

후두편평세포암종에서 인유두종 바이러스의 검출

조선대학교 의과대학 이비인후과학교실

김완수·박성웅·마현웅·도남웅·김응기·이도용·나한조

=Abstract =

Detection of Human Papillomavirus in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas

Wan Soo Kim, MD, Sung Yong Park, MD, Hyun Woong Ma, MD,
Nam-Young Doh, MD, Yong Gi Kim, MD, Do Yong Lee, MD, Han Jo Na, MD

*Department of Otorhinolaryngology,
College of Medicine, Chosun University, Kwang-ju, Korea*

Human papillomavirus(HPV) is epitheliotrophic virus invading the anogenital tract and the upper aerodigestive tract. HPV produces a diversity of benign and malignant tumors. In this study, the author determined the frequency of association of human papillomavirus(HPV) and laryngeal carcinomas and investigated the significance of HPV infection of different subtypes in the tumorigenesis of laryngeal carcinoma. Laryngeal squamous cell carcinomas from 34 patients who did not have preexisting papillomas by clinical history were retrieved from formalin-fixed, paraffin-embedded blocks and analyzed for HPV. Nineteen cases were tumors of the true vocal folds, 11 were supraglottic and 4 were transglottic. HPV detection was done using polymerase chain reaction amplification with HPV L₁ consensus primer. HPV type was determined by the same method using HPV-6, 11 and 16,-18 type-specific E6 primers.

The results were as follows :

- 1) HPV DNA was detected in 7 cases among the 34 patients(20.6%). According to the type of HPV DNA, HPV-11 was detected in 3 cases, HPV-16 was detected in 2 cases & HPV-6 and HPV-18 were detected in 1 case, respectively.
- 2) These 7 HPV-positive patients were advanced carcinoma cases. From these results, we concluded that HPV was thought to be the etiological factor of laryngeal squamous cell carcinomas.

Key Words: HPV, Laryngeal squamous cell carcinoma, PCR

교신 저자 : 김완수(Wan Soo Kim, M.D.)
501-140 광주광역시 동구 서석동 588 조선대학교병원 이비인후과학교실
Tel : 062) 220-3200, Fax : 062) 225-2702

I. 서 론

Human papillomavirus(HPV)는 Papovaviridae군에 속하는 이중쇄 구조의 DNA virus로서 피부, 항문-성기기관 및 호흡-소화기관의 상피세포 조직에 감염되어 양성 또는 악성종양을 일으키는 원인으로 알려져 있다¹⁾. 조직내의 virus 존재를 확인하는 방법으로는 광학현미경이나 전자 현미경을 이용한 세포내 봉입체나 virion의 확인, 항체를 이용한 면역조직화학 염색법, southern blot hybridization, in situ hybridization(ISH), polymerase chain reaction(PCR) 등의 방법이 있으며, PCR은 바이러스가 감염된 위치는 알 수 없으나 염기서열을 수백만배까지 증폭시킬 수 있어 민감도가 매우 높으며 파라핀에 포매된 조직을 사용할 수 있는 장점이 있다. Lorincz 등²⁾은 자궁경부암의 종양 조직에서 HPV DNA가 80%이상 검출되고 자궁경부의 상피내 종양과 침윤성 자궁 경부암에서 HPV-16,-18의 검출율이 높아 자궁경부암의 발생과 HPV가 연관성이 있을 것이라고 하였다. 두경부 암중에서 HPV감염률은 검출 방법에 따라 보고자마다 다소 차이를 보이는데, 하인두 암에서는 12~45%, 후두암에서는 5.1~12.9%의 감염률이 보고되고 있으며³⁾, HPV의 아형은 악성종양에서는 주로 HPV type 16, 18, 31, 33의 순으로 감염이 일어난다고 보고되었다⁴⁾. 또한 HPV-6, -11이 후두 유두종⁵⁾에서, HPV-16은 설암, 편도암, 인두암, 후두암⁶⁾에서 검출되어 두경부종양의 발생과 HPV가 연관성이 있을 가능성이 제시되고 있으나 HPV의 역할 및 의의에 대하여 정확히 알려져 있지 않다.

