

# 繁殖率・生産率向上のための乳牛を対象とした非破壊発情診断

誌名	農業食料工学会誌 = Journal of the Japanese Society of Agricultural Machinery and Food Engineers
ISSN	2188224X
著者名	竹村,豪 Bazar,G. 石川,翔 生田,健太郎 古川,茜 窪田,陽介 Tsenkova,R.
発行元	農業食料工学会
巻/号	77巻3号
掲載ページ	p. 140-145
発行年月	2015年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat





## 繁殖率・生産率向上のための乳牛を対象とした 非破壊発情診断

Non-destructive Diagnosis of Estrus in Dairy Cows for Improvement of  
Reproductive Rate and Production Rate

Go TAKEMURA, Barzar GYORGY, Shou ISHIKAWA, Kentarou IKUTA,  
Akane FURUKAWA, Yosuke KUBOTA, Roumiana TSENKOVA

**キーワード**：発情，近赤外分光法，アクアフォトミクス，ケモメトリックス，  
プロジェステロン

**Keywords**：near-infrared spectroscopy, aquaphotomics, multivariable analysis,  
chemometrics, progesterone



竹村 豪  
(たけむら ごう)

1990年10月生  
2013年神戸大学農学部  
食料環境システム学科  
卒業。  
現在、神戸大学大学院  
農学研究科博士課程前  
期課程修了  
農業食料工学会学生会員  
E-mail: takemura.go@  
gmail.com



BÁZÁR György  
(ジョージ バザール)

1981年3月生  
カポスヴァール大学農  
業生産学部(ハンガリー)  
学部研究員、神戸大学  
生体計測工学研究室、  
日本学術振興会外国人  
特別研究員を経て、  
現在、カポスヴァール大  
学農業生産学部研究員  
E-mail: bazar@agrilib.  
hu



石川 翔  
(いしかわ しょう)

1983年7月生  
2008年3月大阪府立大  
学獣医学科卒業、同年  
4月兵庫県入庁、姫路  
家畜保健衛生所神戸出  
張所、兵庫県農林水産  
技術総合センター研究  
員を経て、  
現在、淡路農業技術セ  
ンター研究員  
E-mail: Shou\_Ishikawa@  
pref.hyogol.jp



生田健太郎  
(いくた けんたろう)

1964年11月生  
1989年宮城県農業共済  
組合連合会入会、1992  
年兵庫県入庁、同年県  
立淡路農業技術セン  
ター研究員、1998年主  
任研究員を経て、  
2012年より主任研究員  
E-mail: Kentarou\_Ikuta  
@pref.hyogol.jp



古川 茜  
(ふるかわ あかね)

1993年2月生  
2015年神戸大学農学部  
食料環境システム学科  
卒業。  
現在、神戸大学大学院  
農学研究科博士課程前  
期課程在学中  
農業食料工学会学生会員  
E-mail: 0211madder@  
gmail.com



窪田陽介  
(くぼた ようすけ)

1979年3月生  
2008年新潟大学ベン  
チャー・ビジネス・ラ  
ボラトリー研究員、生  
研センター基礎技術研  
究部特別研究員を経て、  
現在、神戸大学自然科  
学系先端融合研究環  
境研究部特命助教  
農業食料工学会学生会員  
E-mail: ykubota@people.  
kobe-u.ac.jp



Roumiana TSENKOVA  
(ツェンコヴァ ルミアナ)

1955年11月生  
ルセ大学工学部(ブル  
ガリア)助教授、神戸大  
学農学部助教授を経て、  
現在、神戸大学大学院農  
学研究科教授  
生体計測工学研究室  
農業食料工学会正会員  
E-mail: rtsen@kobe-u.  
ac.jp

