大韓氣管食道科學會誌
Vol. 5, No. 1, Jun. 1999

비강 및 부비동의 반전성 유두종에서 인형유두종 및 Ebstein-Barr 바이러스의 검출

전남대학교 의과대학 이비인후과학교실

조재식 · 임상철 · 백준 · 정형수 · 신명석

= Abstract =

Detection of Human papillomavirus & Ebstein-Barr virus in Sinonasal Inverted papilloma

Jae Shik Cho, MD, Sang Chul Lim, MD, Jun Baik, MD,
Hyoung Soo Jeong, MD, Myoung Seok Shin, MD.

Department of Otolaryngology-H&N Surgery,
Chonnam University Medical School, Kwang Ju, Korea

The etiology of inverted papilloma(IP) remains unknown, but several studies have reported that Human Papillomavirus(HPV) may play a role in the pathogensis of sinonasal inverted papilloma(IP). And recent reports demonstrate the possible etiologic role of Epstein-Barr virus (EBV) in sinonasal IP. The aim of this study is to detect HPV and EBV in sinonasal IP, to examine the relationship between HPV subtype and sinonasal IP, to investigate the relation between HPV and EBV. We reviewed 30 cases of sinonasal IP(simple IP 19 cases, IP with dysplasia 8 cases, IP with squamous cell carcinoma 3 cases). Paraffin embedded archival tissue was used in this study. Detection of HPV, EBV were examined by in situ hybridization(ISH) using HPV type 6/11, 16/18, 31/33/35 DNA probe and EBER probe. The HPV was detected in 6(20%) out of 30 cases. The HPV6/11 was dectected in 4 out of 19 cases of simple IP, HPV 16/18 in 1, HPV 31/33/35 in 1 out of 8 cases of IP with dysplasia respectively. The EBV was not detected in 30 cases. HPV may play a role in the pathogensis of sinonasal inverted papilloma. But EBV is not a etiopathologic factor to be considered in the development of sinonasal IP.

Key Words : Sinonasal inverted papilloma, In situ hybridization, Human papillomavirus, Ebstein-Barr virus.

교신저자 : 조재식(Jae Shik Cho, MD)
501-190 광주광역시 동구 학동 8번지 전남대학교병원 이비인후과
Tel : 062) 220-6771 Fax : 062) 228-7743

Ⅰ. 서 론

비강 및 부비동에 발생하는 반전성 유두종은 드물게 발생하는 양성 종양이지만 재발률이 높고 주위 조직의 파괴 경향 및 악성화 또는 악성종양과의 연관등으로 광범위한 수술적 제거와 술후 악성종양의 발현여부의 지속적인 추적관찰이 필요한 질환이다.

발생 원인은 diethylnitrosamine, organic hydrocarbons, woodworking 혹은 nickel worker 등의 직업적인 요인, 알레르기, 만성 부비동염, 환경적인 발암물질, 바이러스 감염등이 제시되고 있으나 아직까지 확실히 알려지지 않았다[1]. 그러나 1983년 Syrajanen 등[2]이 반전성 유두종의 원인인자로 Human papillomavirus(HPV)를 처음으로 기술한 이래 분자생물학의 발전에 따라 많은 연구 논문에서 HPV의 역할을 강조하고 있다. Ebstein-Barr Virus(EBV)는 HPV와 같이 epitheliotrophic virus로서 두경부에서는 호흡상피조직에 감염되며 비인강암, 후두암, 이하선암을 일으키는 것으로 알려져 왔다. 1995년 Macdonald 등[3]에 의해 중합효소반응(PCR)을 통해 반전성 유두종에서 EBV의 검출을 시도하여 20례의 반전성 유두종에서 13례가 검출되어 반전성 유두종의 병인으로 EBV의 역할이 제기되었다.

