

ゾウリムシの凍結保存技術の実用化

¹ 山口大学 中高温微生物研究センター

² 石巻専修大学 理工学部生物科学科

³ 信州大学 大学院総合医理工学研究科

⁴ 島根大学 学術研究院農生命科学系

藤島政博^{1†}, 芳賀信幸², 秋山佳丈³, 渡部広機³, 児玉有紀⁴

Practical Application of Cryopreservation Technology in *Paramecium*

Masahiro FUJISHIMA^{1†}, Nobuyuki HAGA², Yoshitake AKIYAMA³, Hiroki WATANABE³, Yuuki KODAMA⁴

¹ Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, Yamaguchi University, Yoshida 1677-1, Yamaguchi 753-8515, Japan

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Technology, Ishinomaki Senshu University, Shinmito 1, Minamisakai, Ishinomaki 986-8580, Japan

³ Department of Biomedical Engineering, Graduate School of Medicine, Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda, Nagano 386-8567, Japan

⁴ Institute of Agricultural and Life Sciences, Academic Assembly, Shimane University, 1060 Nishikawatsu-cho, Matsue, Shimane 690-8504, Japan

([†]Corresponding author, e-mail: fujishim@yamaguchi-u.ac.jp)

The ciliate *Paramecium* species are giant eukaryotic cells of 100-250 μm in length and have been used in various researches as model organisms. Successful cryopreservation with DMSO (dimethyl sulfoxide) had been reported. However, due to unstable and low survival rate after the thawing, these methods could not be put into practical use in long-term preservation programs for large numbers of strains. Therefore, majority of *Paramecium* researchers have prevented senescence by culturing paramecia at low temperatures (about 10°C) to suppress the rate of the cell division, because the lifespan of *Paramecium* is determined by the number of the cell divisions after fertilization. However, even with this method, clonal death due to aging cannot be avoided. In our research, conventional cryopreservation methods using DMSO have been improved and are beginning to be put to practical use. This improved method consistently resulted in higher post-thaw survival than other previous methods. This method currently yielded viable cells after thawing in *P. caudatum*, *P. bursaria*, and *P. woodruffi*, and further improvements are expected to increase the number of species that can be cryopreserved.

(Received July. xx, 2023; Accepted Xxx. xx, 2023)

緒 言

Paramecium 属 (繊毛虫綱, Oligohymenophorea) は、世界中の淡水と汽水に広く生息する繊毛虫で培養が容易であることからさまざまな研究分野で利用されている。*Paramecium* 属の凍結保存技術は下記の理由により必要である。

- ・種, syngen, 接合型の標準株の保存
- ・老化の阻止と老化の特定時期の保存
- ・継代培養による変異蓄積の阻止
- ・同一株の長期利用と維持の労力削減
- ・宿主外培養困難な細胞内共生及び寄生生物の宿主ごとの保存

Paramecium 属にはこれまでに 50 種以上が報告されているが、記載ミスや絶滅した可能性がある種を除いた 35 種の存在が現在確認されている。その中で研究材料として特に利用者が多いのは *P. caudatum* (和名：ゾウリムシ)、*P. bursaria* (和名：ミドリゾウリムシ)、*P. tetraurelia* (和名：ヨツヒメゾウリムシ) の 3 種である。

この総説では、「1. *Paramecium* 属の特徴」、「2. 凍結保存の技術開発の歴史」、「3. 老化株の凍結保存に必要な新たな技術開発」を紹介する。

1. *Paramecium* 属の特徴

Paramecium 属を凍結保存し、解凍後に生細胞を増殖させて利用するには、その細胞構造と生活環の特徴の理解が必要である。*Paramecium* 属の細胞は、「ぞうり」の形をしており、細胞長は最小の *P. polycaryum* が約 100 μm 、最大の *P. multimicronucleatum* が約 250 μm ¹⁾で、哺乳類の培養細胞に比べて極めて大きく多様な機能と構造を持つ単細胞の真核生物である。この細胞のサイズと複雑な構造が凍結保存を困難にしている最大の要因になっていると思われる。*P. woodruffi* と *P. calkinsi* は汽水域でも採集できるが、全種が淡水で培養可能である。つまり、*Paramecium* 属は低浸透圧環境に適応した種なので、凍結と解凍の際には浸透圧の変化の影響を考慮する必要がある。