### 1. はじめに

現在、全世界で生産されている生乳は、年間約7億tであり、世界的にその需要は拡大の一途を辿っている。一方で、乳牛の繁殖成績の低下が問題となっている(Dochi et al., 2010)。その大きな原因の一つとしては、人工授精や胚移植などを用いた繁殖プログラムの基盤情報となる発情時期の主な診断手法が、発情行動・徴候観察(Lopez et al., 2002)等の目視観察による方法であることが挙げられる。同手法は、再現性、客観性に乏しく、多大な時間や労力、知識や経験を必要とするため、発情の見逃しや誤診断が生じ、空胎期間の延長、乳生産量の低下、屠殺処理に繋がる危険性が指摘されている(Van Vliet, 1996)。そのため近年では、様々な電子自動診断技術が開発されているが(Rorie et al., 2002; Saint-Dozer et al., 2012)、繁殖成績を向上させ、かつ酪農業における経済状況に見合った、効率的で高精度な診断技術として一般的に普及するにはまだ様々な課題が残っている。

一方で、プロジェステロンやエストロゲンに代表される性ホルモンと乳牛の発情との関係性についての研究

が行われており、血清中、尿中、乳中などの性ホルモン濃度を測定することで、行動・徴候観察を行わずに乳牛の性周期を追跡する手法の報告がされている(Christensen et al., 1974; Roelofs et al., 2006; Narendran et al., 1979; Lopez et al., 2002; Domenech et al., 2011; Nelson et al., 1963)。しかし、性ホルモン測定は、エンザイムイムノアッセイやラジオイムノアッセイ、クロマトグラフィー質量分析、高速液体クロマトグラフィー等、多様な測定手法が挙げられるが(Nakagomi et al., 1999; Lopez et al., 2002; Biddle et al., 2007; Zou et al., 2012)、多大な時間や労力、薬品を要するために、酪農業に応用することは容易ではない。

そこで本研究では、迅速、簡便かつ安価な近赤外分光法およびアクアフォトミクスに着目した(Roberts et al., 2004; Tsenkova, 2009)。近赤外分光法は、700-2500nmが波長領域である近赤外光とサンプルとの相互関係を分析することでサンプルに内在する情報を得る手法である。近赤外光は非常に低いエネルギーを持つ電磁波であるため、対象サンプルに対する影響は極めて小さく、生

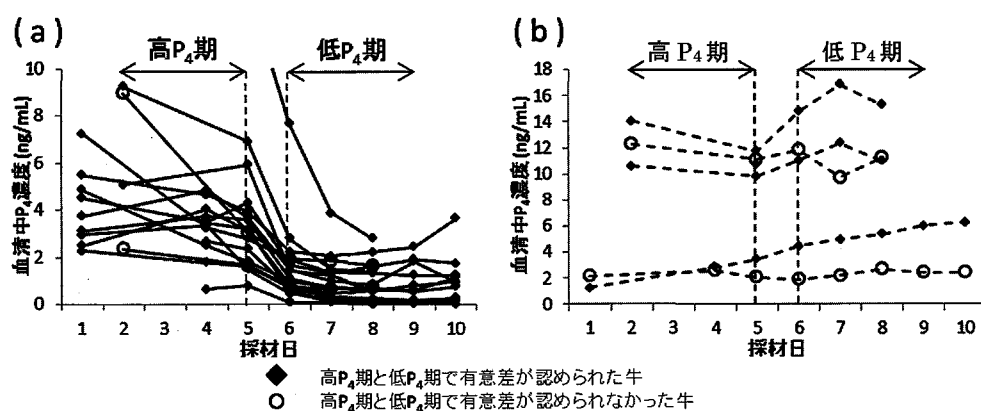


図 1 EIA 法により測定した血清中 P<sub>4</sub> 濃度変化  
(a) 発情同期牛群および (b) コントロール牛群

体などの非破壊分析に非常に有用である。また、アクアフォトミクスは、様々な物質と水分子と光の相互関係を分析し、迅速かつ包括的に生体の情報を得るという新たな科学の概念である。同手法を用いた既往研究としては、生乳中の成分分析 (Tsenkova et al., 2000)、乳牛における乳房炎診断 (Tsenkova et al., 2006; 2009; Morita et al., 2013) があり、近年では、ジャイアントバンダ (Kinoshita et al., 2012) およびオランウータン (Kinoshita et al., 2014) の尿スペクトルから水分子構造が尿中物質濃度を反映していることが示唆され、迅速かつ非破壊による絶滅危惧動物の発情診断への応用可能性が示された。