이에 저자들은 후두암 34례를 대상으로 PCR을 이용하여 HPV DNA 존재 유무를 관찰하여 후두 편평세포암과 HPV와의 관련성을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대 상

1993년 1월부터 1996년 12월까지 조선대학교 부속병원 이비인후과에서 후두의 편평세포암종으로

진단받고 수술을 받았던 34례의 환자에서 수술후 적출된 종양의 파라핀포매 조직을 이용하였다. 성별은 남자가 31명, 여자 3명이었다. 연령 분포는 44세에서 87세로 평균 63세 이었다. 환자의 임상적 병기는 American Joint of Cancer Committee의 분류방법⁷⁾을 따라 결정하였다.

2. 방 법

1) DNA 추출

파라핀 절편을 약 10 μ m두께로 2-3개씩 잘라 1.5ml Eppendorf tube에 넣었다. 이때 시료들간의 상호 오염을 방지하기 위하여 조직절단에 사용한 칼은 한 시료를 자른 후 xylene으로 깨끗이 닦았으며 이하의 실험에 사용되는 시약 및 모든 기구는 소독하거나 autoclave하여 사용하였다. 1ml의 xylene을 섞어 60 $^{\circ}$ C 수조에 약 20분간 담근 후 1,500rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 버리는 과정을 3번 반복하였다. 100% 에탄올 1ml을 넣어 1,500rpm에서 3분간을 원심분리후 상층액을 버렸으며 이러한 과정을 2번 반복하여 xylene을 제거한 후 70% 에탄올 1ml을 넣어 1,500rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 버렸다. pellet을 공기층에서 완전히 건조시킨 후 resin이 들어있는 용해용액(대한 메디칼, Cat #DHP-04) 200 μ l에 proteinase K(20mg/ml) 1 μ l를 넣은 다음 55 $^{\circ}$ C 수조에 하루밤동안 방치하여 조직 절편이 완전히 용해되도록 두었다. 그 후 10분동안 끓여주고 얼음에 식혀준 후 1,500rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 새 tube에 옮겼다.

2) Primers 및 Controls

HPV type 일부를 동시에 증폭시키는 1차 PCR 후 특이적인 primer로 2차 PCR을 시행하였다. 1차 PCR은 여러 유형(type 6, 11, 16, 18, 31, 35, 39, 42, 45, 51, 52, 56등 40여종을 포함함)의 HPV 검출을 위한 공동 시발체(consensus primer)를 이용하였으며 HPV의 L1부위 중 상동성이 있는 부분으로 선택하여 제작한 primer(대한메디칼)를 사용하였다. 2차 PCR은 유형특이성 primer로 nested PCR을 시행하였으며 이들 primer로는 HPV 6, 11, 16, 18의 4가지 유형을 사용하였으며 이들은 E6부위에서 합성한 primer(대한메디칼) 이었다.

PCR의 최대 한계점은 aerosol때문에 생긴 PCR산물에 의한 오염인데 이러한 위양성 방지를 위하여 UNG(Uracil-N-glycosylase)처리를 하여 오염된 DNA를 제거하여 주는 오염방지 조치를 모든 1차 PCR에 적용하였다.

HPV감염 여부를 알기 위한 양성 대조군으로서 이미 HPV감염이 알려져 있는 자궁 경부 편평 세포암종 유래 세포주 CaS(HPV 16이 200copies/cell), HeLa(HPV 18이 10-50/cell)(대한메디칼)를 이용하였다. 음성대조군은 template DNA 대신에 소독된 증류수를 동량으로 사용하였다. 이 과정에서 실험시료에 대한 control DNA의 오염을 방지하기 위하여 DNA분리작업과 PCR반응을 위한 작업은 각각 다른 장소에서 시행하였다.

