



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](#)

博士學位論文

반달가슴곰(*Ursus thibetanus*)
인공증식 기술 개발에 관한 연구

濟州大學校 大學院

獸醫學科

梁 禎 眞

2020年 8月

반달가슴곰(*Ursus thibetanus*) 인공증식 기술 개발에 관한 연구

指導教授 林 允 圭

梁 禎 眞

이 論文을 獸醫學 博士學位 論文으로 提出함

2020年 8月

梁禎眞의 獸醫學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 : 申 台 均

委 員 : 姜 泰 榮

委 員 : 黃 圭 桂

委 員 : 金 永 珠

委 員 : 林 允 圭

濟州大學校 大學院

2020年 8月

목 차

초록	1
그림 목차	4
표 목차	8
총론	11
참고 문헌	14
제 I 장. 뇨 성호르몬에 따른 번식기 암컷 반달가슴곰(<i>Ursus thibetanus</i>)의 발정 패턴 조사	17
1. 서론	18
2. 재료 및 방법	21
1) 대상 동물	21
2) 뇨 시료 수집	23
3) 뇨 성호르몬 분석	24
4) 발정 주기 패턴 분석	29
5) 통계 분석	29
3. 결과	30
1) 번식기 뇨 성호르몬의 변화	30
2) 임신 곰의 E ₂ , P ₄ 농도 변화	35
3) 월별 성호르몬 농도 비교	37
4) 성호르몬 간 상관관계	45
4. 고찰	53
참고문헌	58
제 II 장. 번식기 암컷 반달가슴곰(<i>Ursus thibetanus</i>)의 인공수정 적기 예측을 위한 생물학적 지표의 특성 조사	66

1. 서론	67
2. 재료 및 방법	70
1) 대상 동물	70
2) 초음파 검사	72
3) 질 상피세포 검사	72
4) 질 점막 전기저항 측정	73
5) 외음부 형태적 변화	73
6) 통계 분석	73
3. 결과	75
1) 초음파 검사	75
2) 질 상피세포 변화	80
3) 질 점막 전기저항	85
4) 외음부 형태	89
4. 고찰	93
참고문헌	96

제 III 장. 인공수정에 의한 반달가슴곰(*Ursus thibetanus*)의 새끼 출산 증례:

초음파 가이드 하에 요관경(Ureteroscope)을 활용한 자궁 내 인공수정	102
1. 서론	103
2. 재료 및 방법	106
1) 대상 동물	106
2) 인공수정 일 결정	107
3) 정액 수집 및 평가	108
4) 인공수정	113
5) 초음파 임신진단	115
6) 친자 확인 및 임신기간 평가	116
3. 결과	117
1) 인공수정 당일 출산 개체의 생물학적 지표 검사	117

2) 수집 정액 평가-----	121
3) 인공수정-----	125
4) 임신 진단 및 새끼 출산-----	128
5) 친자 확인 및 임신 기간 평가-----	131
4. 고찰-----	133
참고문헌-----	136
결론-----	142
국문 초록-----	144
감사의 글-----	147

Abstract

A study on the establishment of artificial breeding strategy on the Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*)

Jeong-Jin Yang

(Supervised by Professor Yoon-Kyu Lim)

Department of Veterinary Medicine

Graduate School

Jeju National University

This study is to investigate the estrus pattern and ovulation time in female Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) during the breeding period based on the concentration of estrogen and progesterone metabolites in urine, and to investigate the characteristics of various biological indicators that can estimate the best timing for artificial insemination. In addition, it is a report on the establishment of artificial insemination technique using the ureteroscope under ultrasound guidance.

The purpose of this study is to investigate whether analysis of sex hormones in urine and observation of various biological indicators is useful for determining the breeding status and the time for artificial insemination in Asiatic black bears, to establish an effective artificial insemination technique in Asiatic black bears.

During the breeding period from May to August, the concentrations of 17β

-estradiol and estrone-3-glucuronide in urine from 4 female bears showed similar patterns of change over time, and the concentrations of progesterone and pregnandiol-3-glucuronide also similarly changed over time. However, there were differences among the bears in increasing or decreasing period, the highest concentration, the number of peak days and the interval between peak days of each sex hormone and its metabolite, and did not show a constant pattern. In a pregnant female bear that was confirmed by ultrasound examination in December, the concentration of progesterone in urine gradually increased from May to July, and increased rapidly after artificial insemination in August. While, non-pregnant bears did not show this rapid increasing of progesterone in August.

During the breeding period, from 1 to 4 dominant follicles were formed in size of 7.3 - 19.6 mm, and it took about 2 weeks or more for the dominant follicle over 6 mm to reach the maximum diameter. In addition, the size of the corpus luteum varied from 7.0 to 10.6 mm. In the vaginal cytology, superficial epithelial cells increased and those colors were mostly red or orange when estrus signs were shown. In addition, when the appearance rate of superficial cells was at maximum ($82.3 \pm 7.8\%$), the electrical resistance value of vaginal mucus was also at maximum ($360 \pm 56.9 \Omega$). When the swelling of the vulva, which is one of the indicators for female's estrus state, increased, the level of redness in the vulva, mucus secretion, the rate of superficial cell appearance and the electrical resistance of vaginal mucus also increased.

As a result, it was confirmed that dominant follicles of 6.3 - 10 mm, the appearance of over 70% of superficial epithelial cells, the vaginal mucus electrical resistance of 340 - 400 Ω and maximum size of vulva on the day of artificial insemination were appropriate conditions for female bears in giving birth the cubs. In addition, the concentration of 17β -estradiol in a female urine was 8.26 ng/mg Cr and 1.45 ng/mg Cr on the day before and the

day of artificial insemination respectively.

The quality of collected fresh semen was excellent in sperm concentration, sperm count, survival rate, motility, and sperm morphology, and the semen was put in the uterus through the cervix using the ureterscope under the ultrasound guide. The average length from the vulva to the cervix was 14.2 ± 1.5 cm. 7 fetuses were identified from 4 pregnant female bears by ultrasound pregnancy test conducted at the end of December. All fetuses were born in mid- and late January and it was confirmed that 6 cubs were born through the artificial insemination except for one cub (it was originated from natural mating) by genetic paternity tests. Thus, the total gestation period from the date of artificial insemination to the birth of cubs was 199.3 ± 13.4 days (range, 184 - 216 days).

This study is the first report of success in giving birth through artificial insemination in the Asiatic black bear, and it would be very useful data to establish artificial breeding technique in this species. Furthermore, the methodology and results in this study would be greatly helpful for the restoration of the Asiatic black bear.

Key words: Asiatic black bear, *Ursus thibetanus*, urinary hormone, dominant follicle, corpus luteum, vaginal cytology, vaginal mucus electrical resistance, vulva swelling, ureterscope, artificial insemination, pregnancy, giving birth

그림 목차

Fig. 1. The molecular structure of 4 reproductive hormones used in urinary hormone analysis	28
Fig. 2. Comparisons of longitudinal changes in four urinary hormone concentrations in four female bears during breeding seasons, 2018	32
Fig. 3. Estrus states and z-score transformed urinary 17β -estradiol (E_2) and estrone-3-glucuronide (E1G) data in (a) pregnant and non-pregnant female bears	34
Fig. 4. Profiles of urinary 17β -estradiol (E_2) and progesterone (P_4) concentrations of pregnant female bear during breeding seasons	36
Fig. 5. Urinary steroid hormone concentrations of captive female bears (E_2 , E1G)	43
Fig. 6. Urinary steroid hormone concentrations of captive female bears (P_4 , PDG)	44
Fig. 7. Correlation between urinary 17β -estradiol (E_2) and progesterone (P_4) concentrations in pregnant bear and non-pregnant bears measured by EIA	47
Fig. 8. Correlation between urinary 17β -estradiol (E_2) and progesterone (E1G) concentrations in pregnant bear and non-pregnant bears measured by EIA	48

Fig. 9. Correlation between urinary 17β -estradiol (E_2) and progesterone (PDG) concentrations in pregnant bear and non-pregnant bears measured by EIA	49
Fig. 10. Correlation between urinary 17β -estradiol (P_4) and progesterone (E1G) concentrations in pregnant bear and non-pregnant bears measured by EIA	50
Fig. 11. Correlation between urinary 17β -estradiol (P_4) and progesterone (PDG) concentrations in pregnant bear and non-pregnant bears measured by EIA	51
Fig. 12. Correlation between urinary 17β -estradiol (E1G) and progesterone (PDG) concentrations in pregnant bear and non-pregnant bears measured by EIA	52
Fig. 13. The follicle growth profiles of 7 bears in 2017 and 2018	78
Fig. 14. Ultrasound images of the ovaries in Bear 4 using a transrectal 7.5 MHz transducer	79
Fig. 15. Vaginal epithelial cell cytology stained by the Papanicolaou (PAP) method during the breeding season	82
Fig. 16. Morphological changes in vaginal epithelial cell cytology during breeding seasons of 7 bears	83
Fig. 17. Color changes in vaginal epithelial cell cytology during breeding seasons	

of 7 bears	84
Fig. 18. The Vaginal mucus electrical resistances (VER) and Vaginal epithelial superficial cells during breeding seasons of 7 female bears	87
Fig. 19. Vulva shapes classified by vulva score (0 - 3) during breeding seasons	91
Fig. 20. Semen collection by urethral catheterization	111
Fig. 21. Transrectal ultrasound scanning of the prostate gland in the male Asiatic black bear	112
Fig. 22. Intrauterine artificial insemination using a ureteroscope under ultrasound guidance in the female bear	114
Fig. 23. Profile of urinary E ₂ and P ₄ concentrations in the Bear 4 during 2018 mating season	120
Fig. 24. Morphological assessment of spermatozoa using a Spermac [®] staining in the Asiatic black bear	123
Fig. 25. Viability assessment of spermatozoa using the eosin-nigrosin staining in the Asiatic black bear	124
Fig. 26. Observation of the vaginal cavity using a ureteroscope in Asiatic black bear	126
Fig. 27. Transrectal ultrasound image of the urogenital tract in the female Asiatic	

black bear----- 127

Fig. 28. The fetus confirmed in uterine by ultrasound diagnosis on the - 19th day
(26th of December, 2018) before cub parturition (Bear 4)----- 129

Fig. 29. The cub born by artificial insemination in the Asiatic black bear-- 130

Fig. 30. The results of paternity test using a GeneMapper[®] software ver. 4.0
in two cubs born from Bear 2----- 132

표 목차

Table 1. Bears used daily monitoring of urinary steroid hormone concentrations during breeding seasons in 2018	22
Table 2. Profiles of urinary steroid hormone concentrations and reproductive cycles in each female bear throughout the breeding seasons, 2018	31
Table 3. Urinary 17β -estradiol (E_2) and estrone-3-glucuronide (E1G) concentrations (ng/mg Cr) by z-score transformation	33
Table 4. Comparison of mean urinary E_2 (ng/mg Cr) concentrations in each female bear during breeding seasons	39
Table 5. Comparison of mean urinary E1G (ng/mg Cr) concentrations in each female bear during breeding seasons	40
Table 6. Comparison of mean urinary P_4 (ng/mg Cr) concentrations in each female bear during breeding seasons	41
Table 7. Comparison of mean urinary PDG (ng/mg Cr) concentrations in each female bear between during breeding seasons	42
Table 8. Correlation between steroid hormone concentrations in urine during breeding seasons (May 2018 - August 2018)	46
Table 9. Bears used observation of estrus status during breeding seasons in	

2017 and 2018	71
Table 10. Ultrasound observations of ovaries, dominant follicles and corpus luteums in each female Asiatic black bears	77
Table 11. Comparisons of vaginal epithelial cell types based on superficial cells ratio	81
Table 12. Comparison of vaginal mucus electrical resistance based on superficial cells ratio	86
Table 13. Correlation between vaginal cytology and VER during breeding seasons	88
Table 14. Changes of vulva size and the scores of vulva swelling, rubefaction and mucus	90
Table 15. Correlation between the vulva size and the other factors associated with estrus during breeding seasons	92
Table 16. Records of semen collection of male bears for artificial insemination (AI) to female bears	109
Table 17. Records of male bears for natural matings (NM)	110
Table 18. Records of natural mating and artificial insemination (AI with fresh semen) for 7 female bears during breeding seasons in 2017 and 2018	118

Table 19. Profile of biological factors on the day of artificial insemination (AI)
in female Asiatic black bears ----- 119

Table 20. Semen qualities of the male asiatic black bear at artificial insemination
time (2017~2018) ----- 122

총론

전 세계적으로 반달가슴곰(*Ursus thibetanus*: Asiatic black bear)은 총 7아종으로 분류되며, 남부권 아시아 지역을 중심으로 아시아 서부 끝단에 위치한 아프가니스탄, 파키스탄에서부터 동쪽으로 인도 북부, 중국, 인도네시아 북부, 러시아 동부, 한국, 그리고 일본 등지에 걸쳐 지리적으로 넓게 분포를 하고 있다(Servheen 1990). 그 중 한국에 서식하는 반달가슴곰은 북한, 러시아 동부, 그리고 중국 동북부 지역에 서식하는 반달가슴곰과 동일 아종으로 분류되고 있다(Garshelis and Steinmetz, 2016).

반달가슴곰은 멸종위기에 처한 야생생물 종의 국제거래에 관한 협약(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) 부속서 I에 등재된 국제적 멸종위기 야생생물종인 동시에, 국제자연보전연맹(IUCN)이 지정한 적색 목록(Red list) 범주의 취약 종(Vulnerable)으로 분류되어 있다(Garshelis and Steinmetz, 2016). 또한 우리나라에서도 천연기념물 제329호(1982년), 멸종위기야생생물 I급(1998년)으로 지정하여 법적으로 보호를 하고 있다.

반달가슴곰은 과거 1900년대 초까지만 해도 우리나라의 백두대간을 중심으로 한반도 전역의 산림지역에 널리 분포하였던 종이었으나 불법적인 밀렵 성행과 전쟁, 산업화로 인한 서식지 파괴 등에 기인하여 급격히 개체수가 급감하여 1980년대에 이르러서는 설악산, 오대산, 태백산 등의 강원도 일부 지역과 지리산에서만 소수의 개체가 서식하는 것으로 확인되었다(국립환경연구원, 2002). 이에 따라 2001년부터 소수의 개체가 확인된 지리산국립공원 지역에 스스로 생존할 수 있는 반달가슴곰 개체군을 형성시키기 위한 반달가슴곰 복원 프로젝트가 시작되었다(Jeong *et al.*, 2010). 지난 2005년에 러시아 연해주 지역으로부터 6개체의 새끼 곰을 도입하여 본격적으로 지리산에 방사한 이래, 2019년도에 지리산국립공원 지역을 중심으로 63마리로 개체수가 증가하게 되었고, 이 중 일부 개체는 지리산 지역을 벗어나 다른 지역으로 확산하는

양상이 확인되었다(중복원기술원, 2019).

그러나 동일 아종이 서식하는 러시아, 북한, 그리고 중국으로부터 반달가슴곰 원종을 도입하는데 있어서 국가 간의 정세에 따라 도입 여부가 결정되는 등 지속적인 난항을 겪어왔으며, 또한 반달가슴곰 종의 낮은 번식률과 자연 상태에서 근친 교배 등의 문제가 발생됨에 따라 개체수가 점차 늘어감에도 불구하고 반달가슴곰 복원 개체군의 유전적 다양성은 매우 낮은 수준인 것으로 확인되었다(한 등, 2019). 따라서 국외로부터의 불확실한 개체 도입 문제를 해소하고 자연 상태에서의 반달가슴곰 개체 수 증가와 복원 개체군의 유전적 다양성 증진을 도모하기 위해 자연 개체군에 필요한 원종을 지속 가능하게 선택적으로 생산해 낼 수 있는 인공수정 기술 확립이 요구되어졌고, 이에 따라 우리는 반달가슴곰의 번식 생리에 기초한 인공증식 기술 개발 연구에 착수하게 되었다.

그럼에도 불구하고 대부분의 곰 종이 계절 번식과 지연 착상을 하고, 특히나 반달가슴곰을 비롯한 몇몇 종은 동면(Hibernation) 기간 중에 새끼를 출산하는 등의 독특한 번식 생리 기작을 보유하고 있기 때문에(Sato *et al.*, 2000; Tsubota *et al.*, 2001), 번식기간 중에 배란, 수정, 착상 시점 등의 정확한 시기를 파악하기 어렵고, 가성임신(Pseudopregnacy) 현상 등으로 인해 호르몬을 통한 임신 여부 평가를 수행함에도 한계가 있다. 이러한 곰의 독특한 번식 생리 기작으로 인하여 관련 연구의 정보가 매우 제한적인 실정이며, 특히 곰과(*Ursidae*)에 속하는 전 세계의 8종의 곰 종(species)들 가운데 자이언트 팬더(Moore *et al.*, 1984) 1종을 제외하고, 반달가슴곰을 포함한 나머지 곰 종에서 인공수정을 통해 새끼를 성공적으로 출산했던 사례가 전무한 실정이다(Onuma *et al.*, 2001; Curry *et al.*, 2014; Torri *et al.*, 2019).

본 연구의 목적은 첫 번째로 뇨 중 에스트로젠과 프로게스테론의 대사물질 농도를 기초로 번식기 동안 암컷 반달가슴곰의 발정 패턴 및 배란 적기를 비침습적인 방법으로 조사함으로써 뇨 시료에 의한 성호르몬 분석 기법이

반달가슴곰의 발정 상태를 파악하는데 유용한지 여부를 확인하고자 하였다. 두 번째로 번식기 동안의 암컷 반달가슴곰의 발정과 인공수정 적기 파악에 도움이 될 수 있는 생물학적 지표들을 선정하고, 그들 각각의 특성과 지표들 간의 상호 연관성을 조사함으로써 반달가슴곰의 발정과 배란 상태를 예측하고자 하였다. 마지막으로 수컷 반달가슴곰으로부터 수집된 정액을 효율적으로 활용하기 위해 초음파 가이드 하에 요관경을 이용한 자궁 내 인공수정 기법을 개발하고, 이 기법을 활용하여 실질적으로 인공수정을 수행함으로써 궁극적으로 반달가슴곰의 임신과 새끼 출산을 성공적으로 이끌어내고자 하였다.

참고문헌

Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora Web site. Asiatic black bear. Available at: https://www.cites.org/eng/gallery/species/mammal/Asiatic_black_bear.html. Accessed Apr 14, 2020.

Curry E, Wyatt J, Sorel LJ, MacKinnon KM, Roth TL. Ovulation induction and artificial insemination of a captive polar bear (*Ursus maritimus*) using fresh semen. J Zoo Wildl Med 2014; 45: 645-649.

Garshelis D, Steinmetz R. *Ursus thibetanus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22824A114252336. Available at: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22824A45034242.en>. Accessed Apr 14, 2020.

Jeong DH, Yang DH, Lee BK. Re-introduction of the Asiatic black bear into Jirisan National Park, South Korea. In: IUCN Global reintroduction perspectives, 1st ed. Abu Dhabi: IUCN/SSC/ Re-introduction Specialist Group. 2010: 254-258.

Lee SD. Endangered Species of Endangered Wildlife. Korea Environment Institute. 1998: 43.

Moore HDM, Bush M, Celma M, Garcia AL, Hartman TD, Hearn JP, Hodges JK, Jones DM, Knight JA, Monsalve L, Wildt DE. Artificial insemination in the Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*). J. Zool 1984; 203: 269-278.

- Onuma M, Suzuki M, Ohtaishi N. Reproductive pattern of the sun bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak, Malaysia. J Vet Med Sci 2001; 63: 293-297.
- Sato M, Tsubota T, Yamamoto, K, Komatsu, T, Hashimoto Y, Katayama A, Hazumi T, Kita I, Kudo T. Serum progesterone and estradiol-17beta concentrations in captive and free-ranging adult female japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). J Vet Med Sci 2000; 62: 415-420.
- Servheen C. The status and conservation of the bears of the world. In: Darling LM, Archibald WR, eds. Proceedings of the International Conference on Bear Research and Management, Monograph Series No. 2. Victoria: International Association for Bear Research and Management, 1990: 1-32.
- Torii Y, Matsumoto N, Sakamoto H, Nagano M, Katagiri S, Yanagawa Y. Monitoring follicular dynamics using ultrasonography in captive brown bears (*Ursus arctos*) during the breeding season. Theriogenology 2019; 140: 164-170.
- Tsubota T, Taki S, Nakayama K, Mason JI, Kominami S, Harada N, Kita I. Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the corpus luteum and the placenta of Japanese black bears, *Ursus thibetanus japonicus*, during pregnancy. Reproduction 2001; 121: 587-594.
- Yamamoto K, Tsubota T and Kita I. Observation of sexual behavior of captive Japanese black bears, *Ursus thibetanus japonicus*. J Reprod Dev 1998; 44: 13 - 18.

국립공원공단종복원기술원. 2018종복원기술원 연간보고서. 국립공원공단 종복원
기술원. 2019: 6-133.

국립환경연구원. 멸종위기에 처한 야생동물 복원기술 개발. 환경부. 2002: 3-319.

한상현, 문주영, 김태욱, 정승준, 김정진, 정동혁, 송동주, 강재구, 임현태.
우리나라에 재도입된 반달가슴곰의 유전적 집단 구조와 다양성.
한국환경생태학회 학술발표논문집. (사)한국환경생태학회, 2019: 59-60.

제 I 장

노 성호르몬에 따른 번식기 암컷 반달가슴곰(*Ursus thibetanus*)의 발정 패턴 조사

1. 서론

지구상에 현존하는 곰과(Ursidae)의 동물은 총 8종, 이 중 반달가슴곰은 7아종으로 분류되며 서남부아시아, 중국 동북부, 러시아, 한국, 일본 등지에 걸쳐 지리적으로 넓게 분포하고 있다(Servheen, 1990). 온대 지방에 서식하는 아메리카 흑곰(*Ursus americanus*)과 아시아 흑곰(*Ursus thibetanus*)은 늦은 봄에서 초여름까지 약 2-3 개월 간 교미기를 갖는 계절 발정 사이클을 갖으며 (Ballard *et al.*, 1982; Okano *et al.*, 2003), 아시아 흑곰의 아종인 일본 반달가슴곰(*Ursus thibetanus japonicus*)은 6월 중순에서 8월 초까지 교미기를 갖고 동면기인 1월 말에서 2월 초 사이에 출산한다고 보고되었다(Yamamoto *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000). 이와는 다르게 말레이시아 지역의 태양곰(*Helarctos malayanus*)은 우기 시즌인 8월, 9월에 계절 번식을 하며(Onuma *et al.*, 2002), 특히 자이언트 팬더(*Ailuropoda melanoleuca*)는 다른 종의 곰들과는 다르게 4월과 5월 사이에 2-3일 동안만 교미 허용기를 갖는 단발정(mono estrus)의 계절 발정주기를 나타낸다고 보고되었다(Czekala *et al.*, 2003).

그러나 반달가슴곰(*Ursus thibetanus*)을 포함한 대부분의 곰과(Ursidae)의 동물은 계절 발정(Seasonal estrus), 유도 배란(Induced ovulation), 후속 배란(Sequential ovulation), 지연 착상(Delayed implantation), 가성 임신(Pseudo-pregnancy) 등의 다양하고 독특한 번식생리 특성을 갖고 있기 때문에 번식기간 중 배란, 수정, 착상 등의 정확한 시기 파악과 황체기 동안의 임신 유지 등을 평가하는데 있어서 많은 어려움을 겪고 있다(Craighead *et al.*, 1995; Schenk and Kovacs, 1995; Rosing-Asvid *et al.*, 2002; Boone *et al.*, 2004; Okano *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2011; Roellig *et al.*, 2011; Frederick *et al.*, 2012; Gonzales *et al.*, 2013).

야생동물을 대상으로 한 성호르몬의 모니터링 기법은 해당 종의 내분비 활성을 평가하는 검증된 방법으로써 실질적으로 여러 멸종위기에 처한 야생동물 종들의

사육 관리와 개체 수의 증식을 향상시켜 왔다(Schwarzenberger and Brown, 2013). 특히나 식육목(Carnivora) 야생동물들의 환경적 변화에 대한 생리학적, 그리고 번식 생리학적 반응을 이해하는데 있어 뇨 또는 분변과 같은 비침습적 방법의 시료 수집을 통해 호르몬 대사물질의 농도를 평가함으로써 가능해졌다(Brown and Wildt, 1997; Brown *et al.*, 2001). 곰과 같은 대형 맹수류의 번식 상태 및 발정 패턴 분석을 위해서는 분변이나 뇨 시료와 같이 비침습적으로 내분비 호르몬을 측정하는 것이 필수적이며, 이는 혈액 시료 내 호르몬 분석과 같은 침습적인 방법과 비교해서 물리적 보정이나 화학적 마취 등이 수반되지 않기 때문에, 동물에게 불필요한 스트레스를 유발시키지 않으면서 장기적으로 해당 종의 번식 상태에 대한 정확하고 상세한 정보를 얻을 수 있다는 장점이 있다(Dehnhard *et al.*, 2006; Schwarzenberger and Brown, 2013).

최근 곰 중에서 수행된 비침습적인 내분비 성호르몬 분석 방법에 관한 선행 연구에는 자이언트 팬더(Hodges *et al.*, 1984; Dehnhard *et al.*, 2006; Durrant *et al.*, 2006; Hama *et al.*, 2008; Kersey *et al.*, 2010)에서 뇨 시료로부터의 estrogen, estrone sulfate, estrone-3-glucuronide, pregnanediol-3-glucuronide, 그리고 분변 시료 내 progesterone을 통한 발정기와 황체기 모니터링에 관한 다수의 보고가 있었고, 안경곰(*Tremarctos ornatus*)에서의 뇨와 분변 시료 내 progesterone을 통한 황체기 모니터링에 관한 연구 보고가 있었다(Dehnhard *et al.*, 2006). 또한 태양곰(Schwarzenberger *et al.*, 2004)을 대상으로 분변 시료 내 epi-androsterone과 pregnanediol-3-glucuronide을 통한 번식 생리 연구, 불곰(*Ursus arctos*)에서의 분변 내 estrogen과 progesterone을 통한 발정기와 황체기 연구(Goeritz *et al.*, 2001; Ishikawa *et al.*, 2003; Dehnhard *et al.*, 2006), 그리고 북극곰(*Ursus maritimus*)에서의 분변 내 pregnanediol-3-glucuronide와 androgen을 통한 연중 호르몬 분석 연구와 같은 선행 보고가 있었다(Curry *et al.*, 2014). 마지막으로 반달가슴곰의 아종인 대만 암컷 반달가슴곰(*Ursus thibetanus formosanus*)을 대상으로 분변 내 estrogen과 progesterone 농도 분석을 통한 연중 성호르몬 모니터링에 관한 연구가 보고된 바 있다(Chang *et al.*, 2011).

본 연구는 뇨 중 estrogen 및 progesterone의 대사물질 농도에 기초한 번식기 암컷 반달가슴곰의 발정 패턴 및 배란 적기 모니터링에 관한 최초의 보고로써, 본 연구를 통해 뇨 시료에 의한 성호르몬 분석 기법이 반달가슴곰 종의 번식 상태의 특징을 이해하는데 유용한지 여부를 조사하고, 최종적으로 반달가슴곰의 번식 관리와 인공수정을 수행하는데 기초 자료로 활용하기 위함이었다.

1. 재료 및 방법

1) 대상 동물

2018년도 5월에서 8월까지 반달가슴곰의 번식시즌 동안 국립공원공단 생물종보전원에서 증식·전시를 위해 사육되고 있는 암컷 곰들(n=4)로부터 노 샘플을 채취하였다. 전 개체 모두 임신 경험은 없으며, 평균 연령은 6.1 ± 3.8 년생, 평균 체중은 96.5 ± 16.8 kg이었고, 4년생 암컷 1개체는 이 기간 동안 인공수정을 통해 최종적으로 임신하였음이 확인되었다(Table 1).

Table 1. Bears used in daily monitoring of urinary steroid hormone concentrations during breeding seasons in 2018

ID No.	Year of birth	Age (year)	Weight (kg)	Remarks
Bear 1	2014	4	88.0	Pregnant ^a
Bear 2	2014	4	87.0	
Bear 3	2012	6	95.0	Non-pregnant
Bear 4 ^b	2003	15	136.0	

^a two cubs were born in January, 2019 by artificial insemination and one of them died within a few days.

^b Loaned from the Cheong-ju Zoo in South Korea, 2017.

2) 뇨 시료 수집

반달가슴곰의 발정기 성호르몬 모니터링을 위하여 2018년 5월 16일을 시작으로 8월 26일까지 총 102일에 걸쳐 1일 1회, 오전 04:00-08:00시 사이에 처음 배뇨한 뇨 시료를 개체별로 수집하였다(Monfort *et al.*, 1989).

각각의 암컷 곰은 철재 격자망 구조의 준 개방형(semi-open) 시설 내에 독립적인 공간을 제공하였으며, 시설 외벽을 사이에 두고 격자망을 통해 수컷 곰을 보거나 접촉할 수 있도록 하였다. 뇨 시료의 수집은 바닥에 배뇨된 샘플을 멸균된 주사기를 이용하여 흡인하는 방식으로 이루어졌으며, 수집된 시료는 멸균된 15 ml 플라스틱 원심관 튜브에 분주한 후, 수집한 날짜와 시간, 개체 식별 정보를 기록하였다. 그리고 대변 또는 알 수 없는 불순물 등의 혼입 가능성에 따라 오염 물질의 제거를 위해 냉장상태(-4℃)에서 약 10분간 10,000 rpm으로 원심분리를 실시하였다. 이후 분리된 상층 액을 1.5 ml 동결용 튜브에 각각 소분한 후 성호르몬 분석 이전까지 냉동상태(-80℃)로 보관하였다.

3) 뇨 성호르몬 분석

효소면역측정법에 의해 뇨 중 17β -estradiol (E_2), estrone-3-glucuronide (E1G), progesterone (P_4), 그리고 pregnanediol-3-glucuronide (PDG)의 4가지 성호르몬에 대한 농도를 아래와 같이 측정하였다(Fig. 1). 또한 각각의 뇨 호르몬의 최종 농도를 도출하기 위해 해당 일자의 뇨 creatinine 농도로 나누어 준 후, ng/mg Cr으로 표기하였다(Kersey *et al.*, 2010; Knott *et al.*, 2017).

(1) 17β -Estradiol (E_2)

뇨 중 17β -estradiol의 정량 분석은 multispecies DetectX[®] 17β -estradiol Enzyme Immunoassay kit (K030-H5, Arbor Assays Ann Arbor, Michigan, USA) 제조사의 가이드라인에 따라 수행하였다. 키트의 민감도는 39.6 pg/ml이고, 검출 한계는 26.5 pg/ml, estrone과의 교차 반응성은 0.73%, estrone sulfate, progesterone, testosterone, 5α -dihydroprogesterone, cortisol, corticosterone에 대한 교차 반응성은 0.10% 미만이었다. 요약하자면, goat anti-rabbit IgG 항체가 코팅되어 있는 96 well 마이크로플레이트에 뇨 샘플 원액과 계단 희석한 standard 용액 (39.06-10,000 pg/ml)을 연속되는 2개의 well에 각각 50 μ l씩 동량 분주하고, horseradish peroxidase가 접합된 DetectX[®] estradiol (E_2) conjugate와 DetectX[®] estradiol (E_2) antibody (anti- E_2 antibody)를 각각의 well에 25 μ l씩 첨가한 후, 2시간 동안 흔들면서 실온에서 배양하였다. 이 후에 제조사의 wash buffer를 이용하여 각 well 당 300 μ l씩 흡인, 분주하는 과정을 4회 반복하여 세척을 실시하고, 100 μ l의 tetramethyl benzidine substrate를 각 well에 분주한 후, 30분간 실온에서 배양하였다. 마지막으로 50 μ l의 stop solution (1M hydrochloric acid)을 분주하여 반응을 종료시킨 후, 450 nm 파장에서 흡광도(O.D)를 측정하였다. 표준 곡선(standard curve)의 구현과 각각의 뇨 샘플의 E_2 농도의 계산은 4-PLC (four-parameter logistic curve fit) 소프트웨어(DS-Matrix[™] Software ver. 1.34.5, Dynex Technology Inc., Vagina, USA)를 사용하였다. 분석 간의 변동계수(coefficients of variation)는 10% 미만이었다.

(2) Estrone-3-glucuronide (E1G)

뇨 중 Estrone의 분석은 multispecies DetectX[®] Estrone-3-Glucuronide (E1G) Enzyme Immunoassay kit (K036-H5, Arbor Assays Ann Arbor, Michigan, USA) 제조사의 가이드라인에 따라 수행하였다. 키트의 민감도는 7.38 pg/ml이고, 검출 한계는 8.76 pg/ml, estrone-3-sulfate와의 교차 반응성은 66.6%, estrone 238%, 17 β -estradiol 7.8%, estradiol-3-sulfate 3.8%, estradiol-3-sulfate 3.3%, estradiol-17-sulfate 0.1%, 기타 progesterone, testosterone, estriol, cortisol, testosterone과의 교차 반응성은 0.1% 미만이었다. 요약하자면, goat anti-rabbit IgG 항체가 코팅되어 있는 96 well 마이크로플레이트에 뇨 샘플 원액과 계단 희석한 standard 용액(15.625-1,000 pg/ml)을 연속되는 2개의 well에 각각 50 μ l씩 동량 분주하고, horseradish peroxidase가 접합된 DetectX[®] estrone-3-glucuronide (E1G) conjugate와 DetectX[®] estrone-3-glucuronide (E1G) antibody (anti-E1G antibody)를 각각의 well에 25 μ l씩 첨가한 후, 2시간 동안 흔들면서 실온에서 배양하였다. 그 후에 제조사의 wash buffer를 이용하여 각 well 당 300 μ l씩 흡인, 분주하는 과정을 4회 반복하여 실시하고, 100 μ l의 tetramethyl benzidine substrate를 각 well에 분주한 후, 30분간 실온에서 배양하였다. 마지막으로 50 μ l의 stop solution (1M hydrochloric acid)을 분주하여 반응을 종료시킨 후, 450 nm 파장에서 흡광도(O.D)를 측정하였다. 표준 곡선(standard curve)의 구현과 각각의 샘플의 E1G 농도의 계산은 위의 E₂의 방법과 동일한 방법으로 수행하였으며, 분석 간의 변동계수(coefficients of variation)는 10% 미만이었다.

(3) Progesterone (P₄)

뇨 중 Progesterone의 정량 분석은 multispecies DetectX[®] Progesterone Enzyme Immunoassay kit (K025-H5, Arbor Assays Ann Arbor, Michigan, USA) 제조사의 가이드라인에 기초하여 수행하였다. 키트의 민감도는 47.9 pg/ml이고, 검출 한계는 52.9 pg/ml, 3 β -hydroxy-progesterone과의 교차 반응성은 172%, 3 α -hydroxyprogesterone 188%, 11 β -hydroxy-progesterone 2.7%, 11 α -hydroxyprogesterone 147%, 5 α -dihydroprogesterone 7.0%,

pregnandiol 5.9%, corticosterone, androstenedione 0.1% 미만이었다. 요약하자면, goat anti-mouse IgG 항체가 코팅되어 있는 96 well 마이크로플레이트에 노 샘플 원액과 계단 희석한 standard 용액(50-3,200 pg/ml)을 연속되는 2개의 well에 각각 50 μ l씩 동량 분주하고, horseradish peroxidase가 접합된 DetectX[®] progesterone (P₄) conjugate와 DetectX[®] progesterone (P₄) antibody (anti-P₄ antibody)를 각각의 well에 25 μ l씩 첨가한 후, 2시간 동안 흔들면서 실온에서 배양하였다. 그 후에 제조사의 wash buffer를 이용하여 각 well 당 300 μ l씩 흡인, 분주하는 과정을 4회 반복하여 실시하고, 100 μ l의 tetramethyl benzidine substrate를 각 well에 분주한 후, 30분간 실온에서 배양하였다. 마지막으로 50 μ l의 stop solution (1M hydrochloric acid)을 분주하여 반응을 종료시킨 후, 450nm 파장에서 흡광도(O.D)를 측정하였다. 표준 곡선(standard curve) 구현과 각각의 샘플의 P₄ 농도의 계산은 위의 E₂의 방법과 동일한 방법으로 수행하였으며, 분석 간의 변동계수(coefficients of variation)는 10% 미만이었다.