以上より、本研究では、乳牛の繁殖成績および生産率向上のための発情診断手法の開発を目的とする。本稿では、近赤外分光法およびアクアフォトミクスを用いた迅速、簡便かつ正確な乳牛の乳中性ホルモン濃度水準の診断可能性に関する検討結果について述べる。

## 2. 供試材料および測定サンプル

### (1) 供試材料

本研究では、淡路農業技術センターで飼養されている計 23 頭の乳牛 (ホルスタイン種) を供試牛として用いた。内 17 頭 (牛 A~Q) は、ホルモン剤により発情誘起された発情同期牛群とし、残りの 6 頭 (牛 R~W) については、非発情時期のコントロール牛群とした。

### (2) 乳サンプルの採材方法および期間

乳サンプルは、前搾り乳および生乳とした。前搾り乳は、ミルカーによる搾乳の直前に手搾りにより得られる個体乳であり、前搾り乳サンプル採材後にミルカーにより搾乳された個体乳を生乳サンプルとした。また、前搾り乳サンプルは、牛 D~W (計 20 頭) から採材し、生乳サンプルは、牛 A~W (計 23 頭) から採材した。各乳サンプルは、採材日の午前と午後 2 回ずつ採材した。乳サンプルの採材期間は、発情予定日を中心に前後 1 週間 (計 14 日) 連続で行った。

### (3) 血清サンプルの採材方法および期間

血清サンプルは、各供試牛から 45 mL 採血し、37℃で

30 分間温置した後に 0℃、3000 rpm の条件下で、15 分間遠心分離を行い精製した。採材期間は、ホルモン処置に従い、特徴的な性ホルモンの変動を観察できる範囲で採材した。採材は全て淡路農業技術センター内で行い、採材後は -20℃ でサンプルの保存を行い、分析の際に神戸大学生体計測工学研究室へ移送した。

## 3. EIA 法による血中プロジェステロン測定

乳牛の性周期は約 21 日間であり、その中で卵巣内に黄体が形成され、血中プロジェステロン濃度 (以下、P<sub>4</sub> 濃度) が高い値を保つ時期 (以下、高 P<sub>4</sub> 期) と黄体が退化して低い値を保つ時期 (以下、低 P<sub>4</sub> 期) があり、高 P<sub>4</sub> 期と低 P<sub>4</sub> 期の境界では、P<sub>4</sub> 濃度の急低下が観察される。発情は、血中 P<sub>4</sub> 濃度の急低下が起きた 3~4 日後 (人工授精適期) に発生する (Roelofs et al., 2006; Pemberton et al., 2001)。また、血中 P<sub>4</sub> 濃度と乳中 P<sub>4</sub> 濃度の間には高い相関関係があることから (Dobson et al., 1976; Meisterling et al., 1987)、乳中 P<sub>4</sub> 濃度変化を診断することが、酪農家が搾乳業務中に乳牛の発情時期を診断するのに有用であると考えられる。

そこで本研究では、乳サンプルの採材期間中の発情同期牛とコントロール牛における発情の有無を確認するために、全ての血清サンプルについて、Kinoshita ら (2012) の手法を基に、エンザイムイムノアッセイ (EIA) 法により、マイクロプレートリーダー (iMark: Bio-Rad Laboratories Inc) を用いて血清中 P<sub>4</sub> 濃度測定を行った。また、本手法におけるアッセイ内変動係数およびアッセイ間変動係数はそれぞれ 6.7% と 3.4% であった。

その結果、発情同期牛群では発情同期プログラムに従った高 P<sub>4</sub> 期および低 P<sub>4</sub> 期が EIA 法により測定された P<sub>4</sub> 濃度から確認され、コントロール牛では発情同期牛とは異なるホルモン動態が確認された (図 1)。