3) Polymerase chain reaction

Biometra사의 UNO-Thermoblock을 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응액 총량은 50 μ l로 하였고 1차 PCR시 조성은 10x reaction buffer 5 μ l, 25mM MgCl₂ 6 μ l, 10mM dNTPs 1 μ l, primer 5 μ l(10pmoles), enzyme stabilizer 4 μ l, 1.0U UNG 1.5 μ l, 5.0U Taq polymerase 0.3 μ l(대한메디칼), template DNA 10 μ l와 증류수 18.2 μ l를 혼합하고 50 μ l mineral oil로 반응액을 덮은 후 50 $^{\circ}$ C에서 3분(UNG inactivation), 94 $^{\circ}$ C에서 3분 전변성(predenaturation)시행후 94 $^{\circ}$ C에서 30초 변성(denaturation), 56 $^{\circ}$ C에서 30초 결합(annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 30초 연장(extension)를 40회 반복시행하였고 마지막에 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 postextension을 시행하였다. 제 2차 PCR반응은 제 1차 PCR 산물 1 μ l를 DNA template로 하고 10x reaction buffer 5 μ l, 25mM MgCl₂ 6 μ l, 10mM dNTPs 1 μ l, HPV 16, 18, 11 primer는 6 μ l(10pmoles), HPV 6 primer는 4 μ l(10pmoles), enzyme stabilizer 4 μ l, 5.0U Taq polymerase 0.3 μ l(대한메디칼), 증류수는 총량이 50 μ l가 되게 혼합하고 50 μ l mineral oil로 반응액을 덮은 후 94 $^{\circ}$ C에서 3분씩 22회 시행하였고 마지막에 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 postextension을 시행하였다. PCR 산물 일부(10 μ l)를 취하여 1 μ l의 loading dye와 잘 섞은 후 ethidium bromide가 섞인 2% agarose gel에서 100volts로 30-35분간 전기영동하

고 ultraviolet light하에서 DNA 증폭여부를 확인하였다. 크기 표식자로 100bp 크기(대한 메디칼)를 사용하였고 각각 1, 2차 PCR후 표 1에 언급된 크기에서 띠가 관찰될 때를 양성으로 간주하였다.

3. 자료분석과 통계처리

통계학적 유의성 검정은 Chi-square method로 하였다. 유의성 검정에서 유의 수준은 p<0.05범위로 정하였다.

III. 결 과

1. 임상 및 병리 조직학적 특징과 HPV DNA 검출 연령에 따른 HPV DNA 검출율은 60세 이상군에서 21.4%로서 60세 이하군보다 약간 높았으나 통계학적 의의는 없었다. 임상적 병기는 제 I기와 II기의 조기암군에서는 전례에서 검출되지 않았으나 제 III기와 IV기의 진행암군에서는 24례중 7례(29.2%)가 검출되어 통계적으로도 유의한 차이를 보였다. 종양의 후두내 발생부위에 따른 HPV DNA 검출은 성문상부암에서 11례중 6례(54.5%)가 검출되어 성문부의 5.3%에 비하여 높게 나타나 유의한 차이를 보였다. 병리조직학적 분화도와 검출율의 관계는 고분화암이 26.3%, 중등도 분화암이 15.4%, 미분화암이 0%로 분화도가 높을수록 검출율이 증가되었으나 통계적인 유의성은 없었다. 경부 임프절 전이와의 관계는 전이가 없었던 군이 21.4%로 있었던 군보다 높았으나 유의성이 없었다(Table 1).

2. HPV DNA 아형에 따른 검출과 원발부위와의 관계

HPV L1 consensus primer를 사용한 중합효소 연쇄반응에서 후두암 34례중 7례(20.6%)에서 HPV DNA가 검출되었으며 HPV아형에 따른 검출결과는 HPV-11형이 성문 상부암 3례(27.2%)에서 검출되었으며, HPV-16형이 성문 상부암과 성문암에서 각 1례씩 검출되었고, HPV-6형과 18형이 성문상부암에서 각 1례씩 검출되었다. 이 중 성문상부암에서 HPV-6형과 11형이 1례, HPV-16형과 18형이 각 1례씩 중복 감염되어 있음을 확인하였다(Table 2).

