

原著

ハンドリング処置により誘発されるマウスの行動変化と ストレス反応

土江伸誉¹⁾、高橋佑奈²⁾、長永夕奈³⁾、澤野俊憲⁴⁾

1) 兵庫医療大学共通教育センター

2) 兵庫医療大学薬学部

3) 兵庫県立リハビリテーション中央病院看護部

4) 立命館大学生命科学部生命医科学科

Handling Treatment Induces Behavioral Changes and Stress Response in Mice

Nobutaka DOE¹⁾, Yuna TAKAHASHI²⁾, Yuna OSANAGA³⁾, Toshinori SAWANO⁴⁾

1) General Education Center, Hyogo University of Health Sciences

2) School of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences

3) Nursing Department, Hyogo Rehabilitation Center Hospital

4) Department of Biomedical Sciences, College of Life Sciences, Ritsumeikan University

抄 録

動物実験の開始前に行うハンドリング処置は、実験動物を実験者に馴れさせ、実験を効率的に実施するための有効な手段のひとつである。本研究では、ハンドリング処置が、マウスの自発活動性、不安関連行動、および生理的ストレス反応に与える影響について検討した。実験経験のない雄性のC57BL/6N系統のマウスに6分間のハンドリング処置を施した。この処置は、実験者が飼育ケージ内に手を入れてマウスに触れたり、尾を掴んでマウスを持ち上げ、着衣の上で軽く抑制したり、また、ケージ蓋上にマウスを載せ、マウスが嫌がらない範囲で頭部から背部へかけて被毛を撫でるといった操作から構成されていた。その結果、高架式十字迷路における不安関連行動に変化はなかったが、オープンフィールドにおける自発活動性が抑制された。更に、ハンドリング処置の直後より血中コルチコステロン濃度が上昇した。これらの結果は、ハンドリング処置がマウスに行動的・生理学的なレベルでストレス性の変化を誘発することを示唆する。

キーワード：ハンドリング処置、マウス、ストレス、自発活動性、コルチコステロン

Abstract

“Handling treatment,” applied before animal experiment, is one of the effective methods for taming laboratory animals. In this study, we investigated the effect of handling treatment on spontaneous activity, anxiety-related behavior, and physiological stress response in mice. Experimentally naïve

C57BL/6N male mice were gently handled for 6 minutes. The procedure involved pursuing, touching, and holding the mouse by hand in the cage; lifting it by its tail; and mildly restraining it by hand on the laboratory coat. In addition, the mouse was placed on top of the cage and its coat softly stroked over from scruff to back. The handling treatment significantly decreased spontaneous activity in the open field but did not alter anxiety-related behavior in the elevated plus maze. In comparison with controls, the serum corticosterone level of the handled mice was significantly increased. These data indicate that handling treatment can induce stress-related behavioral and physiological alterations.

Key Words : handling treatment, mice, stress, spontaneous activity, corticosterone

I はじめに

現在の医学・生物学領域の動物実験においては、マウスが代表的な実験動物となっている。実験用に生産・供給されているマウスは、概してヒトに対して従順であり比較的容易に取り扱える。ただし、系統や飼育環境によっては活動性や攻撃性が高かったり逃避反応が強く表れたりし、飼育ケージからの取り出しや保定といった種々の取り扱い（ハンドリング）に困難を伴うことがある。ヒトとの接触はマウスにとって潜在的なストレスであり¹⁾、マウスに無用なストレスを負荷しないためには、実験場面はもちろん飼育場面においてもヒトとの接触を必要最小限に留めることが原則である。しかしながら、実験者がマウスに頻繁に触れざるを得ない実験も少なくない。このような実験を行う場合、実験中のマウスの取り扱いを容易にするため、実験の開始に先立って実験者がマウスにあえて積極的に触れるというハンドリング処置を施すことがある。ハンドリング処置に標準化された方法はなく、実験者が自身の経験に基づいた方法で必要に応じて実施しているのが現状であろう。例えば、飼育ケージ内のマウスを捕まえて軽く抑制する、尾を掴んで短時間持ち上げる、あるいは飼育ケージからマウスを取り出して実験者の着衣に掴ませるといった手続きの反復がハンドリング処置となり得る²⁻⁴⁾。こうしたハンドリング処置には、マウスが実験者に馴れるといった効果や実験者がマウスの取り扱いに習熟するといった効果が期待できる。しかしながら、ここで考慮しなければならないのは、ハンドリング処置そのものがマウスに重大なストレス反応を誘発してしまう可能性についてである。実際、ハンドリング処置の構成要素となるマウスの保定・抑制や尾を掴んでの吊り下げは、長時間継続したり反復したりすれば、マウスにストレス反応を誘発することが明らかにされている⁵⁻⁷⁾。