## 4. 乳サンプルの近赤外スペクトル測定および解析

### (1) 近赤外スペクトル測定方法

乳サンプルのスペクトル測定前に、乳サンプルを 4℃にて解凍後、6 分間 40℃ で加温した。その後、保存の影

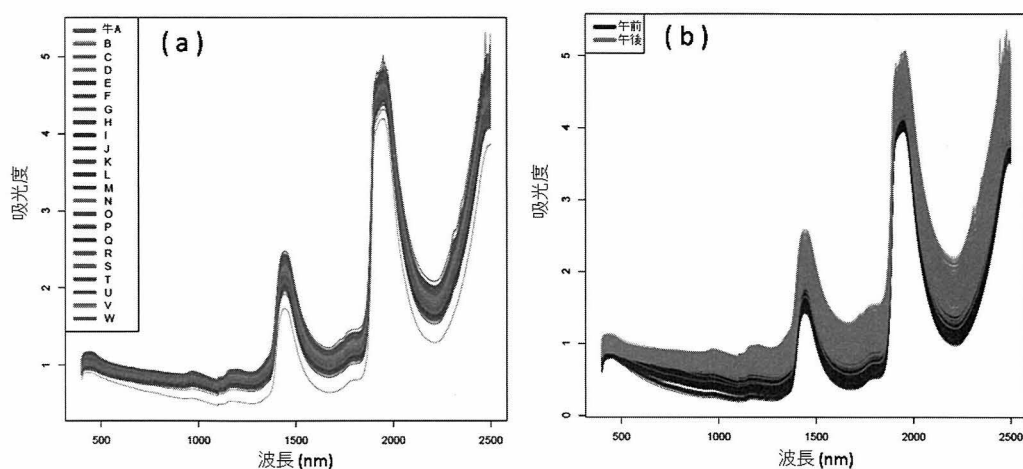


図 2 乳サンプルの生スペクトルと個体差および搾乳時間によるベースライン変動  
(a) 生乳 (午後), (b) 前搾り乳 (午前/午後)

響で分離・凝集した乳サンプル中の脂肪を均一化するために、シリンジと 20G×1 1/2" の注射針を用いてサンプル全体を均質化し、近赤外分光器 (XDS: FOSS) の液体分析用モジュール (Rapid Liquid Analyzer: FOSS) を用いて、透過法による近赤外スペクトル測定を行った。測定波長領域は 400–2500 nm (測定間隔は 0.5 nm) であり、光路長 1 mm の石英キュベットセルを用いて 1 サンプルにつき 3 回連続でスペクトルを測定した。

### (2) 近赤外スペクトル解析

本研究では、EIA 法による血清中 P<sub>4</sub> 濃度測定の結果から、発情同期牛群において P<sub>4</sub> 濃度が急低下を中心とする前後 4 日間をそれぞれ高 P<sub>4</sub> 期と低 P<sub>4</sub> 期と設定し、各期における乳スペクトルを高 P<sub>4</sub> 期スペクトル、低 P<sub>4</sub> 期スペクトルとして分類した。コントロール牛についても、同時期の乳サンプルのスペクトルを発情牛と同様に解析に用いた。

### (3) 乳サンプルの生スペクトル

生スペクトルから、供試牛の個体差、サンプル乳中成分の影響からベースラインの変動が観察された (図 2)。特に乳中の脂肪量は、光の散乱因子として、ベースライン上昇に大きな影響を与える (Tsenkova, 2000)。このため、生乳および前搾り乳のうち午前に搾乳されたサンプルのスペクトルと午後のそれらと比較すると、特に解析波長領域である 1300–1600 nm 付近で脂肪含有量の大きい午後に搾乳されたサンプルの方が高い吸光度を持つスペクトルが得られたため、次項から生乳 (午前)、生乳 (午後)、前搾り乳 (午前)、前搾り乳 (午後) の 4 種類の各乳サンプルでスペクトル解析を行った。

### (4) 差スペクトルによる P<sub>4</sub> 濃度変化に関する波長の抽出

近赤外分光器により 3 回連続で測定された各乳スペクトルを平均し、ランダムノイズ低減のために平滑化を行った後、ベースライン補正として MSC (Multiplicative

Scattering Correlation) を適用した。その後、高 P<sub>4</sub> 期と低 P<sub>4</sub> 期の各乳スペクトルを平均し、差スペクトル (高 P<sub>4</sub> 期–低 P<sub>4</sub> 期) を算出した。