総説

[Key words: Protist, *Paramecium*, Cryopreservation, Senescence, Lifespan; 原生生物, パラメシウム, 凍結保存, 老化, 寿命]

培養に用いるエサは、細菌や小型の藻類で、実験室では、細菌の *Enterobacter aerogenes* や *Klebsiella pneumoniae*、藻類の *Chilomonas paramecium* や *Chlorogonium elongatum* などが使われ、無菌培養も可能である²⁻⁴⁾。

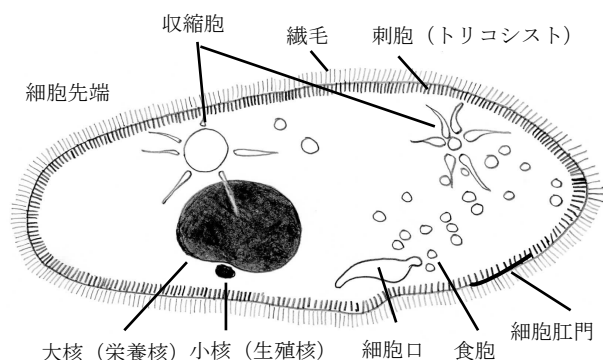


Fig. 1. Cell structures of *P. caudatum*.

Fig. 1 に *P. caudatum* の細胞構造を示した。細胞内には 1 個の受精核から分化した機能と形が異なる 2 種の核 (多細胞生物の体細胞核に相当する大核と生殖細胞核に相当する小核) が存在する。*Paramecium* 属ではどの種も大核は 1 個であるが、小核の数と形は種によって異なっている¹⁾。小核は生活環を通じて転写活性の検出が困難であるが⁵⁾、有性生殖過程では減数分裂を行なって半数体の配偶核と受精核になり、その受精核から次世代の大核と小核が分化する。一方、大核は細胞周期を通じて転写活性が高く維持されているが、有性生殖過程で退化消失する一世代限りの核である。従って、小核を抜きとられても大核さえあれば、細胞はその世代を生きることができる⁶⁻¹⁰⁾。しかし、小核を抜き取った無小核細胞は細胞咽頭の長さが 1/3 に短縮し、食胞形成能と細胞分裂速度も 1/3 に減少するが、小核を移植するとこれらの異常の全てが直ちに回復する。また、小核を移植しなくても約 1 ヶ月後には異常の全てが自然に回復する⁹⁾。これは、小核は転写活性が不活発であるが無性生殖過程では口部装置の細胞咽頭の形態形成に関与しており、小核が除去されて約 1 ヶ月経つと大核で発現が抑制されていた同機能が復活することを示唆している。

光学顕微鏡で見える他の大きな構造としては、2 個の収縮泡、細胞口と細胞肛門、トリコシスト (刺胞)、繊毛、食胞などがある。また、多数の核内共生

細菌や細胞質内共生細菌，細胞質内共生藻の存在が知られ，細胞内共生の成立機構の解明にもよく使われている¹¹⁾．細胞の先端を叩くと繊毛を逆転して後方に泳ぎ，細胞後端を叩くと繊毛運動の速度を早めて前方に泳ぐので機械的刺激に対するセンサーを持っており，障害物を避けるために遊泳方向を変更する時や天敵から逃げる時に役立っている．