これまで、実験の開始に先立って行われるハンドリング処置に関しては、マウスの取り扱いが容易になるという有用な側面が経験的に知られていた一方、マウスの行動やストレス状態に及ぶ否定的な影響に注目されることは少なかった。そこで本研究では、オープンフィールドを用いた自発活動性の解析、高架式十字迷路を用いた不安関連行動の解析、更に生理的ストレス反応の指標として知られる血中コルチコステロン濃度の測定によって、ハンドリング処置に想定される否定的な側面について検討した。

II 方法

1. 実験動物

日本SLC株式会社より購入した実験経験のない雄性のC57BL/6Nマウス85匹を用いた。これらのマウスは、実験開始時に平均15.0週齢 ($SD = 3.29$) で、平均体重は30.1 g ($SD = 5.82$) であった。マウスは、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度50-60%に維持された動物飼育室内において、アクリル製飼育ケージで3-5匹ずつ集団飼育し、実験開始1週間前より個別で飼育した。動物飼育室内は、明期と暗期が12時間毎に交替する（明期：7：00-19：00）ように設定されていた。餌として乾燥固形飼料（オリエンタル酵母工業社，MF）を与え、自由に摂食・摂水させた。本研究で実施した全ての実験において、マウスの週齢と体重の平均値が等しくなるようにマッチした2群を編成し、一方をハンドリング処置（handling treatment, HT）を施すHT群 ($n = 10-14$)、他方をハンドリング処置なしにケージ内で維持するnoHT群 ($n = 9-12$) とした。なお、本研究の動物実験は、株式会社行医研の動物実験委員会の承認の下、同委員会動物実験および実験動物飼育管理規定に従って実施された（承認番号2017-BP-01, 2018-BP-01）。

2. ハンドリング処置

本研究では、以下のように実験者が6分間にわたってマウスに与える一連の操作をハンドリング処置と定義し、HT群のマウスに個別に実施した。初めの2分間は、滅菌された木屑を敷き詰めたアクリル製飼育ケージにマウスを入れ、実験者がゴム手袋を装着した手でマウスを追いかけて捕まえ、全身を覆うようにしてケージ床面で軽く抑制する処置を、1回あたり約5秒ずつ数秒間隔で10回程度繰り返した (Figure 1A)。次の2分間は、マウスの尾を掴んで持ち上げ、白衣を着用した実験者の腹部に載せ、背中を軽く押し付けながらマッサージした (Figure 1B)。最後の2分間は、(1)ケージの上蓋にマウスを載せ、(2)尾を手前に軽く引いてケージの上蓋に掴まらせ、次いで(3)マウスが嫌がらない範囲で頭部から尾部へかけて背面を反り返らせるように被毛を撫でる、という一連の取り扱い (Figure 1C) を、(1)から(3)の順序で10回程度繰り返した。noHT群のマウスは、滅菌された木屑を敷き詰めたアクリル製飼育ケージへ入れ、そこに10分間放置した。

3. オープンフィールドテスト

マウス用オープンフィールド実験装置 (タイヨー電機株式会社, OF-001 ver.1) を用いた。マウスを放つオープンフィールドは、天井部のない透明アクリル板製の立方体の箱 (各辺30 cm) で、防音チャンバー (縦

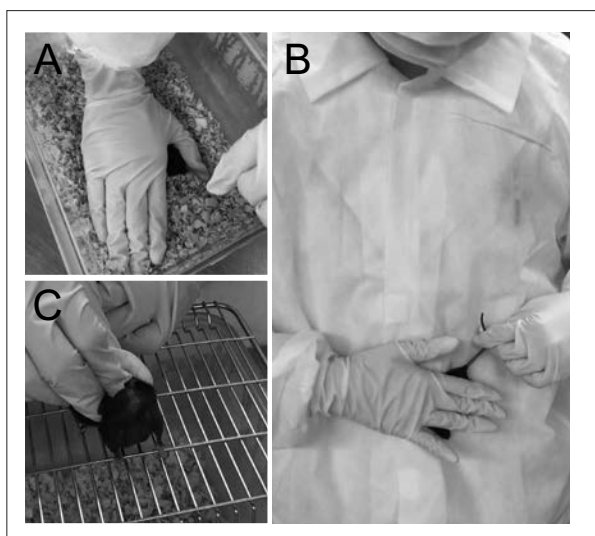


Figure 1. Procedure of handling treatment. Mice in the handling-treated group were individually subjected to the handling treatment for 6 minutes, including pursuing, touching, and holding the mouse with the hand in the cage (A), lifting the mouse by the tail and mild restraint with the hand (B), and stroking over the coat from scruff to back (C).