各乳スペクトルから算出した差スペクトルから Leave-one-cow-out 法を用いて、P<sub>4</sub> 濃度変化に関する波長を抽出した。Leave-one-cow-out 法とは、サンプル群から供試牛一頭分のサンプルを除き、残りの全供試牛のサンプルの差スペクトルを平均し、Savitzky-Golay 法に基づく二次微分を適用することで、ピークを示す波長領域を探索し、全供試牛の頭数回ループすることにより、再現性の高い波長領域を抽出する手法である。本研究においては、前搾り乳サンプルにおいては 20 ループ、生乳サンプルにおいては 23 ループで解析を行った。また、全ループの 80% 以上で抽出された各波長領域において、最も抽出された回数が多い波長を P<sub>4</sub> 濃度変化に関する代表波長とした。

Leave-one-cow-out 法によって抽出された代表波長は、生乳 (午前) が 9 波長、生乳 (午後) が 8 波長、前搾り乳 (午前) が 15 波長、前搾り乳 (午後) が 6 波長であった (表 1)。また、抽出された代表波長は、全ループの 92% 以上で抽出されており、代表波長からのシフトも前後 1.00±0.65 nm 以下のため、抽出された代表波長は P<sub>4</sub> 濃度変化に関する深い波長群であると見なした。

### (5) P<sub>4</sub> 濃度変化に関する波長を用いたアクアグラムによる P<sub>4</sub> 濃度診断

Leave-one-cow-out 法により抽出された代表波長を用いて、アクアグラムによる P<sub>4</sub> 濃度診断を行った。アクアグラムとは、次式により特定波長の吸光度を標準化した値 (アクアグラム値) をレーダーチャートとして図示したものである。これにより、高 P<sub>4</sub> 期と低 P<sub>4</sub> 期を視覚的に比較することが可能となる。

$$Aqg_{in\lambda} = \frac{I_{in\lambda} - \bar{I}_{in\lambda}}{\sigma_{in}}$$

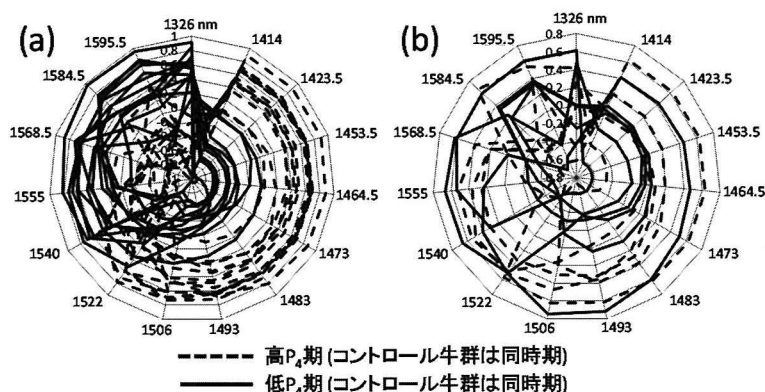


図 3 前搾り乳 (午前) のアクアグラム  
(a) 発情同期牛群および (b) コントロール牛群

表 1 サンプル種ごとの高 P<sub>4</sub> 期と低 P<sub>4</sub> 期でアクアグラム値に有意差が認められた波長群およびその組合せ

生乳(午前) 波長 (nm)	生乳(午後) 波長 (nm)	前搾り乳(午前) 波長 (nm)	前搾り乳(午後) 波長 (nm)
1363.5	1305.5	1326	1429
1407	1326	1414	1447.5
1443.5	1414	1423.5	1475
	1423.5	1453.5	
	1431.5	1464.5	
		1473	
1467.5 (-)	1488	1483	1525
1480 (-)	1500	1493	1561.5
1490	1536	1506	1580
1504	1550	1522	
1534.5	1566	1540	
1551		1555	
		1568.5	
		1584.5	
		1595.5	

■ 高 P<sub>4</sub> 期に低 P<sub>4</sub> 期よりも有意にアクアグラム値が高かった波長  
□ 低 P<sub>4</sub> 期に高 P<sub>4</sub> 期よりも有意にアクアグラム値が高かった波長  
(-) 有意差が認められなかった波長

