

중합효소 연쇄반응을 이용한 성기부사마귀와 후두유두종 Human Papillomavirus DNA의 검색 및 바이러스 전파경로에 대한 연구

서울대학교 의과대학 피부과학교실

박 경 찬 · 정 승 용 · 이 유 신

산부인과학교실

최 영 민

이비인후과학교실

김 광 현

= Abstract =

Detection of Human Papillomaviruses DNA in Genital and Respiratory Tract Papilloma and Study on Transmission of Viruses Using Polymerase Chain Reaction (PCR)

Kyoung Chan Park, M.D., Seung Yong Jung, M.D. and Yoo Shin Lee, M.D.

Department of Dermatology, Seoul National University, College of Medicine, Seoul, Korea

Young Min Choi, M.D.

Department of Gynecology

Kwang Hyun Kim, M.D.

Department of Otolaryngology

Twenty genital warts and seventeen laryngeal papilloma were analysed by PCR to detect HPV DNA. Among 20 cases of condyloma, HPV6 was found in 15 cases, HPV11 in 13 cases. Both types were found in 8 cases. Among 16 cases of laryngeal papilloma, HPV6 was found in 11 cases, HPV11 in 6 cases. Both types were found in only one case. From these results, laryngeal papilloma is found to be a pure viral disease caused by HPV6 or HPV11 and also closely related to condyloma acuminatum which are caused by HPV6, 11.

DNA extracted from cervical swabs of women with treated cervical condyloma or without any remarkable past history, were examined for the presence of HPV DNA. Mothers of children with condyloma and laryngeal papilloma were also included to know the possible mode of transmission. HPV DNA was found in 7 out of 21 cases of normal female and female with previous cervical condyloma history. HPV DNA was also found in 2 out of 9 cases of mothers of children's condyloma and laryngeal papilloma patients. From these results, inapparent infection of HPV6, 11 in birth canal become evident but clinical significance of presence of these virus remained to be elucidated.

서 론

침균콘딜롬은 성기부, 회음부 또는 항문주위등 습윤 부에 발생하는 사마귀로 주로 Human papilloma virus (이하 HPV라 약함) 6, 11에 의해 발생되나 드물게는 HPV16등이 발견된 예가 보고되어 있다^{1,2)}. 성대등 후두에 발생하는 후두유두종은 최근까지 원인이 알려지지 않았으나 Gissman 등³⁾에 의해 HPV11이 후두유두종에서 발견되면서 침균콘딜롬과 같은 형의 바이러스에 의해 발생되는 질환임이 알려지게 되었다. 그러나 현재까지 후두유두종에서 발견되는 HPV의 형에 대해서는 저자에 따라 상이한 보고가 있으며³⁻⁵⁾ 성관계에 의해 전파되는 침균콘딜롬과는 달리 후두유두종의 전파경로에 대해서는 정확히 연구된 바가 없었다. 이에 저자는 현재까지의 HPV 검색방법중 가장 예민한 방법인 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)을 이용 두 질환의 바이러스형을 조사하여 이들 사이의 역학적 관계를 밝히는 한편 정상여성, 침균콘딜롬의 병력을 갖고 있던 여성 및 소아에서 발생한 침균콘딜롬 및 후두유두종환자의 어머니를 대상으로 자궁경부에서 표본을 채취 이를 PCR로 증폭하여 HPV6, 11의 전파경로를 추정해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

침균콘딜롬과 후두유두종의 원인 바이러스를 비교하기 위하여 서울대병원 피부과, 산부인과, 이비인후과를 내원한 침균콘딜롬 환자 20예, 후두유두종 환자 17예를

대상으로 하여 조직을 무균적으로 절제 액체질소 또는 영하 70도 냉장고에 보관하였다. HPV의 감염경로를 확인하기 위하여 소아의 후두유두종 및 침균콘딜롬 환자 어머니의 자궁경부세포를 면봉으로 채취하여 이를 2ml의 PBS에 부유액을 만든 다음 원심분리기로 돌려 침전물을 영하 70도 냉장고에 보관하였다. 잠복감염의 가능성을 알아 보기 위하여 침균콘딜롬의 병력이 없는 18예의 정상인 및 과거력상 침균콘딜롬이 있었던 환자 3예에서 자궁경부세포를 채취하였다.