70 cm × 横60 cm × 高さ50 cm) 内に格納されていた。オープンフィールドの各側面外側、床面から2 cmの位置には、それぞれ2個の赤外線センサーが10 cm間隔で内向きに設置され、マウスが2個のセンサーの前方を連続して遮断すると移動反応 (locomotion) として検出された。更に、向かい合う2側面の床面から4.5 cmの位置にもそれぞれ12個の赤外線センサーが2.5 cm間隔で内向きに並置され、マウスがこれらのセンサーの前方を遮断すると立ち上がり反応 (rearing) として検出された。防音チャンバー内の天井部には白色LEDが取り付けられており、点灯時の照度はオープンフィールドの床面中央部で110 luxであった。また、防音チャンバー背面部には小型換気扇が取り付けられており、換気を行うと共に、その駆動音をマスキングノイズとした。音圧は実験箱の床面中央部で約45 dB(C)であった。

以上のような実験装置を用いて、ハンドリング処置終了の10分後から10分間の試行を1回与えた。マウスをオープンフィールドの床面中央部に置いた後、速やかに防音チャンバーを閉じて行動測定を開始した。試行の開始と終了は、防音チャンバー内の照明の点灯と消灯により規定した。

4. 高架式十字迷路

自作のマウス用高架式十字迷路を用いた。同実験装置の迷路部は灰色のアクリル板製で、1辺10 cmの正方形の中央エリア (center) から、幅5 cm、長さ30 cmのオープンアーム (open arm) と同サイズのクローズドアーム (closed arm) が、互いに90度の角度を保ちながら2本ずつ進展し十字型を形成していた。迷路部は床面から75 cm上方に水平に固定されていた。クローズドアームの両側には透明アクリル板製の高さ15 cmの落下防護壁が取り付けられていた。高架式十字迷路は、高さ120 cmの白い壁で四方が囲まれた一辺140 cmの正方形の実験区画の中央に設置され、実験区画外から蛍光灯で間接照明されていた。その照度は迷路上の中央エリアで約150 luxであった。

以上のような実験装置を用いて、ハンドリング処置終了の10分後から10分間の試行を1回与えた。マウスを実験装置の中央エリアに置き、迷路内を自由に探索させた。マウスの行動は、実験装置の上方約1.5 mに設置したCCDカメラを介してパソコンに記録し、行動解析ソフト (有限会社アイソニック神戸, Be Chase ver.1.3) を用いて、オープンアームとクローズドアームそれぞれへの進入回数、2種類のアームと中

中央エリアそれぞれへの滞在時間、更に、迷路上での移動距離を計測した。各アームへの進入・滞在は、当該のアームへマウスの四肢が入っている状態と定義した。中央エリアへの滞在は、マウスがどのアームへも進入していない状態と定義した。

5. コルチコステロン濃度測定

ハンドリング処置終了の10分後ないしは24時間後、マウスをイソフルラン（ファイザー株式会社）で吸入麻酔した後に開腹し、心臓より採血した。血液は、氷上の1.5 mlチューブに一旦保持した後、4℃に維持しながら8000 rpmで10分間遠心分離し、血清を採取して-30℃で凍結保存した。後日、コルチコステロン測定ELISAキット（Enzo Life Sciences, Inc, ADI-900-097）を用い、キットのプロトコルに準じて血中コルチコステロン濃度を測定した。

6. データ解析

行動実験データの統計的解析は、ハンドリング処置の有無（群）を被験体間要因、試行の経過時間等の実験課題内の変数を被験体内要因とする2要因の分散分析により行い、必要に応じて対応のないt検定を実施した。コルチコステロン濃度については対応のないt検定により群間差を評価した。有意水準はいずれも5%に設定した。