$A_{gim\lambda}$ : 牛  $i$  の  $\lambda$  nm における第  $n$  日目のサンプルのアクアグラム値  
 $I_{in\lambda}$ : 牛  $i$  の  $\lambda$  nm における第  $n$  日目のサンプルの吸光度  
 $\bar{I}_{i\lambda}$ : 牛  $i$  の  $\lambda$  nm における全サンプルの吸光度の平均  
 $\sigma_{i\lambda}$ : 牛  $i$  の  $\lambda$  nm における全サンプルの吸光度の標準偏差

アクアグラムによる P<sub>4</sub> 濃度診断の結果、各乳サンプルについて、各波長で高 P<sub>4</sub> 期と低 P<sub>4</sub> 期の間にアクアグラム値の差がみられ、大部分の発情同期牛が同じ差のパターンを示していることがわかった (図 3)。これらについて、t 検定 (有意水準 5%) を行った結果、発情同期牛群では、生乳 (午前) の 1467.5 nm および 1480 nm 以外の波長において有意差が認められた (表 1)。しかし、コ

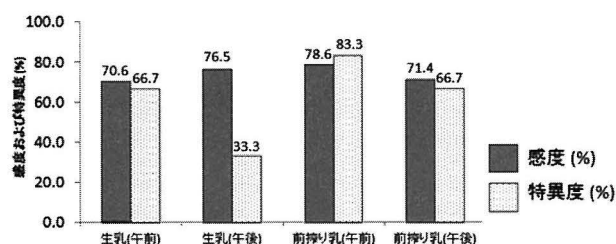


図 4 サンプル種別のアクアグラムの P<sub>4</sub> 濃度診断感度および特異度

ントロール牛群では全波長で有意差が認められなかったため、発情同期牛群から得られた代表波長における高 P<sub>4</sub> 期と低 P<sub>4</sub> 期の差のパターン (以下、P<sub>4</sub> 診断パターン) を用いて、感度と特異度 2 つの指標により、アクアグラムによる乳中 P<sub>4</sub> 濃度変化診断の精度を検討した。

$$\text{感度 (\%)} = \frac{\text{P}_4 \text{ 診断パターンを示した発情同期牛数}}{\text{全ての発情同期牛数}} \times 100 (\%)$$

$$\text{特異度 (\%)} = \frac{\text{P}_4 \text{ 診断パターンを示さなかったコントロール牛数}}{\text{全てのコントロール牛の頭数}} \times 100 (\%)$$

2 つの指標の値を算出した結果、特に前搾り乳 (午前) を用いた場合に 78% 以上の感度および 83% 以上の特異度を得ることができた (図 4)。また、生スペクトルなどから、牛ごとの顕著な個体差が認められたが、代表波長を用いたアクアグラムに関しては、異なる個体間で共通した結果を得ることができたことから、本手法の有用性が示された。

(6) 乳牛と他種動物とのアクアグラムの結果比較  
本研究でアクアグラムに用いた波長群およびその結果と、Kinoshita ら (2012; 2014) がジャイアントパンダお

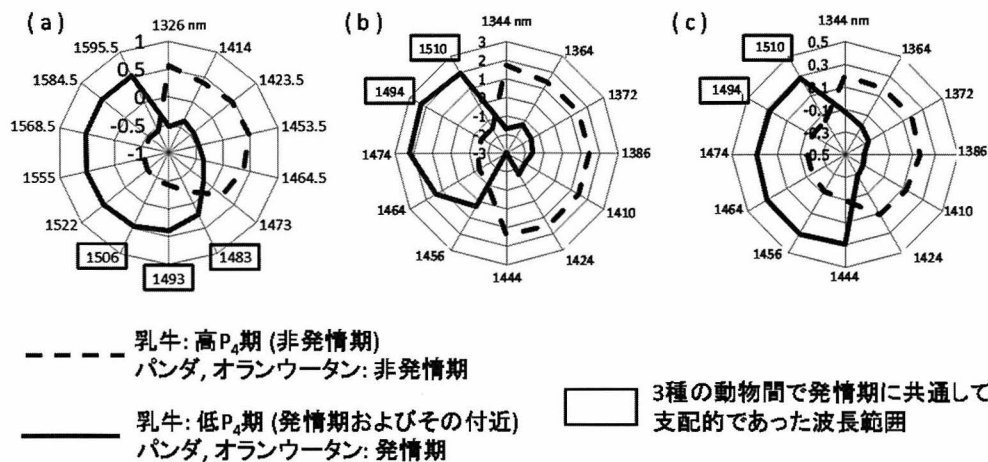


図 5 乳牛赤外スペクトルを用いたアクアグラムによる発情診断の結果とその共通波長  
 (a) 乳牛の乳, (b) ジャイアントパンダの尿, (c) オランウータンの尿