(4) Pregnanediol-3-glucuronide (PDG)

노 중 Pregnanediol glucuronide의 정량 분석은 multispecies DetectX[®] Pregnanediol-3-Glucuronide (PDG) Enzyme Immunoassay kit (K037-H5, Arbor Assays Ann Arbor, Michigan, USA) 제조사의 가이드라인에 기초하여 수행하였다. 키트의 민감도는 0.18 ng/ml이고, 검출 한계는 0.32 ng/ml, 20 α -hydroxyprogesterone과의 교차 반응성은 44.8%, 20 β -hydroxyprogesterone 3.16%, progesterone 0.2%, testosterone 0.2%, cortisol 0.06%, 17 β -estradiol 0.04% 이었다. 요약하자면, goat anti-rabbit IgG 항체가 코팅되어 있는 96 well 마이크로플레이트에 노 샘플 원액과 계단 희석한 standard 용액(0.391-50 ng/ml)을 연속되는 2개의 well에 각각 50 μ l씩 동량 분주하고, horseradish peroxidase가 접합된 DetectX[®] Pregnanediol-3-glucuronide (PDG) conjugate와 DetectX[®] Pregnanediol-3-glucuronide (PDG) antibody (anti-PDG antibody)를 각각의 well에 25 μ l씩 첨가한 후, 2시간 동안 흔들면서 실온에서 배양하였다. 그 후에 제조사의 wash buffer를 이용하여 각 well 당 300 μ l씩 흡인, 분주하는 과정을 4회 반복하여 실시하고, 100 μ l의 tetramethyl benzidine substrate를 각

well에 분주한 후, 30분간 실온에서 배양하였다. 마지막으로 50 μ l의 stop solution (1M hydrochloric acid)을 분주하여 반응을 종료시킨 후, 450 nm 파장에서 흡광도(O.D)를 측정하였다. 표준 곡선(standard curve) 구현과 각각의 샘플의 PDG 농도의 계산은 위와 동일하게 수행하였고, 분석 간의 변동계수(coefficients of variation)는 10% 미만이었다.

(5) Urinary creatinine (Cr)

수집된 뇨 샘플들 간의 수분 함량에 따른 변이를 보정하기 위해 뇨 중 creatinine의 농도를 측정하였다(Kersey *et al.*, 2010; Willis *et al.*, 2011). 뇨 중 creatinine의 정량 분석은 multispecies NCal™ International Standard DetectX® urinary creatinine detection kit (K002-H5, Arbor Assays Ann Arbor, Michigan, USA) 제조사의 가이드라인에 따라 수행하였다. 키트의 민감도는 0.019 mg/dl이고, 검출 한계는 0.037 mg/dl 이었다. 요약해서 설명하자면, 깨끗한 상태의 96 well 마이크로플레이트에 멸균 증류수로 20배 희석하여 준비한 뇨 샘플과 blank 용액(3차 증류수), 그리고 계단 희석한 standard 용액(0.3125-20 mg/dl)을 연속되는 2개의 well에 각각 50 μ l씩 동량 분주하고, DetectX® Creatinine (Cr) Reagent 용액(0.75 N NaOH, 0.04 N picric acid)을 100 μ l씩 첨가한 후 약 30분간 실온에서 배양하였다. 흡광도(Optical Density)의 측정은 자동화 ELISA 시스템(Dynex DS2®, Dynex Technology, Inc., VA, USA)을 이용하여 490 nm 파장에서 측정하였으며, 표준 곡선(standard curve)의 구현과 각각의 샘플의 Cr 농도의 계산은 위의 실험방법과 동일하게 수행하였다. 분석 간의 변동 계수(coefficients of variation)는 10% 미만이었다.

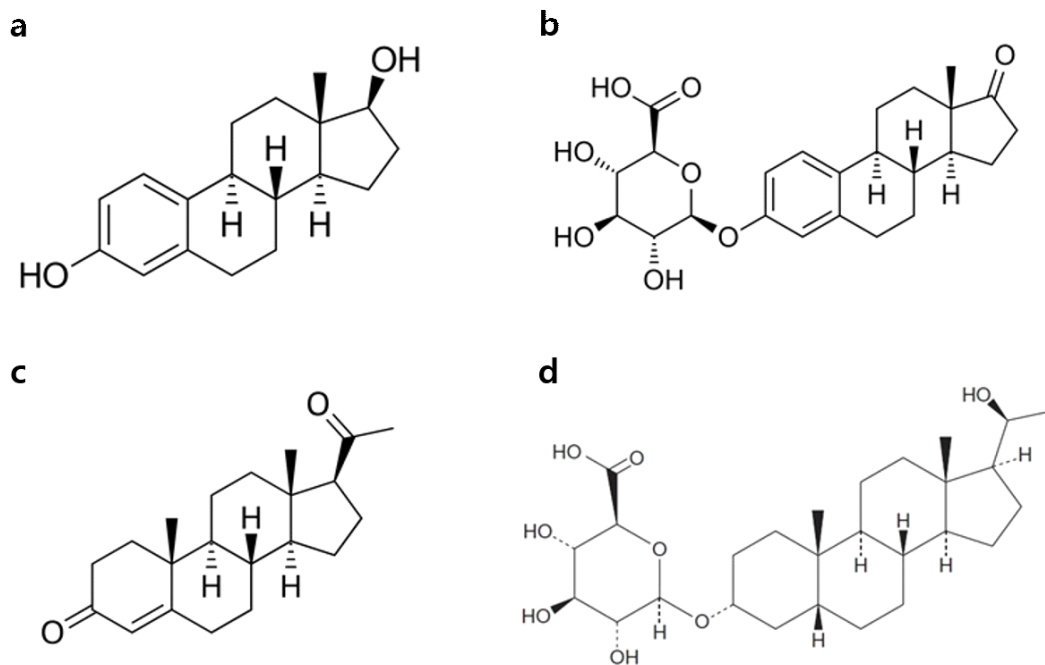


Fig. 1. The molecular structure of 4 reproductive hormones used in urinary hormone analysis. (a) 17β -Estradiol (E_2 ; $C_{18}H_{24}O_2$), (b) Estrone-3-glucuronide ($E1G$; $C_{24}H_{30}O_8$), (c) Progesterone ($P4$; $C_{21}H_{30}O_2$), (d) Pregnanediol-3-glucuronide (PDG ; $C_{27}H_{44}O_8$).

4) 발정 주기 패턴 분석

번식기간 동안 발정 호르몬 농도의 피크 일자와 이에 따른 배란 일자를 확인하기 위해 뇨 중 E₂와 E1G의 농도를 일자별로 측정된 후, 개체별 농도 변이를 상쇄하기 위해 각각의 성호르몬 농도 값을 z-score ($[\text{raw-mean}]/\text{SD}$)로 변환하였다(Dehnhard et al., 2006). 이에 따라 변환된 농도 값이 0미만일 때를 기초 수치(basal value), 0-1사이일 경우를 낮은 수치(low value), 그리고 1을 초과한 값을 높은 수치(high value)로 구분하였다. 또한, 각각의 변환된 호르몬의 농도 값이 높은 수치($z > 1$)에서 다음 날 0미만으로 급격히 감소하는 일자를 발정 호르몬의 피크일로 결정하였다.

5) 통계 분석

통계분석은 IBM SPSS Statistics ver. 18과 Microsoft excel ver. 2016을 활용하여 수행하였다. 각 일자별 성호르몬에 대한 개체별 평균 및 표준편차를 포함하는 기초 통계분석을 실시하였고, 번식기간 동안 암컷 곰의 월별 성호르몬의 변화 양상을 파악하기 위해 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 실시하였다. 또한, 일자별 호르몬 변화에 따른 각각의 성호르몬 간의 상관관계 분석(Pearson's correlation)을 실시하였다. 검출 한계 이하의 결측 값은 모든 분석에서 제외하였고, 유의성 검정은 $p < 0.05$ 의 수준에서 결정하였다.

3. 결 과

1) 번식기 뇨 성호르몬의 변화

2018년 5월 16일부터 8월 26일까지 총 102일 간 4마리의 암컷 반달가슴곰을 대상으로 뇨 성호르몬 분석을 실시한 결과는 Table 2와 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 요약하자면, 각각의 호르몬이 상승 또는 하강하는 시기와 성호르몬 대사물질의 농도 값, 그리고 피크 농도일 사이 간격에는 개체마다 변이가 크고, 일정한 패턴을 나타내지 않았다. 그러나 임신한 개체에서의 프로게스테론 대사물질(P₄, PDG)의 농도는 임신하지 않은 개체에 비해 보다 넓은 범위를 나타내었다.

난포 최대 활성화 및 배란일을 추정하는 우선 지표로 활용한 뇨 중 E₂와 E1G는 변환된 호르몬의 농도 값에 따라 3가지의 범주로 구분하여 나타내었다(Table 3). 4마리의 암컷 곰에서 z-score로 변환된 E₂ 농도 값의 비율은 기초 수치($z < 0$)가 전체 일자의 75.5 ± 4.6%로 대부분을 차지하였고, 낮은 수치($0 < z < 1$)는 14.6 ± 2.5%, 그리고 높은 수치($z > 1$)는 7.2 ± 4.6%를 나타내었다. 게다가 E1G의 비율은 기초 수치($z < 0$)가 전체의 72.9 ± 3.6%, 낮은 수치($0 < z < 1$)는 21.5 ± 6.3%, 그리고 높은 수치($z > 1$)는 5.6 ± 2.3%를 차지하였으며, 이는 E₂의 양상과 유사하였다. 또한 각각의 에스트로젠 대사물질의 피크는 전체 기간 동안 E₂는 2-6회, 그리고 E1G는 2-4회까지 관찰되었다(Fig. 3).

Table 2. Profiles of urinary steroid hormone concentrations and reproductive cycles in each female bear throughout the breeding seasons, 2018

Status	Bear	E ₂		E1G		P ₄		PDG		E ₂ peak intervals (days) ^{a)}
		N	Mean ± SD (Range)	N	Mean ± SD (Range)	N	Mean ± SD (Range)	N	Mean ± SD (Range)	
Pregnant	Bear 1	80	2.90 ± 4.30 (0.26 - 28.13)	85	2.42 ± 3.60 (0.37 - 19.58)	82	11.79 ± 26.88 (1.12 - 240)	60	31.31 ± 77.50 (2.82 - 560.76)	2 - 26
	Bear 2	84	5.07 ± 6.79 (0.52 - 42.45)	87	1.75 ± 2.36 (0.41 - 18.71)	82	6.08 ± 7.22 (1.40 - 36.32)	60	33.49 ± 37.84 (4.75 - 203.46)	3 - 35
non-pregnant	Bear 3	79	2.78 ± 6.49 (0.03 - 49.15)	92	0.91 ± 0.65 (0.21 - 4.96)	83	2.57 ± 3.74 (0.42 - 25.25)	72	17.18 ± 40.48 (1.55 - 272.23)	6 - 19
	Bear 4	79	3.96 ± 5.60 (0.01 - 40.91)	96	1.82 ± 2.14 (0.24 - 14.69)	80	5.27 ± 4.93 (1.52 - 30.72)	64	35.84 ± 48.79 (4.34 - 241.51)	2 - 47

Urinary steroid hormone concentrations were shown in means ± SD (Range) ng/mg Cr.

a) Range (min. - max.) of E₂ peak intervals in each female bear.

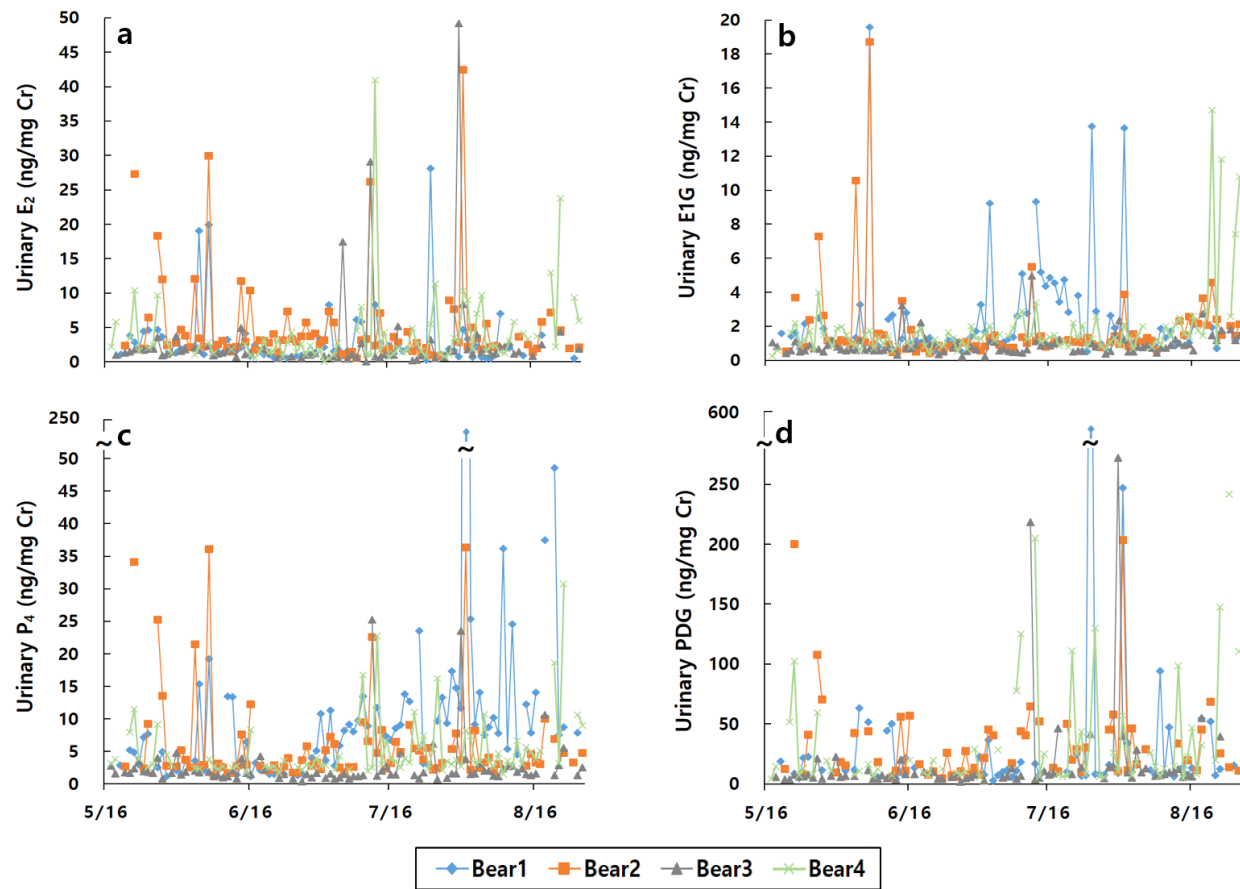


Fig. 2. Comparisons of longitudinal changes in four urinary hormone concentrations in four female bears during breeding seasons, 2018. Bear 1 (—◆—) gave birth the following January in 2019.

Table 3. Urinary 17 β -estradiol (E₂) and estrone-3-glucuronide (E1G) concentrations (ng/mg Cr) by z-score transformation

Hormones	Bear	Basal values (z < 0) ^a		Low values (0 < z < 1) ^b		High values (z > 1) ^c	
		N	Mean \pm SD (Min. - Max.)	N	Mean \pm SD (Min. - Max.)	N	Mean \pm SD (Min. - Max.)
E ₂	Bear 1*	62	1.37 \pm 0.64 (0.26 - 2.85)	14	4.16 \pm 1.47 (3.22 - 7.04)	5	16.72 \pm 8.50 (8.26 - 28.13)
	Bear 2	64	2.55 \pm 1.01 (0.84 - 4.97)	12	7.60 \pm 1.88 (5.71 - 11.72)	7	24.02 \pm 10.89 (11.95 - 42.45)
	Bear 3	67	1.25 \pm 0.57 (0.03 - 2.64)	9	4.46 \pm 1.66 (2.83 - 8.41)	3	31.89 \pm 16.04 (17.44 - 49.15)
	Bear 4	58	1.82 \pm 0.88 (0.01 - 3.69)	12	6.18 \pm 1.78 (4.12 - 9.35)	8	16.12 \pm 11.06 (9.64 - 40.91)
E1G	Bear 1*	62	1.23 \pm 0.54 (0.37 - 3.27)	19	3.52 \pm 0.96 (2.46 - 5.19)	4	13.11 \pm 4.24 (9.24 - 19.58)
	Bear 2	66	0.98 \pm 0.29 (0.41 - 1.57)	15	2.63 \pm 0.69 (1.81 - 3.89)	5	9.32 \pm 5.72 (4.56 - 18.71)
	Bear 3	62	0.62 \pm 0.17 (0.21 - 0.90)	22	1.13 \pm 0.14 (0.95 - 1.45)	7	2.72 \pm 1.11 (1.78 - 4.96)
	Bear 4	70	1.11 \pm 0.36 (0.24 - 1.74)	21	2.30 \pm 0.42 (1.84 - 3.38)	4	8.49 \pm 3.54 (3.97 - 11.79)

*: pregnant bear.

^a ^b: urinary 17 β -estradiol (E₂) and estrone-3-glucuronide (E1G) values below 1 by z-score transformation.

^c: urinary 17 β -estradiol (E₂) and estrone-3-glucuronide (E1G) values above 1 by z-score transformation that are associated with pre-ovulatory E₂ surge.

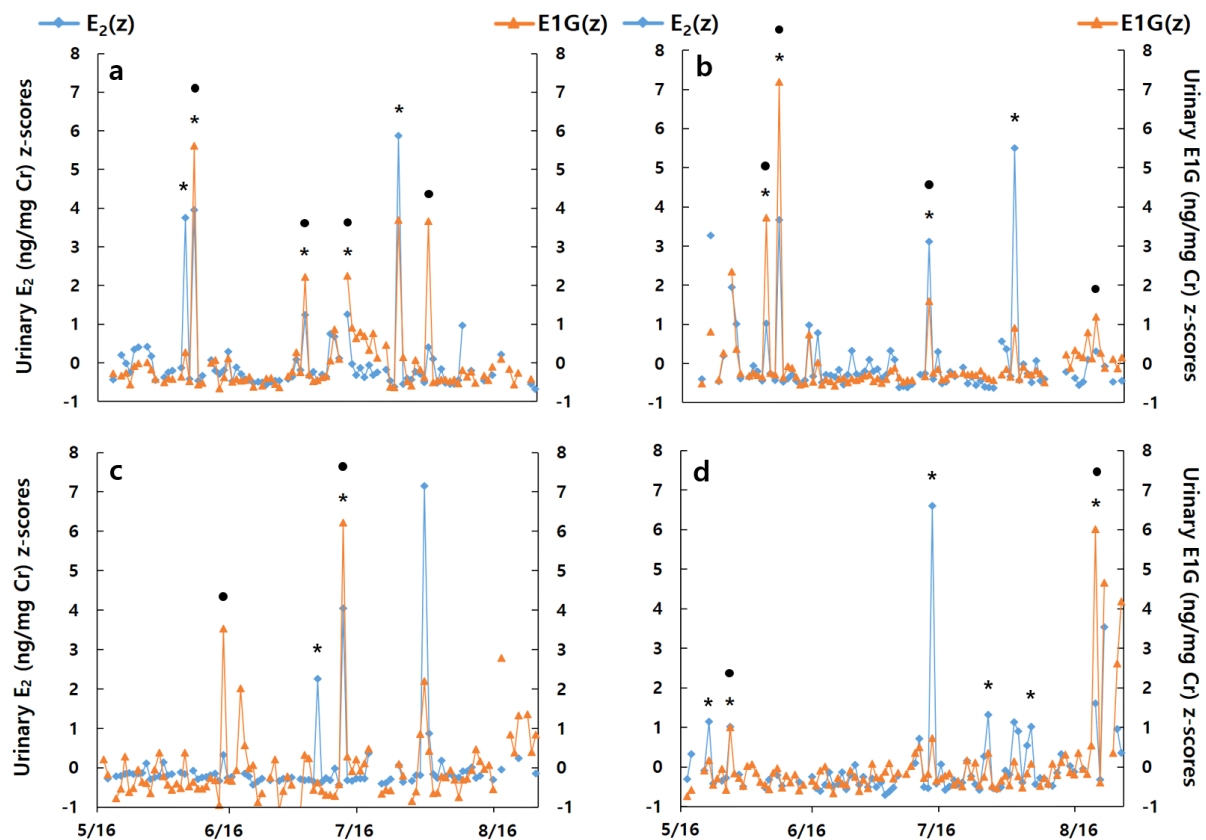


Fig. 3. Estrus states and z-score transformed urinary 17β -estradiol (E_2) and estrone-3-glucuronide (E1G) data in (a) pregnant (Bear 1) and (b), (c), (d) non-pregnant female bears (Bear 2, Bear 3, Bear 4). The point that E_2 (*) and E1G (●) values (z-score) above 1 and rapidly decrease to the basal values below 0 the next day except for missing value intervals.

2) 임신 곰의 E₂, P₄ 농도 변화

뇨 중 E₂의 농도 변화를 바탕으로 Bear 1을 대상으로 2018년 7월 4일부터 7월 6일까지 3일간 서로 다른 수컷의 정액을 수집하여 인공수정을 실시하였다. 이후 2~3번의 배란 전 E₂ 농도의 피크 값이 추가적으로 관찰되었으며, 인공수정 전, 후로 P₄의 농도가 점차적으로 상승하는 양상이 관찰되었다(Fig. 4).

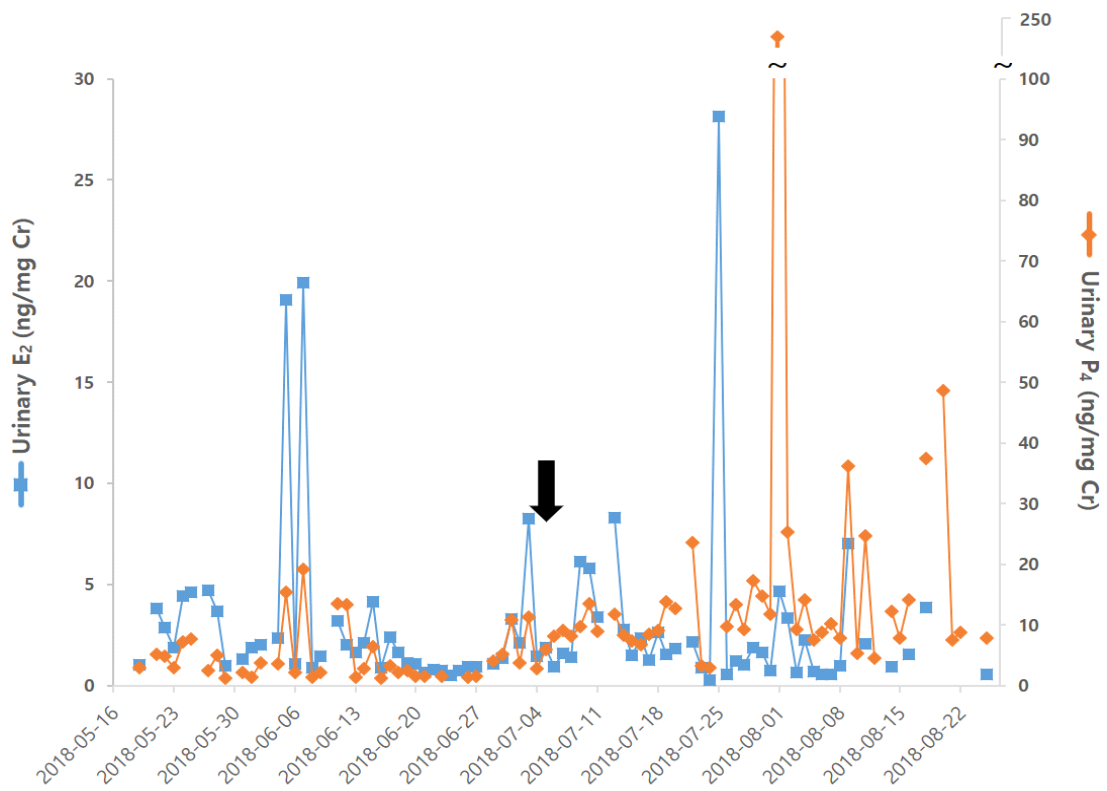


Fig. 4. Profiles of urinary 17 β -estradiol (E₂) and progesterone (P₄) concentrations of pregnant female bear during breeding seasons. The arrow indicates artificial insemination (AI).

3) 월별 성호르몬 농도 비교

(1) 17 β -estradiol (E₂)

전 개체 모두 5월부터 8월까지 월별 E₂ 농도의 유의적 차이는 나타나지 않았다 (Table 4, Fig. 5). 그러나 각각의 곰들은 서로 다른 시기에 상대적으로 높은 E₂ 농도의 상승이 관찰되었다. 그러나 임신한 암컷 곰(Bear 1)의 E₂의 농도는 7월에 상대적으로 높았던 반면, 임신하지 않은 암컷 곰에서 Bear 2는 5월, Bear 3은 7월, 그리고 Bear 4는 8월에 상대적으로 높았다.

(2) Estrone-3-glucuronide (E1G)

임신한 암컷 곰(Bear 1)은 발정기 동안 월별 E1G 값의 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 또한 임신하지 않은 암컷 곰에서 Bear 2는 5월(n = 8, 2.43 ± 2.24 ng/mg Cr)과 6월(n = 30, 1.91 ± 3.66 ng/mg Cr) 간에 E1G 농도의 유의미한 차이($p = 0.033$)를 나타내었고, Bear 4는 8월의 E1G 평균 농도(n = 24, 3.27 ± 3.82 ng/mg Cr)와 5월 (n = 13, 1.41 ± 0.96 ng/mg Cr, $p = 0.039$), 6월(n = 29, 1.14 ± 0.45 ng/mg Cr, $p < 0.01$), 그리고 7월(n = 30, 1.50 ± 0.67 ng/mg Cr, $p < 0.01$)의 E1G 평균 농도와의 유의미한 차이를 나타내었다(Table 5). 또한 모든 개체에서 E1G 농도는 E₂ 농도의 월별 경향과 유사한 패턴이 관찰되었다(Fig. 5).

(3) Progesterone (P₄)

임신한 암컷 곰(Bear 1)은 6월(n = 24, 4.65 ± 5.15 ng/mg Cr)과 8월(n = 20, 26.91 ± 51.73 ng/mg Cr) 사이에 P₄ 농도의 유의미한 차이($p = 0.028$)를 나타내었고, 5월부터 7월까지 서서히 P₄ 농도가 상승하는 경향을 보이다가 8월에 급격히 상승하는 패턴이 관찰되었다. 또한 임신하지 않은 암컷 곰에서는 통계적으로 P₄ 농도의 유의미한 차이가 확인되지 않았다(Table 6, Fig. 6).

(4) Pregnandiol-3-glucuronide (PDG)

임신하지 암컷 곰 가운데 Bear 2의 PDG 농도는 5월(n=7, 64.09 ± 70.38 ng/mg Cr)과 6월(n=21, 19.74 ± 16.41 ng/mg Cr) 사이에 통계적으로 유의미한 차이($p =$

0.033)를 나타내었다. 또한 개체별 PDG의 농도는 P_4 의 월별 경향과 유사한 패턴을 보였으나, 임신한 곰과 임신하지 않은 곰들 사이의 구별되는 특징은 PDG에 비해 P_4 의 월별 분석을 통해 더욱 잘 나타나는 것으로 확인되었다(Table 7, Fig. 6).

Table 4. Comparison of mean urinary E₂ (ng/mg Cr) concentrations in each female bear during breeding seasons

Status	Bear	May		June		July		August	
		N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD
Pregnant	Bear 1	10	2.92 ± 1.52	27	2.83 ± 4.87	29	3.34 ± 5.20	14	2.11 ± 1.96
	Bear 2	8	9.19 ± 9.33	30	4.88 ± 5.50	29	3.80 ± 4.87	17	5.64 ± 9.64
non-pregnant	Bear 3	13	1.83 ± 0.87	23	1.46 ± 0.89	26	4.69 ± 11.05	15	2.37 ± 1.84
	Bear 4	10	4.16 ± 3.34	21	1.90 ± 0.98	28	3.94 ± 7.66	20	6.04 ± 5.45

1) Statistical significances ($p < 0.05$) were tested by One way analysis and Tukey HSD multiple comparison test of variances among months within each animal.

There were no significant differences among the monthly E₂ concentrations in all bears.

Table 5. Comparison of mean urinary E1G (ng/mg Cr) concentrations in each female bear during breeding seasons

Status	Bear	May		June		July		August	
		N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD
Pregnant	Bear 1	10	1.61 ± 0.61	26	1.99 ± 3.66	29	3.31 ± 3.02	20	1.95 ± 2.80
	Bear 2 ^a	8	2.43 ± 2.24	30	1.91 ± 3.66	28	1.19 ± 0.88	21	2.00 ± 1.02
non-pregnant	Bear 3	14	0.75 ± 0.24	29	0.83 ± 0.59	26	0.97 ± 0.92	23	1.05 ± 0.53
	Bear 4 ^{b,c,d}	13	1.41 ± 0.96	29	1.14 ± 0.45	30	1.50 ± 0.67	24	3.27 ± 3.82

1) Statistical significances ($p < 0.05$) were tested by One way analysis and Tukey HSD multiple comparison test of variances among months within each animal.

^aSignificant difference ($p < 0.05$) between May and June.

^bSignificant difference ($p < 0.05$) between May and August.

^cSignificant difference ($p < 0.05$) between June and August.

^dSignificant difference ($p < 0.05$) between July and August.

Table 6. Comparison of mean urinary P₄ (ng/mg Cr) concentrations in each female bear during breeding seasons

Status	Bear	May		June		July		August	
		N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD
Pregnant	Bear 1*	10	4.16 ± 2.18	24	4.65 ± 5.15	28	9.84 ± 4.51	20	26.91 ± 51.73
	Bear 2	8	11.59 ± 12.09	29	5.12 ± 7.17	28	5.45 ± 4.02	17	6.17 ± 8.08
non-pregnant	Bear 3	13	2.35 ± 1.12	23	1.65 ± 0.91	25	3.50 ± 6.40	22	2.60 ± 2.05
	Bear 4	10	5.24 ± 3.12	20	2.95 ± 1.38	28	5.63 ± 5.16	22	6.95 ± 6.56

1) Statistical significances ($p < 0.05$) were tested by One way analysis and Tukey HSD multiple comparison test of variances among months within each animal.

*Significant difference ($p < 0.05$) between June and August.

Table 7. Comparison of mean urinary PDG (ng/mg Cr) concentrations in each female bear between during breeding seasons

Status	Bear	May		June		July		August	
		N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD
Pregnant	Bear 1	6	14.52 ± 7.46	12	24.53 ± 21.36	24	34.90 ± 112.25	18	36.64 ± 57.48
	Bear 2*	7	64.09 ± 70.38	21	19.74 ± 16.41	19	32.14 ± 18.19	13	41.18 ± 51.72
non-pregnant	Bear 3	12	8.34 ± 6.53	23	6.90 ± 3.69	20	35.31 ± 73.27	17	16.01 ± 15.03
	Bear 4	10	29.02 ± 32.10	15	12.36 ± 6.27	20	45.01 ± 55.80	19	48.31 ± 61.29

1) Statistical significances ($p < 0.05$) were tested by One way analysis and Tukey HSD multiple comparison test of variances among months within each animal.

*Significant difference ($p < 0.05$) between May and June.

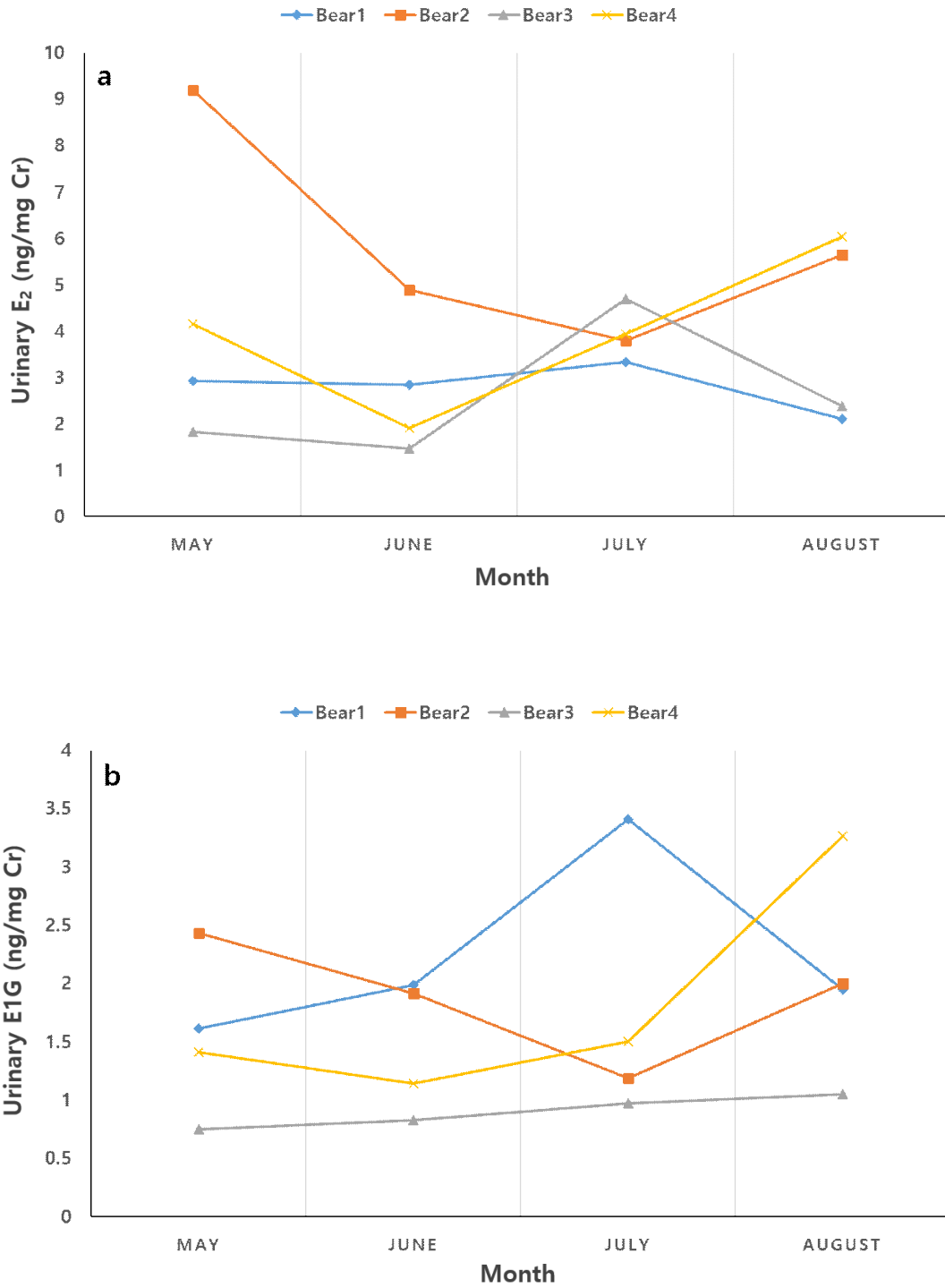


Fig. 5. Urinary steroid hormone concentrations of captive female bears (E₂, E1G). (a) urinary 17β-estradiol (E₂) concentrations and (b) urinary estrone-3-glucuronide (E1G) concentrations during breeding seasons.