Table 1. Incidence of HPV DNA detection according to the clinicopathologic characteristics of 34 laryngeal S.C.C.

Clinicopathologic characteristics		No. of Patients	Detection of HPV DNA(%)
Age	<60	6	1 (16.7)
	≥60	28	6 (21.4)
Clinical stage	Early (I&II)	10	0 (0)
	Advanced (III&IV)	24	7 (29.2)
Anatomical site	Supraglottic	11	6 (54.5)
	Glottic	19	1 (5.3)
	Transglottic	4	0 (0)
Histologic differentiation	Well	19	5 (26.3)
	Moderately	13	2 (15.4)
	Poorly	2	0 (0)
cervical lymph node metastasis	Present	6	1 (16.7)
	Abscent	28	6 (21.4)

Table 2. Prevalence and subtypes of HPV in laryngeal squamous cell carcinoma

Types of tumor	No. of HPV positive cases(%)			
	6	11	16	18
Supraglottic(N=11)	* 1(9.1)	* 3(27.2)	* * 1(9.1)	* * 1(9.1)
Glottic (N=19)	-	-	1(5.2)	-
Transglottic(N=4)	-	-	-	-
Total (N=34)	1(2.9)	3(8.8)	2(5.9)	1(2.9)

* : coinfectd with HPV-6 and HPV-11, * * : coinfectd with HPV-16 and HPV-18

IV. 고 찰

후두암은 우리 몸에 발생하는 암의 약 1.2%를 차지하며 5배 내지 10배 정도 남자에 많이 발생하며 주로 60대이상의 고령에서 발생하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 후두암의 발생원인은 만성적인 음주, 흡연으로 알려져 왔으나⁹⁾ 최근 10년간 젊은 세대 및 여성에서 발병율이 증가하고 이들의 경우 진행과정이 빠르고 더 나쁜 예후를 보여, 그 외의 다른

발병 원인에도 관심을 갖게 되었다¹⁰⁾.

HPV는 우리 몸에 발생하는 여러 종양들과 연관이 있고 그 중에서도 특히 자궁경부암의 주요 발생원인으로 알려져 있다¹¹⁾. HPV 중 type 6과 11이 후두유두종의 원인으로 밝혀지면서¹²⁾ 후두를 포함한 두경부에 발생하는 악성종양에서도 HPV와의 관계를 밝히려는 노력이 분자생물학 및 의용전자공학을 이용하여 시도되고 있다. 두경부는 해부학적 특성상 암 유발원인에 동시에 노출됨으로 두경

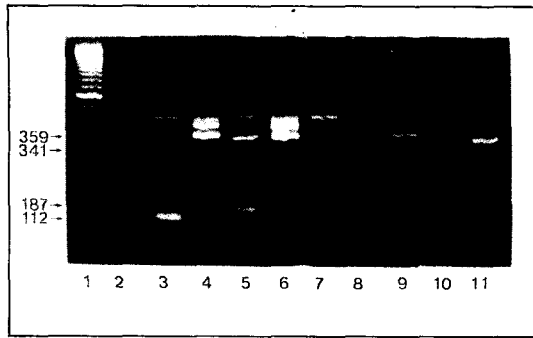


Fig. 1. Result of electrophoresis in PCR. Lane 1 : size marker. Lane 2 : negative control. Lane 3 : positive control, HPV type 6 in 112 bp. Lane 4 : positive control, HPV type 11 in 359 bp. Lane 5 : positive control, HPV type 16 in 187 bp & type 18 in 341 bp. Lane 6, 7 : cases were positive for HPV type 11 & type 6. Lane 8, 9 : cases were positive for HPV type 11. Lane 10 : case was positive for HPV type 16. Lane 11 : case was positive for HPV type 16 & type 18.

부 각 부위는 같은 원인에 의해 암이 유발될 수 있다. HPV와 두경부암의 연관성은 설암, 편도암, 비-부비동암 및 기타두경부 각 부위에서 발생하는 암 등에서 연구되었다. Kahn 등¹³⁾은 후두암에서 HPV-30을 새로이 분자 클로닝하여 HPV가 후두암의 원인이 될 수 있다는 가능성을 제시하였다.