よびオランウータンの尿を用いた発情診断を行う際にアクアグラムに用いた波長群およびその結果を比較した。乳牛においては低 $P_4$ 期が発情時期およびその付近であることを考慮すれば、乳牛、ジャイアントパンダ、オランウータンの3種で共通して、発情時期には1480-1510 nm 付近の吸光度が非発情時期よりも大きくなるという点で共通していた(図5)。また波長の帰属から、発情時期に体液中では、より水素結合の強固な水分子構造( $S_4$ ) (Tsenkoba, 2009) が支配的になる可能性が示唆された。

これらの結果から、乳牛のみならず、複数以上の種に対して本手法が有用であるという可能性も示された。

## 5. おわりに

本報告では、乳牛の繁殖成績および生産率向上のための発情診断手法開発を目指し、その基礎段階として、近赤外分光法およびアクアフォトミクスを用いた、迅速、簡便かつ正確な乳牛の乳中性ホルモン濃度水準の診断可能性を検討した。その結果、特に、水の第一倍音領域の情報が豊富に含まれる1300-1600 nm の範波長範囲から、発情と密接な関係のある性ホルモンである $P_4$ 濃度の変化に関係があると考えられる波長を抽出し、アクアグラムを用いることで $P_4$ 濃度の変化を診断できる可能性を示した。また診断には水分子構造の変化が重要な情報である可能性も示唆された。さらに、他種動物にも同様の手法が応用できる可能性も示された。

一方、より多くの供試牛を用いて結果の再現性を検討していくことが本研究の今後の課題である。その上で、選択的波長のみを用いた乳サンプルによる発情診断が可能であることを立証できた暁には、日々の搾乳業務の中で簡単に利用できるような高精度でかつ簡易でかつ安価な発情診断装置の開発が期待できる。そのような装置を実現することができれば、搾乳業務と同時に採材を行うことができるという点で時間や労力の問題が軽減され、酪農家にとって非常に有用なものとなるだろう。さら

に、搾乳ラインに乳中性ホルモンアッセイによる自動モニタリングシステムを組み込むことで発情診断を行う技術なども提唱されており (Saint-Dizer et al., 2012), 本研究で用いた手法を自動モニタリングシステムに組み込むといった期待もできるのではないだろうか。

また、様々な動物へ本手法を応用することで、畜産動物の生産生向上や絶滅危惧動物保全などに大きく貢献できるものと考えられる。

## 引用文献

- Biddle, S., Teale, P., Robinson, A., Bowman, A., Houghton, E., 2007. Gas chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry analysis to determine natural and post-administration levels of oestrogens in bovine serum and serum. *Analytica Chimica Acta*, 586, 115-121.chata
- Chatani, E., Tsuchisaka, Y., Masuda, Y., Tsenkova, R., 2014. Water molecular system dynamics associated with amyloidogenic nucleation as revealed by real time near infrared spectroscopy and aquaphotomics. *PLoS One*, 9 (7), e101997.
- Christensen, D.S., Hopwood, M.L., Wiltbank, J.N., 1974. Levels of hormones in serum of cycling beef cows. *Journal of animal science*, 38 (3), 577-583.
- Dobson, H., Fitzpatrick, R.J., 1976. Clinical application of the progesterone-in-milk test. *The Veterinary Journal*, 132 (5), 538-542.
- Dochi, O., Kabeya, S., Koyama, H., 2010. Factors affecting reproductive performance in high milk-producing Holstein cows. *Journal of Reproduction and Development*, 56, S61-S65.
- Domenech, A., Pich, S., Aris, A., Plasencia, C., Bach, A., Serrano, A., 2011. Heat identification by  $17\beta$ -estradiol and progesterone quantification in individual raw milk samples by enzyme immunoassay. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14, <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue4-fulltext-6>
- Kinoshita, K., Miyazaki, M., Morita, H., Vassileva, M., Tang, C., Li, D., Ishikawa, O., Kusunoki, H., Tsenkova, R., 2012. Spectral pattern of urinary water as a biomarker of estrus in the giant panda. *Scientific Report*, 2, 856.
- 木下こづえ, 2014. 近赤外分光法を用いた野生動物の生理モニ