비강 및 부비동의 반전성 유두종의 원인 규명에 있어서 양성 혹은 악성종양 발생에 관여하고 있다고 알려진 바이러스중 대표적인 HPV와 EBV의 검출은 본증의 발생원인과 병태를 규명하는데 있어서 중요하다고 판단된다. 이에 저자들은 비강 및 부비동의 반전성 유두종에서 HPV와 EBV의 검출률을 알아보고 특히 HPV의 경우 어떤 아형이 관계하는 가를 알아보며, HPV와 EBV가 각각 단독 혹은 중복되는 것은 어느정도 인지, 이형성증을 동반한 증례 및 악성화된 증례들과 그렇지 않는 증례들 사이에 HPV와 EBV검출에 있어서 어떤 차이가 있는 지, 그리고 각 virus가 세포의 어느 부분에서 발현되는 지 등을 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 대상 및 방법

1. 대 상

1991년 1월부터 1997년12월까지 전남대학교병원에서 비강 및 부비동에 발생하여 병리조직학적으로 반전성 유두종으로 진단받은 증례중 파라핀포매괴 상태가 양호한 30례를 대상으로 하였다. 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매되어 보관중인 파라핀 블록을 5㎛두께로 박절하여 H-E 염색을 시행하여, 이미 제작되어 있는 H-E 염색표본과 같이 재검토하여 전형적인 반전성 유두종 소견을 병리조직학적으로 확인함과 동시에 이형성세포 및 악성병변을 동반하고 있는 지를 자세히 검토하여 단순 반전성 유두종군 19례, 세포 이형성증을 동반한 반전성 유두종군 8례, 악성화를 동반한 반전성 유두종군 3례로 구분하였다. 성별분포는 전체 30례중 남자 27례, 여자 3례로 남녀비는 9:1 이었고, 연령분포는 27세에서 68세까지로 50대에 호발하였고 평균연령은 54.5세였다. 추적 관찰기간은 6개월에서 5년까지 평균 2년 10개월 이었다.

2. 방 법

In Situ Hybridization(ISH)법에 의한 HPV 검출

실험에 이용한 파라핀 절편의 제작은 파라핀 포매괴를 5㎛두께로 연속 절편을 만들어 probe-on 슬라이드에 부착시킨 후 충분히 건조시켰다. 염색의 전 과정은 probe-on 슬라이드에 맞대어 생기는 capillary gap action의 원리를 이용한 Microprobe Immuno/DNA 염색기(Fisher Co.)를 이용하였다.

Probe-on 슬라이드에 부착된 조직을 110℃에서 autodewaxer (Research Genetics)에 2분씩 4번 반복하여 탈파라핀 과정을 거친 후, 실온에서 absolute alcohol로, 110℃에서 ribonuclease에 1분간 노출시킨 후 내재성 peroxidase를 억제할 목적으로 Endo/Blocker(Biomeda M-69)로 2분간 부치시켰다. 핵산이 잘 노출될 수 있도록 단백분해효소인 pepsin으로 110℃에서 70초간 부치한 후 formamide(Amresco, Solon, Ohio)로 다시 2분간 부치시켰다. Nick translation이 된 p-

Table 1. The detection of Human papillomavirus(HPV) in patients with inverted papilloma

Histopathology	No. of Patients	HPV positive(%)	HPV type		
			6/11	16/18	31/33/35
IP	19	4(21)	4	0	0
IP with dysplasia	8	2(25)	0	1	1
IP with SCC	3	0(0)	0	0	0
Total	30	6(20)	4	1	1

· IP : Inverted Papilloma · SCC : Squamous Cell Carcinoma

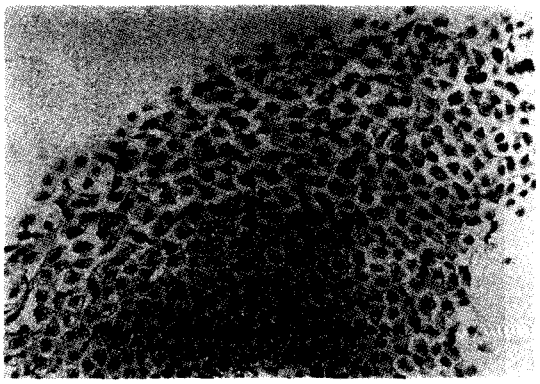

Fig. 1. *In situ hybridization for HPV 6/11*
Positive signals are seen in the nuclei of epithelial cells (X 200).