Ⅲ 結果

Figure 2には、ハンドリング処置10分後に実施したオープンフィールドテストにおける移動反応数(A)と立ち上がり反応数(B)の1分毎の推移を示した。

移動反応数は、HT群とnoHT群の両群において試行開始直後に比較的多く、徐々に減少したが、HT群がnoHT群より全体的に少ない傾向にあった。Figure 2Aにまとめたデータに関して、群(2, HT or noHT) ×経過時間(10)の2要因の分散分析を行ったところ、群($F(1, 24) = 7.74, p < .05$) および経過時間($F(9, 216) = 13.47, p < .0001$)の主効果が認められた。両者の交互作用($F(9, 216) = .73, p = .68$)は認められなかった。立ち上がり反応数は、noHT群において試行中徐々に増加する傾向が見られたが、HT群においてはその傾向がやや弱く、一貫してnoHT群より少なかった。Figure 2Bにまとめたデータに関して、群(2, HT or noHT) ×経過時間(10)の2要因の分散分析を行ったところ、群($F(1, 24) = 24.07, p < .0001$) および経過時間($F(9, 216) = 2.26, p < .05$)の主効果が認められた。両者の交互作用($F(9, 216) = 1.06, p = .39$)は認められなかった。

Figure 3には、ハンドリング処置10分後に実施した高架式十字迷路課題における各アームへの進入回数(A)と迷路上の各エリアへの滞在時間(B)を示した。グラフに明らかなように、全ての指標について群間の差は殆ど見られなかった。各アームへの進入回数について群(2, HT or noHT) ×アーム(2, open or closed)の2要因の分散分析を行ったところ、群($F(1, 18) = 1.20, p = .29$)とアーム($F(1, 18) = .67, p = .43$)の主効果、およびこれらの交互作用($F(1, 18) = .20, p = .66$)の全てが有意ではなかった。また、滞在時間に関して群(2, HT or noHT) ×エリア(3, open, closed, or center)の2要因の分散分析を行ったところ、エリアの主効果($F(2, 36) = 6.39, p < .05$)のみが有意であり、テューキーのHSD検定を行ったとこ

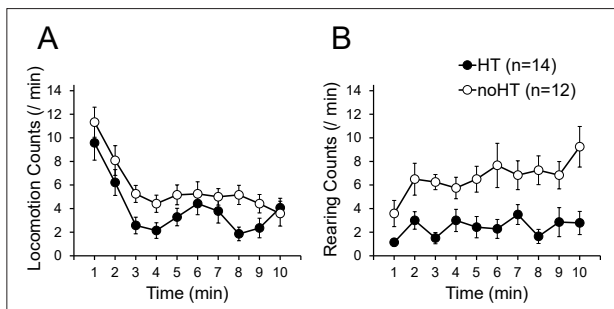


Figure 2. Decreased locomotor activity (A) and rearing behavior (B) of handling-treated mice (HT) and undisturbed control mice (noHT) in the open field test. The open field test was performed 10 minutes after the termination of handling treatment. Data are expressed as mean ± SEM.

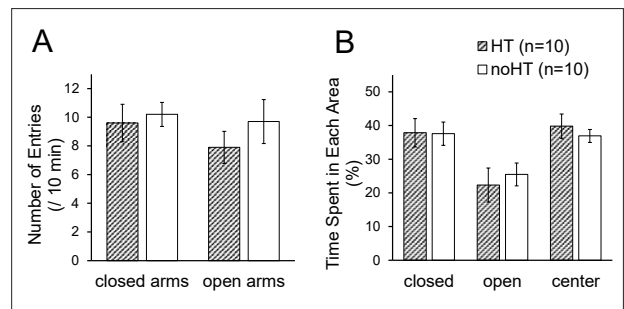


Figure 3. Frequency of entries into open- and closed-arms (A) and time spent on these arms and center area (B) in the elevated plus maze for handling-treated mice (HT) and undisturbed control mice (noHT). The elevated plus maze test was performed 10 minutes after the termination of handling treatment. Data are expressed as mean ± SEM.