さらに，*P. bursaria* はクロレラなどの細胞内共生藻の光合成に適切な照度に集まる機能を備えている¹²⁾．*P. caudatum* では，温度勾配をつけた水槽に移すと以前に培養されていた水温に集まるが，以前と異なる水温に移すと時間経過に伴って前の水温の記憶を捨てて，新たな水温を学習した行動を示す¹³⁾．また，他の繊毛虫の *Tetrahymena thermophila* とは異なり（菅井俊郎氏，私信），*Paramecium* 属では活発な原形質流動が見られる．

Paramecium 属はその細胞質に比べて浸透圧が低い環境に棲んでいるため，細胞内に流入する水を細胞外に排出する必要がある．細胞の前後に一個ずつある収縮胞が交互に開閉してその機能を担っている¹⁴⁾．そのため，収縮胞の機能が低下すると，細胞は膨潤して死ぬ．食胞は細胞口の奥の細胞咽頭が膨らんで切り離されることで作られ，それにアシドソームとリソソームが融合して食胞内に取り込んだエサの消化が行われる^{15, 16)}．食胞内に残った未消化物は食胞が細胞肛門に融合することで細胞外に排出されて沈殿するので食胞形成活動は水の浄化の役割も果たしている．増殖曲線の定常期初期の細胞は飢餓状態初期のために食胞数が少ない．したがって，凍結保存を成功させるためには収縮胞の機能維持だけでなく，高いリソソーム酵素活性を持つ食胞が少ない定常期初期の細胞^{16, 17)}を使うか，食胞膜の損傷を防ぐ対策が重要になる．

Paramecium 属には，形態では識別できない遺伝的に隔離された syngen¹⁸⁾と呼ばれるグループが存在する種がある．*P. caudatum* ではかつては 16 種の syngen が保存されていたが，凍結保存技術が開発される前にインキュベータの故障事故でその多くが失われ，現在，生体保存されている syngen は 7 種類だけになっている．この 7 種の syngen は今は著者らによって液体窒素で安全に凍結保存されている．*P. caudatum* の各 syngen には O 型と E 型と呼ばれる 2 種の性が存在し，形態では識別できないので接合

型と呼ばれている．増殖曲線の定常期初期に O 型と E 型の接合型細胞を混合すると，細胞口がある側の繊毛同士の接着（交配反応）で細胞凝集塊ができ，25°C で約 45 分後に細胞先端で緩く接着した接合対 (holdfast union) が形成され，さらに約 45 分経過すると接着域が細胞口付近まで広がった強固な接合対 (paroral union) が形成される¹⁹⁾．交配反応は異なる syngen の接合型細胞間では起こらないが，接合対は同じ接合型や異なる syngen の細胞間でも接合型に非特異的に形成される．接合対を形成した細胞では G1 期の小核が減数分裂前 S 期を経て減数分裂を行って 4 個の半数体核を作るが，細胞口近くの 1 個の半数体核だけがさらに DNA を複製して 2 個の半数体核（移動核と静止核）になり，接合した細胞間で移動核を相互に交換して自分の細胞に残っている静止核と融合して 1 個の受精核を作る．接合対は 25°C で約 13 時間後に解離し，各接合完了体の受精核は分裂して次世代の大核と小核に分化し，この間に親世代の大核（旧大核）は退化消滅する．

接合型 E の細胞は飢餓状態になりすぎるとクローンを構成する細胞の一部が O 型に一時的に性転換するので，クローン内で接合（自系接合）が行われて子孫が誕生する．一方，O 型細胞は性転換をしない．接合完了体は，50-60 回（25°C での培養期間 17-20 日）の細胞分裂を行うまでは未熟期と呼ばれる交配反応能力を発現できない時期にあり．それが過ぎると成熟期になって，増殖曲線の定常期初期に O 型か E 型の接合型を発現して相補的接合型細胞と混合されると交配反応が行われる．子孫の接合型はメンデルの遺伝の法則に従って決定され，前述のように，成熟期の E 型細胞は飢餓状態になりすぎると一時的に O 型に性転換するようになる．この自系接合能力は E 型のみでも子孫の作成を可能にする生存戦略であるが老化の初期症状でもある¹⁹⁾．