2. 방 법

1) 조직핵산의 분리

액체질소통 또는 냉장고에 보관되어 있던 조직을 호모제나이저로 같은 후 단백분해효소(proteinase) 및 라이보뉴클리에이스(RNase)를 넣고 반응 시키고 페놀과 클로로포름으로 처리하여 디옥시라이보핵산(DNA)을 추출한다. 자궁경부에서 얻은 세포도 같은 방법에 의해 핵산을 추출하며 각 표본은 바이러스 핵산의 표본간 오염을 막기 위하여 따로 처리하였다.

2) 올리고 핵산염 프라이머(Oligonucleotide primer)의 준비

HPV6/11의 특이한 증폭을 위하여 올리고 핵산염 프라이머는 Melchers 등⁶⁾ 염기서열을 사용하였다(Table 1).

3) PCR

0.25~0.5 ug의 DNA를 PCR buffer(Tris HCl (pH 8.3), KCl 50 mM, 1.5 mM MgCl₂, 200 ug gelatin/ml), 1uM upstream primer, 1uM down stream primer, 200 uM dNTP 및 2.5 단위의 Taq DNA polymerase와 섞어 다음 순서에 따라 30회의 반응을 시행하

Table 1. Oligonucleotide Primers and Probes of HPV 6, 11

Primers	Size of product (bp)
HPV 6/E5 : TAGTGGGCTATGGCTCGTC (20 mer) TCCATTAGCCTCCACGGGTG (20 mer)	280
HPV 11/L1 : GGAATACATGCGCCATGTGG (20 mer) CGAGCAGACGTCCGTCTCTG (20 mer)	360
Probes	
HPV 6 : CATTAACGCAGGGGCGCCTGAAATTGTGCC (30 mer)	
HPV 11 : CGCCTCCACCAAATGGTACACTGGAGGATA (30 mer)	

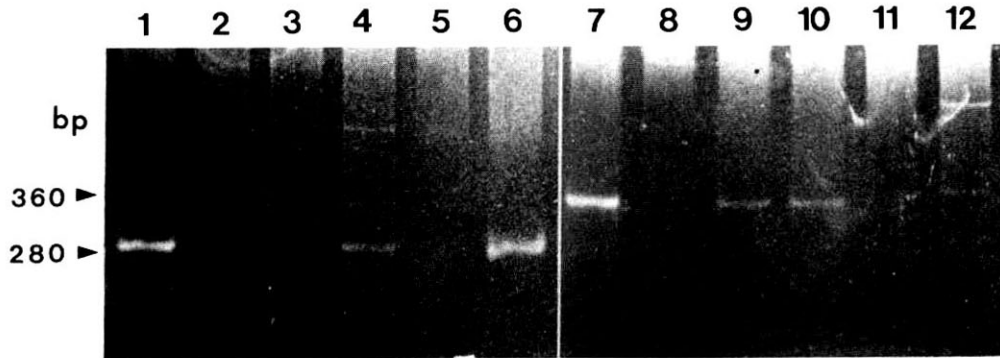


Fig. 1. DNA (0.25 ug) isolated from genital warts and laryngeal papillomas was subjected 30 cycles of amplification with primers specific for HPV6 and HPV11. Lane 1~6 represent amplified HPV6 fragments (280 bp) and lane 7~12 represent amplified HPV11 fragments (360 bp).

였다(denaturation, 94°C: annealing, 50°C: extension, 72°C) 반응에는 programmable heat block(Hybaidd thermal reactor: Hybaidd Ltd, U.K)을 사용하였으며 반응이 끝난 후 10 ul를 2~3% 아가로스 젤 또는 8% 폴리아크릴아마이드 젤에 전기영동을 시행하여 증폭여부를 판독하였다. 증폭된 DNA는 나이론 막에 전이시켜 증폭된 부분에 해당하는 oligonucleotide를 동위원소로 표지하여 교잡반응(hybridization)을 시도하였으며 영하 70도에서 1~2일 노출시켜 현상하였다.

결 과

HPV6, HPV11은 각각 예상한 바와 같이 280 bp, 360 bp의 증폭된 DNA를 관찰 할 수 있었으며 증폭된 DNA는 증폭될 부분의 안쪽 염기서열에 해당하는 소식자에 방사선 표지를 붙여 hybridization을 시도한 결과 양성 반응을 보여 증폭 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 1, 2).