ろ、オープンアームへの滞在時間が他のエリアへの滞在時間より有意に短かった ($p < .01$)。群の主効果 ($F(1, 18) = 1.98, p = .18$) と群とエリアの交互作用 ($F(2, 36) = .22, p = .80$) は認められなかった。また、10分間の試行中の平均移動距離は、HT群で1890.4 cm、noHT群で2076.4 cmであり、対応のない t 検定を行ったところ、有意な差は認められなかった ($t(18) = 1.17, p = .26$)。

Figure 4には、ハンドリング処置後の血中コルチコステロン濃度を示した。グラフに明らかなように、HT群の方がnoHT群より値が高かった。ハンドリング処置からの経過時間別に対応のない t 検定を行ったところ、ハンドリング処置10分後 ($t(17) = 2.83, p < .05$) においても24時間後 ($t(18) = 3.59, p < .01$) においても有意な差が認められた。

IV 考察

オープンフィールドテストでは、様々な反応の生起数や移動距離によってマウスの自発活動性が評価されるが、時間経過に伴う活動量の推移によって新奇な環境に対する馴化の評価も可能である⁸⁾。馴化は、基本的な学習形態のひとつであり、認知機能が健全に維持されているか否かの指標になる。本研究で実施したオープンフィールドテストでは、移動反応数も立ち上がり反応数もHT群がnoHT群より有意に少なかった。しかしながら、いずれの群においても移動反応数が徐々に減少していく馴化が明瞭に観察され、その傾向に群間差はなかった。つまり、ハンドリング処置は、オープンフィールドという新奇場面での自発活動性を全体的に低下させるものの、認知的な機能へは殆ど影

響しないことが明らかとなった。実験中のマウスの取り扱いが容易になるという経験的に知られていたハンドリング処置の効果は、この自発活動性の低下が関係していると考えられる。

高架式十字迷路では、オープンアームはクローズドアームと比較してマウスにより強い不安を喚起させるエリアであると仮定され、オープンアームへの進入頻度や同アームでの滞在時間を指標としてマウスの不安に関する特性および状態が評価可能とされている⁹⁾。本研究で実施した高架式十字迷路では、HT群とnoHTの両群でオープンアームへの滞在時間がクローズドアームへの滞在時間より短かったが、各アームへの進入回数、各エリアへの滞在時間、および試行中の移動距離の全てで群間に有意な差は認められなかった。つまり、本研究で使用したマウスの不安関連行動に異常は見られず、ハンドリング処置は高架式十字迷路場面で喚起される状態不安の水準には影響しないことが明らかとなった。

副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンは、ストレス反応経路である視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA系) の亢進を反映する代表的なストレスマーカーとして知られており、様々なストレスの負荷に反応して分泌されることが知られている¹⁰⁾。血中コルチコステロン濃度は、ハンドリング処置10分後においても24時間後においても、HT群がnoHT群を有意に上回っていた。つまり、ハンドリング処置が急性的にストレス反応を誘発し、そのストレス反応が少なくとも24時間後まで持続することが示された。

本研究で実施したハンドリング処置は、行動面の変化を伴う生理的ストレス反応を誘発したことから、マウスにとって嫌悪的な処置であると考えられる。ただし、オープンフィールドテストでは自発活動性が抑制されたものの馴化に影響は見られず、高架式十字迷路でもコルチコステロン濃度の上昇と並行してしばしば観察される不安関連行動の異常^{11, 12)} は検出されなかった。したがって、本研究で観察された行動変化は認知機能の低下や情動制御の障害ではなく、誘発されたストレス反応はマウスの適応性を損なう水準には達していない比較的低強度のものであったと推測される。

本研究のハンドリング処置は、マウスの飼育管理や実験の実施に際して飼養者や実験者が日常的に行う可能性がある操作の組み合わせであった。Longordoらは、C57BL/6系統のマウスを用いた実験で、飼育ケージを揺らす、マウスに手で触れる、あるいは飼育ケージをタップするといった種々の刺激提示からなる軽い

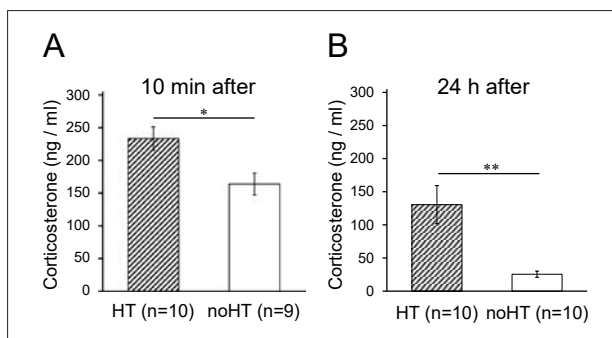


Figure 4. Serum corticosterone levels of handling-treated mice (HT) and undisturbed control mice (noHT) 10 minutes (A) and 24 hours (B) after the termination of handling treatment. Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance of difference was revealed by Student's t -test. * $p < .05$, ** $p < .01$.