一方，*P. bursaria* には，6 種の syngen と各 syngen に 4 種または 8 種の接合型があり²⁰⁾，同じ syngen 内の異なる接合型細胞を混合すると交配反応の後に接合対が形成される²⁰⁻²²⁾．*P. bursaria* の交配反応活性の発現にはサーカディアンリズムがあって，明暗周期を 12 時間：12 時間で培養すると明期でだけ交配反応活性を発現して接合する²¹⁾．また，*P. bursaria* には光センサーの存在が示唆されている^{12, 23)}．

P. tetraurelia には相補的な接合型が 2 種存在するが、この種は飢餓状態になると交配反応活性を発現して接合するだけでなく、接合せずに 1 細胞だけで小核が減数分裂を行って受精核を形成して次世代の大核と小核を分化させる自家生殖能力も持っている。自家生殖による子孫は全ての遺伝子型がホモ接合体になる。性転換や自家生殖は、1 種類の性だけでも子孫の作成を可能にする生存戦略で、*Paramecium* 属では *P. jenningsi* も自家生殖能力を持っている。自家生殖能力を持つ種を凍結する場合には、その培養に自家生殖による子孫が混入している可能性があるので凍結前に培養の再クローニングが必要である。接合完了体が自家生殖能力を発現する前に凍結すれば子孫の混入の心配は無い。

Paramecium 属の 1 細胞周期に要する時間と細胞分裂回数／日は種によって異なり、25°C では、*P. caudatum* が約 8 時間（3 回／日）で、*P. bursaria* が約 24 時間（1 回／日）、*P. tetraurelia* が約 6 時間（4 回／日）である。*Paramecium* 属には老化と寿命があることに注意が必要である。接合完了体や自家生殖完了体は、その後の細胞分裂回数に依存して老化し、種ごとの限界細胞分裂回数（寿命）に達するとクローン死する²⁴⁾。*P. caudatum* の限界細胞分裂回数は 600-750 回、*P. tetraurelia* は 250-330 回である²⁵⁾。ちなみに、*P. tetraurelia* では、老化してもテロメアの長さが短縮しないことが明らかにされている²⁶⁾。このことは、*P. tetraurelia* だけでなく *Paramecium* 属の限界細胞分裂回数（寿命）がテロメアの長さ以外の未知の方法で決定されていることを示唆している。

P. bursaria の限界細胞分裂回数は未解明のままであるが、30 年以上も前に採集や寄託で受け入れた複数株が現在でも増殖を継続し、寿命の記録を更新中である（藤島政博、未発表）。この種では性転換による自系接合や自家生殖能力が報告されていないので長寿命の可能性がある。

老化が進行すると、*P. aurelia* 種では細胞分裂速度、DNA 合成能、RNA 合成能、DNA 修復機能、食胞形成能、稔性、核小体の体積などが減少し、形態異常、染色体異常、リソソーム数・リソソーム酵素活性、UV 感受性が増加する²⁴⁾。*P. caudatum* では老化によって交配反応活性、稔性、細胞分裂速度、細胞のサイズなどが減少し、クローン内に核分裂異常で出現する無小核細胞が増える。老化株を接合させると退

化途中の旧大核の再生 (Macronuclear-regeneration, MR)を行う接合完了体数が増加する。これは受精核からの新大核の分化に異常が生じたためと考えられている。増殖曲線の定常期初期の細胞の大核と小核は顕微分光測光法で測定した DNA 量からは G1 期²⁷⁾で同調して停止しており、細胞質内の食胞数も少ない。したがって、凍結保存を行う際には、老化の程度や増殖曲線のどの時期の細胞を凍結するかによって同一株でも解凍後の生存率に違いが出ることが予測される。解凍後の細胞を長期間使用するためには、受精後の細胞分裂回数が少ない若い細胞を凍結することが望ましい。しかし、凍結保存したい重要株がすでに老化している場合には、この総説の 3 に記載した新たな技術開発が必要になる。