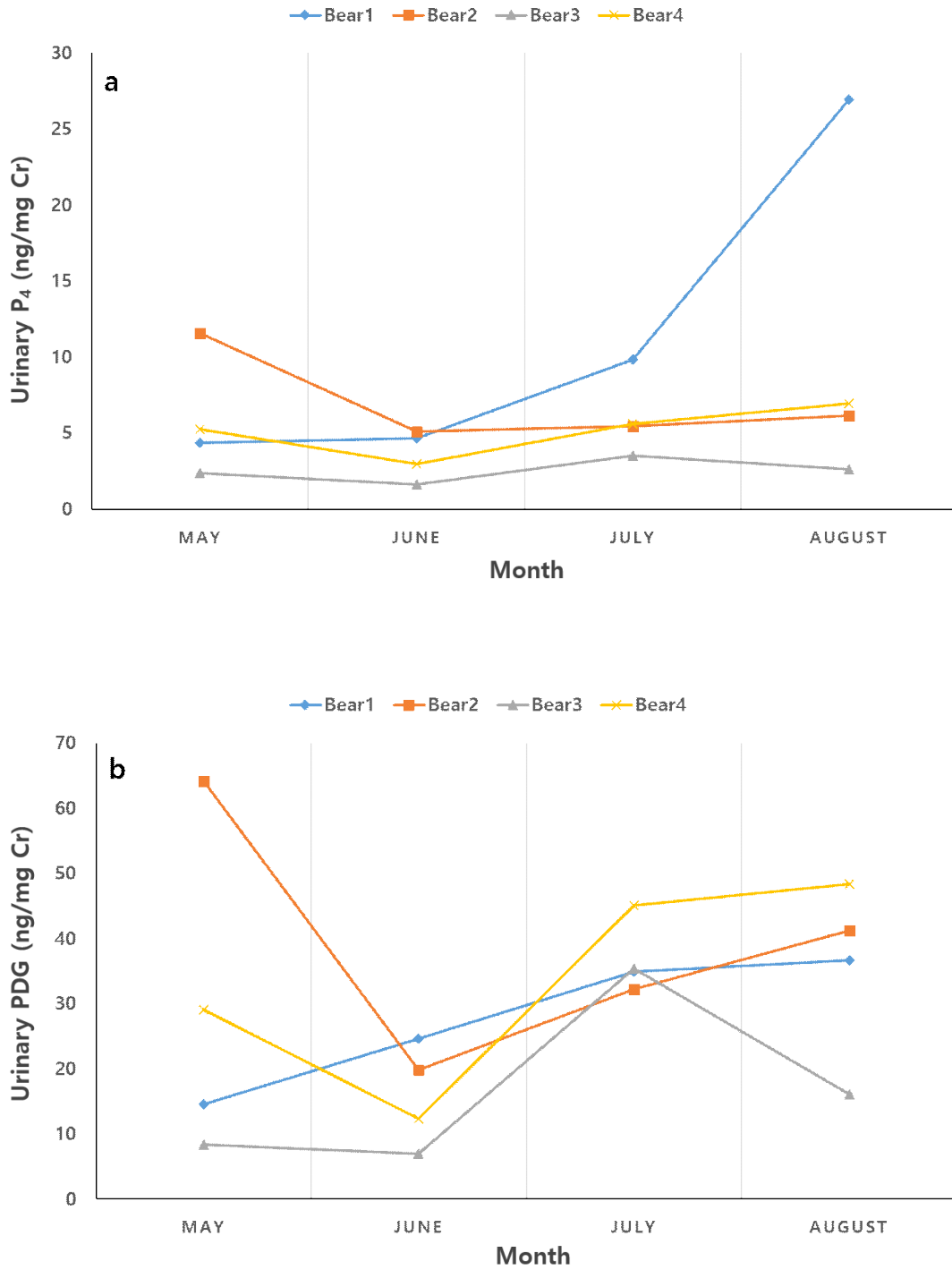


Fig. 6. Urinary steroid hormone concentrations of captive female bears (P₄, PDG). (a) urinary progesterone (P₄) concentrations and (b) urinary pregnanediol-3-glucuronide (PDG) concentrations during breeding seasons.

4) 성호르몬 간 상관관계

번식기간 동안 뇨 성호르몬 간의 상관관계는 Table 8에서 보는 바와 같다(Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12).

(1) 전체

뇨 중 E₂의 농도는 P₄ ($r = 0.581, p < 0.01, n = 307$), E1G($r = 0.517, p < 0.01, n = 319$), 그리고 PDG ($r = 0.715, p < 0.01, n = 239$)의 농도와 양의 상관관계를 나타내었다. 또한 뇨 중 P₄의 농도는 E1G ($r = 0.710, p < 0.01, n = 326$), PDG ($r = 0.734, p < 0.01, n = 248$)의 농도 간, 그리고 뇨 중 E1G의 농도는 PDG ($r = 0.721, p < 0.01, n = 256$)의 농도와 양의 상관관계를 나타내었다.

(2) 임신(Bear 1)

뇨 중 E₂의 농도는 P₄ ($r = 0.164, p = 0.157, n = 76$)를 제외하고 E1G ($r = 0.736, p < 0.01, n = 79$), 그리고 PDG ($r = 0.717, p < 0.01, n = 54$)의 농도와 양의 상관관계를 나타내었다. 또한 뇨 중 P₄의 농도는 E1G ($r = 0.498, p < 0.01, n = 82$), PDG ($r = 0.934, p < 0.01, n = 59$)의 농도 간, 그리고 뇨 중 E1G의 농도는 PDG ($r = 0.593, p < 0.01, n = 60$)의 농도와 양의 상관관계를 나타내었다.

(3) 비 임신(Bear 2, 3, 4)

뇨 중 E₂의 농도는 P₄ ($r = 0.871, n = 231, p < 0.01$), E1G ($r = 0.547, n=240, p < 0.01$) 그리고 PDG ($r = 0.863, n=185, p < 0.01$)의 농도와 양의 상관관계를 나타내었고, 뇨 중 P₄의 농도는 E1G ($r = 0.732, n = 244, p < 0.01$), PDG ($r = 0.832, n=189, p < 0.01$) 간, 그리고 뇨 중 E1G의 농도는 PDG ($r = 0.467, n = 196, p < 0.01$)의 농도와 양의 상관관계를 나타내었다.

Table 8. Correlation between steroid hormone concentrations in urine during breeding seasons (May 2018 – August 2018)

	E ₂ (ng/mg Cr)	P ₄ (ng/mg Cr)	E1G (ng/mg Cr)	PDG (ng/mg Cr)
All				
E ₂	-	0.581*	0.517*	0.715*
P ₄		-	0.710*	0.734*
E1G			-	0.721*
PDG				-
Pregnant				
E ₂	-	0.164	0.736*	0.717*
P ₄		-	0.498*	0.934*
E1G			-	0.593*
PDG				-
Non-pregnant				
E ₂	-	0.871*	0.547*	0.863*
P ₄		-	0.732*	0.832*
E1G			-	0.467*
PDG				-

E₂, 17β-estradiol; P₄, progesterone; E1G, estrone-3-glucuronide; PDG, pregnanediol-3-glucuronide

* Statistical significances ($p < 0.01$) were tested by Pearson correlation analysis.

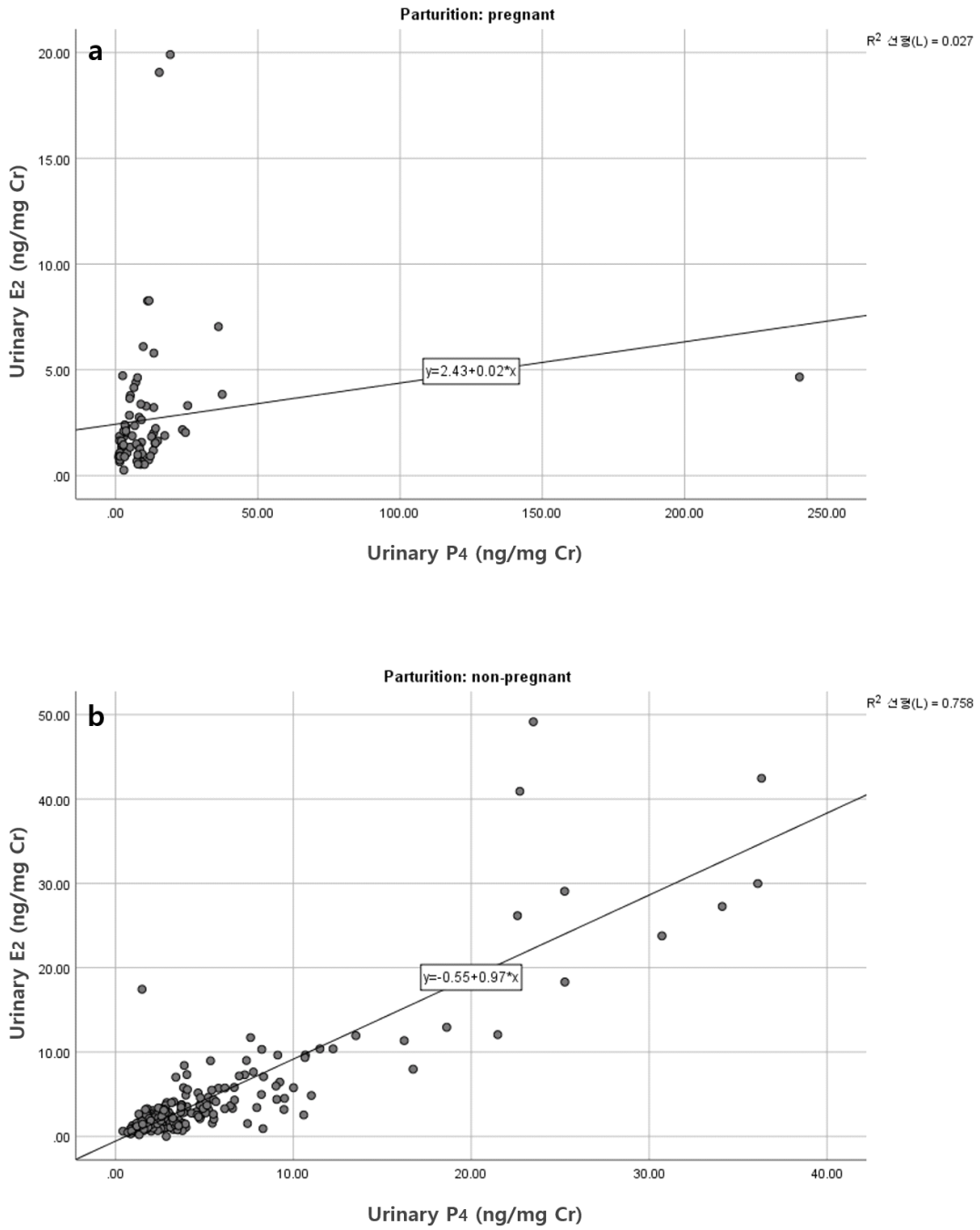


Fig. 7. Correlation between urinary 17 β -estradiol (E₂) and progesterone (P₄) concentrations in (a) pregnant bear (n=1) and (b) non-pregnant bears (n=3) measured by EIA.

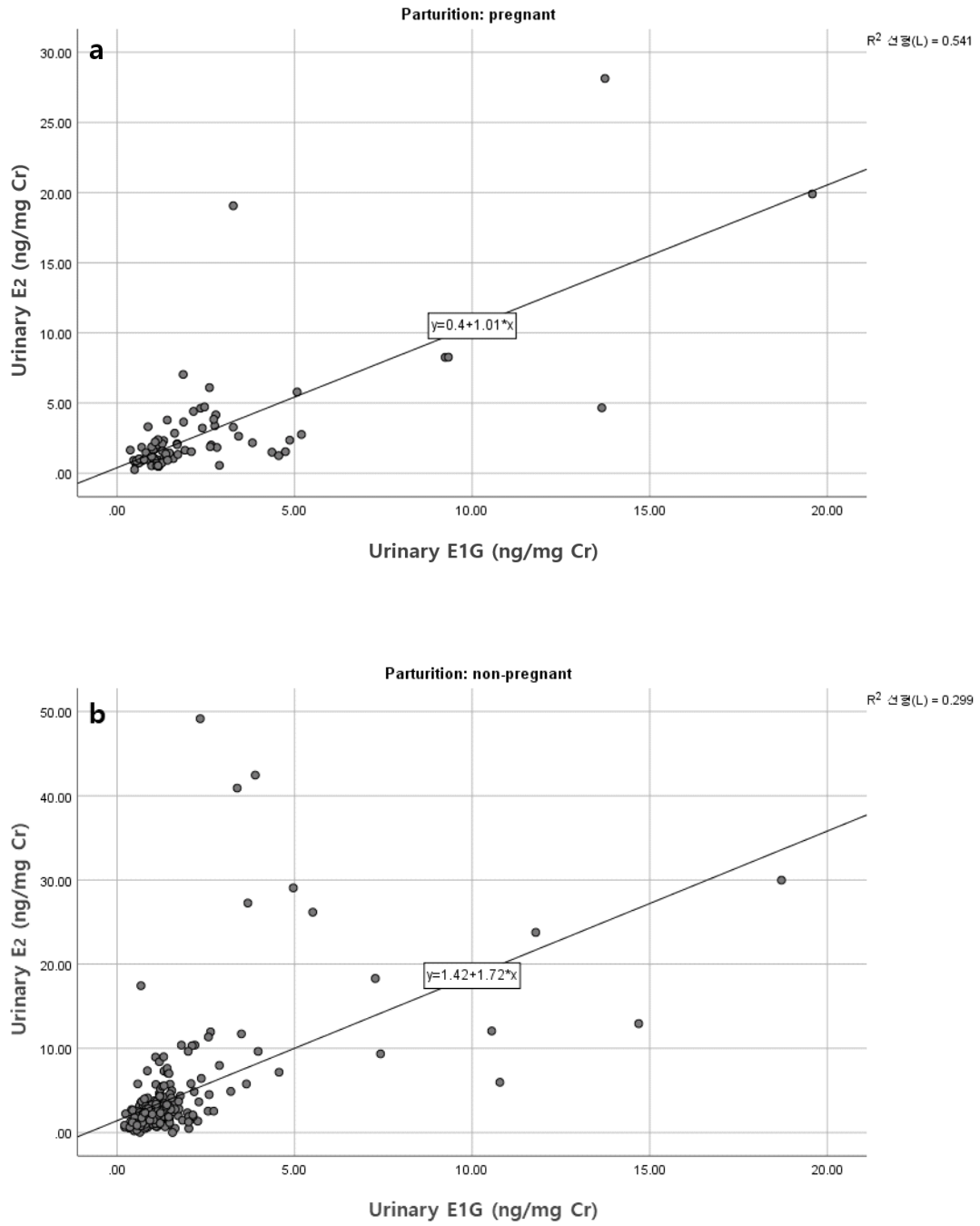


Fig. 8. Correlation between urinary 17β -estradiol (E_2) and estrone-3-glucuronide ($E1G$) concentrations in (a) pregnant bear ($n=1$) and (b) non-pregnant bears ($n=3$) measured by EIA.

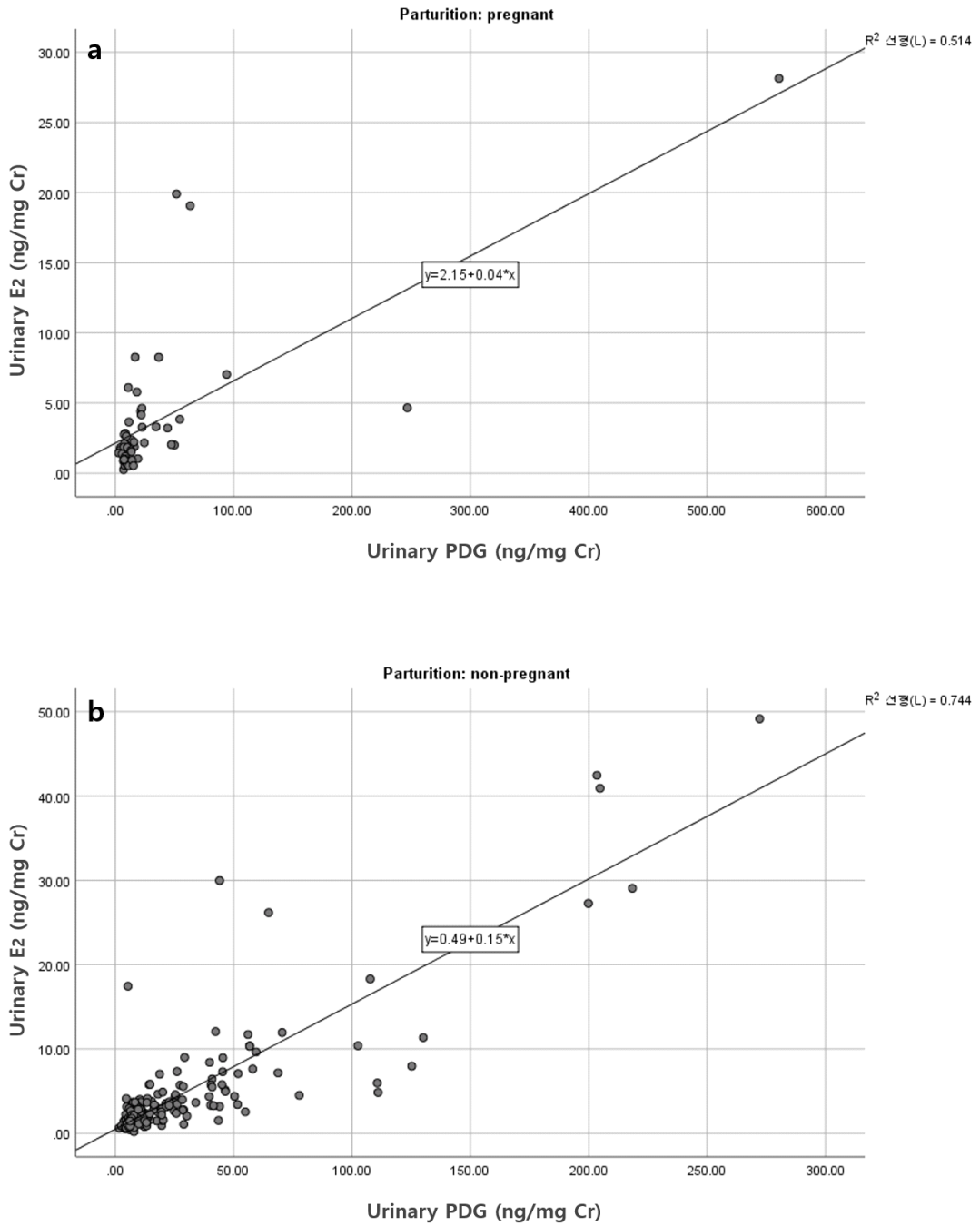


Fig. 9. Correlation between urinary 17 β -estradiol (E₂) and pregnanediol-3-glucuronide (PDG) concentrations in (a) pregnant bear (n=1) and (b) non-pregnant bears (n=3) measured by EIA.

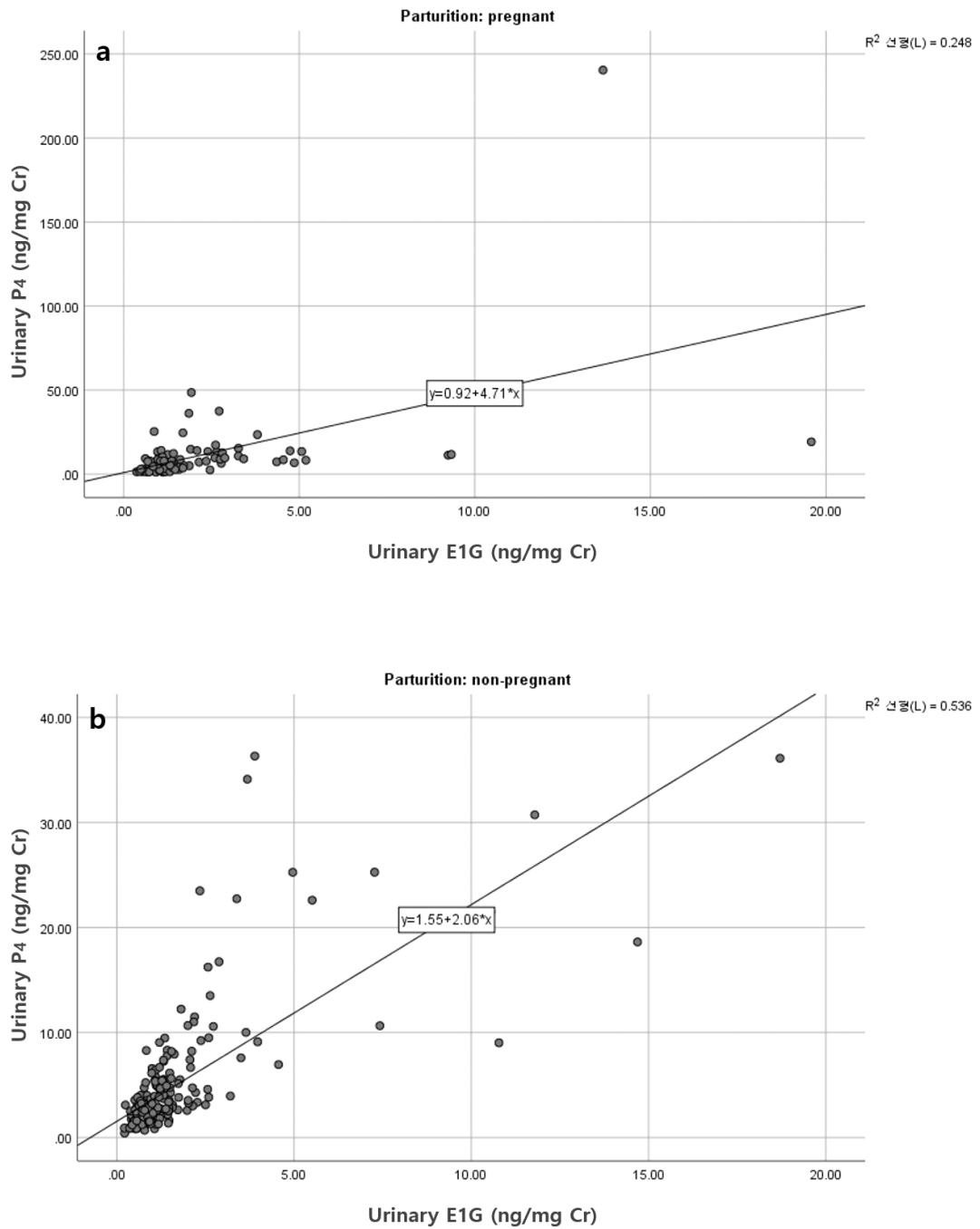


Fig. 10. Correlation between urinary progesterone (P₄) and estrone-3-glucuronide (E1G) concentrations in (a) pregnant bear (n=1) and (b) non-pregnant bears (n=3) measured by EIA.

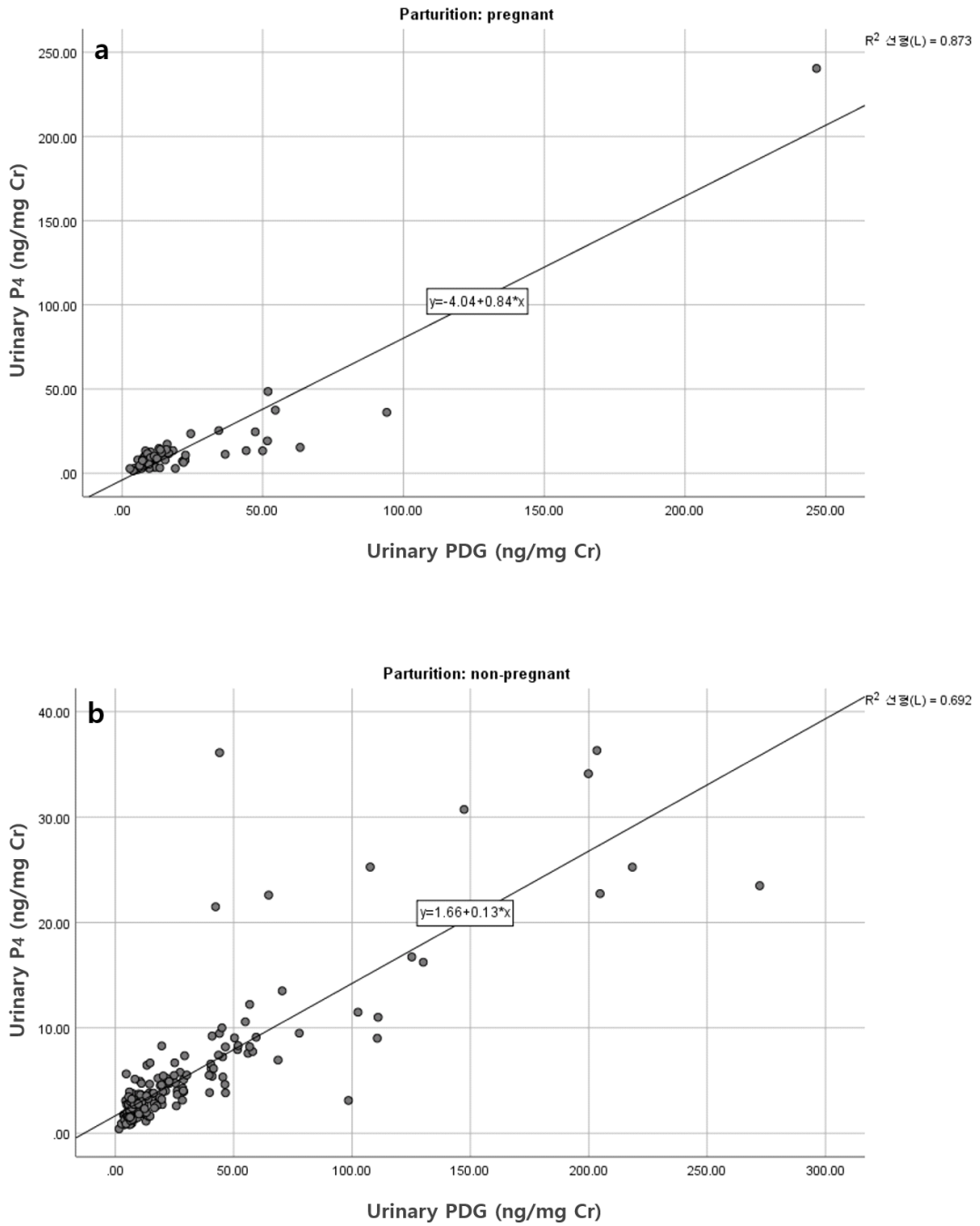


Fig. 11. Correlation between urinary progesterone (P₄) and pregnanediol-3-glucuronide (PDG) concentrations in (a) pregnant bear (n=1) and (b) non-pregnant bears (n=3) measured by EIA.

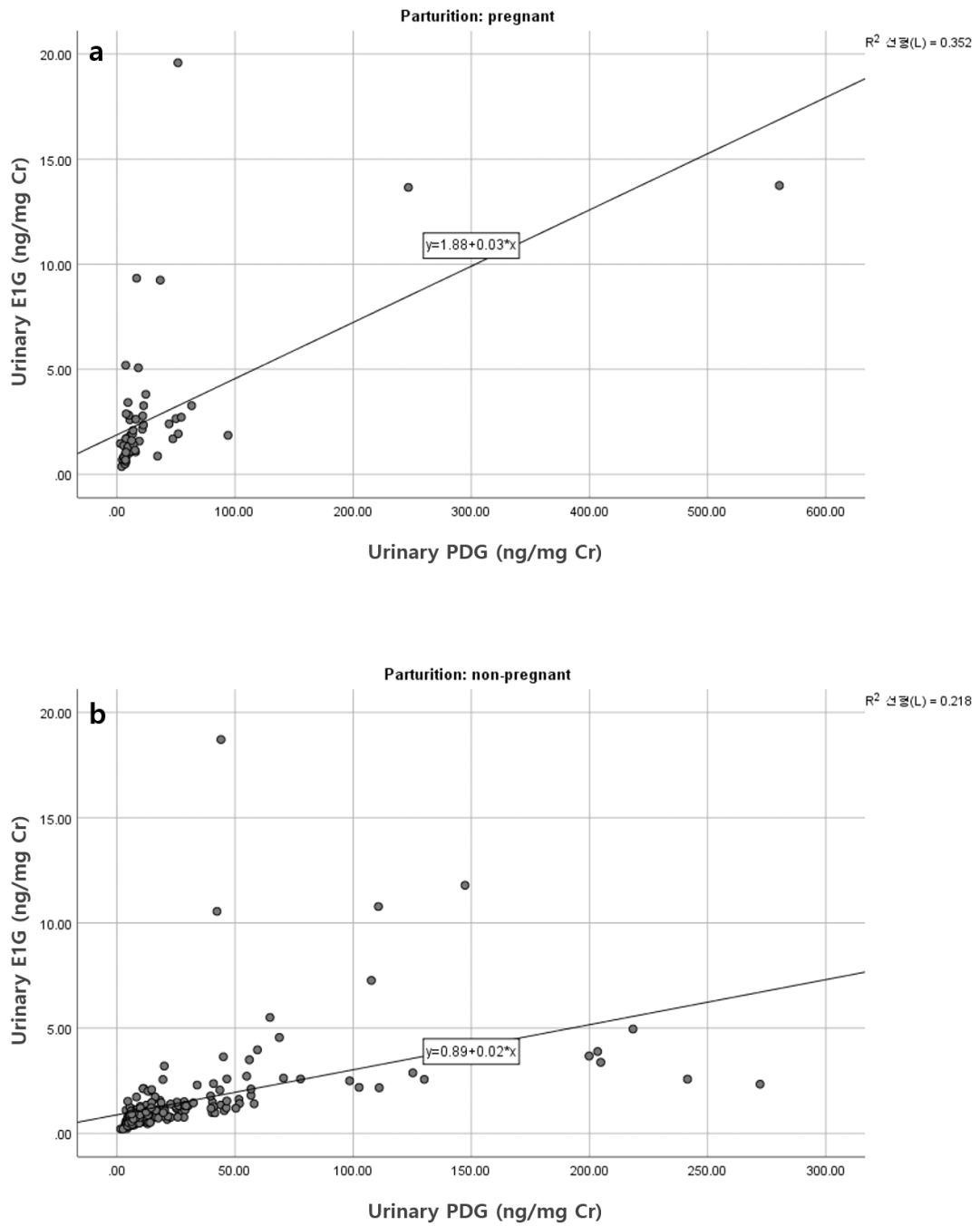


Fig. 12. Correlation between urinary estrone-3-glucuronide (E1G) and pregnanediol-3-glucuronide (PDG) concentrations in (a) pregnant bear (n=1) and (b) non-pregnant bears (n=3) measured by EIA.

4. 고찰

본 연구는 반달가슴곰 중에서는 최초로 뇨 중 성호르몬 분석 기법 적용을 통해 번식기간 동안 암컷 반달가슴곰의 발정주기 패턴을 조사하고, 연속적인 성호르몬 농도 변화를 토대로 배란일의 예측과 인공수정 일자를 결정하기 위해 수행되어졌다.

그 간의 다양한 종의 곰을 대상으로 한 선행 연구에서 언급했던 바와 같이 곰과의 동물에서 직접적인 자극, 즉 수컷에 의한 교미 자극이나 인위적인 배란 유도제(eCG 또는 hCG 또는 합제) 투여를 통한 유도 배란이 아닌, 번식기에 자발적 배란 또는 수컷 곰에 의한 후각적, 청각적 자극 요소들만으로도 암컷 곰의 배란 유도가 가능하다는 사실을 본 연구의 결과를 통해 재확인하였다 (Dehnhard *et al.*, 2006; Okano *et al.*, 2006).

에스트라디올(E₂)과 프로게스테론(P₄)은 곰과의 동물에서 난소와 황체의 활성화, 그리고 임신상태 확인을 위해 일반적으로 사용되어지는 지표로써, 본 연구에서는 이미 선행 연구에서 알려진 여러 가지 에스트로겐과 프로게스테론 대사물질 가운데 각각 2가지의 호르몬 대사물질을 선정하여 지표로 활용하였다 (Sato *et al.*, 2000; Onuma *et al.*, 2002). 본 연구에서 반달가슴곰의 발정 패턴과 배란시기 예측을 위해 사용된 에스트로겐 대사물질(E₂, E1G)은 자이언트 팬더(Czekala *et al.*, 2003; Willson *et al.*, 2019)와 아메리카 흑곰(Tsubota *et al.*, 1998)의 선행 연구에서 보고된 바 있다.

본 연구기간 동안 모든 대상 암컷 곰에서 확인된 여러 번의 에스트로겐 대사물질(E₂, E1G)의 피크 농도는 반달가슴곰에서의 계절적 다발정(Seasonal polyestrus) 또는 순차적 배란(Sequential ovulation)의 발생을 의미할 수 있을 것이다(Spady *et al.*, 2007; Steyaert *et al.*, 2011; Himelright *et al.*, 2014).

또한, 개체에 따라 E₂와 E1G의 농도가 최초로 최고점(Peak)에 도달하는 시기, 최고점에서의 절대 농도 값, 그리고 에스트로겐 피크 사이의 간격 등에서 나타난

차이는 비록 동일한 환경 조건일지라도 개체마다 발정 동기화 시기나 난소의 활성 정도, 그리고 난소 활성의 지속 기간 등에 차이가 나타나는 것으로 판단되고 이는 대만 반달가슴곰(*Ursus thibetanus formosanus*)에서의 분변 내 에스트라디올 분석 결과와 일치하였다(Chang *et al.*, 2011). 또한, 모든 개체에서 E₂와 E1G, 2종의 에스트로겐 대사물질 간에는 정량적인 농도의 차이는 존재하였으나, 일자별로 동일한 양상의 농도 변화가 관찰되었으며, 이를 통해 발정 피크일과 배란일을 예측하고 초음파 검사 등의 추가적인 검사 일자를 결정하는데 있어서 유용하게 활용될 수 있었다. 그럼에도 불구하고 소수의 대상 개체수와 제한된 연구기간 등으로 인하여 번식기간 동안 암컷 반달가슴곰에서의 발정주기 패턴을 명확히 규명하고, 일반화하는데 있어서는 분명한 한계가 있었다.

본 연구를 통해 임신이 확인된 암컷 곰(Bear 1)은 7월 초순경, 인공수정을 수행한 이후 P₄의 평균 농도가 서서히 상승하다가, 8월에 이르러 급격히 상승하는 유의적인 차이를 나타내었다. 이러한 현상은 배란 이후 황체 활성화에 따른 P₄의 분비 증가에 의한 것으로 판단되며, 이는 일본 반달가슴곰, 북해도 불곰 등 다른 종의 곰들에서의 선행 연구 결과와 일치하였다(Sato *et al.*, 2001; Spady *et al.*, 2007). 비록 번식기에 제한된 연구 기간으로 인해 최종 임신이 확인된 암컷 곰에서 배아가 자궁벽에 착상하고 출산 전 태아가 성장하는 시기에 P₄의 농도가 지속적으로 상승하는 양상은 확인할 수 없었지만, 본 연구를 통해 노 중 P₄의 농도는 반달가슴곰의 번식기간 동안 배란시기를 예측하고 황체기를 확인하는데 매우 유용한 지표로 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 프로게스테론 대사물 중 PDG의 농도는 월별로 P₄의 농도 변화와 유사한 패턴이 확인되었지만, 낮은 농도에서 검출한계 이하의 결측 값들이 다수 발생하여 독립적으로 PDG의 연속적인 호르몬 변화 양상만을 토대로 배란시기 예측 및 황체기 특징을 상세히 확인하는데 한계가 있었다.

또한 자이언트 팬더(Monfort *et al.*, 1989), 아메리카 흑곰(Hellgren *et al.*, 1990; Schulz *et al.*, 2003), 북해도 불곰(Tsubota *et al.*, 1987; Tsubota *et al.*, 1992),

그리고 일본 반달가슴곰(Sato *et al.*, 2001)에서 보고된 선행 연구 결과에 따르면 교미하지 않은 곰에서도 임신한 암컷 곰과 구별하기 어려운 가성임신(pseudopregnancy) 현상, 즉 발정기 이후에 임신하는 기간 동안 혈액, 또는 분변 내 P₄의 농도가 높게 유지되는 것으로 보고되었으나, 본 연구에서의 임신하지 않은 암컷 곰들은 5월에서 8월까지 월별 프로게스테론 농도의 상승 변화를 확인할 수 없었다. 이는 수컷의 간접적 자극(시각적, 후각적, 청각적 자극)에 대한 미약한 반응 또는 무반응, 기타 확인되지 않은 다양한 요인들에 의할 수 있을 것이다. 이와 관련된 근거로 일본 반달가슴곰의 선행 연구에 따르면 수컷 곰으로부터 완전히 격리된 암컷 개체 무리에서 황체 형성이 관찰되지 않았다는 보고가 있었다(Okano *et al.*, 2006).

Dehnhard 등에 따르면, 발정기 동안 성호르몬 농도의 변화와 발정주기 패턴 등에 대한 종합적인 정보를 얻기 위해서는 곰 종에 따라 발정기와 황체기의 성호르몬을 검출할 수 있는 시료(혈액, 분변, 오줌 등)의 형태와 분석 방법 등을 달리 적용해야 한다고 보고하였다(Dehnhard *et al.*, 2006). 이는 종에 따라 호르몬의 배설 경로가 다양하고, 동일한 종일지라도 호르몬의 종류에 따라 배설되는 경로가 다르기 때문이다(Schwarzenberger, 2007). 예를 들어 곰 종에 있어서 자이언트 팬더에서는 뇨 에스트로겐(E₂)과 뇨 프로그나디올(PDG) 분석을 통해 발정기와 황체기의 일반적인 양상을 확인할 수 있었던 반면, 불곰은 뇨 에스트로겐의 농도가 자이언트 팬더에 비해 현저히 낮았고, 황체 활성화에 대한 정보는 분변 내 프로게스테론(P₄) 분석이 뇨 중 프로게스테론 또는 프로그나디올 분석에 비해 더욱 효과적인 방법이라고 보고하였다(Tsubota *et al.*, 1991; Göritz *et al.*, 2001). 또한 아메리카 흑곰은 교미 시기 전후에 혈청 에스트라디올 농도의 명확한 차이가 관찰되지 않았으며(Tsubota *et al.*, 1998), 안경곰의 경우 뇨 시료를 통한 에스트로겐 농도 분석이 난포기 활성을 증명하는데 효과적이지 않았던 반면, 뇨 프로게스테론 분석을 통해서도 임신과 연관된 황체기의 특징이 잘 관찰되었다고 보고하였다(Dehnhard *et al.*, 2006). 이러한 현상은 동일한 곰과(*Ursidae*)의 동물일지라도 종에 따라 성호르몬의 최종 대사산물의 형태와 배설 경로에 있어서 차이가 있음을 나타낸다.