ハンドリング (gentle handling) でさえも、1日に3分間6日間連続で処置することで行動変化を伴うストレス反応が誘発されることを明らかにしている²⁾。また、Clarksonらは、同系統のマウスを用いた実験で、尾を掴んで30秒間吊り下げる処置を1日2回9日間にわたって反復することで無快感症状の指標とされている甘味溶液の選好低下が誘発されることを明らかにしている¹³⁾。これらの研究は、マウスの飼育管理や実験に際して日常的に行われているおよそ全ての操作がストレス反応を誘発する可能性があることを示唆する。本研究において、ハンドリング処置を構成するどの要素がストレス反応を誘発したのかを特定することは困難である。しかしながら、軽いハンドリングや尾を掴んで持ち上げるといった処置は短時間であればストレス反応を惹き起こさないとする報告²⁾ や被毛をやさしく撫でるハンドリングはうつ行動の誘発を緩和するといった報告⁴⁾ もある。これらの知見を勘案すると、本研究では、ケージ内および処置者の着衣上で行った一時的な抑制・拘束がストレス反応を誘発した主たる要因であった可能性が高い。HPA系は、身体的な抑制・拘束に対して敏感に反応し¹⁴⁾、マウスでは僅か3分間の処置でさえ血中コルチコステロンを上昇させる¹⁵⁾。ただし、本研究で実施した6分間のハンドリング処置の内、マウスの動きを抑制したのは計2分間程度に過ぎず、しかも採血ホルダーのような器具を用いた拘束とは異なり、マウスの自由を完全に奪う処置ではなかった。このように物理的な負荷という意味ではむしろ緩やかと考えられる抑制・拘束をごく短時間施しただけであるにも関わらず、HT群の血中コルチコステロン濃度は急激に上昇し、24時間経過後もnoHT群より明らかに高い水準が維持されていた。器具を用いた場合、数十分間の抑制・拘束であっても、単回の処置であれば、コルチコステロン濃度の上昇は処置後数時間以内に速やかに低下するというデータが多く¹⁶⁻¹⁸⁾、24時間にも及ぶ抑制・拘束であっても、処置から24時間後にはベースラインに回帰するという報告もある⁶⁾。すなわち、本研究のハンドリング処置に含まれる抑制・拘束は、行動面において重篤な機能異常をもたらさないことから嫌悪性が低いと推定される反面、持続的なストレス反応を誘発するという点が特徴的であると言えよう。抑制・拘束処置は用いる器具の属性によって誘発されるストレス反応の質と強度が異なることも示唆されており¹⁹⁾、ヒトが手で行う抑制・拘束には、器具で行う抑制・拘束とはストレスサーとして異なる特性があるのかも知れない。ただし、ハンドリング処置

によってマウスに誘発される行動変化には系統差があることも示唆されており⁷⁾、本研究で観察された持続的なストレス反応がC57BL/6N以外の系統のマウスでも生じるのか否かについては今後検討する必要がある。

本研究により、ハンドリング処置は、ごく短時間であってもマウスの行動面の変化を伴うストレス反応を惹き起こすことが明らかとなった。ハンドリング処置には、実験中のマウスの取り扱いが容易になるという有用な効果が期待できる一方、実験データに影響しかねないストレス反応を誘発するという否定的な側面もあることに留意し、実施するか否かは、研究目的や実験内容に応じて適切に判断すべきであると考えられる。