robe인 인형 유두종 바이러스 6/11, 16/18 및 31/33/35형 probe(Krea tech)를 hybridization cocktail로 희석하여 110℃에서 95℃, 85℃, 65℃, 45℃까지 단계적인 온도로 반응시키고 온도 변화의 중간 중간에 실온에서의 냉각기간을 두면서 hybridization을 시켰다. Hybridization이후에 비특이적 결합을 한 probe를 제거할 목적으로 2x-SSC로 수세후 인형 유두종바이러스 DNA를 검출하기 위해 검출계인 streptavidin-horseradish peroxidase(HRP)에 45℃에서 6분간 작용시켰다. 양성반응의 관찰을 위해 3-amino-9 ethylcarbazole(AEC)로 45℃에서 10분간 발색 시켰다. Hematoxylin으로 대조 염색을 시행하였고 crystal mount(Biomeda)로 봉입한 후 현미경으로 검색하였다. 대조군으로서는 비강질환이 전혀 없었던 5례의 비외상 환자들로부터 채취한 비강 점막을 사용하였고 음성 대조군으로는 probe diluent (Research Genetics, Huntsville, AL)만으로 부치시킨 표본을 실험에 이용하였다. 양성 대조군으로는 HPV감염이 확인된 절편으로서 HPV 6/11은 condyloma accuminatum, HPV 16/18, 31/33/35는 uterine cervix dysplasia를 이용하였다.

In Situ Hybridization(ISH)법에 의한 EBV 검출

상기와 동일한 원리와 과정을 거쳤으며 다만 단백분해효소인 pepsin은 110℃에서 25초간 부치시켰으며 probe는 oligoprobe인 EBER(Research Genetics)를 사용하였으며 양성 대조군으로는 Hodgkin's disease로 진단된 림프절의 파라핀 절편을 이용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. HPV 검출

ISH을 이용한 HPV 검출 결과는 반전성 유두종 30례중 6례(20%)에서 검출되었으며 병리조직학적 분류에 따른 HPV 검출 결과는 Table 1과 같다.

단순 반전성 유두종 19례중 4례(21%)에서 HPV 6/11(Fig. 1)이 검출 되었으며, 세포 이형성증을 동반한 반전성 유두종 8례중 2례(25%)에서 HPV 16/18(Fig. 2), HPV 31/33/35(Fig. 3)이 검출되었다. 한편 HPV가 발현된 6례 전례에서 virus는 세포의 핵내에서 발현되었다.

2. EBV 검출

ISH를 이용한 EBV검출 결과는 전체 30례중에서 단 한례도 검출되지 않았다.

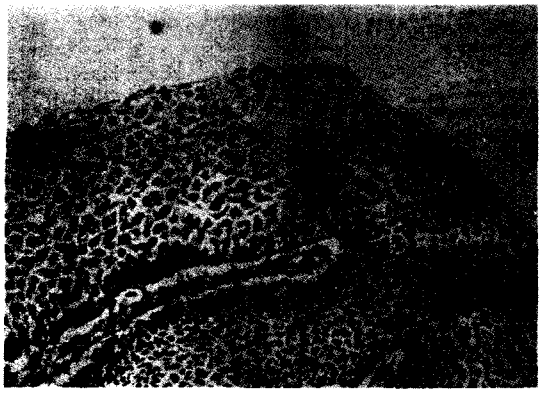

Fig. 2. *In situ hybridization for HPV 16/18*
Positive signals are seen in the nuclei of epithelial cells (X 100).

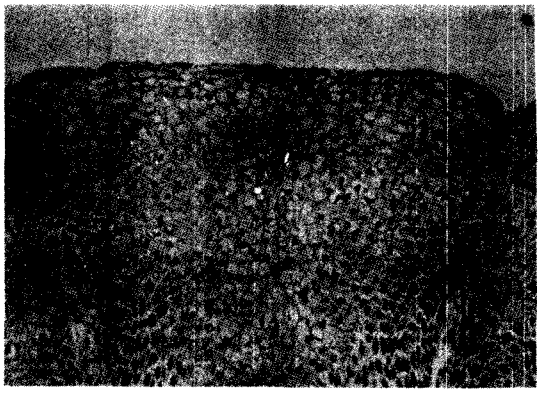

Fig. 3. *In situ hybridization for HPV 31/33/35*
Positive signals are seen in the nuclei of epithelial cells (X 100).