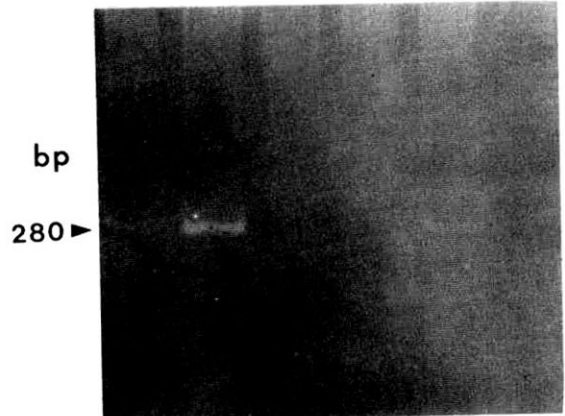


Fig. 2. Agarose gel analysis of HPV6 specific PCR amplification of DNA. DNA was extracted from cervicovaginal cells in normal individuals. Amplified bands of 280 base pairs indicates the presence of HPV6 in the specimens.

Table 2. Results of Polymerase Chain Reaction

	HPV6	HPV11	HPV6/11	Total
Genital warts	15 (75)	13 (65)	8 (40)	20 (100)
Laryngeal papilloma	11 (68.8)	6 (37.5)	1 (6.3)	16 (100)
Mother of children's condyloma and laryngeal papilloma patients	—	2 (22.2)	—	9 (100)
Normal women (18) and women with previous condyloma (3)	6 (28.6)	1 (4.8)	—	21 (100)
Total	32 (48.5)	21 (31.8)	9 (13.6)	66 (100)

실험결과는 Table 2에 정리하였는데 침균콘딜롬 20예 중 HPV6이 15예, HPV11이 13예에서 발견되었으며 8예에서는 두가지 형이 같이 있었다. 후두유두종에서는 16예 중 HPV6이 11예 HPV11이 6예에서 있었고 1예에는 두가지 형이 같이 발견되었다. 과거력상 침균콘딜롬이 있었던 환자 및 정상인에서는 총 21예 중 6예에서 HPV6이 발견되었고 HPV11은 1예에서 있었다. 전과 경로의 추정을 위하여 조사한 소아 후두유두종 및 침균콘딜롬 환자 어머니에서는 총 9예 중 2예에서 HPV가 발견되었다.

고 찰

분자생물학의 짧은 역사에 있어 Southern blotting, molecular cloning과 같은 기술의 개발은 생물학 연구의 새로운 가능성을 제시한 큰 전기가 될 수 있었다. 최근 개발된 PCR은 특정 염기서열을 in vitro에서 증폭시킬 수 있는 방법으로 이론상 수백만배의 증폭도 가능한 것으로 생각하고 있다⁷⁾. 이 방법은 sickle cell anemia의 진단에 처음으로 이용되었으며⁸⁾ 유전질환의 진단이나 유전자보유자의 검색 및 암, 각종 전염성질환의 연구에 널리 사용되기 시작하였다⁹⁻¹²⁾.

이 방법은 HPV의 연구에 있어 각 형에 특이한 염기서열을 증폭시켜 예민하면서도 형에 특이한 검출이 가능하게 됨에 따라 적은 양의 검체에서도 바이러스의 검출이 가능하게 되었음은 물론 역학적인 수단으로서도 사용하게 되었다^{13,14)}.

침균콘딜롬 및 후두유두종은 주로 HPV6과 HPV11에 의해 발생됨이 보고되어 왔는데³⁾ Halden과 Majumdar¹⁵⁾에 따르면 소아 유두종환자의 약 50%에서 분만 또는 임신중에 어머니의 침균콘딜롬 병력이 있었음을 보고하여 두 질환의 밀접한 연관성을 주장하였다. 그러나 두 질환에서 발견되는 HPV의 종류가 저자에 따라 빈도의 차이가 있으며³⁻⁵⁾ 실제로 소아 후두유두종 환자에서 어머니의 침균콘딜롬 병력이 있는 예는 많지 않아 두 질환의 역학적 관계는 아직 확실하지 않다. 저자가 조사연구한 결과 침균콘딜롬 환자 20예 중 15예가 HPV6, 13예가 HPV11이 발견되어 Southern hybridization에 의한 박등¹⁶⁾의 연구결과와 유사한 소견을 보였으며 후두유두종의 경우 국내에서는 이에 대한 연구결과가 없으나 저자의 결과에 따르면 16예 중 11예가