HPV는 papovaviridae의 일종으로 72 capsomer의 단백 껍질로 둘러싸인 8,000 염기쌍의 DNA virus로서, 유전자 구조의 차이에 따라 약 60여종의 아형(subtype)이 밝혀져 있으며, epitheliotropic virus로서 동물이나 인체의 상피세포조직에서 양성 혹은 악성종양의 원인인자로 작용하고 있다¹⁴⁾. HPV에 감염된 상피조직의 keratinocyte나 koilocyte는 불멸화(immortalization)되게 되며, 시간이 경과하면서 담배, 방사선, 화학물질 등과 같은 조인자(cofactor)와의 상승작용 효과에 의하여 악성세포의 형질 전환이 이루어지게 된다¹⁵⁾. 이러한 조직에서 integrated viral DNA가 발견되고, HPV DNA의 특이 시발체(open reading frame, E6나 E7부위)로부터 특이 전사(transcription)가 일어나며, HPV type 16, 18 DNA가 포함된 종양에서 aneuploidy가 있는 것 등이 HPV가 종양발생에 관여한다는 것을 증명하여 주고 있다¹⁶⁾. 조직내의 virus존재를 확인

하는 방법으로는 광학현미경이나 전자현미경을 이용한 세포내 봉입체나 virion의 확인, 항체를 이용한 면역조직화학 염색법, southern blot hybridization, in situ hybridization(ISH), polymerase chain reaction(PCR) 등의 방법이 있다. 이 중 ISH법은 1969년 Gall 등에 의하여 처음 소개된 이후 분자생물학의 발전과 함께 virus감염진단에 있어서 특이성이 가장 높은 검사법으로 알려져 있다. ISH법의 장점은 조직을 분쇄하지 않고 그대로 이용하므로 세포나 조직의 형태가 잘 보존된 상태에서 양성 반응을 나타내므로 감염된 세포의 조직내 위치 및 세포내 감염부위도 확인할 수 있어 특이성이 높다. 또한 소식자(probe)와 표적 DNA나 RNA간의 결합이므로 훨씬 선택적이고 강한 결합을 이루며, 파라핀 절편을 이용할 수 있기 때문에 아주 적은 검체물로 검사가 가능하고 후향적 검사가 가능하다는 장점이 있다¹⁷⁾. 그러나 각세포에 50-200개 이상의 virus genome이 있어야 검출이 가능하기 때문에 southern blot hybridization이나 PCR에 비하여 민감도가 떨어진다는 단점이 있다¹⁸⁾. 이에 반해 PCR은 특정 DNA검출에서 정확도와 예민도가 교잡법 등의 방법보다 우수한 것으로 알려져 있고¹⁹⁾ 파라핀 포매 조직으로부터 추출된 DNA에서도 HPV DNA를 검출할 수 있으며²⁰⁾ 오래 보관되었던 파라핀 포매조직에서도 성공적인 PCR 결과를 얻을 수 있다는 것이 보고되어²¹⁾ 최근 후향적 연구방법으로 많이 사용되고 있다.

본 연구에서는 대한메디칼에서 제작한 HPV의 L1부위 중 상동성이 있는 부분으로 선택하여 제작한 공동 시발체(consensus primer)를 이용하여 1차 PCR에 사용하였으며, 2차 PCR은 유형-특이성 primer를 이용하여 HPV type 6, 11, 16, 18의 4가지 유형을 사용한 nested PCR을 시행하였다. 34명의 후두암 환자중 20.6%인 7명에서 HPV DNA가 검출되었으며 이는 같은 파라핀 포매 조직을 이용했던 다른 연구들과 비교할 때 Hoshikawa 등¹⁸⁾의 20.6%, Kiyabu 등²⁰⁾의 40%보다는 같거나 낮게 나타났으나 Brandwein 등²²⁾의 8%보다는 높게 나타났다. HPV DNA가 검출된 군의 임상적 특성을 분석해 보면 후두암의 호발연령인 60대를 기준으로하여 60세 이전에 발생한 군과 이후에 발생한 군을