2. 凍結保存の技術開発の歴史

Paramecium 属では、DMSO (Dimethyl sulfoxide)を使用した凍結保存技術の開発が行われてきた。Simon (1971)²⁸⁾と Simon and Schneller (1973)²⁹⁾は 7.5% (v/v) DMSO を含む凍結保護剤と液体窒素を用いて *P. aurelia* の 4 種で凍結解凍後に生細胞を増殖させることに成功したが、増殖できた細胞数は解凍された細胞数の 1.4%程度であった。また、Daggett and Nerad (1992)³⁰⁾も 7.5% (v/v) DMSO を含む凍結保護剤と液体窒素を用いて *P. aurelia*, *P. jenningsi*, *P. polycarium*, *P. sonneborni* の凍結保存に成功し、その方法の一部を変更して *P. caudatum* と *P. multimicronucleatum* の凍結保存にも成功した。その後、孫ら(1996)³¹⁾は 5% (v/v) DMSO を含む凍結保護剤と液体窒素を用い、Krenek and Berendonk (2009)³²⁾は 7.5% (v/v) DMSO を含む凍結保護剤と液体窒素を用い、Sasaki ら(2010)³³⁾は 5% (v/v) DMSO を含む凍結保護剤とディープフリーザーを用いて *P. caudatum* の凍結保存に成功した。Krenek and Berendonk (2009)³²⁾はプログラムフリーザーを使用し、Sasaki ら(2010)³³⁾は、長さ 90 mm（内径 1 mm）のガラス管に対数増殖期の細胞を入れて凍結した。しかし、Krenek and Berendonk (2009)³²⁾の方法は特殊な設備が必要であり、Sasaki ら(2010)³³⁾の方法は簡易で極めて再現性が高いが、長いガラス管を使用するので、凍結サンプル数が多い時の整理方法と液体窒素タンクの利用が難しい。そこで、我々は、凍結保存の実

用化に必要な4要件(1.簡単な設備と方法で凍結保存と解凍が可能, 2.小スペースに凍結細胞の保存が可能, 3.解凍後に増殖を再開する細胞数が安定して多い, 4.多くの種と株に利用可能な方法)を満たす方法の開発を目指した。4の「多くの種と株に利用可能な方法」を満足するにはまだ不十分であるが, 我々は Sasaki ら(2010)³³⁾の方法を液体窒素タンクの利用にも対応できるように部分的に変更した。その結果, *P. caudatum* については液体窒素で全7種の syngen の標準株の凍結保存を完了した。

以下にその凍結と解凍の方法の概要を紹介する。

- 1) 試験管培養の若い定常期初期の細胞を手回し遠心機で濃縮
- 2) 等量の凍結保護剤[最終濃度 5% (v/v) DMSO, 1.5% (w/v) BSA (Bovine Serum Albumin), Dryl 氏液³⁴⁾ (2 mM Sodium citrate, 1.5 mM CaCl₂, 2 mM Na-K リン酸緩衝液, pH 7.2)]と混合
- 3) 10 μ L ガラス管 (Hirshmann, 32 mm)に毛细管現象で2)の細胞浮遊液を吸引 (100-200 cells/tube)
- 4) ガラス管をナイロン袋に入れ, 4 隅をポリシーラーで閉じる (ガラス管 5 本/袋)
- 5) ディープフリーザー(-80~-85°C)で急速凍結
- 6) ナイロン袋を 35°Cの温湯で解凍
- 7) 実体顕微鏡で遊泳細胞数/各ガラス管をカウント
- 8) 1本のガラス管内の細胞浮遊液を約 1 mL のレタスジュース培養液に押し出し, 遊泳細胞を個別に培養