유인원 중 가운데 다람쥐 원숭이(*Saimiri sciureus*)는 에스트로겐과 프로게스테론 대사물질 모두 약 70%를 분변 경로를 통해 배설하는데 반해(Moorman *et al.*, 2002), 목화 머리 타마린(*Saguinus oedipus*)은 에스트로겐 대사물질은 대부분(약 92%) 뇨로 배설하고, 프로게스테론 대사물질은 분변으로(95%) 배설한다고 보고하였다(Ziegler *et al.*, 1989). 또한 수마트라 코뿔소(*Dicerorhinus sumatrensis*)와 아프리카 코끼리(*Loxodonta africana*)는 에스트로겐 대사물질은 뇨로 배설하고, 프로게스테론 대사물질은 분변으로 배설한다고 보고되었다(Wasser *et al.*, 1996; Heistermann *et al.*, 1998). 그 밖에도 다양한 종의 야생동물에서 이와 관련한 많은 연구가 보고되어 왔다(Kleiman *et al.*, 2010).

본 연구를 통해 반달가슴곰에서 최초로 시도된 비침습적인 뇨 성호르몬 모니터링 기법은 비록 번식기에 한하여 소수의 개체를 대상으로 시행되었지만, 반달가슴곰의 발정 패턴 확인과 배란 시기를 예측함에 있어서 효과적인 것으로 판단되고, 다만 2가지의 프로게스테론 대사물질 중 PDG에 비해 P₄를 통한 모니터링이 더욱 황체기의 특징을 확인하는데 있어서 주요할 것으로 판단된다.

그러나 아직 밝혀지지 않은 보다 나은 성호르몬 지표를 발굴해내기 위해서는 반달가슴곰에서의 최종 성호르몬 대사산물의 형태와 주요 배설 경로 등에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각하고, 이를 기반으로 반달가슴곰에 최적화된 적절한 형태의 시료 수집과 성호르몬 분석 기법 확립되어야 할 필요가 있을 것이다(Dehnhard *et al.*, 2006).

본 연구는 비침습적으로 뇨 중 성호르몬 분석을 통해 번식기간 동안 암컷 반달가슴곰의 발정 패턴의 특징에 대해 조사한 최초의 보고로써, 결과적으로 연속적인 뇨 성호르몬의 변화를 토대로 배란 전 발정 피크일 확인과 이에 따른 배란시기 예측, 그리고 인공수정을 위한 추가적인 검사일정을 결정하는데 있어서 매우 유용한 방법이라고 판단된다.

그리고 뇨 시료를 통한 비침습적 성호르몬 모니터링 기법 적용이 대상 동물에게 불필요한 스트레스나 고통을 주지 않고 발정 상태에 대한 기초 정보를

제공받을 수 있으나, 이와 더불어 반달가슴곰 중에서 발정기와 황체기에 특징적으로 변화하는 내, 외부 생식기관의 형태, 질 상피 세포상의 변화와 같은 다양한 생물학적 요인의 분석과 이 시기에 나타나는 번식행동 관찰, 페로몬 분석 등과 같은 추가적인 조사가 함께 병행되어야 할 필요가 있을 것으로 판단된다(Swaisgood *et al.*, 2000; Durrant *et al.*, 2006).

참고문헌

- Ballard WB, Miller SD, Spraker TH. Home range, daily movements, and reproductive biology of Brown bear in southcentral Alaska. *Can Field Nat* 1982; 96: 1-5.
- Brown JL, Wildt DE. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring. *Int Zoo Yearb* 1997; 35: 173-191.
- Brown JL, Graham LH, Wielebnowski N, Swanson WF, Wildt DE, Howard JG. Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids. *J Reprod Fertil Suppl* 2001; 57: 71-82.
- Chang GR, Yang CC, Hsu SH, Lin C, Chiu CL, Chan FT, Mao FC. Faecal reproductive steroid profiles for monitoring reproductive patterns in female Formosan black bears (*Ursus thibetanus formosanus*). *Ann Zool Fennici* 2011; 48: 275-286.
- Craighead L, Paetkau D, Reynolds HV, Vyse ER, Strobeck C. Microsatellite analysis of paternity and reproduction in Arctic grizzly bears. *J Hered* 1995; 86: 255-261.
- Curry E, Wyatt J, Sorel LJ, MacKinnon KM, Roth TL. Ovulation induction and artificial insemination of a captive polar bear (*Ursus maritimus*) using fresh semen. *J Zoo Wildl Med* 2014; 45: 645-649.
- Czekala N, McGeehan L, Steinman K, Xuebing L, Gual-Sil F. Endocrine monitoring and its application to the management of the Giant panda. *Zool*

Biol 2003; 22: 389-400.

Dehnhard M, Hildebrandt TB, Knauf T, Jewgenow K, Kolter L, Göritz F. Comparative endocrine investigations in three bear species based on urinary steroid metabolites and volatiles. *Theriogenology* 2006; 66: 1755-1761.

Douglas DA, Song JH, Houde A, Cooke GM, Murphy BD. Luteal and placental characteristics of carnivore gestation: Expression of genes for luteotrophic receptors and steroidogenic enzymes. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 51: 153-166.

Durrant BS, Ravida N, Spady T, Cheng A. New technologies for the study of carnivore reproduction. *Theriogenology* 2006; 66: 1729-1736.

Frederick C, Hunt KE, Kyes R, Collins D, Wasser SK. Reproductive timing and aseasonality in the sun bear (*Helarctos malayanus*). *J Mammal* 2012; 93: 522-531.

Gonzales RL, Mendoza AV, Himelright BM, Moore JM, Spady TJ. American black bear mating behavior and chemosensation of estrus. *Ursus*. 2013; 24: 139-147.

Goeritz F, Quest M, Hildebrandt TB, Meyer HHD, Kolter L, Jewgenow K. Control reproduction with anti-progestin and oestrogens in captive bears. *J Reprod Fert Suppl* 2001; 57: 249-254.

Hama N, Kanemitsu H, Sakamoto K, Oyama Y, Acosta TJ, Ishikawa O, Pengyan W, Okuda K. Development and evaluation of a rapid

enzyme-immunoassay system for measurement of the urinary concentration of estrone-3-glucuronide in a female giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). J Reprod Dev 2008; 54: 281-285.

Heistermann M, Agil M, Bütthe A, Hodges JK. Metabolism and excretion of oestradiol-17beta and progesterone in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). Anim Reprod Sci 1998; 53: 157-172.

Hellgren EC, Vaughan MR, Gwazdauskas FC, Williams B, Scanlon PF, Kirkpatrick RL. Endocrine and electrophoretic profile during pregnancy and nonpregnancy in captive female black bears. Can J Zool 1990; 69: 892-898.

Himelright BM, Moore JM, Gonzales RL, Mendoza AV, Dye PS, Schuett RJ, Durrant BS, Read BA, Spady TJ. Sequential ovulation and fertility of polyoestrus in American black bears (*Ursus americanus*). Conserv Physiol 2014; 2: cou051.

Hodges JK, Bevan DJ, Celma M, Hearn JP, Jones DM, Kleiman DG, Knight DG, Moore HDM. Aspects of the reproductive endocrinology of the female Giant panda (*Ailuropoda metanoleaca*) in captivity with special reference to the detection of ovulation and pregnancy. J zool 1984; 203: 253-267.

Ishikawa A, Sakamoto H, Katagiri S, Takahashi Y. Changes in sexual behavior and fecal steroid hormone concentrations during the breeding season in female Hokkaido brown bears (*Ursus arctos yesoensis*) under captive condition. J Vet Med Sci 2003; 65: 99-102.

Kersey DC, Wildt DE, Brown JL, Snyder RJ, Huang Y, Monfort SL. Unique biphasic progestagen profile in parturient and non parturient giant pandas

(*Ailuropoda melanoleuca*) as determined by faecal hormone monitoring. *Reproduction* 2010; 140: 183-193.

Kersey DC, Wildt DE, Brown JL, Snyder RJ, Huang Y, Monfort SL. Endocrine milieu of perioestrus in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), as determined by non-invasive hormone measures. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 901-912.

Kleiman DG, Thompson KV, Kirk Baer C. Wild Mammals in Captivity. In: Principles and Techniques for Zoo Management. 2nd ed. Chicago: University of Chicago Press. 2010: 449-461.

Knott KK, Mastromonaco GF, Owen MA, Kouba AJ. Urinary profiles of progesterin and androgen metabolites in female polar bears during parturient and non-parturient cycles. *Conserv Physiol* 2017; 5: cox023.

Monfort SL, Dahl KD, Czekala NM, Stevens L, Bush M, Wildt DE. Monitoring ovarian function and pregnancy in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) by evaluating urinary bioactive FSH and steroid metabolites. *Reprod Fertil Dev* 1989; 85: 203-212.

Moorman EA, Mendoza SP, Shideler SE, Lasley BL. Excretion and measurement of estradiol and progesterone metabolites in the feces and urine of female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Am J Primatol* 2002; 57: 79-90.

Okano T, Murase T, Tsubota T. Spermatogenesis, serum testosterone levels and immunolocalization of steroidogenic enzymes in the wild male Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *J Vet Med Sci* 2003; 65:

1093-1099.

Okano T, Nakamura S, Nakashita R, Komatsu T, Murase T, Asano M, Tsubota T. Incidence of ovulation without coital stimuli in captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*) based on serum progesterone profiles. J Vet Med Sci 2006; 68: 1133-1137.

Onuma M, Suzuki M, Uchida E, Niyama M, Ohtaishi N. Annual changes in fecal estradiol-17 beta concentrations of the sun bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak, Malaysia. J Vet Med Sci 2002; 64: 309-313.

Roellig K, Menzie B, Hildebrandt T, Goeritz F. The concept of superfetation: a critical review on a 'myth' in mammalian reproduction. Biol Rev Camb Philos Soc 2011; 86: 77-95.

Rosing-Asvid A, Born EW, Kingsley MCS. Age at sexual maturity of males and timing of the mating season of polar bears (*Ursus maritimus*) in Greenland. Polar Biol 2002; 25: 878-883.

Sato M, Tsubota T, Yamamoto, K, Komatsu, T, Hashimoto Y, Katayama A, Hazumi T, Kita I, Kudo T. Serum progesterone and estradiol-17beta concentrations in captive and free-ranging adult female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). J Vet Med Sci 2000; 62: 415-420.

Sato M, Tsubota T, Komatsu T, Watanabe G, Taya K, Murase T, Kita I, Kudo T. Changes in sex steroids, gonadotropins, prolactin, and inhibin in pregnant and nonpregnant Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Biol Reprod 2001; 65: 1006-1013.

- Schenk A, Kovacs KM. Multiple mating between black bears revealed by DNA fingerprinting. *Anim Behav* 1995; 50: 1483-1490.
- Schulz LC, Nelson RA, Pyter LM, Bahr JM. Induction of pseudopregnancy in the American black bear (*Ursus americanus*). *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2003; 298: 162-166.
- Schwarzenberger F, Fredriksson G, Schaller K, Kolter L. Fecal steroid analysis for monitoring reproduction in the sun bear (*Helarctos malayanus*). *Theriogenology* 2004; 62: 1677-1692.
- Schwarzenberger F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *Int. Zoo Yb* 2007; 41: 52-74.
- Schwarzenberger F, Brown JL. Hormone monitoring: An important tool for the breeding management of wildlife species. *Wien Tierärztl Monat - Vet Med Austria* 2013; 100: 209.
- Servheen C. The status and conservation of the bears of the world. In: Darling LM, Archibald WR, eds. *Proceedings of the International Conference on Bear Research and Management, Monograph Series No. 2*. Victoria: International Association for Bear Research and Management, 1990: 1-32.
- Spady TJ, Lindburg DG, Durrant BS. Evolution of reproductive seasonality in bears. *Mamm Rev* 2007; 37: 21-53.
- Steyaert S, Endrestol A, Hacklander K, Swenson J, Zedrosser. A The mating system of the brown bear *Ursus arctos*. *Mamm Rev* 2011; 42: 12-34.

- Swaisgood RR, Lindburg DG, Zhou X, Owen MA. The effects of sex, reproductive condition and context on discrimination of conspecific odours by giant pandas. *Anim Behav* 2000; 60: 227-237.
- Tsubota T, Takahashi Y, Kanagawa H. Changes in serum progesterone levels and growth of fetuses in Hokkaido brown bear. *Int. Conf. Bear Res. and Manage* 1987; 7: 355-358.
- Tsubota T, Takahashi Y, Kanagawa H, Gohda K. Embryo recovery during delayed implantation in the captive Hokkaido brown bear, *Ursus arctos yesoensis*. *J Vet Med Sci* 1991; 53: 141-142.
- Tsubota T, Kanagawa H, Yamamoto K, Manu T, Yamanaka M, Kita I, Tiba T. Serum progesterone concentrations using P-EIA kit in captive and free-ranging Hokkaido brown bears (*Ursus arctos yesoensis*). *J Vet Med Sci* 1992; 54: 1-5.
- Tsubota T, Howell-Skalla L, Boone WR, Garshelis DL, Bahr JM. Serum progesterone, oestradiol, luteinizing hormone and pro lactin profiles in the female black bear (*Ursus americanus*). *Anim Reprod Sci* 1998; 53: 107-118.
- Yamamoto K, Tsubota T, Kita I. Observation of sexual behavior of captive Japanese black bears, *Ursus thibetanus japonicus* [in Japanese with an English abstract] *J Reprod Dev* 1998; 44: 13-18.
- Wasser SK, Papageorge S, Foley C, Brown JL. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. *Gen Comp*

Endocrinol 1996; 102: 255-262.

Willis EL, Kersey DC, Durrant BS, Kouba AJ. The acute phase protein ceruloplasmin as a non-invasive marker of pseudopregnancy, pregnancy, and pregnancy loss in the giant panda. 2011; PLoS One 6: e21159.

Wilson KS, Wauters J, Valentine I, McNeilly A, Girling S, Li R, Li D, Zhang H, Rae MT, Howie F, Andrew R, Duncan WC. Urinary estrogens as a non-invasive biomarker of viable pregnancy in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Sci Rep 2019; 9: 12772.

Ziegler TE, Sholl SA, Scheffler G, Haggerty MA, Lasley BL. Excretion of estrone, estradiol, and progesterone in the urine and feces of the female cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus oedipus*). Am J Primatol 1989; 17: 185-195.

제 II 장

번식기 암컷 반달가슴곰(*Ursus thibetanus*)의 인공수정
적기 예측을 위한 생물학적 지표의 특성 조사

1. 서론

한반도에 서식하는 반달가슴곰은 중국 동북부, 러시아 연해주 등지에 서식하는 곰과 동일한 우수리 아종(*Ursus thibetanus ussuricus*)으로 과거 한반도에 많은 수의 개체수가 서식하고 있었으나 경제 산업화에 따른 무차별적인 개발로 인한 서식지 파괴와 불법 밀렵 등으로 인해 개체수가 급격히 줄어들었고, 2000년대 초에는 한반도 이남 지역에 극소수의 개체만 확인되었다. 이 지역에 살아남은 소수의 야생 반달가슴곰 개체군을 복원하기 위해 러시아, 북한, 중국 등지로부터 동일 아종의 개체를 도입하여 개체군 보강에 주력하여 왔으나, 국가 간의 정세 불안정성에 따른 변동 가능성으로 지속적인 도입에 난항을 겪어왔다. 또한 반달가슴곰 종의 낮은 번식률과 근친 교배 등에 따라 야생에서 자체 생존력을 갖춘 충분한 수의 개체군 형성과 개체군 내 유전적 다양성 확보에도 차질을 빚어옴에 따라 반달가슴곰의 인공증식 기술 개발을 통한 자체 원종 확보 시스템 확립이 요구되어졌다. 이를 위해서는 우선적으로 반달가슴곰 종의 독특한 번식 생리 기작에 대한 상세한 정보와 이해가 필요하지만, 아직까지 반달가슴곰의 번식 생리 기작에 관한 정보가 매우 제한적이며, 특히나 전 세계적으로 인공수정을 통해 새끼 곰을 출산한 사례는 전무한 상태이다.

그 간의 곰의 번식생리 기작을 규명하기 위한 선행 연구들은 성호르몬 분석, 초음파 검사, 질 상피세포 상의 관찰, 번식행동 관찰, 그리고 사후 생식기관의 해부학적 검사 등을 통해 조사되어져 왔다(Tsubota *et al.*, 1998; Lindburg *et al.*, 2001; Onuma *et al.*, 2001; Durrant *et al.*, 2003; Frederick *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015; Torii *et al.*, 2019).

특히, 초음파 검사는 다양한 종에서 난포의 성장과 배란 상태를 모니터링하기 위해 널리 사용되어져 왔다. 소, 말 등 가축(Ginther, 2000) 뿐 아니라 코끼리(Hermes *et al.*, 2000) 코뿔소(Stoops *et al.*, 2004), 기린(Lueders *et al.*, 2009) 등의 멸종위기에 처한 야생동물 종에서도 이를 활용한 선행 연구가 수행되어져

왔다. 또한 곰 종에서는 자이언트 팬더(Durrant *et al.*, 2002), 불곰(Torii, 2019), 아메리카 흑곰(Boon *et al.*, 2004), 반달가슴곰(Kang *et al.*, 2015) 등에서 보고된 바 있었다.

질 상피세포의 평가는 암컷의 배란 시기를 결정하고 자연 번식 적기의 탐지를 개선하는데 호르몬, 초음파 검사 등의 다른 진단 기법들과 함께 사용되어 지고 있다(Linde and Karlsson, 1984; Moxon *et al.*, 2010; Antonov, 2016). 이는 각질화표재세포(Superficial cell)의 출현 비율과 혈 중 에스트로겐의 농도 사이에 양의 상관관계가 있다고 보고된 설치류(Zylicz *et al.*, 1967; Parakkal, 1974), 개(Shutte, 1967), 고양이(Mills *et al.*, 1979) 등의 선행 연구에서와 같이 일관적인 결과들을 바탕으로 많은 종에서 자연 번식과 인공수정에 일상적으로 적용되어지고 있는 방법이다(Durrant *et al.*, 2003). 또한 수달(Stenson, 1988), 페렛(Williams *et al.*, 1992), 밍크(Klotchkov *et al.*, 1998), 그리고 여우(Boue *et al.*, 2000) 등과 같은 다양한 야생동물 종에서도 발정 주기를 특징화하는데 사용되어져 왔다. 특히 곰 종에서 자이언트 팬더(*Ailuropoda melanoleuca*)는 행동학적 또는 내분비학적 호르몬 데이터를 바탕으로 발정 피크 기간 동안에 제한적으로 질 상피세포 도말을 통한 연구를 수행하였다(Moore *et al.*, 1984). 최근 자이언트 팬더에서 사용되어졌던 3색 염색 기법인 PAP(Trichome papanicolaou) 염색은 세포의 모양이나 크기에만 의존하던 전통적인 단색 염색(Monochrome stain) 방법에 비해 발정 주기 동안의 생화학적 변화들에 대해 보다 많은 정보를 제공하여 주었으며, 또한 질 상피세포의 변화상은 외음부의 크기 및 외음순의 발적 상태와 상호 연관관계가 있음을 확인하였다(Durrant *et al.*, 2002; Durrant *et al.*, 2003). 동물 종의 발정 상태를 확인할 수 있는 또 다른 방법으로 질 점막 전기저항을 측정하는 방법이 있으며, 이는 개를 대상으로 한 선행 연구에서 혈 중 호르몬과 질 점막 전기저항 수치는 밀접하게 연관되어 있고 암컷의 번식 적기에 대한 정보를 제공해 줄 수 있는 또 하나의 지표로 보고되었다(Günzel *et al.*, 1986).

본 연구는 번식기 동안의 암컷 반달가슴곰의 인공수정 적기를 예측하기 위해서

이미 가축이나 다른 야생동물 중에서 일반적으로 활용되어지고 있는 다양한 검사 방법들을 적용함으로써 반달가슴곰의 생물학적 지표들에 대한 특징을 조사하기 위해 수행되어졌다. 그리고 이러한 지표들이 반달가슴곰 종에서도 발정기의 특징 및 배란 상태를 예측하는데 유용한 지에 대해 조사하고, 각각의 생물학적 지표들 간의 상호 연관 관계를 파악함으로써 궁극적으로 이러한 데이터의 종합적인 분석을 기반으로 반달가슴곰의 자연 번식 및 인공 수정에 활용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

1) 대상 동물

본 연구는 「야생생물 보호 및 관리에 관한 법률」 제 14조 제1항, 동법 시행령 제 11조 제 1항, 동법 시행규칙 제 15조 제2항에 따라 환경부로부터 멸종위기 야생생물 인공증식에 관한 심의 및 승인 절차를 이행하고, 국립공원생물종보전원 동물연구심의위원회로부터 승인(승인번호: 2017-820, 2018-856)을 받아 수행되어졌다.

2017년도, 2018년도에 반달가슴곰(*Ursus thibetanus*)의 번식시즌 동안 국립공원 생물종보전원의 전시시설 내에서 증식·사육하고 있는 총 7마리의 암컷 반달가슴곰을 대상으로 인공수정 적기 파악을 위한 생물학적 지표에 대해 조사하였다(Table 9). 대상 곰들은 개체별로 독립적인 공간에 계류하였으며, 계류 시설의 외벽은 철재의 격자망 구조로 외부 환경과 준 개방(semi-open)되어 있어서 수컷 곰의 모습을 보거나 냄새를 맡을 수 있는 환경이었다.

모든 곰들에게는 동일하게 오전, 오후로 배합 사료(Dry Omnivore Diet Food, Zupreem, KS, USA)와 계절 과일들을 혼합한 먹이가 제공되었으며, 자동 급수를 통해 곰들이 자유롭게 음수 할 수 있도록 하였다. 본 연구 기간 동안 전 개체 모두 건강상태는 양호하였으며, 관련 선행 연구(Yang *et al.*, 2017)와 비교하여 혈액성상 검사 및 혈액화학검사 결과 상, 이상 수치는 관찰되지 않았다.

Table 9. Bears used observation of estrus status during breeding seasons in 2017 and 2018

ID No.	Age (Y)	BW (kg)	Parity	Year	Date of observations	Remarks
Bear 1 ^b	13	182	2	2017	June 22/ July 5, 18, 19	1 cub was born
Bear 2 ^b	7	110	2	2017	June 21/ July 6, 13	2 cubs were born
Bear 3 ^b	8	132	2	2018	June 13, 19, 20, 21, 29, 30/ July 1, 6, 19/ August 1	2 cubs were born
Bear 4 ^{a, b}	4	88	0	2018	May 16/ June 12, 21, 27/ July 4, 5, 6, 18, 26	2 cubs were born
Bear 5 ^a	6	95	0	2018	May 16/ June 13, 21, 27/ July 9, 10, 14/ August 2	-
Bear 6	12	170	0	2018	June 15, 19, 26, 27, 28/ July 11, 12, 17, 26/ August 9	-
Bear 7 ^a	4	87	0	2018	May 16/ June 12, 13, 14, 19/ July 4, 14/ August 2	-

All bears were commonly tested for transrectal ultrasonography, vaginal cytology and vaginal mucous electrical resistance (VER).

^a The individual was accompanied by urinary estrogen metabolites monitoring.

^b Bear gave birth the following year by natural mating or artificial insemination (AI).

2) 초음파 검사

모든 검사는 마취를 통해 실시하였다. 마취를 위해 2 mg/kg의 tiletamine/zolazepam (Zoletil 50[®], Virbac, Carros, France)과 0.04 mg/kg의 medetomidine (Dormitor[®], Pfizer, Helsinki, Finland)의 약물을 혼합한 후, CO₂ 건(CO₂ PI, Dan-Inject Aps, Børkop, Denmark)을 이용하여 근육 내로 투여하였고, 이후 isoflurane (Ifran[®], Hana Pharm. Co., Ltd., Seoul, Korea)의 흡입을 통해 작업시간 동안 마취 상태를 유지시켰다(Jeong *et al.*, 2017). 내부 생식기관의 검사는 초음파 장비(ProSound Alpha 7 device, Hitachi Aloka Medical, Ltd., Tokyo, Japan)에 7.5 MHz의 선상(또는 블록) 배열의 직장 초음파 프로브(Aloka UST-678, Hitachi Aloka Medical, Ltd., Tokyo, Japan)를 장착하고 직장 내 삽입을 통해 질, 자궁경관, 자궁, 자궁각 등의 내부 생식기관의 구조를 살핀 후, 난소와 난포의 크기, 황체 형성 등의 형태학적 변화상을 관찰하였다(Table 10).

3) 질 상피세포 검사

2017년, 2018년도 번식시즌 동안 개체별로 질 상피세포 검사를 실시하였다. 검사 일자와 간격은 개체별 최초 검사일의 질 상피세포의 양상을 기준으로 랜덤하게 결정하였으며, 표재세포(Superficial cells)의 비율이 증가해 감에 따라 보다 짧은 간격으로 검사를 실시하였다.

멸균된 면봉에 phosphate-buffered saline (PBS) 용액을 1-2 방울 떨어뜨리고, 질 입구에서 내강으로 약 5 cm 정도 삽입한 후, 360°로 회전시켜 질 상피세포를 채취하고 현미경용 슬라이드글라스 위에 도말하였다. 이후 Papanicolaou (PAP) 염색법의 기본 절차에 따라 염색 과정을 수행하였다(Papanicolaou, 1942; Durrant, 2002). 염색된 세포는 반려 견에서의 선행 연구로부터 확립된 기준에 따라 분류하였다(Shutte, 1967; Feldman and Nelson, 1987). 염색된 슬라이드는 최소 100개 이상의 세포를 센 후, 세포 형태에 따라 기저결세포(Parabasal cell), 중간세포(Intermediate cell), 그리고 표재세포로 구분하여 기록하였다. 그리고

각각의 염색된 세포 도말 슬라이드는 형태에 따른 세포 분류와는 상관없이 염색된 색의 구분에 의해 호염성(Basophilic cell; blue), 호산성(Acidophilic cell; pink), 그리고 각질화(keratinized cell; orange/yellow) 세포로 재 구분하여 최소 100개 이상의 세포를 센 후 기록하였다.

4) 질 점막 전기저항 측정

질 점막 전기저항은 배란 측정기(Dog Ovulation detector, Draminski Electronics in Agriculture, Olsztyn, Poland)의 질 내 삽입을 통해 측정되어졌다. 요약하자면 마취된 곰의 외음부를 깨끗이 세척하고 멸균 거즈로 닦아 건조시킨 후, 70% 알코올로 미리 소독한 배란 측정기의 프로브를 질 내 깊숙이 삽입하여 연속적으로 3회 이상(3 - 5회) 전기저항 값을 측정하였다.

5) 외음부 형태적 변화

외음부의 형태 변화는 자이언트 팬더의 선행 연구 기준을 참고하여 외음부의 크기 측정, 외음부의 종창, 발적, 그리고 질 점액 분비 등을 기초로 각 항목별 0-3까지의 점수를 부여하였다(Durrant *et al.*, 2003). 요약하자면 0점은 외음부의 종창이 없고, 점막은 창백하며 질 점액이 관찰되지 않은 상태를 나타내며, 1점은 약간의 외음부 종창과 점막은 창백한 핑크빛이 감돌며, 미약한 정도의 질 점액이 확인되는 정도를 나타내었다. 그리고 2점은 외음부 종창이 두드러지고 점막에 진한 핑크빛을 띄며, 중등도 이상의 질 점액이 확인되는 상태를 나타내었으며, 마지막으로 3점은 외음부가 최대로 종창되어 외음순이 일정 간격 벌어지고, 점막에 어두운 핑크빛을 띄며, 질 점액양이 최대로 확인되는 정도를 기준으로 판단하였다.

6) 통계 분석

통계 분석은 IBM SPSS Statistics ver. 18과 Microsoft excel ver. 2016을

활용하여 수행하였다. 번식기간 동안 개체별 난소, 우성난포, 그리고 황체의 크기에 대한 기초 통계 분석(Mean \pm SD)을 실시하였고, 표재세포(Superficial cell)의 출현 비율(50% 기준)에 따른 각각의 유형별 세포 출현 비율(%)과 질 점막 전기저항 수치(Ω)에 대해 Mann-whitney U test를 통해 비교 분석하였다. 또한, 유형별 세포 출현 비율 간, 그리고 질 점막 전기저항 수치 간에 상관관계(Pearson's correlation) 분석을 실시하였다. 모든 통계 분석에서의 유의성 검정은 $p < 0.05$ 의 수준에서 결정하였고, 각 항목에 대한 검사 일자별 형태 변화의 양상은 그래프를 통해 표기하였다.

3. 결과

1) 초음파 검사

2017년도에 Bear 1과 Bear 2, 그리고 2018년도에 Bear 3, Bear 4, Bear 5, Bear 6, Bear 7의 번식기간 동안 좌, 우측 난소 및 우성난포(Dominant follicle, > 6 mm)의 크기와 황체 형성 여부 및 황체의 크기는 Table 10에 나타내었다. 또한 검사 일자에 따른 개체별 좌, 우측 난포 크기의 변화는 Fig. 13의 그래프에서 보는 바와 같다.

2017년도 연구 대상개체 중 Bear 1은 검사 첫 날인 6월 22일에 양쪽 난소에서 3 mm 미만의 소 난포들만 관찰되었으나, 13일 후 좌측 난소에서 6.80 mm인 비교적 큰 난포가 관찰되기 시작하였다. 관찰이 시작된 일자로부터 약 2주 후(7월 18일)에 좌, 우 양쪽 난소에서 각각 7.8 mm, 8.8 mm인 난포가 1개씩 관찰되었으며, 하루 다음 날인 7월 19일에는 각각 8.9 mm, 9.6 mm로 점차 커지는 양상을 보였다. Bear 2는 6월 21일, 검사 첫 날에 양쪽 난소에 5 mm 미만의 소 난포들만이 관찰되었고, 약 3주 후인 7월 13일에 좌, 우 양쪽 난소에서 각각 7.3 mm, 7.8 mm의 큰 난포가 관찰되었다. 그러나 이 후에 두 개체 모두 추가적인 검사를 실시하지 않았기 때문에 황체의 형성 여부는 확인할 수 없었다.

2018년도에 황체 형성까지 확인된 개체는 Bear 3, Bear 4, Bear 5, 그리고 Bear 6, Bear 7 총 5개체였다(Fig. 13). Bear 3은 검사 첫 날(6월 13일)에 좌, 우 양쪽 난소에서 5 mm 미만의 소 난포들이 다수 산재하고 있었고, 6일째(6월 19일) 좌측 난소에서 6.0 mm이상의 서로 다른 2개의 난포가 확인된 후, 23일째(7월 6일)까지 점진적으로 커져가는 양상이 관찰되었다. 이 날 난포의 최대 크기는 12.8 mm이었고, 이로부터 약 2주 후 검사 결과, 2개의 난포 모두 1/2로 크기가 줄어들었음이 관찰되었다. 최종적으로 마지막 검사 일(8월 1일)에 좌측 난소에서 퇴행성 내강(< 3.0 mm)이 남아있는 8.5-9.9 mm 크기의 2개의 황체가

관찰되었다. 그러나 전체 검사기간 동안 우측 난소에서는 6 mm 이상의 난포는 관찰되지 않았다. Bear 4는 총 8번의 검사 중, 최초 검사일(6월 12일)로부터 15일째(6월 27일)까지 양쪽 난소에서 2.0 - 3.5 mm 크기의 다수의 소 난포들만이 관찰되었다. 이로부터 7일 후(7월 4일)에 양쪽 좌, 우 난소에 6 mm 이상의 우성난포가 각각 4개, 그리고 3개씩 관찰되기 시작하였고, 이로부터 약 2주 후 검사일(7월 18일)에는 좌, 우 각각 19.1 mm, 16.1 mm로 최대 직경의 우성난포가 확인되었다. 그리고 8일 후, 7월 26일에 좌, 우측 난소에 각각 퇴행성 내강이 있는 4, 3개의 황체(최대 9.5 mm)가 관찰되었다(Fig. 14). 그리고 Bear 5는 첫 번째 검사일(6월 13일)로부터 약 2주 동안 양쪽 난소에서 모두 5 mm 미만의 소 난포들만 관찰되었다가, 7월 9일에 좌, 우 양쪽 난소에서 6 mm 이상의 난포가 각각 1개씩 관찰되었다. 이로부터 5일 후(7월 14일) 좌, 우측 난소에서 직경이 8.1 mm, 8.3 mm로 커진 난포가 확인되었고, 8월 2일에 양쪽 난소로부터 퇴행성 내강(< 3 mm)이 남아있는 최대 직경 7.5 mm인 황체를 확인할 수 있었다. Bear 6은 6 mm 이상의 난포가 양쪽 난소에서 관찰된 이후, 우측 난소에서 관찰된 난포는 9일째까지 증가 또는 비슷한 크기로 유지되다가 이후 6 mm 미만으로 감소하였던 반면, 좌측 난소에서는 약 3주 동안 난포의 크기가 지속적으로 증가함이 관찰되었다. 관찰된 난포의 최대 직경은 11.3 mm이었고, 최종 검사 일에 10.6 mm의 황체가 확인되었다. 마지막으로 Bear 7은 검사 첫 날(6월 12일)에 이미 우측 난소에서 9.1 mm 정도의 크기가 큰 난포가 관찰되었고, 약 일주일 간 비슷한 크기로 유지되다가 7월 1주에 좁은 내강이 있는 7.0 mm 이상 크기의 황체가 확인되었다. 그러나 좌측 난소에서는 전체 검사기간 동안 6.0 mm 이상의 난포는 관찰되지 않았다.

우측 난소와 우측 우성난포의 크기($r = 0.33, p = 0.05, n = 35$), 그리고 좌측 난소와 좌측 우성난포의 크기($r = 0.56, p < 0.05, n = 36$) 사이에는 각각 양의 상관관계를 나타내었으며, 좌, 우측 양쪽 난소의 크기 간에도 양의 상관관계를 나타내었다($r = 0.39, p < 0.05, n = 38$).