비교해볼 때 양군간의 차이는 없었는데, 이는 젊은 군에서 HPV DNA가 더 많이 검출되었던 Hoshikawa 등¹⁸⁾의 보고와 차이를 보였다. HPV DNA의 검출은 병기별로는 진행암인 III, IV기 후두암에서는 29.2%에서 나타난 반면 조기암인 I, II기 후두암에서는 검출되지 않았으며 이는 통계학적으로 유의한 수치였다. Jensen 등²³⁾은 HPV에 의해 초래되는 세포 병변은 피부 표층에 있는 완전 분화된 세포에서 주로 발생한다고 보고하였는데, 본 연구의 경우 HPV DNA가 검출되었던 7예 모두 종양의 분화도가 중등도 이상의 좋은 분화도를 보였고 이는 Ishibashi 등²⁴⁾의 보고와 일치하였다. 해부학적 발생 부위별로는 성문상부암 환자의 54.5%에서 HPV DNA가 검출되어 성문암 환자의 5.3%보다 많았으며 이는 통계학적으로 유의하였으나 민 등²⁵⁾의 성문상부암종 26례중 10례(38.46%), 성문암종 13례중 5례(38.46%)와 약간 다른 양상을 보였다.

두경부종양에 관여하는 HPV아형은 이들이 유발하는 종양의 악성도 정도에 따라 3군으로 나눌 수 있는데, HPV type 16, 18은 심한 세포이형성증, 전구암 병소, 악성 상피변형을 예측하는 지표로 사용되므로 고위험군(high risk group)으로 분류하며, HPV 31, 33, 35는 상피내암종에서 고도의 세포이형성을 나타내므로 중등도 위험군(intermediate risk group)으로, HPV type 6, 11은 저급 상피내암종이나 양성유두종과 연관이 있으므로 저위험군(low risk group)으로 분류하는데⁴⁾ 두경부 암의 경우 HPV의 아형은 악성종양에서는 주로 HPV type 16, 18, 31, 33의 순으로 감염이 일어난다⁴⁾. HPV type 6, 11은 Hoshikawa 등¹⁸⁾의 성문상부암 23례중 1례(8.7%)에서 HPV type 6의 감염을, Tyan 등²⁶⁾은 후두암에서 HPV type 11의 감염을 10례중 1례(10%)에서 보고하였으며 민 등²⁵⁾은 성문 상부암에서 HPV type 16이 3례(11.53%), type 18이 5례(19.53%), 성문암에서는 HPV type 18이 2례(15.38%) 검출을 보고하였고, 또한, 성문상부암에서 HPV type 6이 2례(7.69%), 성문암에서는 HPV type 6, 11이 각각 2례(15.38%), 1례(7.69%)를 보고하였다. 본 연구에서는 성문상부암에서 HPV type 11이 3례(27.2%), type 6이 1례(9.1%), type 16과 18이 각각 1례(9.1%)이었으며, 성문암에서는 HPV type 16

이 1례(5.2%)검출되어 이제까지의 보고자들과 다소 차이를 보여 HPV아형이 후두종양의 발생에 어떠한 영향을 미치는지를 규명하기 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

후두의 편평상피세포암 34예를 대상으로 중합효소연쇄반응을 통해서 HPV DNA를 검색하여 임상적 특징과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HPV DNA는 34명중 7명(20.6%)에서 검출되었고 모두 진행암에서 검출되었다.
2. HPV 감염은 성문상부암에서 54.5%로 성문암 5.3%에 비해 통계학적으로 유의하게 높았으며, 성문상부암에서 HPV type 11이 3례(27.2%), type 6이 1례(9.1%), type 16과 18이 각각 1례(9.1%)이었고 성문암에서는 HPV type 16이 1례(5.2%)검출되었다.
3. HPV 양성을 보인 7예 모두 중등도 이상의 종양세포 분화도를 보였다. 이상의 결과로 HPV 감염은 후두 편평세포암의 유발에 어느정도 관여하리라 생각되나 후두암의 병기와 부위에 따른 HPV 감염률의 차이와 HPV 아형과의 연관관계는 보다 많은 증례를 이용한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