- タリング技術の開発. 第30回記念近赤外フォーラム講演要旨集, つくば, 91-94.
- Lopez, H., Bunch, T.D., Shipka, M.P., 2002. Estrogen concentrations in milk at estrus and ovulation in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 72, 37-46.
- Meisterling, E.M., Dailey, R., 1987. Use of concentrations of progesterone and estradiol-17 beta in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 70, 2154-2161.
- Morita, H., Kuroki, S., Ikuta, K., Tsenkova, R., 2013. Real-time near infrared spectral monitoring of mammary gland for inflammation diagnosis in dairy cows. *Journal of near infrared spectroscopy*, 21 (5), 427-433.
- Nakagomi, M., Yamada, K., Matsuki, Y., Kurihara, H., Suzuki, E., 1999. Enzyme immunoassay for the measurement of 17 alpha-estradiol 17-N-acetylglucosaminide in rabbit urine. *Steroids*, 64 (4), 301-307.
- Narendran, R., Hacker, R.R., Smith, V.G., Lun, A., 1979. Estrogen and progesterone concentrations in bovine-milk during the estrous-cycle. *Theriogenology*, 12 (1), 19-25.
- Nelson, D.W., Smith, E.P., 1963. Urinary excretion of estrogenic compounds during estrus and gestation by bovine as determined by 3 assay methods. *Journal of dairy science*, 46 (2), 135-139.
- Pemberton, R., Hart, J., Mottram, T., 2001. An electrochemical immunosensor for milk progesterone using a continuous flow system. *Editors Selection. Biosensors and Bioelectronics*, 16, 715-723.
- Roberts, C.A., Workman Jr, J., Reeves III, J.B., 2004. Near-infrared spectroscopy in agriculture. *American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, USA.*
- Roelofs, J.B., Van Eerdenburg, F.J.C.M., Hazeleger, W., Soede, N.M., Kemp, B., 2006. Relationship between progesterone concentrations in milk and blood and time of ovulation in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 91, 337-343.
- Rorie, R.W., Bilby, T.R., Lester, T.D., 2002. Application of electronic estrus detection technologies to reproductive management of cattle. *Theriogenology*, 57 (1), 137-148.
- Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S., 2012. Towards an Automated Detection of Oestrus in Dairy Cattle. *Reproduction in domestic Animals*, 47, 1056-1061.
- Tsenkova, R., Atanassova, S., Itoh, K., Ozaki, Y., Toyoda, K., 2000. the World Wide Web at: Near infrared spectroscopy for biomonitoring: Cow milk composition measurement in a spectral region from 1, 100 to 2, 400 nanometers. *Journal of animal science*, 78, 515-522.
- Tsenkova, R., Atanassova, S., Morita, H., Ikuta, K., Toyoda, K., Iordanova, I.K., Hakogi, E., 2006. Near infrared spectra of cows' milk for milk quality evaluation: disease diagnosis and pathogen identification. *Journal of near infrared spectroscopy*, 14 (6), 363-370.
- Tsenkova, R., 2009. Introduction aquaphotomics: Dynamic spectroscopy of aqueous and biological systems describes peculiarities of water. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 17, 303-314.
- Van Vliet, J.H., Van Eerdenburg, F.J.C.M., 1996. Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 50, 57-69.
- Zou, Y., Li, Y.H., Jin, H., Tang, H.N., Zou, D.Q., Kiu, M.S., Yang, Y.L., 2012. Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-point extraction. *Analytical biochemistry*, 421 (2), 378-384.