Table 10. Ultrasound observations of ovaries, dominant follicles and corpus luteums in each female Asiatic black bears

Bear	Ovaries (mm)				Dominant Follicles (mm)				CL (mm)
	Lt.O		Rt.O		Lt.DF		Rt.DF		max.
	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	No.	Mean ± SD	No.	Mean ± SD	
Bear 1	3	20.67 ± 2.08	3	21.70 ± 2.18	1	7.83 ± 1.05	1	9.20 ± 0.57	Not found
Bear 2	2	22.65 ± 0.07	2	20.35 ± 0.78	1	7.30 ± 0.65	1	7.80 ± 0.75	Not found
Bear 3	10	24.56 ± 3.92	7	22.02 ± 1.38	2	9.38 ± 1.86	0	Small*	9.90
Bear 4	8	25.70 ± 5.44	8	24.04 ± 3.91	4	9.86 ± 5.29	3	9.16 ± 3.91	9.50
Bear 5	7	19.16 ± 1.61	7	17.67 ± 1.50	1	6.93 ± 1.04	1	7.57 ± 0.91	7.50
Bear 6	10	25.32 ± 2.46	8	19.24 ± 3.76	4	8.69 ± 1.86	4	8.57 ± 0.96	10.60
Bear 7	6	20.08 ± 1.48	6	19.01 ± 0.80	0	Small*	2	8.83 ± 0.70	7.20

Lt.O, Left Ovary; Rt.O, Right Ovary; Lt.DF, Left dominant follicles; Rt.DF, Right dominant follicles; CL, Corpus luteums; SD, Standard deviation

*Small follicles < 6mm

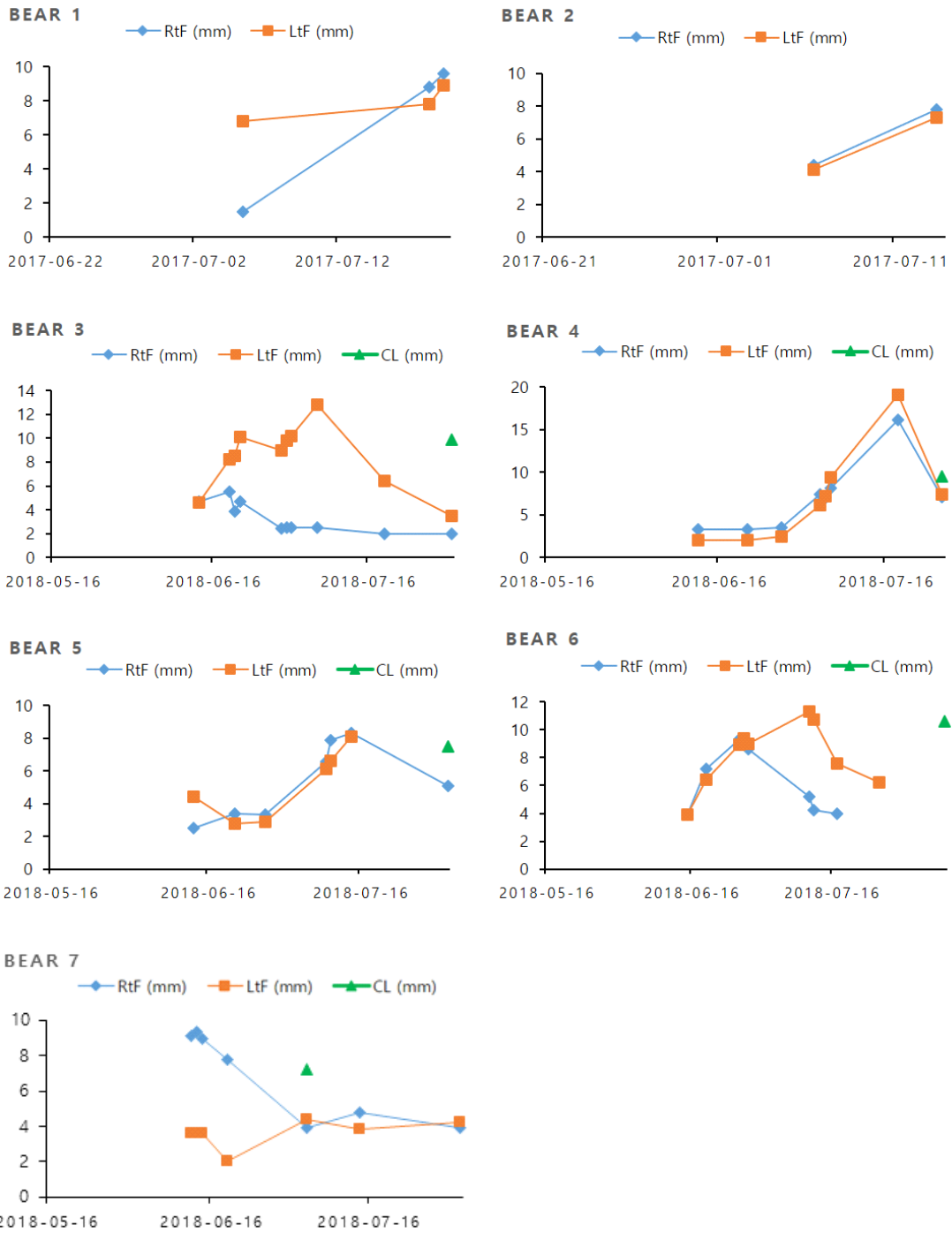


Fig. 13. The follicle growth profiles in 7 bears in 2017 and 2018. In Bear 1 and Bear 2, the largest follicle remained without decreasing. In Bear 3 to Bear 7, the corpus luteum (CL) was observed after the largest follicles decrease rapidly. (RtF; right follicles, LtF; left follicles).

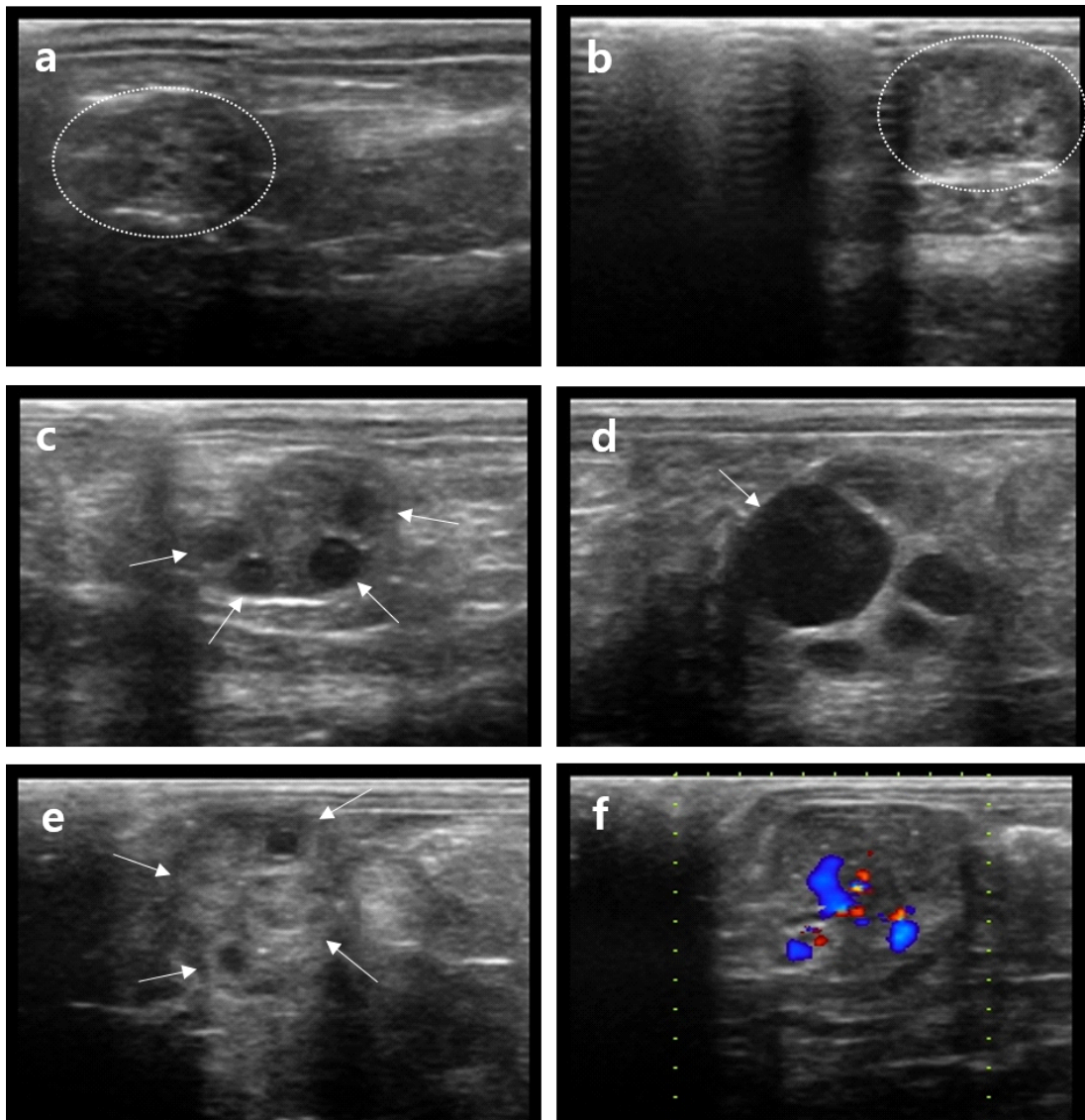


Fig. 14. Ultrasound images of the ovaries in Bear 4 using a transrectal 7.5 MHz transducer. **a)** A left ovary with several small follicles (< 3 mm) was observed on June 12th in Bear 4. **b)** Same ovary 15 days after panel a (June 27th). **c)** Same ovary 7 days after panel b (July 4th), dominant follicles (> 6 mm) were observed (white arrows). **d)** Same ovary 16 days after panel c (July 18th). The dominant follicle (white arrow) in panel d had developed to maximum size (19.1 mm). **e)** Same ovary 8 days after panel d (July 26th). The corpus luteums (CL; white arrows, 9.5 mm) with a cavity inside, were observed. **f)** Same image as panel e. The blood flow is shown in red and blue colors. **a), b)** A dotted line indicated ovarian border.

2) 질 상피세포 변화

2017년도에 Bear 1과 Bear 2, 그리고 2018년도에 Bear 3, Bear 4, Bear 5, Bear 6, Bear 7을 대상으로 질 상피세포의 변화상을 관찰하였다(Fig. 15). 번식기간 동안 일자별 질 상피세포의 출현 비율을 표재세포의 출현 비율($< 50\%$ vs. $\geq 50\%$)을 기준으로 두 그룹으로 나누어 분석하였으며, 질 상피 세포의 형태별, 색상별 세포 출현 비율은 표재세포의 50% 출현 비율에 따라 두 그룹 간에 유의미한 차이($p < 0.001$)가 관찰되었다(Table 11). 세포의 형태와 색상에 기초한 개체별 질 상피세포의 변화 양상은 각각 Fig. 16, Fig. 17에서 보는 바와 같다.

연구기간 동안 표재세포가 50% 이상이었던 구간은 대부분 개체에서 1회(Bear 1, Bear 2, Bear 5, Bear 6, Bear 7) 관찰되었으나, Bear 3와 Bear 4는 2회까지 관찰되었다. 표재세포가 50% 이상이었던 구간이 2회 관찰된 두 개체 중 Bear 3는 첫 번째 구간이 약 7일, 두 번째 구간이 약 11일, 그리고 두 구간 사이의 간격은 약 6일 정도로 관찰되었다. 그리고 Bear 4는 첫 번째 구간은 약 5일, 두 번째 구간은 약 12일, 두 구간 사이 간격은 약 1일로 관찰되었다.

질 상피세포의 유형별 출현 비율 간의 상관관계는 표재세포의 출현 비율 증가함에 따라 호산성세포와 각질화세포의 출현 비율이 함께 증가하는 양의 상관관계($p < 0.001$)가 관찰되었던 반면, 호염성세포와 기저결세포, 그리고 중간세포의 비율은 감소하는 음의 상관관계($p < 0.001$)를 나타내었다(Table 13).

Table 11. Comparisons of vaginal epithelial cell types based on superficial cells ratio

Cells (%)		Superficial epithelial cells (%)				<i>p</i> - value ¹⁾
		< 50 %		≥ 50 %		
		n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	
	Basophilic	27	82.43 ± 18.45	30	18.13 ± 14.31	< 0.001
Color	Acidophilic	27	14.56 ± 16.02	30	63.00 ± 13.27	< 0.001
	Keratinized	27	3.01 ± 4.07	30	18.87 ± 12.22	< 0.001
	Parabasal	27	23.48 ± 31.38	30	0.96 ± 2.89	< 0.001
Type	Intermediate	27	64.02 ± 29.46	30	23.71 ± 10.67	< 0.001
	Superficial	27	12.51 ± 13.13	30	75.33 ± 11.24	< 0.001

SD, Standard deviation

1) Statistical significances ($p < 0.05$) were tested by Mann-whitney U test of variances among groups.

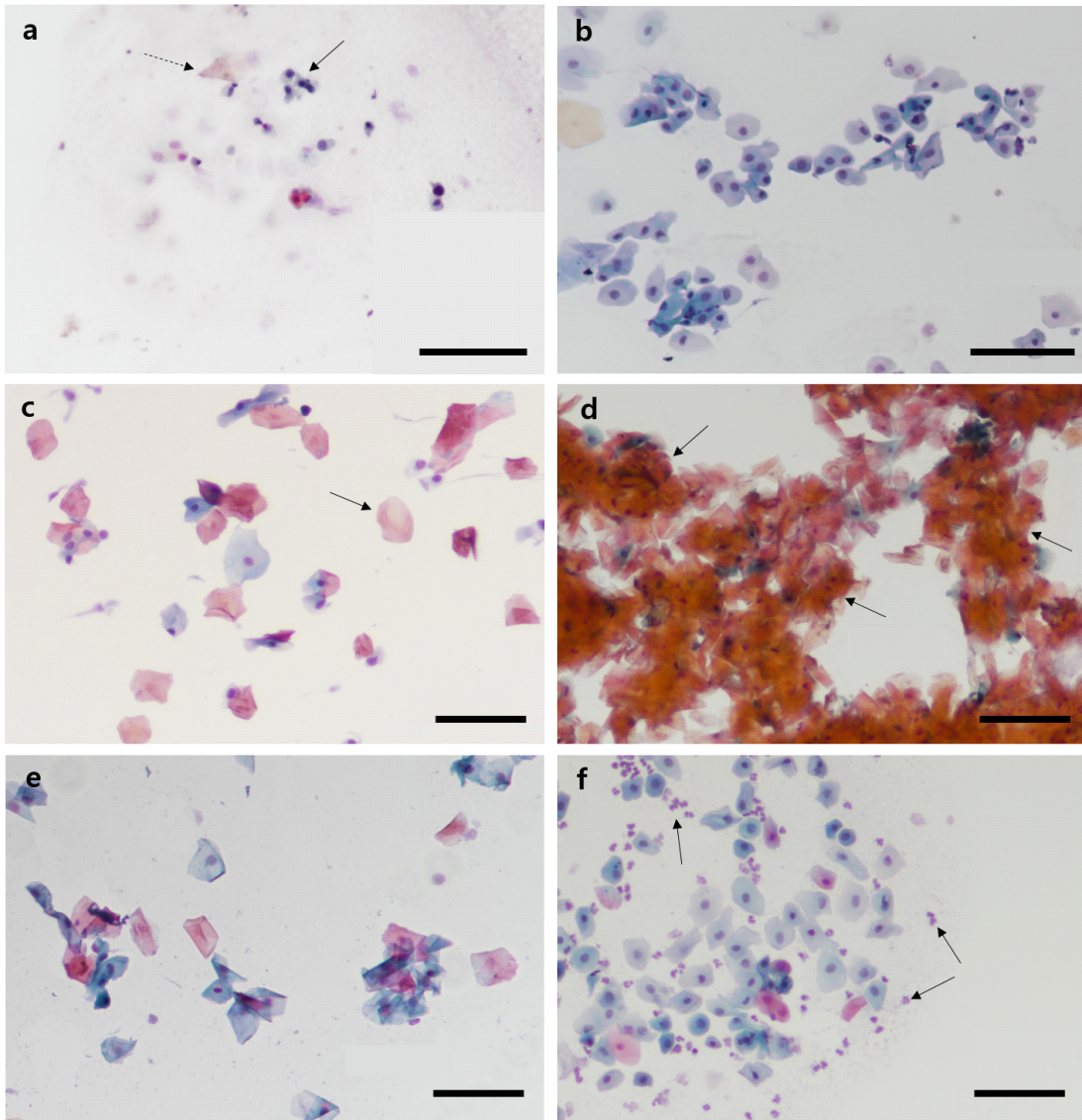


Fig. 15. Vaginal epithelial cell cytology stained by the Papanicolaou (PAP) method during the breeding season. **a)** anoestrus; parabasal basophilic cells (arrow) and a few remnant superficial cells (broken arrow) can be seen. **b)** early proestrus; small and large Intermediate cells are predominated in the image. **c)** mid-late proestrus; increased anuclear acidophilic superficial cells (arrow) are observed in the image. **d)** estrus; clumps (arrows) of anuclear keratinized superficial cells are increased rapidly. **e)** late estrus; decreased keratinized superficial cells are observed. **f)** diestrus; small and large Intermediate basophilic cells are predominated and a high number of leukocytes (arrows) can be seen in the image. Scale bar represents 100 micrometers.

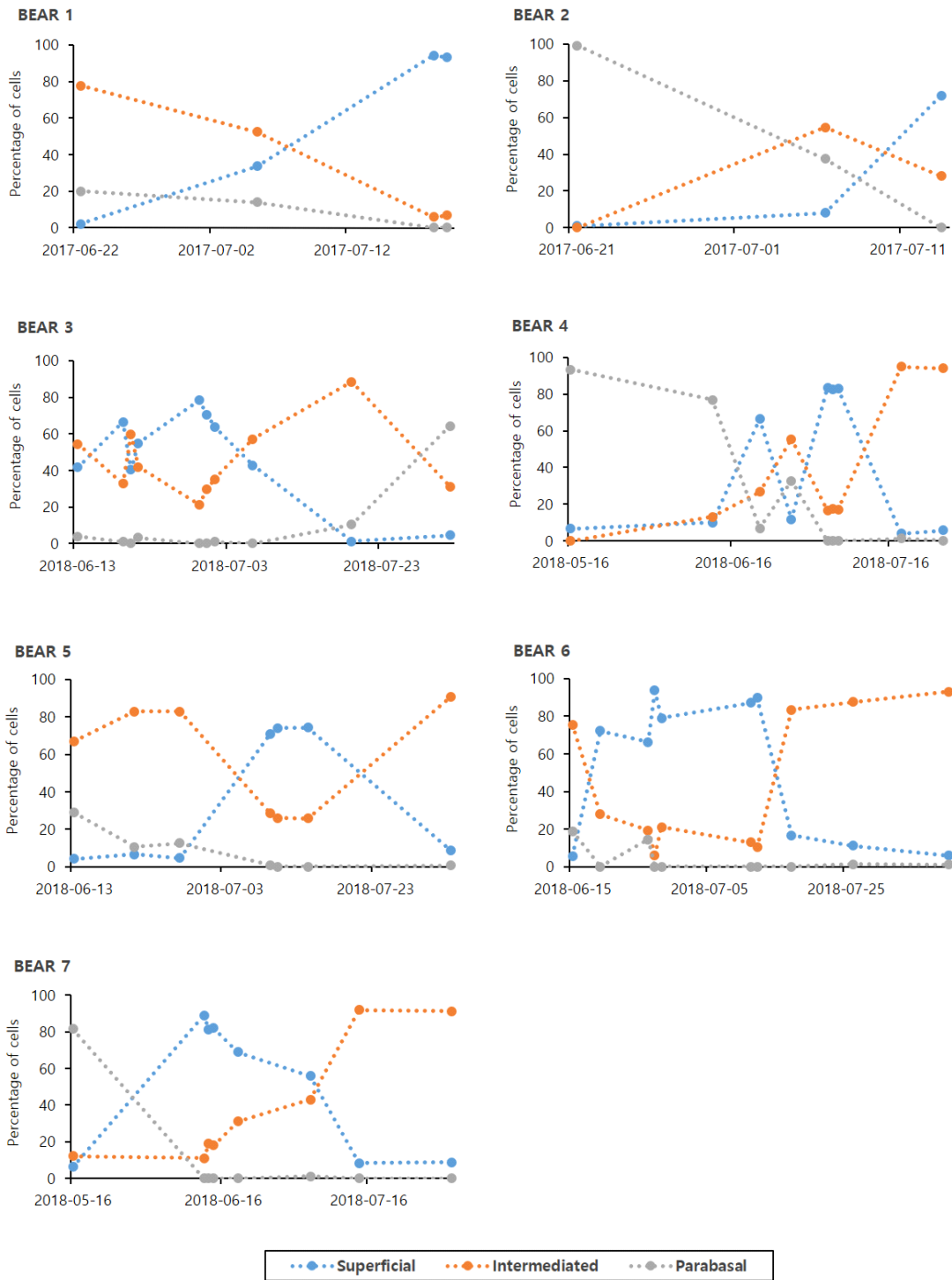


Fig. 16. Morphological changes in vaginal epithelial cell cytology during breeding seasons in seven bears.

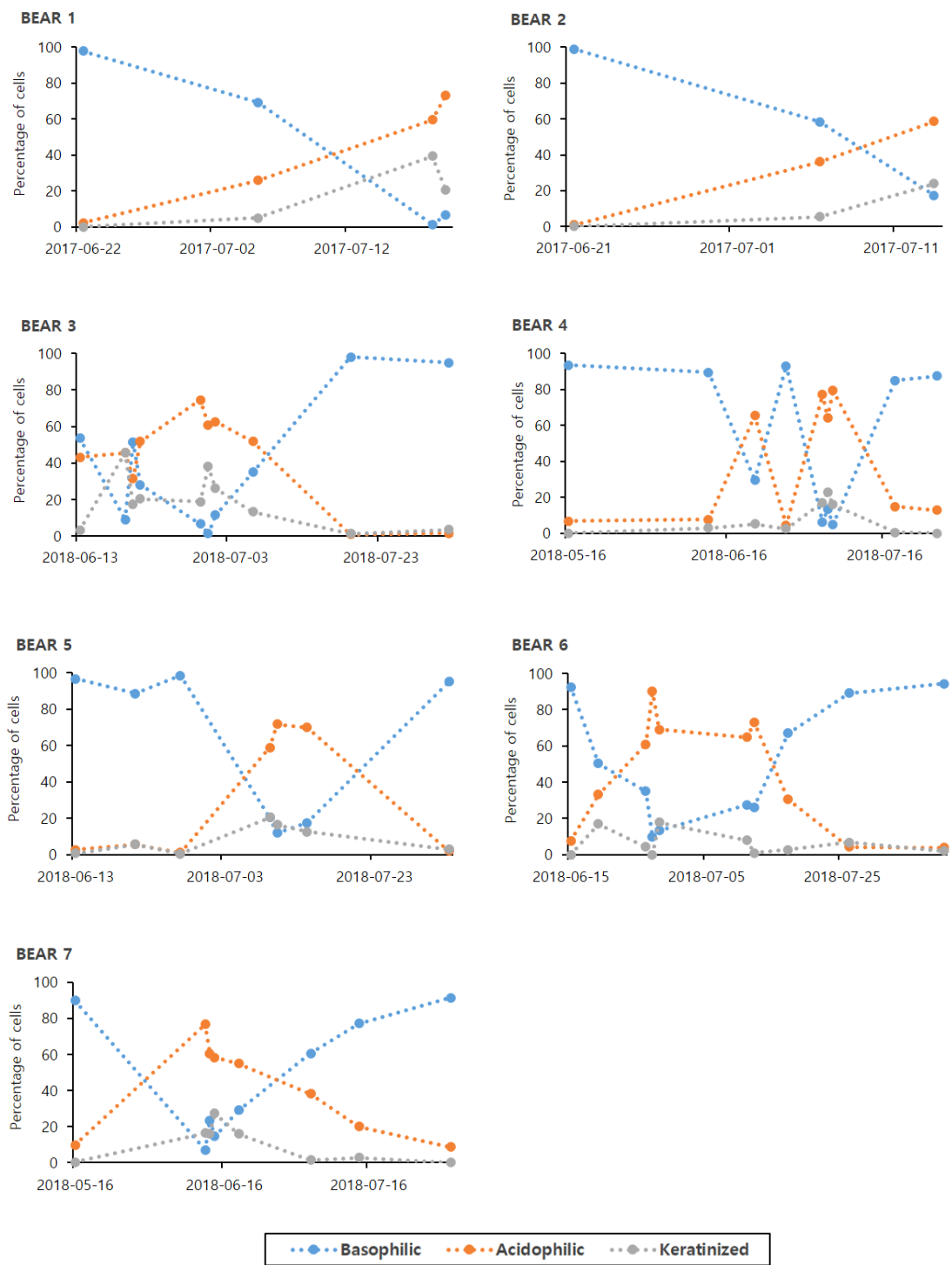


Fig. 17. Color changes in vaginal epithelial cell cytology during breeding seasons in seven bears.

3) 질 점막 전기저항

2017년도에 총 2개체(Bear 1과 Bear 2), 그리고 2018년도에 총 5개체(Bear 3, Bear 4, Bear 5, Bear 6, Bear 7)를 대상으로 번식 기간 동안의 표재세포(superficial cell)의 출현 비율(< 50% vs. \geq 50%)을 기초로 한 질 점막 전기저항의 변화(Mean \pm SD)는 Table 12에서 보는 바와 같고, 검사 일자에 따른 개체별 전기저항 수치의 변화는 표재세포 출현 비율과 함께 그래프로 나타내었다(Fig. 18).

검사 결과, 전체 세포 중 표재세포의 비율이 50% 이상을 차지할 때 측정된 질 점막 전기저항(VER) 수치는 50% 미만일 때의 수치에 비해 유의적 수준($p < 0.05$)에서 높게 관찰되었다. 그리고 질 점막 전기저항 수치는 호산성세포와 각질화세포(이상 색깔에 의한 구분), 그리고 세포 형태학적으로는 표재세포의 출현 비율과 양의 상관관계를 나타내었으나, 반면에 호염성세포와 기저결세포, 그리고 중간세포의 출현 비율과는 음의 상관관계를 나타내었다(Table 13).

번식 기간 동안 표재세포 출현 비율이 50% 이상인 구간이 2회 관찰된 Bear 3와 Bear 4의 질 점막 전기저항 수치는 첫 번째 구간에 비해 두 번째 구간에서 보다 높은 수치(> 300 Ω)가 관찰되었다.

Table 12. Comparison of vaginal mucus electrical resistance based on superficial cells ratio

Item	Superficial cells < 50 %		Superficial cells ≥ 50 %		<i>p</i> - value ¹⁾
	n	Mean ± SD (Range)	n	Mean ± SD (Range)	
VER (Ω)	26	120.38 ± 33.76 (60 - 240)	29	238.97 ± 108.64 (90 - 420)	< 0.001

VER, Vaginal mucus electrical resistance; SD, Standard deviation

1) Statistical significances ($p < 0.05$) were tested by Mann-whitney U test of variances among groups.

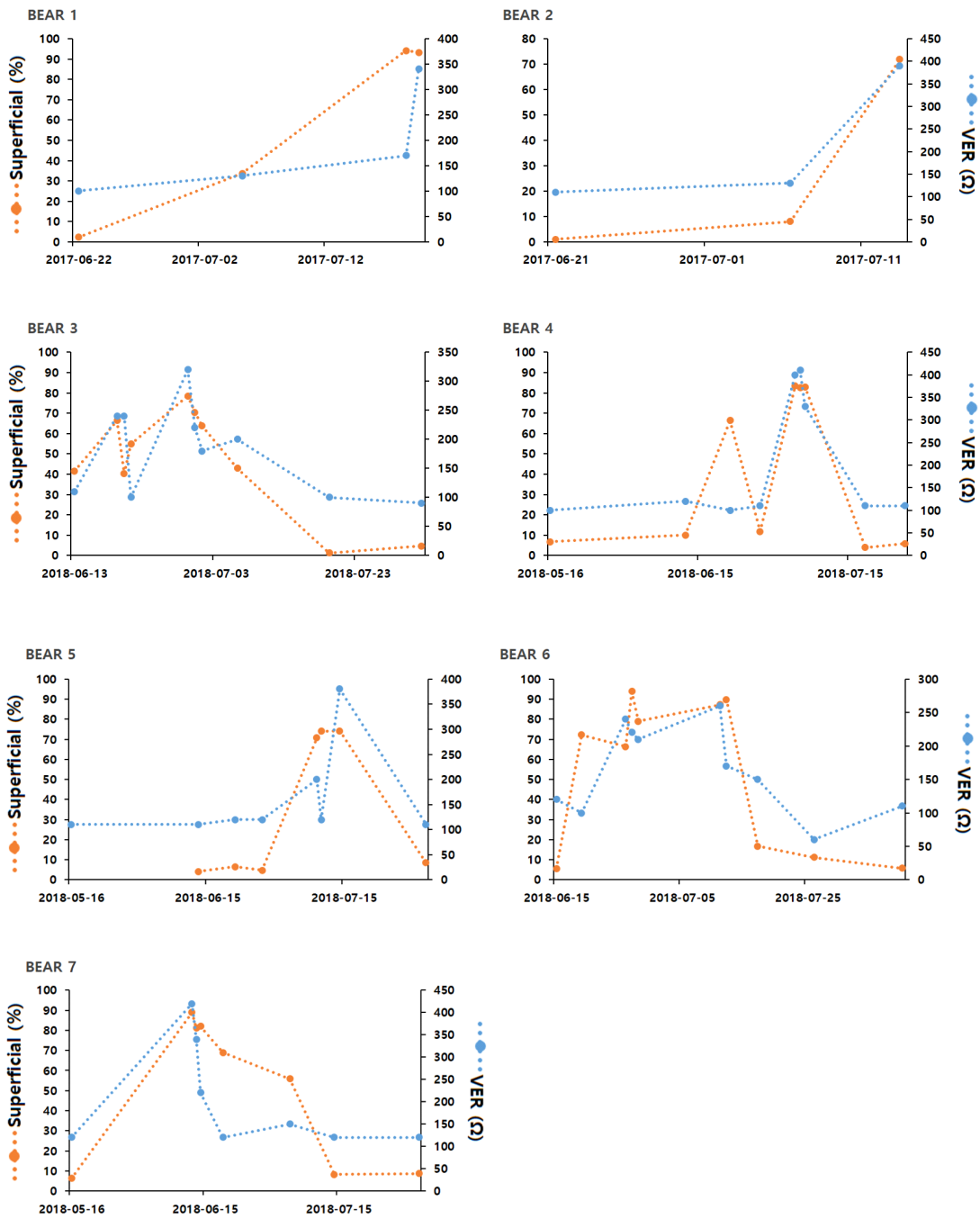


Fig. 18. The Vaginal mucus electrical resistances (VER) and Vaginal epithelial superficial cells during breeding seasons in seven female bears.

Table 13. Correlation between vaginal cytology and VER during breeding seasons

	Basophilic (%)	Acidophilic (%)	Keratinized (%)	Parabasal (%)	Intermediate (%)	Superficial (%)	VER (Ω)
Basophilic (%)	1	- 0.985*	- 0.742*	0.535*	0.651*	- 0.952*	- 0.667*
Acidophilic (%)		1	0.518*	- 0.520*	- 0.646*	0.937*	0.642*
Keratinized (%)			1	- 0.742*	0.518*	0.646*	0.484*
Parabasal (%)				1	- 0.221	- 0.525*	- 0.327*
Intermediate (%)					1	- 0.715*	- 0.496*
Superficial (%)						1	0.672*
VER (Ω)							1

Basophilic, blue-coloured cells; Acidophilic, red-coloured cells; Keratinized, orange-coloured cells; Parabasal, parabasal cells; Intermediate, Intermediate cells; superficial, superficial cells; VER, vaginal mucus electrical resistance

* Statistical significances ($p < 0.05$) were tested by Pearson correlation analysis.

4) 외음부 형태

번식 기간 동안 암컷 곰의 외음부의 크기 및 외음부 종창, 발적 상태, 점액 분비와 관련된 항목별 점수는 Table 14에서 보는 바와 같고, 각각의 유형별 외음부의 형태학적 변화는 Fig. 19에 제시하였다.

그리고 외음부의 크기와 기타 발정기와 밀접하게 연관된 다른 지표들 간의 상관관계를 분석한 결과, 외음부의 크기는 좌, 우 난포의 크기, 외음부의 종창 및 발적 상태, 그리고 점액 분비 정도, 표재세포의 출현 비율, 질 점막 저항 수치와 모두 통계적으로 유의미한 양의 상관관계($p < 0.05$)를 나타내었다(Table 15).

Table 14. Changes of vulva size and the scores of vulva swelling, rubefaction and mucus

	unit	n	Mean ± SD	Min. - Max.
Vulva (W)	mm	53	34.38 ± 2.94	25.29 - 41.00
Vulva (L)	mm	53	46.72 ± 5.13	36.40 - 56.30
Swelling*	score	53	1.70 ± 1.10	0 - 3
Rubefaction*	score	53	1.47 ± 0.89	0 - 3
Mucus*	score	53	1.40 ± 1.01	0 - 3

SD, Standard deviation

* The vulva score was determined by the criteria of previous study (Durrant et al, 2003).

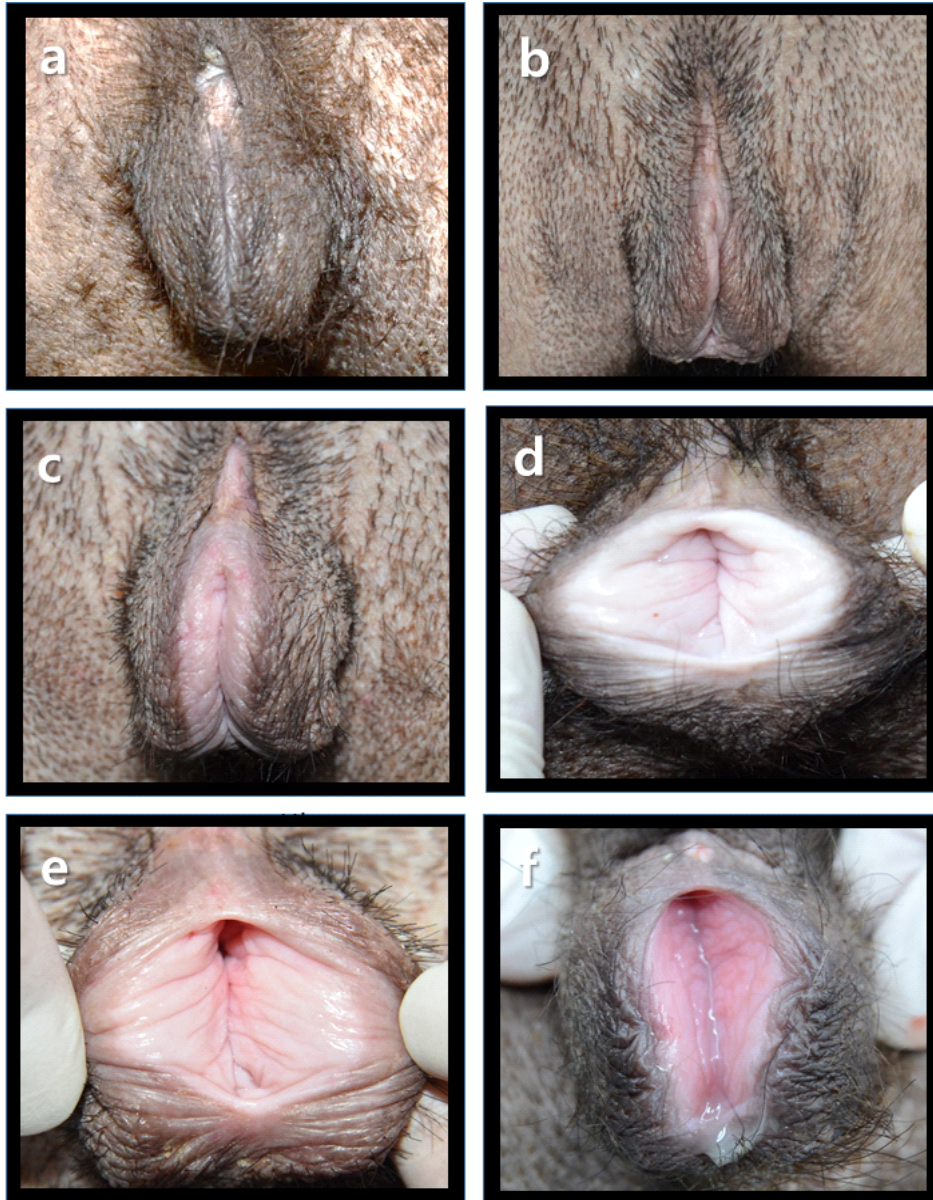


Fig. 19. Vulva shapes classified by vulva score (0 - 3) during breeding seasons. a), b), c) images are represented the vulva swelling and d), e), f) images are represented the vulva rubefaction and mucus status. a) Vulva scores were 0, 0, 0 on 16th of May in Bear 4. b) Vulva scores were 1, 2, 1 on 19th of June in Bear 3. c) Vulva scores were 2, 3, 1 on 20th of June in Bear 3. d) Vulva scores were 1, 2, 2 on 12th of July in Bear 6. e) Vulva scores were 2, 2, 1 on 19th of June in Bear 3. f) Vulva scores were 3, 2, 3 on 12th of June in Bear 4. All vulva scores were presented in order of rubefaction, swelling, and mucus status.

Table 15. Correlation between the vulva size and the other factors associated with estrus during breeding seasons

	Vulva (mm)	RtF (mm)	LtF (mm)	Swelling	Rubefaction	Mucus	Superficial (%)	VER (Ω)
Vulva (mm)	1	0.341*	0.431*	0.547*	0.481*	0.465*	0.495*	0.418*
RtF (mm)		1	0.364*	0.530*	0.259	0.162	0.418*	0.384*
LtF (mm)			1	0.338*	0.111	0.152	0.257	0.199
Swelling (0-3)				1	0.775*	0.630*	0.627*	0.640*
Rubefaction (0-3)					1	0.753*	0.481*	0.458*
Mucus (0-3)						1	0.702*	0.528*
Superficial (%)							1	0.702*
VER (Ω)								1

Vulva, Vulva width size; RtF, Right Follicles size; LtF, Left Follicles size; Superficial, superficial cells ratio; VER, Vaginal mucus electrical resistance

*Statistical significances ($P < 0.05$) were tested by Pearson correlation analysis.