Ⅳ. 고 찰

비강 및 부비동에 발생하는 반전성 유두종의 발생 원인은 diethylnitrosamine, organic hydrocarbons, woodworking 혹은 nickel worker등의 직업적인 요인, 알레르기, 만성 부비동염, 환경적인 발암물질, 바이러스 감염등이 제시되고 있으나 아직까지 확실히 알려지지 않고 있다. 그러나 반전성 유두종의 병변들이 다발성이고, 다중심성(multicentricity)이고 주위 상피조직이 이형성화(epithelial metaplasia)를 잘하고 임상적으로 재발율이 높다는 사실등이 바이러스가 원인인자임을 간접적으로 시사한다[4,5]. 또한 최근 분자생물학의 발전으로 비강 및 부비동에 발생하는 반전성 유두종에서 HPV의 존재를 입증하는 보고들이 많다. HPV는 약 8000개의 염기를 갖는 DNA virus로서 현재까지 65종 이상의 아형이 발견되었고 30종 이상이 피부질환이나 점막의 이상과 관련이 있는 것으로 보고 되었으며 두경부 종양에서는 15-50%정도에서 HPV DNA가 발견되며[6], HPV는 고위험군과 저위험군으로 분류하기도 하는데 고위험군은 악성조직과 전구단계에서 검출되는 아형으로 16형, 18형, 31형 및 33형등이 포함되고[7], 저위험군은 6형과 11형으로 양성종양의 발생에 관여하지만 악성종양으로의 진행은 극히 드문 것으로 알려져 있다[8].

본 연구에서도 세포이형성증을 동반한 군에서 16/18형과 31/33/35형이 각각 1례씩 검출되었는데 이는 암의 전단계인 고위험군으로서 의의 있는 소견이라고 생각된다.

조직내의 virus존재를 확인하는 방법으로는 광학현미경이나 전자현미경을 이용한 세포내 봉입체나 viron의 확인, 항체를 이용한 면역조직화학염색법, southern blot hybridization, in situ hybridization(ISH), polymerase chain reaction (PCR) 등의 방법이 있다[9]. PCR법은 민감도가 높아 바이러스 DNA의 존재여부를 알 수 있으나 조직의 어느부위에서 바이러스가 위치하고 있는 지에 대해 알 수 없다. 반면에 ISH법은 세포나 조직의 형태가 보존된 상태에서 양성 반응을 확인할 수 있어서 특이성이 있는 검사방법이고 파라핀 절편을 이용할 수 있으며 아주 적은 검체물도 검사가 가능하며 감염된 세포의 조직내 위치 및 세포내 감염부위도 확인할 수 있는 장점이 있다.

본 연구는 ISH법을 이용하여 시행하였는데 HPV가 발현된 장소는 편평상피의 핵내에서 양성반응을 보였다(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3). 반전성 유두종에서 ISH에 의한 HPV검출률은 10-75% 정도로 보고되고 있으며 본 연구결과 HPV검출은 반전성 유두종 총 30례중 6례(20%)에서 검출되었다. 검출된 6례는 단순 반전성 유두종에서

HPV 6/11형 4례, 세포이형성증을 동반한 반전성 유두종에서 HPV 16/18, HPV 31/33/35형이 각 1례씩 발현 되었다. 따라서 HPV가 반전성 유두종의 원인인자로서 역할을 할 것으로 생각되었다.

몇몇 Human DNA 바이러스가 종양 발생과 관계하며 특히 EBV가 상피와 임파계에 악성종양을 유발한다고 알려져 있다[10]. EBV의 직접적인 발암 역할은 장기 이식을 받은 환자나 자가면역결핍 증후군을 가진 환자와 같이 면역결핍된 숙주에서 악성 임파종을 일으킨다고 한다. 그리고 비인강암, 후두암, 이하선암을 일으키는 것으로 알려져 왔다. EBV는 herpesvirus에 속하는 이중쇄(double-stranded) DNA virus로서 150nm-180nm 크기이며, EBV-DNA 유전자는 175K염기쌍으로 구성되어 있다[11].