謝辞

本研究の実施にあたり、実験動物の飼育管理と行動実験の実施についてご協力いただいた澄田美保氏（株式会社日医研）に深く感謝致します。

文献

- 1) Sorge, R. E.; Martin, L. J.; Isbester, K. A.; Sotocinal, S. G.; Rosen, S.; Tuttle, A. H.; Wieskopf, J. S.; Acland, E. L.; Dokova, A.; Kadoura, B.; Leger, P.; Mapplebeck, J. C. S.; McPhail, M.; Delaney, A.; Wigerblad, G.; Schumann, A. P.; Quinn, T.; Frasnelli, J.; Svensson, C. I.; Sternberg, W. F.; Mogil, J. S. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods*. 2014, vol.11, p.629-632.
- 2) Longordo, F.; Fan, J.; Steimer, T.; Kopp, C.; Lüthi, A. Do mice habituate to "gentle handling"? A comparison of resting behavior, corticosterone levels and synaptic function in handled and undisturbed C57BL/6J mice. *Sleep*. 2011, vol.34, p.679-681.
- 3) Meijer, M. K.; Sommer, R.; Spruijt, B. M.; van Zutphen, L. F. M.; Baumans, V. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. *Lab Anim*. 2007, vol.41, p.161-173.
- 4) Neely, C.; Lane, C.; Torres, J.; Flinn, J. The effect of gentle handling on depressive-like behavior in adult male mice: Considerations for human and rodent interactions in the laboratory. *Behav Neurol*. 2018, vol. 2018, article ID 2976014. <https://doi.org/10.1155/2018/2976014>
- 5) Balcombe, J.P.; Barnard, N. D.; Sandusky, C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2004, vol.43, p.42-51.
- 6) Chu, X.; Zhou, Y.; Hu, Z.; Lou, J.; Song, W.; Li, J.; Liang, X.;

- Chen, C.; Wang, S.; Yang, B.; Chen, L.; Zhang, X.; Song, J.; Dong, Y.; Chen, S.; He, L.; Xie, Q.; Chen, X.; Li, W. 24-hour-restraint stress induces long-term depressive-like phenotypes in mice. *Sci Rep.* 2016, vol.6, 32935. <https://doi.org/10.1038/srep32935>
- 7) Hurst, J.; West, R. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods.* 2010, vol.7, p.825-826.
- 8) Muller, U.; Cristina, N.; Li, Z. W.; Wolfer, D. P.; Lipp, H. P.; Rulicke, T.; Brandner, S.; Aguzzi, A.; Weissmann, C. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell.* 1994, vol.79, p.755-765.
- 9) Hogg, S. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996, vol.54, p.21-30.
- 10) Bowers, S. L.; Bilbo, S. D.; Dhabhar, F. S.; Nelson, R. J. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain Behav Immun.* 2008, vol.22, p.105-113.
- 11) Chotiawat, C.; Harris, R. B. S. Increased anxiety-like behavior during the post-stress period in mice exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav.* 2006, vol.50, p.489-495.
- 12) Macedo, G. C.; Morita, G. M.; Domingues, L. P.; Favoretto, C. A.; Suchecki, D.; Quadros, I. M. H. Consequences of continuous social defeat stress on anxiety- and depressive-like behaviors and ethanol reward in mice. *Horm Behav.* 2018, vol.97, p.154-161.
- 13) Clarkson, J. M.; Dwyer, D. M.; Flecknell, P. A.; Leach, M. C.; Rowe, C. Handling method alters the hedonic value of reward in laboratory mice. *Sci Rep.* 2018, vol.8, 2448. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20716-3>
- 14) Buynitsky, T.; Mostofsky, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009, vol.33, p.1089-1098.
- 15) Raber, J.; Akana, S. F.; Bhatnagar, S.; Dallman, M. F.; Wong, D.; Mucke, L. Hypothalamic-pituitary-adrenal dysfunction in Apoe^{-/-} mice: Possible role in behavioral and metabolic alterations. *J Neurosci.* 2000, vol.20, p.2064-2071.
- 16) Ahn, T.; Bae, C. S.; Yun, C. H. Acute stress-induced changes in hormone and lipid levels in mouse plasma. *Vet Med (Praha).* 2016, vol. 61, p. 57-64.
- 17) McGill, B. E.; Bundle, S. F.; Yaylaoglu, M. B.; Carson, J. P.; Thaller, C.; Zoghbi, H. Y. Enhanced anxiety and stress-induced corticosterone release are associated with increased Crh expression in a mouse model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, vol.103, p.18267-18272.
- 18) Ridder, S.; Chourbaji, S.; Hellweg, R.; Urani, A.; Zacher, C.; Schmid, W.; Zink, M.; Hörtnagl, H.; Flor, H.; Henn, F. A.; Schütz, G.; Gass, P. Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci.* 2005, vol.25, p.6243-6250.
- 19) Shoji, H.; Miyakawa, T. Differential effects of stress exposure via two types of restraint apparatuses on behavior and plasma corticosterone level in inbred male BALB/cAJcl mice. *Neuropsychopharmacol Rep.* 2020, vol.40, p.73-84. <https://doi.org/10.1002/npr2.12093>