4. 고찰

본 연구는 번식기 동안 암컷 반달가슴곰의 인공수정 적기 파악을 위해서 발정 상태를 설명할 수 있는 다양한 생물학적 지표들에 대한 특성 조사를 위한 난포 성장 및 황체 형성 확인을 위한 초음파 검사, 질 상피세포 검사, 질 점막 전기저항 검사, 그리고 외음부의 형태학적 변화상 관찰을 수행하였다.

번식기 동안에 암컷의 배란 적기 파악을 위해서는 종에 따른 난포의 역학에 대한 이해가 필수적 요소이다. 그럼에도 불구하고 곰과(*Ursidae*)의 동물을 대상으로 한 관련 연구는 불곰(Torii, 2019), 아메리카 흑곰(Boon *et al.*, 2004), 반달가슴곰(Kang *et al.*, 2015) 중에서 매우 제한적으로 수행되어져 왔다. 현재까지 알려진 관련 정보는 북해도 불곰의 선행연구(Tsubota and Kanagawa, 1993)에서 번식기가 지난 암컷 곰의 난소로부터 10-11 mm의 크기의 황체(범위: 1-3개)가 확인되었다고 보고하였고, 아메리카 흑곰(Willey, 1978)을 대상으로 한 연구에서는 평균 2.1개의 황체가 형성되었다고 보고하였다. 최근 반달가슴곰을 대상으로 난포의 역학과 관련한 선행연구(Kang *et al.*, 2015)가 이루어진 바 있으며, 5-8월까지의 발정기 동안 3마리의 암컷 곰으로부터 직경 7.4 ± 0.2 mm 크기의 4.0 ± 0.4 (범위: 3-5)개의 우성난포(Dominant follicles)가 관찰되었고 6월에서 12월 사이에 혈청 프로게스테론 상승과 연관되어 8.9 ± 0.2 mm 크기의 2.6 ± 0.2 개(범위: 2-3)의 황체가 검출되었다고 보고하였다. 반면에 본 연구는 7마리의 암컷 반달가슴곰을 대상으로 실시하였으며, 5-8월까지 최소 7.3 mm에서 최대 19.6 mm 크기의 1-4개의 우성난포와 배란 이후 7.0 mm에서 최대 10.6 mm 크기의 황체 형성이 관찰되었고, 이는 선행연구에서의 우성난포와 황체 크기에 비해 비교적 크기가 큰 형태를 확인할 수 있었다. 이러한 차이는 연구 대상 개체의 수, 선정된 개체의 개체별 특성, 그리고 검사 빈도 등에 따른 수집 데이터의 양 등에 기인한 것으로 판단된다. 한편, 불곰의 선행 연구(Torii *et al.*, 2019)에서 언급한 배란 전 우성난포의 최대 직경이 11.2 ± 2 mm(9.3-14.0 mm), 그리고 6 mm 이상의 우성난포가 최대 직경에 도달할 때까지 2주 이상이

소요되었다는 결과는 본 연구에서의 결과와 유사하였다.

질 상피세포의 검사는 개과의 종에서 발정 및 배란 시기를 예측하기 위한 보조적 방법으로 널리 사용되고 있으며, 이와 관련한 선행 연구는 개(Shutte, 1967; Holst *et al.*, 1986; Feldman and Nelson, 1987), 여우(Boue *et al.*, 2000), 검은발 페렛, 긴털 족제비 등의 족제비과 동물(Willians *et al.*, 1992), 그리고 곰과의 동물에서는 자이언트 팬더(Durrant *et al.*, 2002; Durrant *et al.*, 2003), 태양곰(Frederick *et al.*, 2010), 그리고 반달가슴곰(Kang *et al.*, 2015) 등에서 보고된 바 있다. PAP(Papanicolaou) 염색은 Diff-Quick이나 Wright Giemsa와 같은 단색 염색을 하였을 때 확인할 수 없는 호산성표재세포(pink color)와 각질화표재세포(orange color)를 구분해 줌으로써 발정 상태에 대한 보다 상세한 정보를 습득할 수 있었다. 특히 자이언트 팬더의 선행 연구에 따르면 각질화표재세포의 출현은 배란의 신호라고 언급할 만큼 표재세포의 색상에 따른 구분은 배란을 예측하는데 매우 중요한 단초라고 할 수 있을 것이다(Durrant *et al.*, 2002). 본 연구에서도 PAP 염색을 통해 표재세포가 50% 이상 증가할수록 호염성세포는 감소하고 호산성세포와 각질화세포의 출현 비율이 증가함을 확인할 수 있었다.

질 점막 전기저항 수치는 혈청 프로게스테론과 에스트라디올의 농도와 밀접한 관련이 있다고 보고된 바 있지만 개에 있어서 질 저항 측정이 번식 최적기를 정확하고 구체적으로 나타낼 수 있는지, 또는 암캐의 발정 주기의 단계를 식별하는 정도로만 유용한 것인지에 대한 의견이 분분하다(Günzel *et al.*, 1986; Bartlewski *et al.*, 1999). 양(Bartlewski *et al.*, 1999), 소(Edwards, 1980), 돼지(Rezác and Olic, 2006), 버팔로(Gupta and Purohit, 2001), 쥐(Jaramillo *et al.*, 2012)에서의 선행 연구에서는 발정전기 동안에 질 점막 전기저항 수치가 낮게 유지되다가 발정기에 이르러 배란 시기까지 점차적으로 증가한다고 보고되었다. 개나 여우의 선행 연구에서는 발정기의 질 점막 전기저항 수치가 1000 Ω 이상 증가하였으며(Boue *et al.*, 2000; Bergeron *et al.*, 2014), 본 연구에서도 반달가슴곰의 표재세포가 최대로 출현($82.3 \pm 7.8\%$)하는 발정기 동안

질 점막 전기저항 값이 평균 360 ± 56.9 Ω (260 - 420 Ω)로 유사하게 증가하는 경향을 보였다.

외음부의 종창 여부의 관찰은 수많은 종에서 발정 주기의 상태를 파악하는데 있어서 수행되어져 왔다(Poglayan-Newall *et al.*, 1989; Dahl and Nadler, 1992; Nishiyama *et al.*, 2000). 곰 종에서도 자이언트 팬더(Durrant *et al.*, 2013), 태양곰(Frederick *et al.*, 2010), 그리고 아메리카 흑곰(Gonzales *et al.*, 2013) 등에서 연구된 바 있다. 비록 외음부 종창 정도는 개체에 따라 가변성이 크지만 아직까지 질 상피세포 검사 및 행동학적 관찰과 더불어 암컷의 발정 상태를 확인할 수 있는 또 하나의 평가 지표이며, 이는 자이언트 팬더의 연구 결과에서 질 상피세포 분석 결과와 상호 연관관계가 있음을 확인하였다(Durrant *et al.*, 2003). 본 연구의 결과에서도 외음부의 종창이 증가함에 발적 상태, 점액 분비, 표재세포 출현 비율, 질 점막 전기 저항 수치가 모두 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 상호 연관 관계에도 불구하고 개체별로 외음부의 종창과 발적 상태, 그리고 점액 분비 정도의 변동이 심하여 독립적으로 발정과 배란일을 예측하는 진단법으로써 활용되기는 어려울 것으로 판단된다.

결론적으로 이전 곰과의 선행 연구(Durrant *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2003; Boone *et al.*, 2004; Frederick *et al.*, 2010)에서 언급했던 바와 같이 반달가슴곰은 교미와 같은 직접적인 신체적 자극 없이도 준 개방(Semi-open) 상태의 환경 조건에서 수컷 곰의 시각적, 후각적, 청각적 자극 등에 의해 배란이 유도될 수 있다는 것을 초음파 검사를 통해 재확인 할 수 있었다. 또한 반달가슴곰의 인공수정 적기를 예측하기 위한 다양한 생물학적 지표(외음부 종창과 난소, 난포, 황체, 질 상피세포 상, 그리고 질 점막 전기저항)들 간에는 상호 연관 관계가 있음을 확인할 수 있었다. 그러므로 반달가슴곰과 같은 중대형 야생동물 종에 있어서는 비침습적 방법의 성호르몬 모니터링을 기초로 하여 위에서 언급한 다양한 생물학적 지표들의 종합적인 분석이 이루어져야만 보다 정확한 인공수정 적기를 예측할 수 있을 것으로 판단되어진다.

참고문헌

- Antonov AL. Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction-A review. *Bulg J Vet Med* 2016; 20: 193-203.
- Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. The relationship between vaginal impedance and serum concentrations of estradiol and progesterone throughout the sheep estrous cycle. *Theriogenology* 1999; 51: 813-827.
- Bergeron LH, Nykamp SG, Brisson BA, Madan P, Sears W, Gartley CJ. Vaginal impedometry for detection of optimal breeding time in bitches. *J Am Vet Med Assoc* 2014; 245: 1360-1366.
- Boone WR, Keck BB, Catlin JC, Casey KJ, Boone ET, Dye PS, Schuett RJ, Tsubota T, Bahr JC. Evidence that bears are induced ovulators. *Theriogenology*. 2004; 61: 1163-1169.
- Boue F, Delhomme A, Chaffaux S. Reproductive management of silver foxes (*Vulpes vulpes*) in captivity. *Theriogenology* 2000; 53: 1717-1728.
- Dahl JF, Nadler RD. The external genitalia of female gibbons, *Hylobates* (H.) lar. *Anat Rec* 1992; 232: 572-578.
- Durrant B, Czekala N, Olson M, Anderson A, Amodeo D, Campos-Morales R, Gual-Sill F, Ramos-Garza J. Papanicolaou staining of exfoliated vaginal epithelial cells facilitates the prediction of ovulation in the giant panda. *Theriogenology* 2002; 57: 1855-1864.

- Durrant B, Olson M, Amodeo D, Anderson A, Russ K, Campos-Morales R, Gual-Sill F, Ramos-Garza J. Vaginal cytology and vulvar swelling as indicators of impending estrus and ovulation in the giant panda. *Zoo Biol* 2003; 22: 313-321.
- Edwards DF. Proposed instrumentation to determine the optimum time to inseminate cattle by measurement of vaginal impedance. *Med Biol Eng Comput* 1980; 18: 73-80.
- Feldman EC, Nelson RW. Canine and feline endocrinology and reproduction. Philadelphia: WB Saunders Co. 1987: 399-480.
- Frederick C, Kyes R, Hunt K, Collins D, Durrant B, Wasser SK. Methods of estrus detection and correlates of the reproductive cycle in the sun bear (*Helarctos malayanus*). *Theriogenology* 2010; 74: 1121-1135.
- Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 61-79.
- Gonzales RL, Mendoza AV, Himelright BM, Moore JM, Spady TJ. American black bear mating behavior and chemosensation of estrus status. *Ursus* 2013; 24: 139-147.
- Günzel AR, Koivisto P, Fougner JA. Electrical resistance of vaginal secretions in the bitch. *Theriogenology* 1986; 25: 559-570.
- Gupta KA, Purohit GN. Use of vaginal electrical resistance (VER) to predict estrus and ovarian activity, its relationship with plasma progesterone and its use for insemination in buffaloes. *Theriogenology* 2001; 56: 235 - 245.

- Hermes R, Olson D, Goritz F, Brown JL, Schmitt DL, Hagan D, Peterson JS, Fritsch G, Hildebrandt TB. Ultrasonography of the estrous cycle in female African elephants (*Loxodonta africana*). *Zoo Biol* 2000; 19: 369-382.
- Holst PA. Vaginal cytology in the bitch. In: Current therapy in theriogenology, vol. 2. Philadelphia: WB Saunders Co. 1986: 457-462.
- Jaramillo LM, Balcazar IB, Duran C. Using vaginal wall impedance to determine estrous cycle phase in Lewis rats. *Lab Anim (NY)* 2012; 41: 122 - 128.
- Jeong DH, Yang JJ, Seok SH, Song DJ, Yeon SC. Cardiorespiratory effects of isoflurane in Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*) anesthetized with intramuscular medetomidine and zolazepam/tiletamine. *J Vet Med Sci* 2017; 79: 153-159.
- Kang HG, Jeong DH, Yang JJ, Lee BK, Kong JY, Lee JW, Kim IH. Serial transrectal ultrasonography for monitoring the reproductive activity of the asiatic black bear (*ursus thibetanus ussuricus*). *Reprod Domest Anim* 2015; 50: 149-158.
- Klotchkov DV, Trapezov OV, Kharlamova AV. Folliculogenesis, onset of puberty and fecundity of mink (*Mustela vison Schreb*) selectively bred for docility or aggressiveness. *Theriogenology* 1998; 49: 1545-1553.
- Lindburg DG, Czekala NM, Swaisgood RR. Hormonal and behavioral relationships during estrus in the giant panda. *Zoo Biol* 2001; 20: 537-543.
- Linde C, Karlsson I. The correlation between the cytology of the vaginal

smear and the time of ovulation in the bitch. J Small Anim Pract 1984; 25: 77-82.

Lueders I, Hildebrandt TB, Pootoolal J, Rich P, Gray CS, Niemuller C. Ovarian ultrasonography correlated with fecal progestins and estradiol during the estrous cycle and early pregnancy in giraffes (*Giraffa camelopardalis roth schildi*). Biol Reprod 2009; 81: 989-995.

Mills JN, Valli VE, Lumsden JH. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. Can Vet J 1979; 20: 95-101.

Moore HDM, Bush M, Celma M, Garcia AL, Hartman TD, Hearn JP, Hodges JK, Jones DM, Knight JA, Monsolve L, Wildt DE. Artificial insemination in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). J Zool Soc Lond 1984; 203: 269-278.

Moxon R, Copley D, England GCW. Quality assurance of canine vaginal cytology: A preliminary study. Theriogenology 2010; 74: 479-485.

Nishiyama T, Narita K, Tsumagari S, Takeishi M. Shrinkage in the horizontal dimensions of the vulva (vulvar shrinkage) as an indicator of standing heat in the beagle. J Am Anim Hosp Assoc 2000; 36: 556-560.

Onuma M, Suzuki M, Ohtaishi N. Reproductive pattern of the sun bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak, Malaysia. J Vet Med Sci 2001; 63: 293-297.

Papanicolaou GN. A new procedure for staining vaginal smears. Science 1942; 95: 438-439.

- Parakkal PF. Cyclical changes in the vaginal epithelium of the rat seen by scanning electron microscopy. *Anat Rec* 1974; 178: 529-537.
- Poglayan-Newall I, Durrant BS, Swansen ML, Williams RC, Barnes RA. Estrous cycle of the tayra, *Eira barbara*. *Zoo Biol* 1989; 8: 171-177.
- Rezác P, Olic I. Relationship between opposite changes of vaginal and vestibular impedance during estrous cycle in sows. *Theriogenology* 2006; 66: 868-876.
- Shutte AP. Canine vaginal cytology. I. Technique and cytological morphology. *J Small Anim Pract* 1967; 8: 301-306.
- Schulz LC, Nelson RA, Pyter LM, Bahr JM. Induction of pseudopregnancy in the American black bear (*Ursus americanus*). *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2003; 298: 162-166.
- Stenson GB. Oestrus and vaginal smear cycle of the river otter, *Lutra canadensis*. *J Reprod Fertil* 1988; 83: 605-610.
- Stoops MA, Pairan RD, Roth TL. Follicular, endocrine and behavioural dynamics of the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) oestrous cycle. *Reproduction* 2004; 128: 843-856.
- Torii Y, Matsumoto N, Sakamoto H, Nagano M, Katagiri S, Yanagawa Y. Monitoring follicular dynamics using ultrasonography in captive brown bears (*Ursus arctos*) during the breeding season. *Theriogenology* 2019; 140: 164-170.

- Tsubota T, Kanagawa H. Morphological characteristics of the ovary, uterus and embryo during the delayed implantation period in the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*). J Reprod Dev 1993; 39: 325-331.
- Tsubota T, Howell-Skalla L, Boone WR, Garshelis DL, Bahr JM. Serum progesterone, oestradiol, luteinizing hormone and prolactin profiles in the female black bear (*Ursus americanus*). Anim Reprod Sci 1998; 53: 107-118.
- Williams ES, Thorne ET, Kwaitkowski DR, Lutz K, Anderson SL. Comparative vaginal cytology of the estrous cycle of black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) Siberian polecats (*M. eversmanni*) and domestic ferrets (*M. putorius furo*). J Vet Diagn Invest 1992; 4: 38-44.
- Yang JJ, Jeong DH, Um SM, Lee AN, Song DJ, Kim SB, Yang J, Yun Y, Lim YK. Blood chemistry reference intervals of captive Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*). Vet Med (Praha) 2017; 62: 533-540.
- Zylicz E, Sips D, Levy E, Peters H. The vaginal smear in mice. A correlation of smear type and oocyte number. Acta Cytol 1967; 11: 483-485.

제 III 장

인공수정에 의한 반달가슴곰(*Ursus thibetanus*)의 새끼 출산
증례: 초음파 가이드 하에 요관경(Ureteroscope)을 활용한
자궁 내 인공수정

1. 서론

2002년도부터 시작된 반달가슴곰 복원 프로젝트는 본격적으로 2005년 러시아 연해주로부터 6마리의 새끼 곰을 도입, 방사한 것을 시작으로 2020년 현재, 지리산 전역에 63마리로 개체수가 증가하였다(중복원기술원, 2019). 그럼에도 불구하고 자연 상태에서 번식에 참여하는 수컷 곰은 세력이 우세한 소수의 개체들로 한정되었고, 이를 부계로 한 2, 3세대의 자손이 태어나는 근친교배 현상이 나타남에 따라 개체수가 점차 늘어감에도 불구하고 지리산 반달가슴곰 개체군의 유전적 다양성은 매우 낮은 수준인 것으로 확인되었다(한 *et al.*, 2019). 또한 한반도의 반달가슴곰과 동일한 아종이 서식하는 러시아, 중국, 북한 등지로부터 지속적으로 반달가슴곰 원종을 도입하는데 있어 정치적, 경제적, 그리고 국가 간의 복잡한 행정적 문제들로 인해 끊임없이 복원사업을 추진하는데 제약을 받아 왔다. 따라서 이러한 복합적인 문제들을 해소하고 자연 개체군의 유전적 다양성 증진에 도움이 될 수 있는 개체를 선택적으로 지속 가능하게 공급시킬 수 있는 방안으로 반달가슴곰의 인공증식 기술 개발이 요구되어졌다. 종에 따른 번식 기술의 확립은 서식지 내, 외에서의 멸종위기에 처한 야생동물 개체군의 유전적, 그리고 생물 다양성을 보전하는데 매우 중요한 요소이기 때문이다(Pukazhenth and Wildt, 2004).

반달가슴곰은 6월부터 8월까지 계절 번식(Seasonal breeding)을 하며, 수정 이후 11월에서 12월경까지 배아 지연 착상(Embryonic delayed implantation) 현상을 겪은 후, 1월에서 2월 경, 동면 기간에 새끼 출산을 하는 등의 독특한 번식 생리 기작을 갖고 있다.(Yamamoto *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000; Tsubota *et al.*, 2001). 이러한 번식 생리의 특성은 유럽 불곰(Mano *et al.*, 2002), 아메리카 흑곰(Gonzales *et al.*, 2013), 그리고 북해도 불곰(Tsubota and Kanagawa, 1993) 등의 연구에서도 보고된 바 있다. 비록 종마다 번식 시기나 발정 패턴 등의 차이가 있지만, 전 세계에 현존하는 8종의 곰들은 모두 공통적으로 배아 지연 착상을 하는 특성을 갖고 있다(Fenelon *et al.*, 2014).

이러한 독특한 번식 생리 기작으로 인해 전 세계적으로 곰 종을 대상으로 수많은 번식 생리 연구와 인공수정을 시도해오고 있음에도 불구하고 현재까지 자이언트 팬더(Moore *et al.*, 1984; Masui *et al.*, 1989; Kersey *et al.*, 2016)를 제외한 다른 곰 종에서는 인공수정을 통해 성공적으로 새끼를 출산한 사례는 전무한 실정이다(Onuma *et al.*, 2001; Curry *et al.*, 2014).

반면에 곰 종을 제외한 멸종위기에 처한 육상 포유류 중 가운데 코알라(*Phascolarctos cinereus*)에서의 비뇨 생식동(Urogenital sinus) 내 인공수정(Allen *et al.*, 2008), 아시아 코끼리(*Elephas maximus*)와 아시아 황금 고양이(*Catopuma temminckii*)에서의 내시경을 이용한 자궁경관을 경유한 자궁 내 인공수정(Brown *et al.*, 2004; Lueders *et al.*, 2014), 그리고 치타(*Acinonyx jubatus*), 검은 발 페렛(*Mustela nigripes*), 시베리안 긴 털 족제비(*Mustela eversmannii*)에서의 복강경을 이용한 자궁 내 인공수정(Howard *et al.*, 1992; Howard *et al.*, 1996) 등과 같은 성공적인 인공수정 연구 사례가 보고된 바 있다.

이러한 다양한 야생동물 종에서의 성공적인 사례가 있음에도 불구하고 고양이과(Felids), 개과(Canids) 등의 식육목(Carnivore) 야생동물 종에서의 인공수정은 일상적으로 시행되기 어려울 뿐 아니라 아직까지 인공수정의 성공률 또한 매우 낮은 실정이다(Crosier *et al.*, 2006; Jewgenow and Songsasen, 2014). 그러므로 종에 따른 가장 효율적인 인공수정 기법을 확립하는 것이 매우 중요하다고 하겠다.

인공수정의 방식은 정액을 주입하는 위치에 따라 질 내 인공수정과 자궁 내 인공수정으로 구분되어지며, 고양이와 개 등의 반려동물을 대상으로 한 선행 연구에 따르면 자궁 내 인공수정에 필요한 정자 수는 질 내 인공수정 방식에 비해 요구되는 정자 수가 각각 1/5, 1/10 정도로 낮은 수준이라고 보고하였다(Tsutsui *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 2000; Tsutsui *et al.*, 2000).

그러므로 곰을 포함한 멸종위기에 처한 야생동물을 대상으로 인공 수정의 성공율을 높이기 위해서는 양질의 정액 수집과 대상 종에 최적화된 자궁 내 인공수정 기법을 확립하는 것이 무엇보다 중요하다고 하겠다. 이와 관련한 곰 종에서의 선행 연구는 자이언트 팬더(Hori *et al.*, 2006)와 북극곰(Curry *et al.*, 2014)에서 내시경을 이용한 자궁 내 인공수정 방법이 소개된 바 있다.

본 연구의 궁극적인 목적은 다양한 생물학적 지표 분석을 통한 암컷 반달가슴곰의 인공수정 일자의 예측과 양질의 신선정액 수집을 통해 초음파 가이드 하에 요관경을 이용한 자궁 내 인공수정을 시도함으로써 반달가슴곰의 임신과 출산을 성공적으로 이끌어 내고, 이를 통해 반달가슴곰 종에 최적화된 인공수정 기법의 프로토콜을 구축하고자 함이다.

2. 재료 및 방법

1) 대상 동물

본 연구는 「야생생물 보호 및 관리에 관한 법률」 제 14조 제1항, 동법 시행령 제 11조 제 1항, 동법 시행규칙 제 15조 제2항에 따라 환경부로부터 멸종위기 야생생물 인공증식에 관한 심의 및 승인 절차를 이행하고, 국립공원생물종보전원 동물연구심의위원회로부터 승인(승인번호: 2017-820, 2018-856)을 받아 수행되어졌다.

2017년도, 2018년도에 반달가슴곰(*Ursus thibetanus*)의 5월에서 8월까지의 번식기간 동안 국립공원 생물종보전원의 전시 시설 내에서 증식·사육하고 있는 총 7마리의 암컷과 6마리의 수컷 반달가슴곰을 대상으로 본 연구를 실시하였다(Table 16, Table 18).

암컷 곰의 연령은 8.2 ± 3.8 년, 평균 체중은 123.4 ± 34.6 kg이었고, 수컷 곰의 연령은 13.2 ± 0.9 년, 평균 체중은 165.7 ± 31.7 kg이었고, 연구 기간 동안 전 개체 모두의 건강상태는 양호하였으며, 관련 선행 연구(Yang *et al.*, 2017)와 비교하여 혈액성상 검사 및 혈액화학검사 결과에서 이상 수치는 관찰되지 않았다. 추가적으로 암컷 곰의 배란 유도를 위해서 7마리의 암컷 곰 중 3마리의 암컷 곰을 대상으로 인공수정에 관여하지 않은 2마리의 수컷 곰을 선별하여 자연교미를 병행하였다(Table 17).

시설 내에서 곰들은 배합사료(Zupreem[®], Premium Nutritional Products, Inc., Kansas, USA)와 다양한 계절 과일, 채소 그리고 밤, 도토리 등의 견과류를 혼합하여 1일 2회 오전, 오후로 급여하였으며, 자동 급수를 통해 곰들이 자유롭게 음수 할 수 있도록 하였다. 또한 임신이 확인된 암컷 곰들은 겨울철 동면 기간 동안 새끼를 출산하는 특성을 고려하여 12월 중순부터 3월 중순까지 동면 상태를 유지시켰다.

2) 인공수정 일 결정

총 7마리의 암컷 곰 가운데 4마리의 암컷 곰은 뇨 중 성호르몬 검사에 따른 일자별 에스트로겐과 프로게스테론 대사물의 농도 변화 관찰을 통해 최종적으로 검사 일자를 결정하였던 반면, 나머지 3마리의 암컷 곰은 번식기 동안 인공수정을 위해 정액을 제공하지 않은 수컷 곰과의 자연스러운 교미를 유도하였고, 뇨 중 성호르몬 검사 없이 랜덤하게 주기적으로 검사를 실시하였다.

그리고 전 개체 모두 검사 당일에는 공통적으로 외음부의 형태, 질 상피세포상, 질 점막 전기저항, 그리고 초음파 검사를 통한 난소의 구조적 변화의 관찰을 토대로 최종적으로 인공수정 일자를 결정하였다.

3) 정액 수집 및 평가

반달가슴곰(Jeong *et al.*, 2019), 사자(Lueders *et al.*, 2012), 고양이(Zambelli *et al.*, 2008) 등에서의 선행 연구의 방법에 따라 신선 정액을 채취하였다. 요약하자면 2 mg/kg의 tiletamine/zolazepam (Zoletil 50[®], Virbac, Carros, France)과 0.04 mg/kg의 medetomidine (Dormitor[®], Pfizer, Helsinki, Finland)을 통해 전신 마취 후, isoflurane (Ifran[®], Hana Pharm. Co., Ltd., Seoul, Korea)의 흡입을 통해 마취 상태를 유지하였다.

이 후에 물리적 보정 후 관장을 수행하고 7.5 MHz의 선상(또는 볼록) 배열의 직장 초음파 프로브(Aloka UST-678, Hitachi Aloka Medical, Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 전립샘의 위치와 요도 카테터의 삽입 깊이를 미리 확인한 후 바깥요도구멍을 통해 초음파 가이드 하에 8 Fr 또는 10 Fr 크기의 요도 카테터(Foley catheter, Smiths Medical ASD, Inc., Minnesota, USA)를 진입시켜 정액을 수집하였다(Fig. 20, Fig. 21). 수집된 정액은 수집 양(ml)과 정자 농도($\times 10^6/\text{ml}$), 총 정자 수($\times 10^6$), 정자의 운동성(%), 정자 생존율(%), pH, 그리고 정자의 형태학적 이상 비율(%), 정자의 정상 침체 비율 등의 검사 항목 분석으로 정자의 성상을 평가하였다. 선행 연구(Jeong *et al.*, 2019)에서 언급했던 바와 같이 정자분석프로그램(CASA; FSA sperm analyzer, Medical Supply, Wonju, Korea)에 의해 정자의 운동성을 분석하였고, 정자의 형태학적 분석을 위해 Spermac[®] (Minutübe GmbH, Tiefenbach, Germany) 염색을 실시하였다. 대상 수컷 곰에 관한 정액 채취 이력은 Table 16에서 보는 바와 같다.

Table 16. Records of semen collection of male bears for artificial insemination (AI) to female bears

ID No.	Origin	Age (yr)	Weight (kg)	Date of semen collection	Females receiving AI
Male-01	Russia	14	130	6/20/2018	Bear 3
Male-02	Russia	14	153	6/30/2018	Bear 3
Male-03	Russia	14	130	6/13/2018	Bear 7
				7/01/2018	Bear 3
				7/06/2018	Bear 4
				7/14/2018	Bear 5
Male-04	Russia	12	190	7/13/2017	Bear 2
				7/19/2017	Bear 1
		13	200	6/14/2018	Bear 7
				6/27/2018	Bear 6
				6/29/2018	Bear 3
				7/04/2018	Bear 4
Male-05	North Korea	14	143	6/12/2018	Bear 7
				6/21/2018	Bear 3
				6/28/2018	Bear 6
				7/05/2018	Bear 4
				7/09/2018	Bear 5
Male-06	North Korea	15	150	7/06/2018	Bear 3

Table 17. Records of male bears for natural matings (NM)

ID No.	Origin	Age (yr)	Weight (kg)	Date of NM	Females receiving NM
Male-03	Russia	14	130	7/18/2017	Bear 1
				7/19/2017	Bear 1
Male-06	China	7	133	7/11/2017	Bear 2
				7/16/2017	Bear 2
				8	110
		7/03/2018	Bear 3		
		7/05/2018	Bear 3		

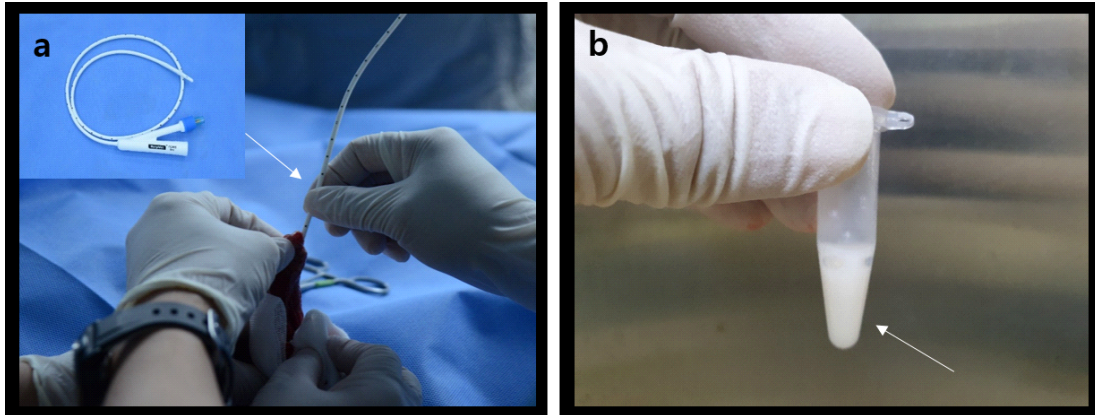


Fig. 20. Semen collection by urethral catheterization. a) Semen collection by urethral catheterization under ultrasound guidance in the Asiatic black bear. The white arrow is urethral catheter (8 Fr), b) The collected semen in micro centrifuge tube (white arrow).

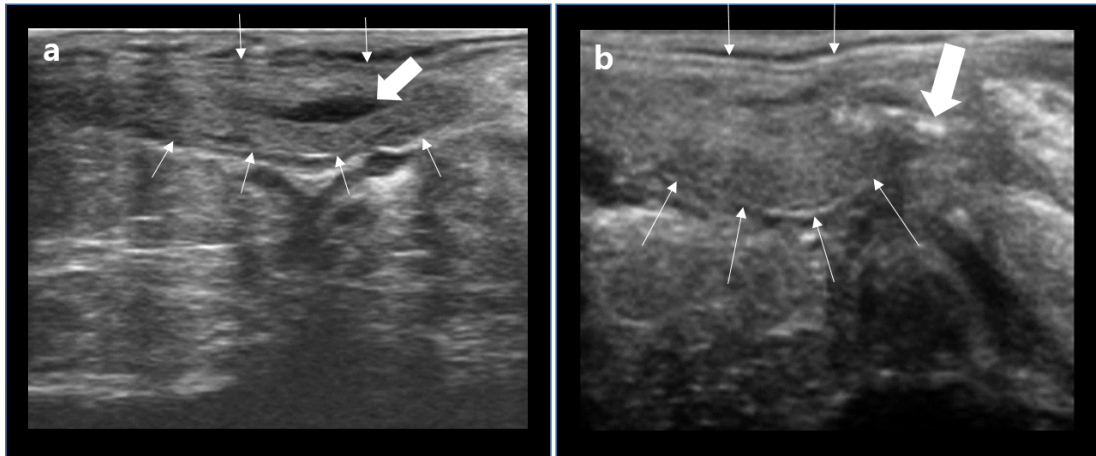


Fig. 21. Transrectal ultrasound scanning of the prostate gland in the male Asiatic black bear. a) The image before semen collection; the semen within seminal colliculus (large arrow) in prostate (small arrows), b) Urethral catheter (large arrow) advanced up to seminal colliculus in prostate (small arrows) for semen collection.

4) 인공수정

대상 암컷 개체들의 마취 유도과 유지의 흐름은 수컷 곁을 대상으로 한 정자 수집 및 평가 방법에서 언급한 바와 같다.

마취된 암컷 곁은 인공수정을 위해 약 10° 정도의 경사진 테이블 위에 등쪽 횡와위 자세(Dorsal recumbency)로 눕히고 뒷다리를 들어 올려 물리적 보정을 시켰다. 그리고 난 후, 외음부를 통해 21cm 길이의 실리콘 재질의 내시경용 Shunt 카테터(Replacement catheter, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany)를 질 내에 삽입한 후 공기 주입을 통해 단단히 고정하고 카테터의 채널을 통해 요관경(8/9.8 F rigid ureteroscope, Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Germany)을 삽입하여 자궁경부(Cervix) 입구의 시야를 확보하였다. 이 후, 요관경의 채널을 통해 탐침 가이드가 있는 TC 캐놀라(Transcervical cannular; Dual port, 외경: 5 Fr, 길이: 70 cm)를 자궁경부까지 진입시킨 후 바깥자궁구멍(External uterine ostium)을 통해 자궁 내로 정액을 주입하였다. 이와 관련한 모든 작업은 초음파 가이드 하에 내시경 시스템(FENCER, MGB Endoskopische Geräte GmbH, Berlin, Germany)을 이용하여 수행하였다(Fig. 22).

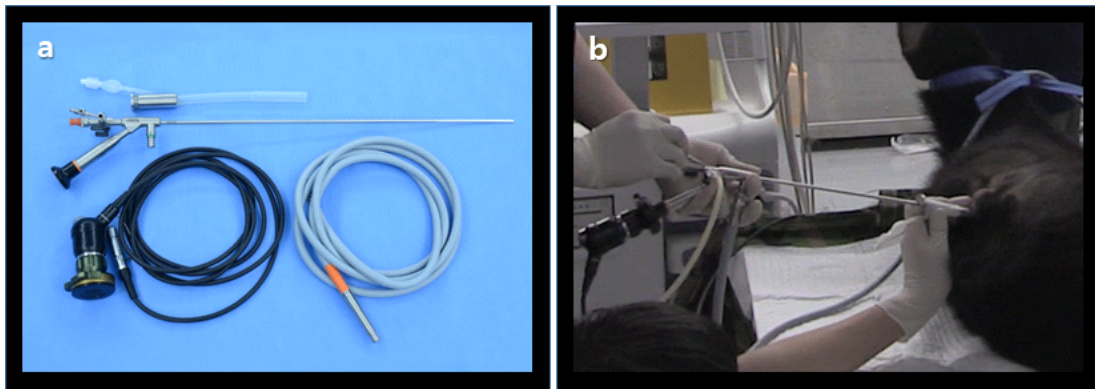


Fig. 22. Intrauterine artificial insemination using a ureteroscope under ultrasound guidance in the female bear. a) Materials for Asiatic black bear artificial insemination, b) Ureteroscope inserted into vaginal lumen through a shunt catheter for intrauterine artificial insemination.

5) 초음파 임신진단

동면 전 시점인 12월 4주차 경에 인공수정을 실시한 7마리의 암컷 곰을 대상으로 초음파 장비(ProSound Alpha 7 device, Hitachi Aloka Medical, Ltd., Tokyo, Japan)와 7.5 MHz의 선상(또는 볼록) 배열의 직장 초음파 프로브(Aloka UST-678, Hitachi Aloka Medical, Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 임신 진단을 실시하였다.