1995년 McDonald 등[3]은 반전성 유두종에서 처음으로 PCR을 이용하여 EBV의 검출을 시도하여 20례 중 13례(65%)에서 EBV의 검출을 보고하였고, 1998년 김 등[12]은 PCR을 이용한 경우 19례 중 15례(78.9%)에서, ISH을 이용한 경우 19례 중 13례(68.4%)에서 EBV의 검출을 보고하여 반전성 유두종의 발생에서 EBV의 연관가능성을 제시하였지만 1996년 Gaffey 등[5]은 PCR을 이용하여 20례의 반전성 유두종에서 2례에서 EBV를 검출하였지만 이 2례를 ISH을 이용할 경우는 1례에서는 완전 음성반응이 나타났고 1례에서는 일부 stromal lymphocyte에서만 양성을 보이고 종양 component에서는 음성을 보여 반전성 유두종과 EBV는 연관가능성이 없다고 보고하였다. 저자들의 경우에 ISH을 이용하여 총 30례중에서 한례도 EBV를 검출하지 못하였다. 1례에서 약양성의 소견을 보인듯했으나 3명의 병리과 의사와 토의한 결과 약성으로 판정하는 데는 무리가 있다고 양성으로 인정하지 못했다. 이러한 점은 ISH의 한계점인 것으로 생각된다. 검출방법과 기술상의 문제, 검체의 보존상태, 바이러스에 감염된 세포내에서의 바이러스 DNA의 복제정도, 사용되는 probe의 종류에 따라 검출율에 있어서 심한 차이를 보일 수 있지만 총 30례에서 한례도 검출되지 않은 것으로 보아 비강 및 부비동의 반전성 유두종과 EBV와는 연관성이 없는 것으로 생각되나 파라핀조직이 아닌 신선조직을 이용하거나 PCR등의 방법을 이용하여 향후 더 많은 검증이 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 요약하면 현재까지의 보고들과 같이 HPV는 비강 및 부비동에 발생하는 반전성 유두종의 원인인자로서 역할을 할 것으로 생각되지만 EBV는 비강 및 부비동의 반전성 유두종의 병인으로서의 역할에 대해서는 더 많은 검증이 필요할 것으로 생각된다.

References

1. Ahn HY, Yeo SG, Seok SR, Hong NP, Cho JS, Cha CI, Lee JH: *Inverted papilloma and Malignat transformation. Korean J Otolaryngol 1994; 37: 306-15*
2. Syrjanen KJ, Pyrhonen S, Syrjanen SM: *Evidence suggesting human papillomavirus(HPV) etiology for the squamous cell papilloma of the paranasal sinus. Arch Geschwulstforsch 1983; 53: 77-82*
3. Macdonald MR, Le KT, Freeman J, Hui MF, Cheung RK, Dosch HM: *A majarity of inverted sinonasal papillomas carries Epstein-Barr virus genomes. Cancer 1995; 75: 2307-12*
4. McLachlin CM, Kandel RA, Colgan TJ, Swanson DB, Witterick IJ, Nigan BY: *Prevalence of human papillomavirus in sinonasal papillomas : A study using polymerase chain reaction and in situ hybridization. Mod Pathol 1992; 5: 406-9*
5. Gaffey MJ, Frieson HF, Weiss LM, Barber CM, Barber GB, Stoler MH: *Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in sinonasal schnederian papillomas : An in situ hybridization and polymerase chain reaction study. Am J Clin Pathol 1996; 106: 475-82*

6. Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, et al: *Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. Relationship to survival. Arch Otolaryngol Head and Neck Surg. 1994; 120: 743-8*
7. Howley PM: *Role of the human papilloma viruses in human cancer. Cancer Res 1991; 51: 5019-22*
8. Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK: *Epidemiology of genital human papilloma virus infection. Epidemiol Rev 1989; 10: 122-63*
9. Morris RG, Arends MJ, Bishop PE et al: *Sensitivity of digoxigenin and biotin labelled probes for detection of human papillomavirus by in situ hybridization. J Clin Pathol 1990; 43: 800-805*
10. Cheung RK, Miyazaki I, Dosch H-M: *Unexpected patterns of EBV gene expression during early stages of B cell transformation. Int J Immunol 1993; 5: 707-16*
11. Farell PJ: *Epstein-Barr virus. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1993 120-33*
12. Kim JS, Park MJ, Park JS, Lee SS, Sohn EJ, Shin SH: *Expression of Epstein-Barr Virus in Inverted papilloma by In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction. Korean J Otolaryngol 1998; 41: 876-82*