HPV6, 6예가 HPV11로서 침균콘딜롬과 비슷한 양상을 보여주었다. 후두유두종은 현재 HPV에 의한 질환임이 어느 정도 인정되고 있었으나 저자들의 연구결과 후두유두종 전례에서 바이러스가 발견되었고 같은 시기에 모은 두 질환에서 HPV6, 11이 비슷한 빈도로 발견되어 두 질환은 같은 바이러스에 의해 발병하며 상호 역학적으로 연관되어 있음을 추측할 수 있었다.

자궁경부암의 원인으로 의심되고 있는 HPV16/18의 경우 자궁이형성증은 물론 정상여성의 자궁경부에서도 발견되어¹⁷⁾ 바이러스의 병원성 및 역학에 대한 재고찰이 필요하게 되었다. 그러나 HPV6/11의 경우 임상적으로 침균콘딜롬이나 후두유두종을 일으키는 이외에 잠복 감염의 형태로 존재할 수 있는지에 대해 별로 알려진 바가 없으나 최근 Pao 등¹⁸⁾의 보고에 따르면 정상여성 산도내의 세포를 대상으로 PCR을 수행한 결과 약 30%에서 HPV6, 11이 매우 적은 수에서 존재하며 이들은 일과성으로 존재한다고 보고하였다. 이들의 보고에 따르면 산도내에 존재하는 적은 수의 HPV의 임상적 의의는 아직 확실하지 않으며 어떠한 경우에 침균콘딜롬이나 후두유두종과 같은 임상적 질환을 일으키는 지에 대해서는 더욱 연구가 필요하리라고 하였다. 저자들의 연구결과도 정상인 및 과거력상 침균콘딜롬이 있었던 환자의 33.4%에서 HPV가 발견되어 Pao 등¹⁸⁾의 결과와 일치하였다. 한편 소아의 후두유두종 및 침균콘딜롬 환자의 어머니에서는 9예 중 2예에서 HPV가 발견되어 잠복감염은 실제로 존재하는 것을 확인할 수 있었으나 소아 후두유두종 환자 및 침균콘딜롬 환자 어머니에서 일부만 발견된 것으로 보아 다른 경로를 통한 감염이 이루어졌는지 Pao 등¹⁸⁾과 같이 일과성인 바이러스의 존재로부터 전파되었는지는 규명하지 못하였다. 헤르페스 감염시 신생아 헤르페스가 발생한 경우 일부만 산모가 현증이 있었을 뿐 대부분은 산모가 증상이 없어 이의 예방이 어려운 것으로 알려져 있으며 바이러스 뿐만 아니라 개체의 면역상태도 발병에 중요한 인자가 되리라고 생각되고 있다¹⁹⁾. Pao 등¹⁸⁾과 저자들의 연구결과를 볼 때 HPV6, 11도 침균콘딜롬 및 후두유두종등의 질환을 일으키는 외에도 일과성으로 존재할 수 있으며 이러한 상태의 임상적 의의는 확실하지 않으나 헤르페스와 마찬가지로 개체의 면역기능이 떨어진 경우에 발병하는 것이 아닌가 추측된다. 따라서 소아의 침균콘딜롬 및 유전형 후두유두종의 경우 산모의 산도를 통한 전염의 가능성이

높으리라 생각되며 산모의 침균콘딜롬은 제왕절개의 적응증으로 추가되어 난치성 질환인 후두유두종의 발생을 예방하여야 할 것으로 생각된다. 가족력 및 과거력상 이러한 감염이 의심되는 예들을 PCR을 이용하여 바이러스 검색을 시도 이들 질환의 발생을 사전에 예방하여야 할 것으로 생각되며 일과성으로 존재하는 바이러스의 임상적 의의에 대한 연구가 추후 필요할 것으로 판단된다.