6) 친자 확인 및 임신기간 평가

새끼를 출산한 암컷 곰과 이에 관여한 인공수정을 위해 정액을 공여하거나 자연 교미에 참여한 수컷 곰, 그리고 출생한 새끼 곰 모두의 혈액 또는 모근 시료로부터 DNA를 확보한 후, 반달가슴곰의 친자 확인을 위해 개발된 10여종의 MS(Microsatellite) 마커의 대립 유전자형 분석을 통해 부(父)-자(子) 간, 그리고 모(母)-자(子) 간의 일치 여부를 판독한 후, 최종적으로 새끼 곰의 출생에 관여한 수컷 곰을 추적하였다(Fig. 30). 해당 분석은 대립 유전자형 분석 프로그램 (GeneMapper[®] Software Version 4.0, Applied Biosystems, California, USA)을 이용하여 수행되었다.

또한 친자 확인을 통해 아비 곰으로 확인된 수컷 곰의 정자 공여 일자로부터 새끼 출산 일자까지의 일수를 역산하여 최종 암컷 곰의 임신 기간을 평가하였다.

3. 결과

2017년도에서 2018년도까지 2년에 걸쳐 총 7마리의 암컷 곰을 대상으로 인공수정을 실시한 결과는 Table 16에서 보는 바와 같다. 본 연구를 통해 새끼 곰 출산에 성공한 암컷 곰은 총 7마리 중 4마리(57%)이었고, 이 중 2마리의 새끼를 출산한 암컷 곰이 4마리 중 3마리(75%), 그리고 오직 1마리의 새끼만을 출산한 암컷 곰은 1마리(25%)였다. 2마리의 새끼를 출산한 암컷 곰 중 1마리는 자연 교미와 인공수정을 통해 부계가 서로 다른 새끼 곰을 각각 1마리씩 출산하였다. 결과적으로 4마리의 암컷 곰은 인공수정을 통해 6마리의 새끼를 출산하는데 성공하였다.

1) 인공수정 당일 출산 개체의 생물학적 지표 검사

인공수정 당일에 암컷 곰의 생물학적 지표 검사 결과는 Table 17에서 보는 바와 같다. 요약하자면, 출산한 암컷 곰들은 인공수정 당일에 우성난포(Dominant follicle)의 크기가 최소 6.3 - 최대 10 mm이었으며, Bear 3을 제외한 나머지 3마리의 암컷 곰의 표재세포(Superficial cell)의 비율은 70(%) 이상, 그리고 질 점막 전기저항(VER)은 최소 340(Ω)에서 최대 400(Ω)의 수치를 나타냈다. 또한 외음부의 크기는 검사기간 동안 최대 수치를 나타내었다.

또한 2018년도에 뇨 성호르몬 검사를 기반으로 검사를 수행하였던 총 4마리의 암컷 곰 중에 유일하게 새끼를 출산한 암컷 곰(Bear 4)의 뇨 에스트라디올과 뇨 프로게스테론의 농도 변화에 관한 양상은 Fig. 23의 그래프에서 보는 바와 같다.

결과적으로 Bear 4의 새끼 출산과 연관된 첫 번째 인공수정 당일(0일)에 뇨 에스트라디올의 농도는 1.45(ng/mg Cr)로써, 전일(-1일) 농도 8.26(ng/mg Cr)에 비해 급격히 기초 수준으로 감소하였음이 확인되었다. 또한 이 날로부터 뇨 프로게스테론 농도는 서서히 증가하는 양상을 나타내었다. 첫 번째 인공수정 당일에 우성난포의 크기는 직경 6.3(mm), 표재세포의 출현 비율은 $83.5 \pm 2.9(\%)$, 그리고 질 점막 전기저항 수치는 400(Ω)이었다.

Table 18. Records of natural mating and artificial insemination (AI with fresh semen) for 7 female bears during breeding seasons in 2017 and 2018

Female	Age (Y)	BW (kg)	Origin	Parity	Breeding method	Breeding (Y)	Male (n)		AI attempt (n)	NM Induction (n)	Cub born (AI/Total)	Gestation Length (days)	
							AI	NM				AI	NM
Bear 1	13	182	Russia	2	NM/AI	2017	1	1	1	2	1/1	184	-
Bear 2	7	110	China	2	NM/AI	2017	1	1	1	2	1/2 ^a	202	199 or 204 ^c
Bear 3	8	132	China	2	NM/AI	2018	6	1	6	3	2/2	216	-
Bear 4	4	88	Korea	0	AI	2018	3	0	3	0	2/2 ^b	195	-
Bear 5	6	95	Russia	0	AI	2018	3	0	3	0	-	-	-
Bear 6	12	170	Korea	0	AI	2018	2	0	2	0	-	-	-
Bear 7	4	87	Korea	0	AI	2018	3	0	3	0	-	-	-

BW, Body weight; NM, Natural mating; AI, Artificial insemination

Females were received AI of fresh semen from other male bears and the cub born by AI confirmed their father and gestation length by paternity test.

^a Two cubs were born in January, 2018. It was confirmed by paternity test that one was born by artificial insemination and the other by natural mating.

^b Two cubs were born in January, 2019 by artificial insemination and one of them died within a few days.

^c The gestation length based on twice natural mating dates of same male bear.

Table 19. Profile of biological factors on the day of artificial insemination (AI) in female Asiatic black bears

Female code no.	N	Cell type (%) (Mean ± SD)				VER* max. (Ω)	Ovary (mm)		DF (mm)		Vulva (mm)		Urinary E ₂ (ng/mg Cr) 0 day / -1 day
		superficial	basophil	acidophil	keratinized		W	L	W	L	W	L	
Bear 1	6	93.2 ± 2.8	6.4 ± 0.26	73.2 ± 5.3	20.4 ± 5.2	340	16	22.7	7.6	9.6	35.6	53.2	-
Bear 2	7	71.9 ± 6.5	17.4 ± 1.4	58.7 ± 11.5	23.9 ± 10.2	390	16.3	22.7	6.6	7.2	37.3	51.0	-
Bear 3	7	54.8 ± 8.2	28.0 ± 0.49	51.7 ± 5.3	20.3 ± 4.9	100	17.4	23.0	6.8	10	38.8	51.3	-
Bear 4	5	83.5 ± 2.9	6.0 ± 2.5	77.0 ± 4.2	17.0 ± 3.8	400	17.1	25.3	6.3	6.3	36.7	47.7	1.45 / 8.26

* VER, Vaginal mucus electrical resistance; SD, Standard deviation; W, Width; L, Length

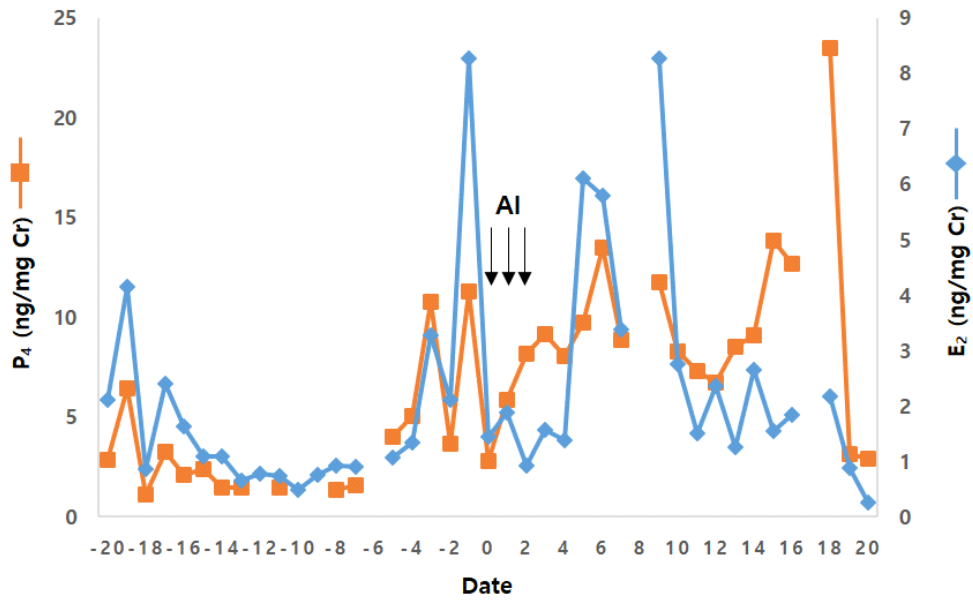


Fig. 23. Profile of urinary E₂ and P₄ concentrations in the Bear 4 during 2018 mating season. Artificial insemination (AI) is denoted by black arrows and day 0 was determined by retrospective paternity test.

2) 수집 정액 평가

초음파 가이드 하에 전립샘으로부터 수집된 신선 정액(n = 19)의 검사 결과는 Table 18과 같았다. 1회 평균 정액의 수집 양은 $160 \pm 90(\mu\text{l})$, 정자의 농도는 $5068.6 \pm 3122.4(\times 10^6/\text{ml})$, 총 정자 수는 $810.9 \pm 744.5(\times 10^6/\text{ml})$, 그리고 진행성 정자의 운동성은 $91.4 \pm 7.7(\%)$ 이었다. 또한 정자 생존율은 $94.3 \pm 5.3(\%)$, 비정상적 형태를 갖는 정자의 비율은 $21.2 \pm 4.5(\%)$, 그리고 정상 침체를 갖는 정자 비율은 $93.4 \pm 8.5(\%)$ 이었다(Fig. 24, Fig. 25).

Table 20. Semen qualities of the male asiatic black bear at artificial insemination time (2017~2018)

	N	Mean ± SD	Min	Max
Age (yrs)	19	13.6 ± 0.8	12	15
Weight (kg)	19	160.9 ± 30.1	130	218
Semen volume ($\mu\ell$)	19	160 ± 90	40	380
Sperm concentration ($\times 10^6/\text{ml}$)	19	5068.6 ± 3122.4	2015.0	14000
Total sperm count ($\times 10^6/\text{ml}$)	19	810.9 ± 744.5	159.7	2856.3
Sperm viability (%)	19	94.3 ± 5.3	83.1	99.8
Progressive sperm motility (%)	19	91.4 ± 7.7	75.5	99.8
pH	19	8.0 ± 0.1	7.7	8.3
Abnormal morphology (%)	19	21.2 ± 4.5	18.2	30.7
Intact acrosome (%)	19	93.4 ± 8.5	82.0	95.7

SD, Standard deviation; Min, Minimum; Max, Maximum

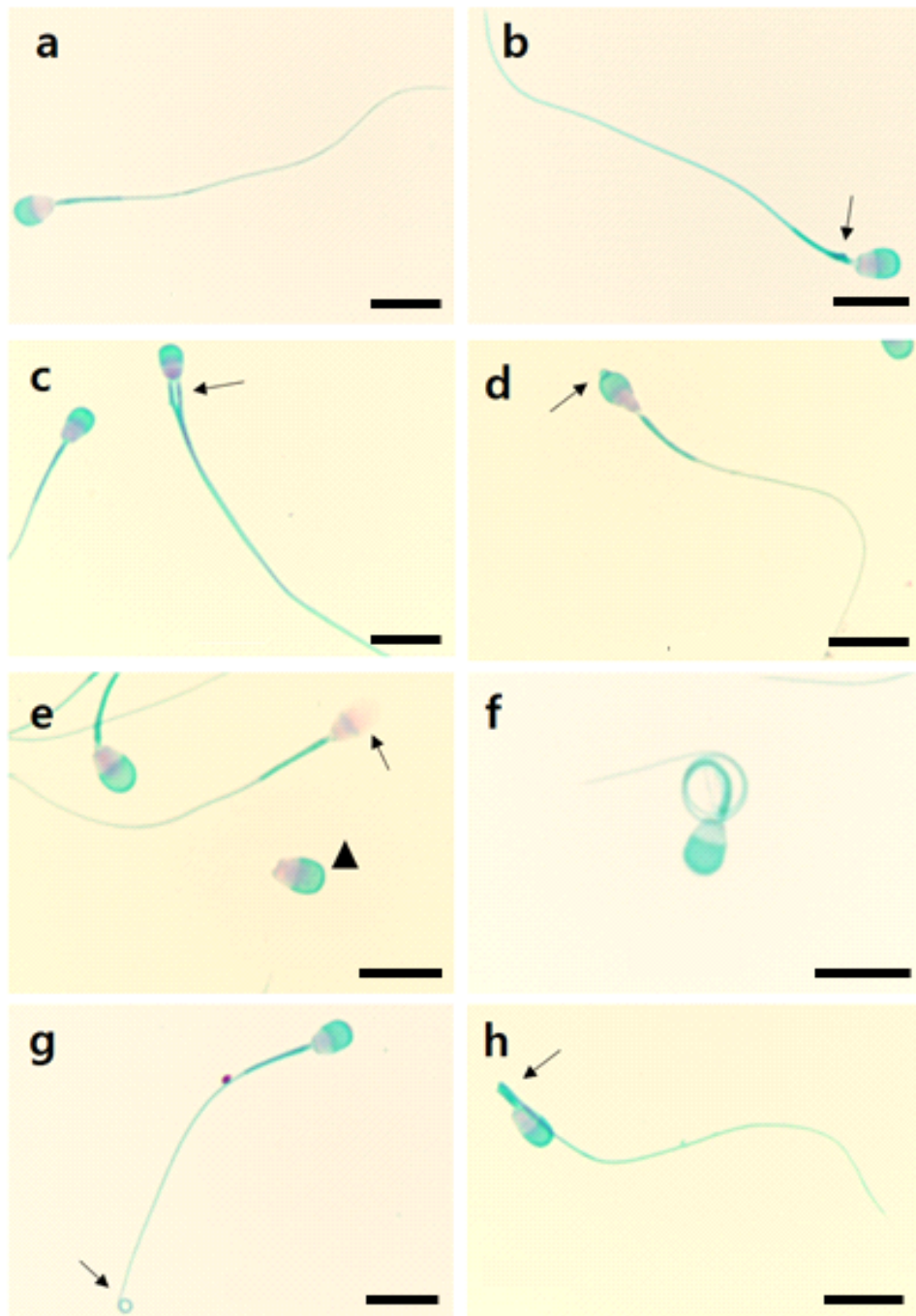


Fig. 24. Morphological assessment of spermatozoa using a Spermac[®] staining in the Asiatic black bear. a) normal. b) proximal droplet (arrow). c) double neck (arrow). d) knobbed acrosome. e) detached acrosome (arrow) & detached head (arrow head). f) dag defect. g) coiled tale (arrow). h) kinked midpiece (arrow). Scale bar is 10 μm .

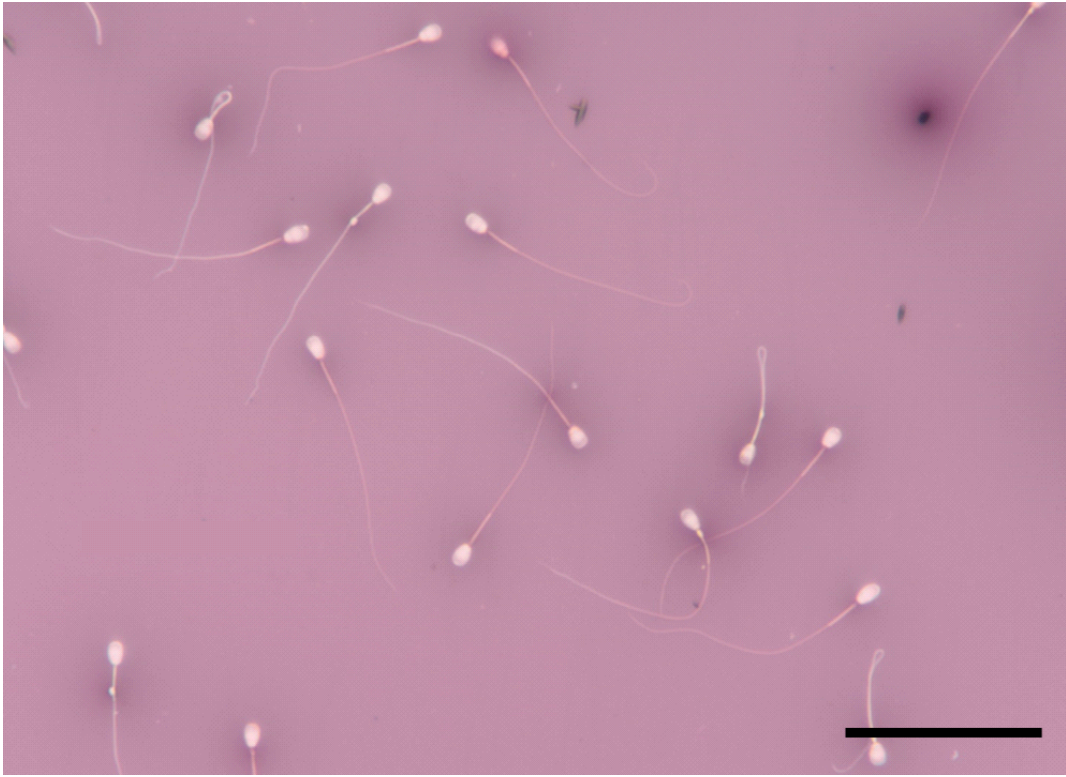


Fig. 25. Viability assessment of spermatozoa using the eosin-nigrosin staining in the Asiatic black bear. Scale bar is 50 μm .

3) 인공수정

요관경의 삽입을 통해 외음부로부터 자궁경부 입구까지의 길이를 측정한 결과, 평균 14.2 ± 1.5 cm(n = 23)이었다. 그리고 자궁과 질 사이의 경계부의 등쪽 부위(Dorsal region)에는 약 0.5-1 cm 가량의 돌출된 폴립(Polyp) 형태의 자궁경부가 위치하였으며, 자궁경부의 정중앙 내측으로 바깥자궁구멍이 확인되었다(Fig. 26).

모든 인공수정 작업은 초음파 가이드 하에서 요관경 장비를 이용하여 자궁경부의 위치를 확인하고 자궁 경관을 경유해서 자궁 내로 정액을 주입하는 방식으로 이루어졌다(Fig. 26, Fig. 27). 1회의 인공수정에 사용된 희석 정액의 총량은 평균 1.1 ± 1.2 ml이었다.

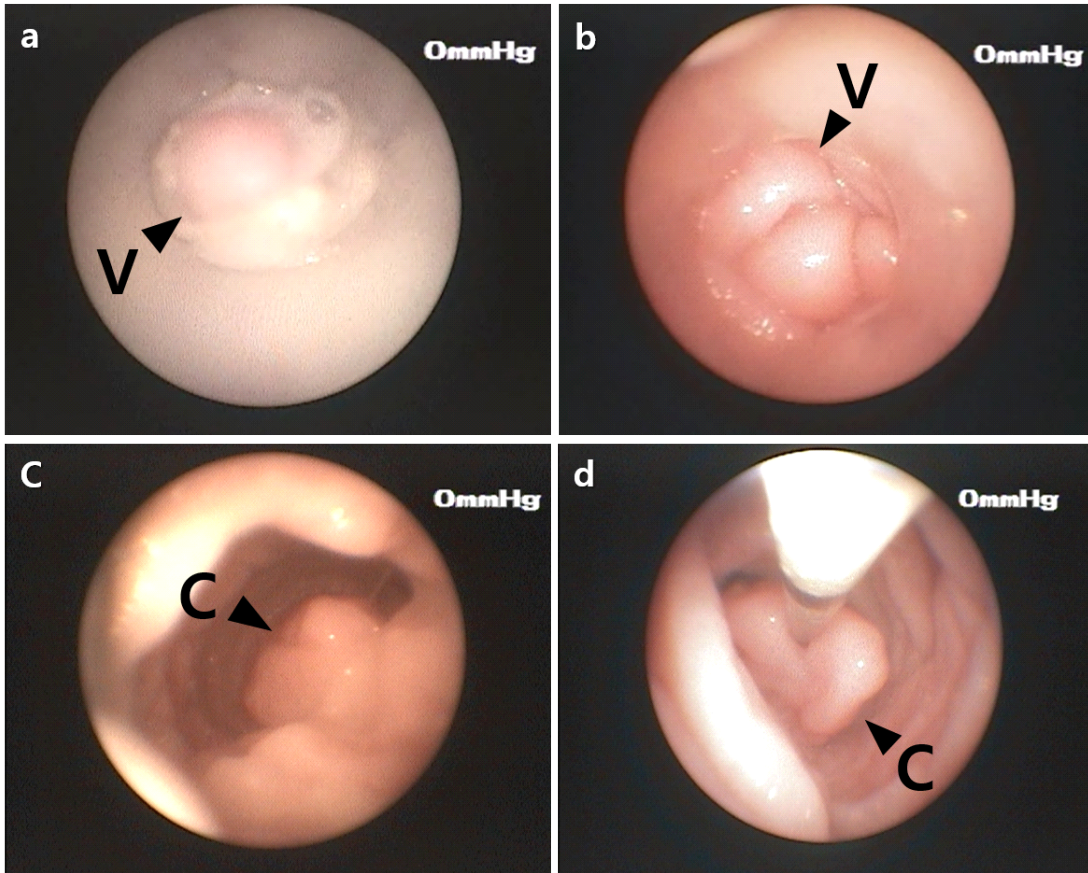


Fig. 26. Observation of the vaginal cavity using a ureterscope in Asiatic black bear. a), b) The Vagina at a site about 14 cm from the vulva. c) Cervix in uterovaginal region. d) Transcervical artificial insemination (AI) using a cannula.

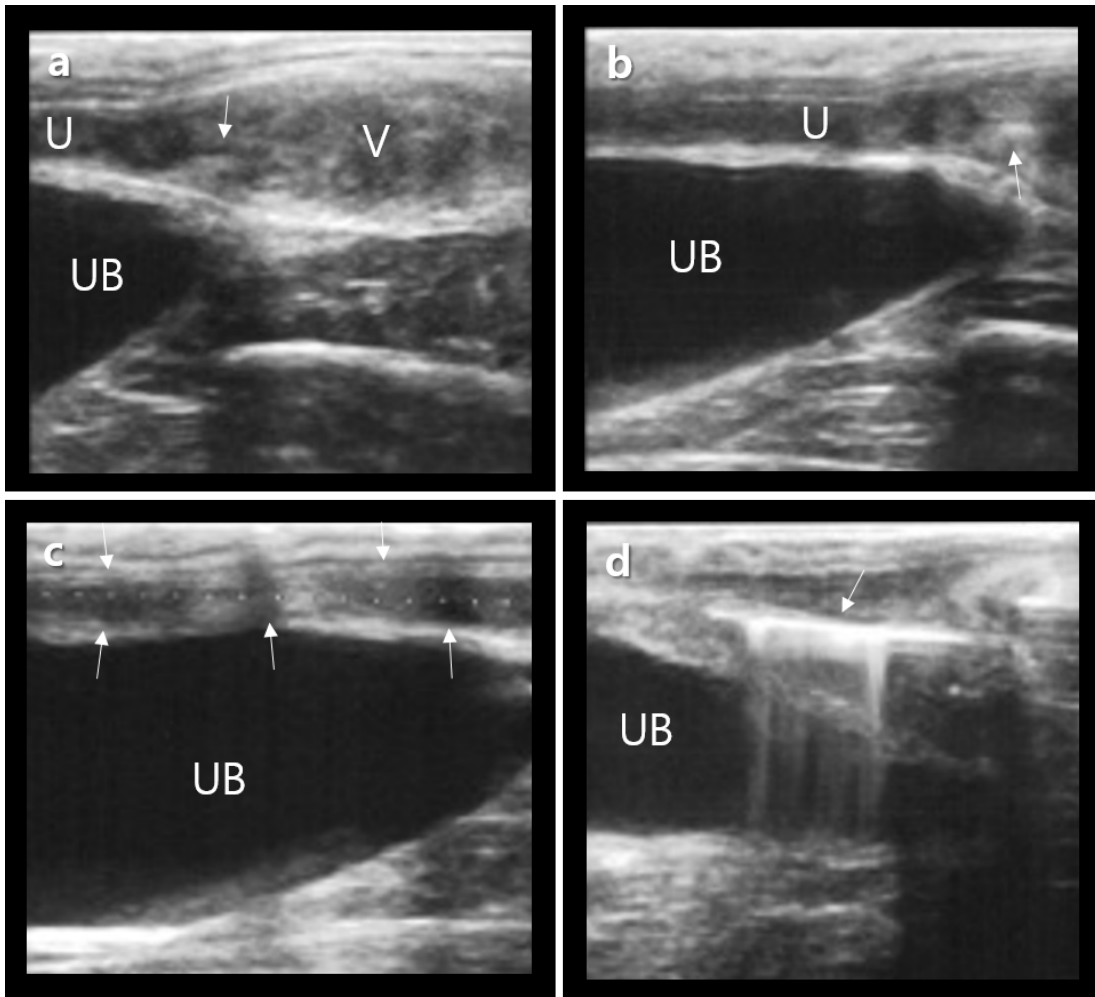


Fig. 27. Transrectal ultrasound image of the urogenital tract in the female Asiatic black bear. a), b) U; uterine, V; Vagina, UB; Urinary bladder, Cervix (arrow). c) The image of the uterine (arrows). d) Intrauterine artificial insemination (AI) via cervix using a TC cannula (arrow).

4) 임신 진단 및 새끼 출산

2017년 12월 21일에 실시한 Bear 2의 초음파 임신 진단 결과, 태아의 두개골 크기는 164×290 mm, 심장의 크기는 90×120 mm이었고, 이 날로부터 23일 후인 2018년 1월 13일에 2마리의 새끼를 출산하였다. 그러나 같은 날 임신 진단을 실시한 Bear 1은 마취 유지 불안정으로 인해 태아의 크기 측정은 실시하지 않았으며, 이 날로부터 28일 후인 2018년 1월 18일에 1마리의 새끼를 출산하였다.

2018년 12월 26일에 실시한 Bear 4의 초음파 임신 진단 결과는 Fig. 28에서 보는 바와 같다. 검사 결과, 태아의 두개골 크기는 164×289 mm, 심장의 크기는 113×195 mm, 자궁벽의 두께는 43 mm이었다. 이 날로부터 19일 후인 2019년 1월 14일에 2마리의 새끼를 출산하였다. 또한 같은 날 실시한 Bear 3의 초음파 임신 진단 결과, 태아의 전체 길이는 483 mm, 두개골 장축 길이는 195 mm, 심장의 크기는 68×68 mm이었으며 이 날로부터 27일 후인 2019년 1월 22일에 2마리의 새끼를 출산하였다.

Bear 4의 출산 후 새끼 곰의 성장 과정은 Fig. 29에서 보는 바와 같다.

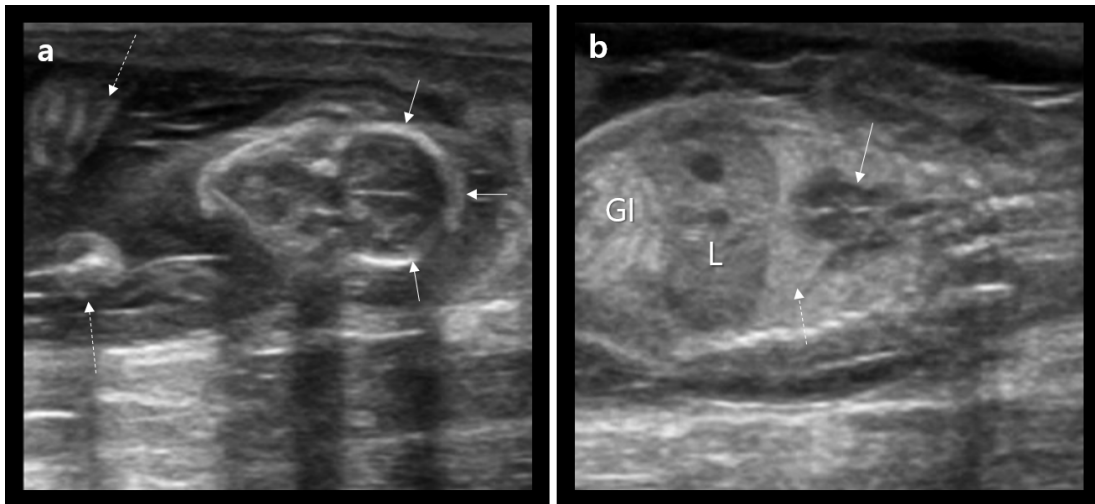


Fig. 28. The fetus confirmed in uterine by ultrasound diagnosis on the - 19th day (26th of December, 2018) before cub parturition (Bear 4). a) The fetal head (arrows) and forelimb (broken arrows) are identified. b) The heart (arrow), lung (broken arrows), liver (L), and gastrointestinal tract (GI) are identified.

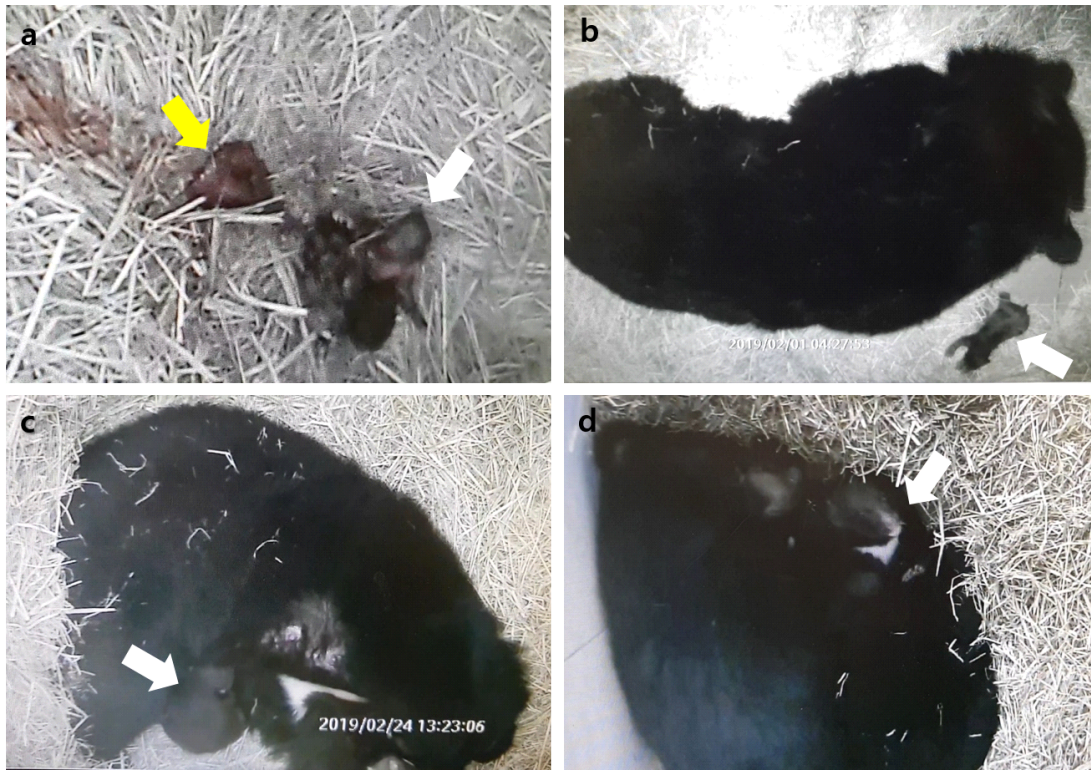


Fig. 29. The cub born by artificial insemination in the Asiatic black bear (white arrow). a) The cub with placenta observed on the day of birth (yellow arrow; 14th of January, 0 day). b) 1st of February (18 days). c) 24th of February (41 day). d) 24th of March (69 day).

5) 친자 확인 및 임신 기간 평가

새끼를 출산한 4마리의 암컷 곰(Bear 1, Bear 2, Bear 3, Bear 4) 중에 인공수정과 자연 교미를 병행하여 번식을 시킨 암컷 곰은 3마리(Bear 1, Bear 2, Bear 3)였으며, 자연 교미 없이 인공수정만을 통해 출산에 성공한 암컷 곰은 1마리(Bear 4)였다. 비록 3마리의 암컷 곰은 위에 언급한 바와 같이 인공수정과 자연 교미를 병행하였지만, 추후 친자 확인 검사 결과 Bear 1(1마리의 새끼 출산)과 Bear 3(2마리의 새끼 출산)의 새끼 곰들은 오직 인공수정에 의해 출산된 것으로 최종적으로 판명되었다. 그리고 쌍태를 출산한 Bear 3의 2마리의 새끼 곰들은 부계가 동일하였으며, 성 판별 결과 2마리의 새끼 곰은 서로 다른 성별인 것으로 최종 확인되었다. 반면에 Bear 2가 출산한 2마리의 새끼 곰들은 서로 다른 부계 혈통으로 확인되었고, 최종적으로 자연 교미(수컷 새끼)와 인공수정(암컷 새끼)에 의해 각각 1마리씩 태어난 것으로 확인되었다. 또한, 자연 교미 없이, 수컷과 가까운 거리에 계류하고 오직 뇨 성호르몬의 모니터링 결과를 기반으로 인공수정 일자를 결정하였던 Bear 4는 최종적으로 2마리의 새끼를 출산하는데 성공하였다. 비록 Bear 4로부터 태어난 2마리의 새끼 곰 중 1마리가 수일 만에 폐사하여 친자 확인과 성 판별 검사는 수행할 수 없었으나, 생존한 1마리의 새끼 곰(암컷)은 총 3회의 인공수정 시도 중에서 첫 번째로 실시한 인공수정에 의해 출산되었음을 최종적으로 확인하였다.

친자 확인 검사 결과를 근거로 해당 수컷(아버지) 곰의 정액을 주입한 인공수정 일자로부터 암컷 곰이 새끼를 출산하는데 까지 걸린 총 임신 기간은 평균 199.3 ± 13.4 일(범위: 184 - 216일, $n = 4$)이었다(Table 16).

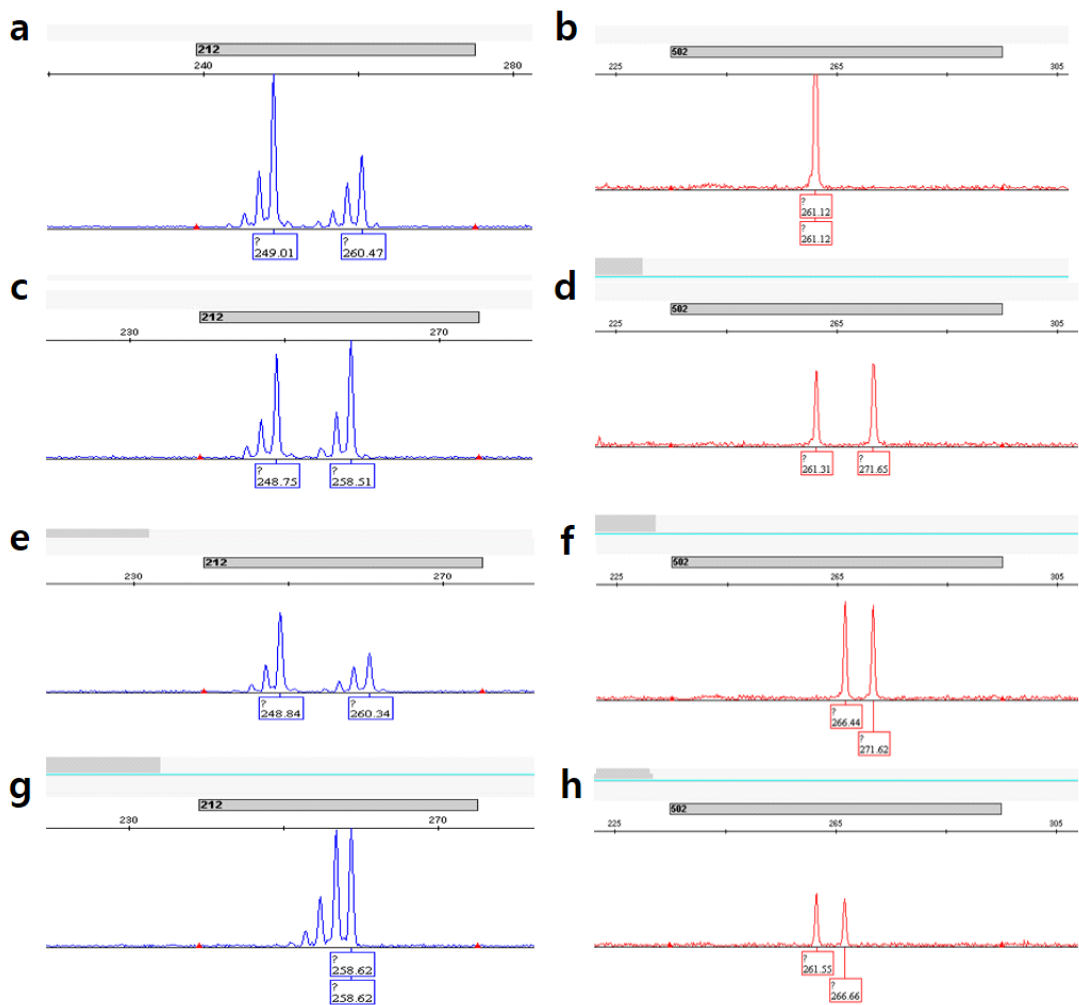


Fig. 30. The results of paternity test using a GeneMapper[®] software ver. 4.0 in two cubs born from Bear 2. a), b) Allelotype of Bear 2. c) Allelotype of the cub-1 born by artificial insemination (AI). d) Allelotype of the cub-2 born by natural mating (NM). e), f) Allelotype of the male bear given semen by NM. g), h) Allelotype of the male bear given semen by AI. Two different microsatellite markers were represented by blue and red color.