References

1. Pfister H, Fuchs PG: *Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. Intervirology. 1994; 37: 143-149.*
2. Lorincz AT, Temple GF, Furman RJ, et al: *Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. J Cancer Inst. 1987; 79: 671-677.*
3. Brandsma JL, Abramson AL: *Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1989; 15: 621-625.*
4. Ogura H, Watanabe S, Fukushima K, et al: *Presence of human papillomavirus type 18 DNA in a pharyngeal and a laryngeal*

- carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 1991; 82: 1184-1186.
5. Gissmann L, Wolink L, Ikenberg H: Human-papillomavirus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80: 560-563.
 6. Brandsma JL, Abramson AL: Association of papillomavirus with cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol.* 1989; 1145: 621-625.
 7. Beahrs OH: *Manual for staging of cancer. 4th ed Philadelphia JB Lippincott Press.* 1992.
 8. Sasaki CT & Carlson RD: Malignant neoplasm of the larynx In: *Otolaryngology Head and Neck Surgery, 2nd Ed Cummings CW, Fredrickson JM, Krause CJ, Schuller DE, St Louis Mosby Year Book Vol 3:* 1993; 1925-1954.
 9. Decker J & Goldstein JC: Risk factor in head and neck cancer. *New Engl J Med.* 1982; 306: 1151-1155.
 10. Bradford CR, Zacks SE, Androphy EJ, et al: Human papillomavirus DNA sequences in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991; 104: 303-310.
 11. Zur Hausen H: Papillomaviruses in human cancer. *Cancer.* 1987; 59: 1692-1696.
 12. Gissmann L, Wolink L & Ikenberg H: Human papillomavirus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80: 560-563.
 13. Kahn T, Schwarz E & zur Hausen H: Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus(HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 1986; 37: 61-65.
 14. Lindeberg H, Fey SJ, Ottosen PD, et al: Human papillomavirus(HPV) and carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol.* 1988; 13: 447-454.
 15. Chen MR, Middledrop JM, Hayward SD: Separation of the complex DNA binding domain of EBNA1 into DNA recognition and dimerization subdomains of novel structure. *J Virol.* 1993; 67: 4875-85.
 16. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, et al: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical cells. *Nature.* 1985; 314: 111-114.
 17. Kim PS, Cho JS, Rhyu JJ, Park EH, Lee CW: Detection of human papillomavirus by one hour in situ hybridization in laryngeal papilloma. *Korean J otorhinolaryngol Head Neck surg.* 1995; 38(7): 1072-1080.
 18. Hoshikawa T, Nakajima T, Uhara H, et al: Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. *Laryngoscope.* 1990; 100: 647-650.
 19. Sarkar FH & Crissman JD: Detection of human papillomavirus DNA sequences by polymerase chain reaction. *Biotechniques.* 1990; 9: 180-185.
 20. Shibata D, Martin WJ & Arnheim N: Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections.: A bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer Research.* 1988; 48: 4554-4566.
 21. Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N, Martin WJ & Fitzgibbons PL: Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol.* 1989; 13: 221-224.
 22. Brandwein MS, Nuovo GJ & Biller H: Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinoma: Study of 40 cases using polymerase chain reaction and consensus primers *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1993; 102:

- 309-313.
23. Jenson AB, Kurman RJ & Lancaster WdD: *Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection. Obst Gynecol Clin North Am.* 1987; 14: 397-407.
24. Ishibashi T, Matsushima S, Tsunodawa T, et al.: *Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990; 116: 294-298.
25. Min HG, Jung KW, Choi JO: *Detection and significance of human papillomavirus and Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma and laryngeal squamous cell carcinoma. Korean J otorhinolaryngol.* 1996; 39 (2): 273-281.
26. Tyan YS, Liu ST & Ong WR: *Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in head and neck tumors. J Clin Microbiol.* 1993; 31: 53-56.