결 론

침균콘딜롬 및 후두유두종의 HPV를 PCR로 조사한 결과 침균콘딜롬 20예중 15예는 HPV6, 13예는 HPV11이 발견되었으며 8예는 두가지 형이 같이 있었다. 후두유두종은 16예중 HPV6이 11예, HPV11이 6예에서 있었고 1예만 두가지 형이 같이 발견되었다. 따라서 후두유두종은 HPV6, 11에 의해 발생하는 바이러스성 질환임을 확인할 수 있었으며 침균콘딜롬과의 밀접한 관계를 추측할 수 있었다.

두 질환의 역학적 관계를 알아보기 위하여 정상여성 및 과거력상 자궁경부의 침균콘딜롬의 병력이 있는 여성을 대상으로 자궁경부의 세포를 채취하여 HPV6, 11의 잠복 가능성을 알아본 결과 총 21예중 7예에서 HPV가 발견되어 HPV6, 11이 잠복할 수 있음을 알 수 있었으나 이러한 잠복감염의 임상적 의미는 아직 확실하지 않다. 소아에서 발생한 침균콘딜롬 및 후두유두종 환자 어머니의 자궁경부세포를 채취하여 HPV의 존재를 조사해 본 결과 9예 중 2예에서 HPV가 발견되어 HPV6, 11의 산도를 통한 감염 가능성을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- Oriel JD: *Genital and anal papillomaviruse infections in human males. In Papillomaviruses and human disease.* Syrjanen K, Gissman L, Koss LG (eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1987, pp 182-196
- Gross G, Ikenberg H, Gissmann L et al: *Papillomavirus infection of the anogenital region.* J Invest Dermatol 85:147, 1985
- Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H et al: *Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers.* Proc Natl Acad Sci USA 80:560-563, 1983
- Corbitte G, Zarod AP, Arrand JR et al: *Human papillomavirus genotypes associated with laryngeal papilloma.* J Clin Pathol 41:284, 1988
- Mounts P et al: *Viral etiology of juvenile-and adult-onset squamous papilloma of the larynx.* Proc Natl Acad Sci USA 79:5425, 1982
- Melchers WJG, Schiff R, Stolz E, et al: *Human papillomavirus detection in urine samples from male patients by the polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol 1989;27:1711
- Guyer RL, Koshland DE: *The molecule of the year.* Science 22:1543, 1989
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al: *Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle cell anemia.* Science 230, 1350, 1985
- Chamberlin JS, Gibbs RA, Ranier JE et al: *Multiplex amplification for diagnosis of Duchenne's muscular dystrophy. In Current communicatins in molecular biology.* Ehrlich HA, Gibbs R, Kazazian HH (eds) Cold spring Harbor Laboratory Press New York, 1989, pp 75-pp 81
- Johannes LB: *Detection of ras oncogenes using PCR. In PCR techology.* Ehrlich HA (ed) M stockton press, New York, 1989, pp 225
- Kwok S, Sninsky JJ: *Application of PCR to the detection of human infectious disease. In PCR technology* Ehrlich HA (ed) Macmillan publishers LTD, New York, pp 235-244
- Ou Cy, Kwok S, Mitchell SW et al: *DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells.* Science 239, 295, 1988
- Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N et al: *Detection of Human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction.* Amer J Surg Pathol 13:221, 1989
- Ting Y, Mans MM: *Detection and typing of genital human papillomaviruses. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds): PCR protocols.* Academic Press, Inc, San diego, 1990, pp 356-367
- Hallden C, Majmudar B: *The relationship between juvenile laryngeal papillomatosis and maternal condylomata acuminata.* J Repro Med 31:804-807, 1986
- 박경찬, 이상학, 이유신의: *Molecular hybridization을 이용한 침균콘딜롬의 Human papillomavirus*

- DNA의 검색. 대한피부과학회지 27:660, 1989
- 17) Shibata D, Fu Ys, Gupta JW, Shah KV, Arnheim N, Martin WJ: *Methods in laboratory investigation. Detection of human papillomavirus in normal and dysplastic tissue by the polymerase chain reaction. Lab Invest* 59:555-559, 1988
- 18) Pao CC, Lin CY, Maa JS, Lai CH, Wu SY, Soong YK: *Detection of human papillomaviruses in cervicovaginal cells using polymerase chain reaction. JID* 161:113-115, 1990
- 19) Arnold HL, Odom RB, James WD: *Andrew's Diseases of the Skin. 8th (ed), WB Saunders, Philadelphia, 1990, pp 437-445*
-