4. 고찰

본 연구는 반달가슴곰을 대상으로 인공수정을 통해 새끼 출산에 성공한 세계 최초의 연구 사례 보고이다. 이는 다양한 생물학적 지표의 종합적인 분석을 토대로 인공수정 일자를 결정하고, 또한 양질의 신선 정액 수집을 통해 요관경 장비를 활용하여 자궁 내 인공수정을 최초로 시도함으로써 얻어진 성공적인 결과이다.

결과적으로 2017년도에서 2018년도까지 2년간의 인공증식 연구를 통해 총 7마리의 암컷 반달가슴곰 중 4마리로부터 7마리의 새끼 곰을 출산시키는데 성공하였고, 이 중 자연 교미에 의해 태어난 1마리의 새끼 곰을 제외하고 나머지 6마리의 새끼 곰이 인공수정에 의해 태어난 것임을 친자 확인 검사를 통해 최종적으로 확인하였다.

암컷 곰의 인공수정일 결정을 위해 실시한 외음부의 종창, 질 상피세포의 변화상, 그리고 뇨 에스트로젠 호르몬 수치 등의 생물학적 지표 검사는 결과적으로 매우 유용하게 활용되었다(Masui *et al.*, 1989; Durrant *et al.*, 2002; Czekala *et al.*, 2003). 또한 발정 피크기에 특징적으로 상승하는 질 상피 표재세포 비율과 거의 동시에 상승하는 것으로 확인된 질 점막 전기저항 수치도 반달가슴곰의 인공수정 적기를 결정하는데 도움이 될 수 있는 간접적 지표로 활용될 수 있을 것을 판단한다.

또한 사자(Lueders *et al.*, 2012), 반달가슴곰(Jeong *et al.*, 2015) 등에서의 선행 연구에서와 같이 인공수정을 위해 초음파 가이드 하에 카테터를 이용하여 전립샘으로부터 수집된 정액의 질은 연구 결과에도 언급하였듯이 정자 생존율, 정자 운동성, 정자 농도, 정자 수, 그리고 정상 정자의 형태학적 비율에 있어서 매우 우수한 것으로 분석되었다.

반달가슴곰에서 초음파 가이드 하에 요관경을 이용한 자궁 내 인공수정 기법은 본 연구를 통해 처음 시도되어졌다. 비록 자이언트 팬더(Hori *et al.*, 2006)와 북극곰(Curry *et al.*, 2014) 등의 선행 연구에서 내시경을 이용한 자궁 내 인공수정 시도에 관한 연구가 있었으나 결국 새끼 출산까지는 이어지지 않았다. 그럼에도 불구하고 이러한 자궁 내 인공수정 방법이 질 내 인공수정 방법에 비해 보다 적은 양의 정자 수로 수정과 임신의 확률을 높일 수 있는 효과적인 방법(Tsutsui *et al.*, 2000; Hori *et al.*, 2006)일 것으로 판단한다.

특히 본 연구에서 시도된 인공수정 기법은 1차적으로 요관경을 통해 외음부로부터 자궁경부까지의 해부학적 구조를 확인한 후 자궁 경관으로 인공수정용 카테터를 삽입하는 것을 용이하게 하였으며, 2차적으로 초음파를 통해 자궁 내측의 구조를 확인해 가며 원하는 위치에 정액을 주입하는 것을 가능하게 하였다.

초음파 검사는 임신 여부 진단과 더불어 태아의 발달 정도와 출산일을 예측할 수 있는 방법으로써 이와 관련된 곰 종에서의 선행 연구는 불곰(Tsubota *et al.*, 1987)과 자이언트 팬더(Zhang *et al.*, 2009) 종에서 수행되어졌다. 그 결과 불곰의 경우 출산 전 33-35일 전에 초음파로 처음 태아(1.5 - 2.0 cm)가 확인되었고, 이는 자이언트 팬더의 경우에 비해 약 2배 이른 시기에 확인된 것이지만 처음 확인된 태아의 크기는 비슷하다고 보고하였다. 또한, 태아의 성장 속도는 초기에 성장률이 낮고 중간 단계에서부터 급속히 성장한다고 언급하였다.

본 연구의 결과, 새끼 출산에 성공한 4마리의 암컷 곰은 초음파 임신 진단 일자로부터 최소 19일에서 최대 28일 후에 각각 새끼를 출산하였고, 검사 당일에 태아의 크기는 개체마다 차이가 있었다. 본 연구에서는 태아의 두개골과 심장의 크기를 제외한 그 밖의 태아에 대한 상세한 기록이 많지 않은 한계를 갖고 있다. 그러므로 추후 임신한 반달가슴곰을 대상으로 태아의 발달 정도에 따른 출산 일자를 예측하기 위해서는 관련된 지표 확립과 동일한 기준의 시기별 태아의 크기에 대한 자료가 지속적으로 축적되어야 할 것이다.

자이언트 팬더의 선행 연구(Huang *et al.*, 2012)에 의하면 대부분(78.9%) 에스트로겐 피크일 당일 또는 그 다음 날에 첫 교미를 시작하고, 임신한 암컷 곰 중 84.2%가 암컷 곰과의 첫 교미 또는 첫 인공수정에 기인한 것이라고 보고하였다. 이는 본 연구에서 뇨 성호르몬을 통해 에스트로겐 피크일을 확인할 수 있었던 암컷 곰(Bear 4)를 통해 이와 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 대립 유전자형 분석 프로그램을 통해 부(父)-자(子) 간, 그리고 모(母)-자(子) 간의 대립 유전자형의 일치 여부를 분석하여 친자 확인 검사를 수행하였으며, 이는 정액을 공여한 여러 마리의 수컷 곰 가운데 최종적으로 인공수정 또는 자연교미를 통해 임신에 관여한 수컷 곰을 추적하고, 정액 공여 일자를 기준으로 총 임신기간 등을 예측하는데 필수적 요소일 것이다(Huang *et al.*, 2012). 이를 통해 후향적으로 인공수정 성공 일자에 따른 다양한 생물학적 지표에 관한 상세한 정보를 습득할 수 있을 것으로 판단된다. 암컷 곰의 총 임신기간은 새끼 출산에 관여한 인공수정 일자에서부터 출산일까지로 산정하였으며, 그 결과, 199.3 ± 13.4 일(범위: 184 - 216일)이었고, 이는 불곰의 225일보다 짧고, 야생 상태와 사육 상태의 자이언트 팬더의 평균 임신기간에 비해 길었다(Zhu *et al.*, 2001).

결론적으로 본 연구는 2017년도와 2018년도에 걸쳐 2년 연속 반달가슴곰을 대상으로 인공수정을 통해 새끼 출산에 성공한 세계 최초의 연구 사례로써 매우 중요한 의의를 갖는다고 하겠다. 우선적으로 앞으로의 반달가슴곰 복원사업 추진에 있어서 국외로부터의 어려운 도입 환경을 극복하고, 반달가슴곰의 자연 개체군에 필요한 다양한 유전 형질의 개체를 선택적으로 지속 가능하게 생산하여 복원 프로젝트에 활용함으로써 근친교배를 방지하고 개체군의 유전적 다양성을 증진시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한 그간의 수많은 노력에도 불구하고 아직까지 인공수정을 통해 새끼를 출산한 사례가 없는 다른 곰 종을 대상으로 본 연구에서 시도되었던 다양한 인공수정 기법 프로토콜을 종에 맞게 적용하여 새끼 출산을 도모함으로써 전 세계의 멸종위기에 처해 있는 곰 개체군의 멸종 방지와 종 보전에 크게 기여할 것으로 기대한다.

참고문헌

- Allen CD, Burridge M, Mulhall S, Chafer ML, Nicolson VN, Pyne M, Zee YP, Jago SC, Lundie-Jenkins G, Holt WV, Carrick FN, Curlewis JD, Lisle AT, Johnston SD. Successful artificial insemination in the koala (*Phascolarctos cinereus*) using extended and extended-chilled semen collected by electroejaculation. *Biol Reprod* 2008; 78: 661-666.
- Brown JL, Goritz F, Pratt-Hawkes N, Hermes R, Galloway M, Graham LH, Gray C, Walker SL, Gomez A, Moreland S, Murray S, Schmitt DL, Howard J, Lehnhardt J, Beck B, Bellem A, Montali R, Hildebrandt TB. Successful artificial insemination of an Asian elephant at the National Zoological Park. *Zoo Biol* 2004; 23:45-63.
- Crosier AE, Pukazhenti BS, Henghali JN, Howard JG, Dickman AJ, Marker L, Wildt DE. Cryopreservation of spermatozoa from wild born Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*) and influence of glycerol on cryosurvival. *Cryobiology* 2006; 52: 169 - 181.
- Curry E, Wyatt J, Sorel LJ, MacKinnon KM, Roth TL. Ovulation induction and artificial insemination of a captive polar bear (*Ursus maritimus*) using fresh semen. *J Zoo Wildl Med* 2014; 45: 645-649.
- Czekala N, McGeehan L, Steinman K, Xuebing L, Gual-Sil F. Endocrine monitoring and its application to the management of the Giant panda. *Zool Biol* 2003; 22: 389-400.
- Durrant B, Czekala N, Olson M, Anderson A, Amodeo D, Campos-Morales R,

- Gual-Sill F, Ramos-Garza J. Papanicolaou staining of exfoliated vaginal epithelial cells facilitates the prediction of ovulation in the giant panda. *Theriogenology* 2002; 57: 1855-1864.
- Fenelon JC, Banerjee A, Murphy BD. Embryonic diapause: development on hold. *Int J Dev Biol* 2014; 58: 163-174.
- Gonzales RL, Mendoza AV, Himelright BM, Moore JM, Spady TJ. American black bear mating behavior and chemosensation of estrus. *Ursus* 2013; 24: 139-147.
- Howard JG, Barone MA, Donoghue AM, Wildt DE. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J Reprod Fertil* 1992; 96: 175-186.
- Howard JG, Kwiatkowski DR, Williams ES, Atherton RW, Kitchin RM, Thorne ET, Bush M, Wildt DE. Pregnancies in black-footed ferrets and Siberian polecats after laparoscopic artificial insemination with fresh and frozen - thawed semen. *J Androl* 1996; Suppl: P-51.
- Hori T, Hashizaki F, Narushima E, Komiya T, Orima H, Tsutsui T (2006) A trial of intrauterine insemination using a fiberscope in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *J Vet Med Sci.* 68: 987-990.
- Huang Y, Zhang H, Li D, Zhang G, Wei R, Huang Z, Zhou Y, Zhou Q, Liu Y, Wildt DE, Hull V. Relationship of the estrogen surge and multiple mates to cub paternity in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*): implications for optimal timing of copulation or artificial insemination. *Biol Reprod* 2012; 87: 112.

- Jeong DH, Yang JJ, Seo MK, Lee AN, Lim YK. Effectiveness of urethral catheterization under ultrasound guidance for semen collection from Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*). *Theriogenology* 2019; 129: 154-159.
- Jewgenow K, Songsasen N. Reproduction and advances in reproductive studies in carnivores. *Adv Exp Med Biol* 2014; 753: 205 - 239.
- Kersey DC, Aitken-Palmer C, Rivera S, Willis EL, Liang LY, Snyder RJ. The birth of a giant panda: Tracking the biological factors that successfully contribute to conception through to postnatal development. *Theriogenology* 2016; 85: 671-677.
- Lueders I, Luther I, Scheepers G, van der Horst G. Improved semen collection method for wild felids: urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). *Theriogenology* 2012; 78: 696-701.
- Lueders I, Ludwig C, Schroeder M, Mueller K, Zahmel J, Dehnhard M. Successful nonsurgical artificial insemination and hormonal monitoring in an Asiatic golden cat (*Catopuma temmincki*). *J Zoo Wildl Med* 2014; 45: 372-329.
- Mano T, Tsubota T, Kie JG. Reproductive characteristics of brown bears on the Oshima peninsula, Hokkaido, Japan. *J Mammal* 2002; 83: 1026-1034.
- Masui M, Hiramatsu H, Nose N, Nakazato R, Sagawa Y, Tajima H, Sato K. Successful artificial insemination in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) at ueno zoo. *Zoo Biol* 1989; 8: 17-26.

- Moore HDM, Bush M, Celma M, Garcia AL, Hartman TD, Hearn JP, Hodges JK, Jones DM, Knight JA, Monsalve L, Wildt DE. Artificial insemination in the Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*). J Zool 1984; 203: 269-278.
- Onuma M1, Suzuki M, Ohtaishi N. Reproductive pattern of the sun bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak, Malaysia. J Vet Med Sci 2001; 63: 293-297.
- Pukazhenthil BS, Wildt DE. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? Reprod Fertil Dev 2004; 16: 1-14.
- Sato M, Nakano N, Tsubota T, Komatsu T, Murase T, Kita I and Kudo T. Changes in serum progesterone, estradiol-17 β , luteinizing hormone and prolactin in lactating and non-lactating Japanese black bears. J Reprod Dev 2000; 46: 301-308.
- Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Hori T, Tsutsui T. Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. J Vet Med Sci 2000; 62: 1163-1167.
- Torii Y, Matsumoto N, Sakamoto H, Nagano M, Katagiri S, Yanagawa Y. Monitoring follicular dynamics using ultrasonography in captive brown bears (*Ursus arctos*) during the breeding season. Theriogenology 2019; 140: 164-170.
- Tsubota T, Takahashi Y, Kanagawa H. Changes in serum progesterone levels and growth of fetuses in Hokkaido brown bears. Bears: Their Biology and Management 7. 1987: 355-358.

- Tsubota T, Taki S, Nakayama K, Mason JI, Kominami S, Harada N and Kita I. Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the corpus luteum and the placenta of Japanese black bears, *Ursus thibetanus japonicus*, during pregnancy. *Reproduction* 2001; 121: 587-594.
- Tsutsui T, Tezuka T, Shimizu T, Murao I, Kawakami E, Ogasa A. Artificial insemination with fresh semen in beagle bitches. *J Vet Med Sci* 1988; 50: 193 - 198.
- Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 1241-1245.
- Yamamoto K, Tsubota T and Kita I. Observation of sexual behavior of captive Japanese black bears, *Ursus thibetanus japonicus*. *J Reprod Dev* 1998; 44: 13-18.
- Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo B. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology* 2008; 69: 485-490.
- Zhang H, Li D, Wang C, Hull V. Delayed implantation in giant pandas: the first comprehensive empirical evidence. *Reproduction* 2009; 138: 979-986.
- Zhu X, Lindburg DG, Pan W, Forney KA & Wang D. The reproductive strategy of giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*): infant growth and development and mother infant relationships. *J Zool* 2001; 253: 141-155.

국립공원공단종복원기술원. 2018종복원기술원 연간보고서. 국립공원공단 종복원
기술원. 2019: 6-133.

한상현, 문주영, 김태욱, 정승준, 김정진, 정동혁, 송동주, 강재구, 임현태.
우리나라에 재도입된 반달가슴곰의 유전적 집단 구조와 다양성.
한국환경생태학회 학술발표논문집. (사)한국환경생태학회, 2019: 59-60.

결 론

본 연구는 뇨 중 성호르몬 분석을 통해 반달가슴곰의 발정 패턴을 파악하기 위한 최초의 연구 보고로써, 결론적으로 뇨 중 에스트로겐과 프로게스테론의 대사물질을 통한 성호르몬 분석 기법은 비침습적으로 반달가슴곰의 발정 상태에 대한 기초 정보를 습득하고 배란 시기를 예측하는데 있어서 유용한 방법인 것으로 판단된다. 비록 5개체 미만의 소수의 암컷 개체를 대상으로 제한된 기간 동안 수행된 연구였던 만큼 본 연구를 통해 번식기 동안의 암컷 반달가슴곰의 전반적인 발정 패턴을 규명하고 일반화하는데 분명 한계가 있었으나, 앞으로 반달가슴곰 종에 최적화된 뇨 성호르몬 분석 기법을 보다 견고히 확립하고, 정확한 인공수정 일자를 결정하기 위한 추가적인 연구 수행에 있어서 매우 유용한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

또한 반달가슴곰은 다른 몇몇 종의 곰들과 유사하게 교미와 같은 직접적인 신체적 자극 없이도 배란 유도가 가능하다는 것을 재확인 할 수 있었고, 반달가슴곰의 인공수정 적기를 예측하기 위한 여러 생물학적 지표들(외음부 종창과 난소, 난포, 황체, 질 상피세포 상, 그리고 질 점막 전기저항) 간에는 유기적인 상호 연관 관계가 있음을 확인할 수 있었다. 그러므로 향후 반달가슴곰의 인공수정을 수행함에 있어서는 뇨 중 성호르몬 분석을 기초로 하여 다양한 생물학적 지표들의 특성을 종합적으로 분석함으로써, 보다 더 정확한 반달가슴곰의 인공수정 적기를 예측할 수 있는 상세한 정보를 습득할 수 있을 것으로 기대한다.

본 연구는 암컷 반달가슴곰을 대상으로 양질의 신선 정액 수집을 통해 초음파 가이드 하에 요관경을 이용한 자궁 내 인공수정으로 새끼 곰 출산에 성공한 세계 최초의 사례로써, 이를 통해 총 4마리의 암컷 곰으로부터 6마리의 새끼 곰을 출생시키는 귀중한 성과를 이루어냈다. 이로써 요관경을 이용한 자궁 내

인공수정 기법의 효용성이 검증되었고, 앞으로 반달가슴곰을 대상으로 인공수정을 수행함에 있어서 널리 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

결론적으로 본 연구의 기법들은 반달가슴곰 복원사업을 추진함에 있어서 서식지 내, 외에서의 개체군 번식 관리에 실질적으로 활용함으로써 그 간의 해외 도입에 따른 원종 확보 이슈와 국내의 자연 복원 개체군의 유전적 다양성 문제 등을 해소해 나아가는데 크게 기여할 수 있을 것으로 기대한다. 또한 향후 반달가슴곰을 비롯한 다른 곰 종에서의 추가적인 번식생리 연구 수행과 종에 따른 인공수정 기법을 확립하는데 매우 중요한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단되고, 이는 현재 지구상에서 심각한 멸종위기에 처해 있는 여러 곰 종의 멸종 방지와 종 보전에 크게 기여할 것으로 기대한다.

초 록

반달가슴곰(*Ursus thibetanus*) 인공증식 기술 개발에 관한 연구

양 정 진

(지도교수 : 임 윤 규)

제주대학교 일반대학원 수의학과

본 연구는 암컷 반달가슴곰의 뇨 중 성호르몬 분석과 다양한 생물학적 지표 관찰이 반달가슴곰 종의 번식상태와 인공수정 적기의 파악을 위한 유용성 여부를 조사하고, 수집된 신선 정액을 가장 효율적으로 주입할 수 있는 자궁 내 인공수정 기법을 확립하고자 수행하였다.

이를 위하여, 뇨 중 estrogen 및 progesterone의 대사물질(metabolites) 농도에 기초한 번식기 동안의 암컷 반달가슴곰(*Ursus thibetanus*)의 발정 패턴 및 배란 적기 파악을 위한 조사를 실시하였다. 아울러 인공수정 적기를 파악할 수 있는 난포와 황체의 초음파 상, 질 상피세포 상, 질 점막 전기저항, 그리고 외음부의 형태 등의 다양한 생물학적 지표들의 특성을 조사하였다. 최종적으로, 초음파 가이드 하에 요관경 장비를 이용한 인공수정 기법을 확립하였다.

반달가슴곰의 번식기간인 5월부터 8월까지 공시된 4마리의 암컷 곰에서 뇨 중 에스트로겐 대사물질(17β -estradiol vs. estrone-3-glucuronide)과 프로그스테론 대사물질(progesterone vs. pregnandiol-3-glucuronide)의 농도는 각각 월별로

상호 유사한 변화 패턴이 확인되었다. 그러나 각각의 호르몬이 상승 또는 하강하는 시기와 성호르몬 대사물 농도 정점(peak)의 수치, 횟수, 그리고 정점 간의 간격은 개체마다 변이가 컸으며, 일정한 패턴을 나타내지 않았다.

12월에 초음파 검사를 통해 임신이 확인된 암컷 곰(n = 1)의 경우, 5월부터 7월까지 뇨 중 progesterone (P₄)의 농도가 서서히 상승하였다가 인공수정 이후, 8월에 급격히 P₄의 평균 농도가 상승하였고, 특히 6월과 8월에 통계적으로 의미있는 상승을 보였다($p < 0.05$). 반면, 임신하지 않은 곰들은 같은 기간 동안에 임신한 곰에서 보인 P₄의 변화 양상은 관찰되지 않았다. 각각의 성호르몬 값 간에는 임신한 암컷 곰에서의 E₂와 P₄ 사이를 제외하고 모두 양의 상관관계를 나타내었다.

번식기 중의 우성난포는 개체에 따라 7.3-19.6 mm 크기의 1-4개까지 형성되었으며, 6 mm 이상의 우성난포가 최대 직경에 도달할 때까지 약 2주 이상의 기간이 소요되었다. 또한 배란 이후에 확인된 황체의 크기는 개체에 따라 7.0-10.6 mm로 다양하였다.

질 상피세포 검사 결과, 발정 징후가 감지되는 시기에 형태학적으로 표재세포(Superficial cell)의 출현 비율이 증가할수록 호산성세포(Acidophilic cell, red color)와 각질화세포(Keratinized cell, orange color)가 함께 증가하였던 반면, 호염성세포(Basophilic cell, blue color)의 출현은 감소하였다.

발정기 동안의 표재세포의 출현 비율이 최대(82.3 ± 7.8%)일 때 질 점막 전기저항 수치는 평균 360 ± 56.9 Ω로 증가하였다.

외음부의 종창은 질 상피세포 검사 및 행동학적 관찰과 더불어 암컷의 발정 상태를 확인할 수 있는 또 하나의 지표이며, 본 연구를 통해 외음부의 종창이 증가함에 따라 발적, 점액 분비, 표재세포 출현 비율, 그리고 질 점막 전기저항 수치가 함께 증가하는 양상을 확인할 수 있었다.

결과적으로 새끼 출산에 성공한 암컷 곰들은 인공수정 당일 6.3-10 mm의 우성난포가 관찰되었고, 1개체를 제외한 나머지 암컷 곰의 표재세포의 비율은 70 % 이상 출현하였으며, 질 점막 전기저항 수치는 340-400 Ω, 그리고 외음부의 크기는 검사 기간 동안에 최대로 증가하였음을 확인하였다. 또한 뇨 성호르몬

검사를 동반한 개체는 인공수정일 전일과 당일 에스트라디올의 농도에 차이(전일: 8.26 vs. 당일: 1.45 ng/mg Cr)가 관찰되었다.

수집된 신선 정액은 선행 연구에서와 같이 정자 농도, 정자 수, 생존율, 운동성, 정자 형태 등에서 매우 우수한 상태인 것으로 분석되었고, 초음파 가이드 하에 요관경을 통해 자궁경관을 경유하여 자궁 내로 인공수정을 실시하였다.

외음부로부터 자궁 경관까지의 길이는 평균 14.2 ± 1.5 cm(n = 23)이었다.

12월 말경에 실시한 초음파 임신진단 결과, 총 4마리의 임신한 암컷 곰으로부터 골격과 장기가 확인되는 크기가 서로 다른 총 7마리의 태아를 확인하였다. 결과적으로 7마리의 새끼 모두 출산하는데 성공하였으며, 친자 확인 검사를 통해 1마리의 새끼 곰을 제외한 6마리의 새끼 곰들이 인공수정에 의해 태어난 것으로 최종 확인되었다.

이를 근거로 산정한 총 임신기간은 수컷 곰의 정액을 주입한 인공수정 일자로부터 새끼 출산까지 199.3 ± 13.4 일(범위: 184-216일, n = 4)이었다.

본 연구의 결과는 반달가슴곰의 복원사업 과정에서 인공수정을 통해 새끼 출산에 성공한 세계 최초이자 유일한 사례로서, 본 연구를 통해 도출된 결과들은 추후 반달가슴곰을 대상으로 하는 후속적인 번식생리 연구와 인공증식 기술의 개선을 위한 초석으로 활용될 것으로 기대된다. 또한 종복원사업 추진 과정에서 문제점으로 지적되었던 사항 즉, 해외로부터의 도입에 따른 이슈와 국내의 자연 복원 개체군의 유전적 다양성 문제들의 해소에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단되며, 더 나아가 건강한 반달가슴곰 개체군 형성과 성공적인 복원사업 추진에 크게 기여를 할 것으로 사료된다.

주요어: 반달가슴곰, *Ursus thibetanus*, 노 성호르몬, 난포, 황체, 질 상피세포, 질 점막 전기저항, 외음부 종창, 요관경, 인공수정, 초음파 임신진단, 새끼 출산

감사의 글

학위 과정을 수행하는데 도움을 주신 많은 분들과 야생동물 수의사로서의 삶을 가치 있게 살아갈 수 있도록 도움을 주신 모든 분들께 감사의 마음을 전합니다.

먼저 99년도 예과 2학년 시절, 처음 실험실 일원으로 인연을 맺고 학부 졸업과 석사 과정, 그리고 박사 과정에 이르기까지 긴 세월동안 부족한 제자를 끝까지 책임져 주시고, 끊임없는 관심과 지도, 가르침을 주셨던 영원한 나의 지도 교수님이신 **임윤규 교수님**께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 어느 덧 20년이라는 세월이 훌쩍 지나 곧 퇴임하신다는 얘기가 아직까지 믿기지 않지만, 오랜 시간 후학 양성을 위해 노력하신 열정과 헌신의 세월은 저 뿐만이 아니라 교수님을 거쳐 간 모든 제자들에게 영원히 잊혀지지 않을 것입니다. 감사합니다. 교수님, 그리고 고생 많으셨습니다.

그리고 이번 저의 학위논문 심사에 기꺼이 심사위원장을 맡아주신 존경하는 **신태균 교수님**과 부족한 부분을 채울 수 있도록 마지막까지 지도해 주시고 응원해 주신 존경하는 **강태영 교수님**, **황규계 교수님**, 그리고 **김영주 박사님**께도 감사의 말씀을 드립니다.

또한 지금의 야생동물 수의사로서의 삶을 살아갈 수 있게 기회를 열어주시고 부족한 저를 위해 지금까지도 아낌없이 A/S를 해주시는 **김재훈 교수님**께 진심으로 감사의 인사를 드립니다. 아마도 교수님이 아니었다면 지금의 저의 삶도, 또 오늘의 결과도 없었을 것입니다. 감사드립니다. 교수님.

그리고 대학시절 연구실에서의 처음 연으로 아직까지도 다방면으로 도움을 주고 계시는 검역본부의 **김성희 연구관님**과 **양재혁 교수님**께도 감사의 인사를 전합니다.

2007년도 국립공원에 수의사로서 처음 발을 내딛고 지금에 이르기까지 同苦同樂하며 힘든 시절을 함께 해 온 모든 동료 직원 분들에게 감사에 인사를 전합니다.

가장 먼저 15년 가까운 세월동안 迂餘曲折을 함께 건디며 喜怒哀樂을 함께 해 온 나의 선배이자 동지인 **정동혁 박사님**께 진심으로 감사드립니다. 그 간의 여러 고난과 역경들을 이겨내고 하나 둘 성과를 이뤄올 수 있었던 것은 당신의 변하지 않는 미래 비전과 굳은 의지, 그리고 적극적인 추진력이 있었기에 가능했던 일이라고 생각합니다. 감사합니다.

또한, 학위 논문에 전념할 수 있도록 아낌없는 응원을 보내준 우리 **야생동물의료센터 직원 동료** 여러분들께 깊은 감사의 말을 전합니다. 우선 저를 대신하여 수의사가 해야 하는 모든 분야에서 업무 공백을 느낄 수 없게 스스로 한발 더 뛰어준 **임승효 선생**에게 미안함과 고마움을 함께 전합니다. 그리고 늘 저를 믿어주고 언제나 제 편이 되어주길 마다하지 않는 **이안나 예비 박사**, 묵묵히 집안 살림을 도맡아 해결사 역할을 해 준 **유지상 연구원**, 19살 어린 나이에 들어와서 이제는 어엿한 야생동물 재활 분야의 한 축을 담당하고 있는 **허욱 연구원**, 조직의 분위기를 누구보다 민감하게 파악하고 노련하게 조직원 간의 갈등과 분위기를 중재하는 역할을 톡톡히 해주고 있는 **김민 연구원**, 2015년도 학부생 때의 센터 자원봉사 겸 실습을 인연으로 어려운 시기에 동료로서 함께 할 수 있게 된 듄직하고도 앞으로의 기대가 더 큰 **경의범 선생**에게도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 곳곳이 자신의 철학과 소신을 굽히지 않고 야생동물에 대한 깊은 애정과 관심으로 중부권역의 수의 분야를 새롭게 개척해 가고 있는 믿음직한 **이숙진 팀장님**, 멀리 강원도에서 혼자 孤軍奮鬪하고 있는 **서명교 선생**. 모두 모두 고맙습니다.

학부 시절부터 야생동물에 대한 꿈을 함께 나누고 또, 한때는 직장 동료로서 같은 길을 걸어가기도 했던 나의 영원한 벗이자 형인 **이제욱 박사님**, 비록 오래 함께 하진 못했지만 어려운 여건 속에서도 함께 고통 분담을 해주며 고생해 준 **공주연 선생**, **엄소민 선생**에게도 감사의 인사를 전합니다.

그리고 이곳에 와서 알게 되었지만 국내 야생동물 분야의 오랜 개척자이자 아직까지 순수함과 열정을 잃지 않고 후배 야생동물 수의사들에게 귀감이 되어 주시는 청주동물원의 **김정호 박사님**, 그 누구도 가지 않았던 또 다른 분야를 묵묵히 걸어가고 있는 **최성준 박사님**에게도 감사의 인사와 응원을 보냅니다.

역대 원장님들께도 감사의 인사를 드립니다. 우선 국립공원에서 야생의

수의사로 살아갈 수 있게 입사의 기회를 주시고, 아직까지도 애정과 연민으로 보살펴 주시는 **송동주 처장님**, 늘 환한 미소를 잃지 않고 직원들의 노고를 격려해 주셨던 **강재구 원장님**, 그리고 직원들의 작은 소리에도 항상 귀를 기울이시고, 작지만 함께 나누면 배가 된다는 사실을 몸소 실천해 보여주시는, 따뜻한 리더십이라는 말이 잘 어울리는 **현 남성열 원장님**. 존경합니다.

또한 지금은 명예롭게 퇴임하셨지만 늘 야생동물의료센터의 앞날을 걱정해 주시고 전폭적인 지원을 아끼지 않으셨던 **김종달 원장님**, **권철환 원장님**께도 깊은 감사의 인사를 전합니다.

때때로 직장생활에 지치고 힘들어 포기하고 싶을 때마다 늘 곁에서 버팀목이 되어 주시고 조언을 아끼지 않으셨던 **이사현 부장님**께도 감사드린다는 말을 전합니다.

또한 현장에서 치열하게 꿈과의 사투를 함께 해 온 남부복원센터의 모든 직원 동료 분들께도 감사의 인사를 전합니다. 특히 저에게 양원장이라는 애칭을 붙여주시고 아껴주시는 보전원의 말형이자 반달가슴곰복원사업의 역사이신 **강도영 조장님**, 그리고 누구도 범접할 수 없는 현장 최고의 곰 전문가이자 눈빛만 봐도 생각을 서로 공유하는 **김종백 연구원님**, 가끔 직장의 피로에서 벗어나 맘 편히 소주 한잔 기울이고 싶을 때 언제나 가장 먼저 달려와 주던 **손대삼 주임님**, 그리고 **김전두 팀장님**, 늘 저를 신뢰해주고 저 또한 의지를 많이 해왔던 **정우진 팀장님**, 그리고 격 없이 지내는 동생이자 편한 친구인 **김만우 연구원**에게도 감사의 인사를 전합니다.

또한 지금은 멀리 있지만 한때 강원도 오지에서 전우애를 함께 나누었던 국내 최고의 산양 생태 전문가인 **조재운 박사님**, 나의 소울메이트이자 늘 저를 걱정해 주시는 형인 **정대호 박사님**, 지리산에서 함께 同苦同樂하다가 더 큰 일을 위해 보전원 대표로 본사로 떠난 저와 이름이 같은 **김정진 박사님**에게도 감사하다는 말을 전합니다. 그리고 함께 했던 세월만큼 돈독한 연을 맺을 수 있었던 직장 선배 **양두하 박사님**, **박종길 박사님**, **김석범 박사님**, **정승준 부장님** 그리고 **장정재 부장님**과 이번 학위논문엔 많은 도움을 주신 **한상현 박사님**께도 특별히 감사의 인사를 드립니다.

이제껏 15년 가까이 공단의 삶을 살아오면서 제게 가장 많은 영향을 주었고 지금은 멀리서 저를 항상 응원하고 계실 것만 같은 국립생태원의 **이배근**

박사님께도 진심으로 감사의 인사를 드립니다.

그리고 오래 전 지리산에서 함께 근무하다가 지금은 국내 자연자원조사 분야에서 열일하고 계시는 친구 같은 형 **신화용 예비 박사님**, 나의 강원도 오지 시절의 또 한 명의 전우인 강원대학교 **임상진 박사님**, 그리고 **김기윤 예비 박사**, **김규철 예비 박사**에게도 감사하다는 말을 전합니다. 또 지금은 공중방역 수의사로 근무하고 있지만 예전 실습생 시절의 추억을 잊지 않고 늘 양손 무겁게 찾아와 주는 **이상현 선생**, **김홍철 선생**에게도 감사의 인사를 전합니다.

그리고 더 이상의 말이 필요 없는 내 어릴 적 오랜 친구들. **김태현**, **변성환**, **박지훈**, **한상연**에게도 감사하다는 이야기를 전합니다. 또한 대학 시절부터 늘 붙어 다니던, 그리고 지금까지도 늘 옆에서 응원해주는 **피정현 원장님**, **차인석 원장님**, **노정석 원장님**, 그리고 **문성민 원장님**에게도 감사드립니다. 내 오래된 자랑스러운 벗들이 있어서 힘든 시기를 잘 버티고 참아올 수 있었던 것 같습니다. 이제 나의 사랑하는 가족에게 감사의 인사를 전합니다.

우선 나의 사랑하는 형제들, 먼 타국에 있어 자주 만나진 못하지만 가끔씩 연락해서 막내 동생의 안위를 살뜰히 챙겨주시는 **큰 누나 양윤정**, 형제 중 유일하게 제주도에 계셔서 온갖 집안일을 도맡아 챙기시는 속 깊은 **작은 누나 양윤심**, 나의 인생의 롤 모델이자 치열한 병동에서 환자의 생사와 마주하는 바쁜 와중에도 끊임없이 연구의 노력을 기울이시는 **형 양정훈**, 그리고 종손 집의 머느리로 들어와서 온갖 집안 대, 소사를 맡아 완벽히 해내고 4명의 아이를 낳아 기르면서도 자기 개발에 끊임없이 노력하시는 만능 슈퍼우먼 우리 **형수 이미진**, 또 타국에 계셔서 자주 뵙지 못하고 말로는 서로 잘 통하지는 못하지만 그래도 나를 무척이나 좋아해주던 **큰 매형 사이트 히로무**, 언제 봐어도 친근하고 다정한 **작은 매형 강상보**. 나의 자랑스러운 형제들이 있어서 저는 너무 행복합니다.

그리고 나의 사랑스런 조카들, **사이트 리사**, **강종원**, **양승혁**, **양승운**, **강지원**, **양유지**, **양해은**에게도 사랑한다고 전합니다.

마지막으로 넉넉지 않은 삶 속에도 네 명의 자식들을 보란 듯이 바르고 훌륭하게 길러 내신 존경하는 나의 **아버지 양용수 님**과 사랑하는 나의 **어머니 김봉임 님**에게 진심으로 고개 숙여 감사의 인사를 전합니다. 앞으로도 오래 오래 건강하시기를 바랍니다. 사랑합니다.