array for Detecting and Genotyping Human Papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2009. 7: 1785-1790.
- Fatima GS, Rodriguez-Iglesias MA. Comparison of human papillomavirus genotyping using commercial assays based on PCR and reverse hybridization methods. *APMIS.* 2009. 117: 708-715.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *Int J Cancer.* 2010. 127: 2893-2917.
- Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-

- cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000. 92: 690-698.
- Hwang TS, Jeong JK, Park M, Han HS, Choi HK, Park TS. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecol Oncol.* 2003. 90: 51-56.
- Jing YP, Park EH, Choi J, Bo Q, Kang DH, Park PY, Kim DS, Chung DS. Direct visual detection of DNA based on the light scattering of silica nanoparticles on a human papillomavirus DNA chip. *Talanta.* 2009. 80: 967-973.
- Kang WD, Kim CH, Cho MK, Kim JW, Kim YH, Choi HS, Kim SM. Comparison of the Hybrid Capture II Assay With the Human Papillomavirus DNA Chip Test for the Detection of High-Grade Cervical Lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 2009. 19: 924-928.
- Kim YS, Lee HJ, Lee GG. Detection of human papillomavirus type 16 and 18 in cervical specimens by nested polymerase chain reaction. *Korean J Clin Pathol.* 2001. 21: 210-214.
- Kwon HS, Kim YT, Kim JW, Kim SH. Comparison of oligonucleotide microarray-based test with hybrid capture-based test for detecting carcinogenic HPV in patients with CIN and invasive cervical cancer. *Korean J Gynecol Oncol Colposc.* 2002. 13: 327-335.
- Lee DS, Kim S, Park S, Jin H, Kim TU, Park KH, Lee H. Human Papillomavirus Prevalence in Gangwon Province Using Reverse Blot Hybridization Assay. *The Korean Jour of Pathol.* 2011. 45: 348-353.
- Lee HP, Kim SO, Hwang TS, Bae JM, Kim SN, Kim JW, Hwang SY, Lee HS, Shin SK, Cho W, Hong SP. Analytical and Clinical Performances of a Restriction Fragment Mass Polymorphism Assay for Detection and Genotyping of a Wide Spectrum of Human Papillomaviruses. *J Med Virol.* 2011. 83: 471-482.
- Lee JH, Lee NW, Hong SW, Nam YS, Choi JW, Kim YS. Establishment of an efficient multiplex real-time PCR assay for human papillomavirus genotyping in cervical cytology specimens: comparison with hybrid capture II. *Cytopathology.* 2011. 22: 261-268.
- Oh JK, Laia A, Suh JI, Rha SH, Muñoz N, Bosch FX, Quint W, Lloveras B, Klaustermeier JE, Sanjosé SD, Shin HR. Type-specific Human Papillomavirus Distribution in Invasive Cervical Cancer in Korea, 1958-2004. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010. 11: 993-1000.
- Park TC, Kim CJ, Lee KH. HPV genotyping in Korean women with cervical neoplasia. *Korean J Gynecol Oncol Colposc.* 2003. 14: 40-48.
- Rhee JE, Shin MY, Kim CM, Kee HY, Chung JK, Min SK, Kim SJ, Jang DH, Kim SS, Choi BS. Prevalence of human papillomavirus infection and genotype distribution among high-risk Korean women for prospecting the strategy of vaccine development. *Virol J.* 2010. 7: 1-4.
- Schudel BR, Tanyeri M, Mukherjee A, Schroeder CM, Kenis PJ. Multiplexed detection of nucleic acids in a combinatorial screening chip. *Lab Chip.* 2011. 11: 1916-1923.
- Thomas I, Liesje G, Ryan S. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 1999. 37: 2508-2517.
- Vecchio G, Sabella S, Tagliaferro L, Menegazzi P, Bello MP, Brunetti V, Cingolani R, Rinaldi R, Pompa PP. Modular plastic chip for one-shot human papillomavirus diagnostic analysis. *Anal Biochem.* 2010. 397: 53-59.
- Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Barros-Dios XM, Parkin DM. International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 1998. 75: 536-545.