上記の5)と6)の代わりに下記の5)'と6)'も行った。

- 5)' 4)のガラス管入りナイロン袋を 1.8 mL クライオバイアル(Nalgene)に押し込み, 1本のクライオケーン(Nalgene)に5本のバイアルを取り付け, さらにクライオスリーブ(Nalgene)をケーンに装着して液体窒素タンクの気相と液相で急速凍結
- 6)' クライオバイアルから取り出したナイロン袋を 35°Cの温湯で解凍

また, 上記5)'の後にディープフリーザーで凍結してから, 液体窒素タンク内の気相と液相で凍結し, その後 35°Cの温湯で解凍する方法も行った。

これらのいずれの方法でも凍結解凍後に遊泳細胞が8%以上(株によって30%以上)得られ, その約10%が増殖してクローン化した。液体窒素タンクの液相と気相に1年間保存後に解凍しても凍結直後に解凍した場合と同様の遊泳細胞数と増殖クローン数が得られた。また, *P. bursaria* の syngen B1 と *P. woodruffi* の各1株も凍結解凍後に細胞を増殖させることができた。*P. bursaria* では細胞内共生クロレラも増殖して宿主内に維持された。しかし, 解凍直後に遊泳細胞が得られたにも関わらず増殖しなかった種が8種(*P. multimicronucleatum*, *P. trijenningsi*, *P. nephridiatum*, *P. triaurelia*, *P. tetraurelia*, *P. putrinum*, *P. duboscqui*, *P. calkinsi*)と, 解凍後に遊泳細胞も得られずに死んだ種が12種(*P. primaurelia*, *P. biaurelia*, *P. pentaurelia*, *P. sexaurelia*, *P. septaurelia*, *P. octaurelia*, *P. novaurelia*, *P. decaurelia*, *P. undecaurelia*, *P. tredecaurelia*, *P. quqdecaurelia*, *P. sonneborni*)あった。

他の生物で用いられている凍結保護剤も試したが良好な結果は得られなかった。特定株しか解凍後に増殖できない原因としては, 使用した株の老化の可能性を排除できない。したがって, 老化株でも凍結保存を可能にする新たな技術開発が必要である。

3. 老化株の凍結保存に必要な新たな技術開発

老化が原因で凍結後に増殖細胞を回収できない場合には, 凍結前にその株の子孫を作成して凍結すれば良いが, 老化が進行すると子孫が取れなくなる^{24, 35)}。しかし, 小核は転写活性が抑制されているので, 老化株でもその小核が老化を免れているか, または老化が遅延していれば, 若い細胞から小核を抜き取った無小核細胞に老化株の小核を移植し, 次にその細胞に自系接合か自家生殖を誘導して移植小核由来の大核と小核を持つ若い細胞を作成して凍結することで, 解凍後に増殖細胞が得られる可能性がある。

Paramecium の小核移植は, Fujishima and Hiwatashi (1978)⁷⁾によって可能になり, その後, syngen 間で小核を入れ替えた細胞を作成して接合させると, 移植された小核が減数分裂や移動核の核交換などを正常に行えることが確認されている⁶⁾。老化した細胞の小核を利用した新たな凍結保存の試みは, 著者らによって早期実現を目指してこれから実施される。

ま と め

Paramecium 属の凍結保存技術の歴史と問題点について、低温生物工学会第 68 回大会での我々の発表の概要を解説した。Sasaki ら(2010)³³⁾の方法を改変した方法を用いて、*P. caudatum* については、7 種の syngen の全てで解凍後に増殖能力を持つ細胞の回収が可能な凍結保存が完了し、現在、島根大学と山口大学の液体窒素タンクに保存されている。*P. bursaria* と *P. woodruffi* でも各 1 株が同じ方法で解凍後に生細胞を回収できた。解凍後に遊泳細胞は得られるが増殖させることができなかった種が 12 種類ある。凍結保存の不成功の原因が株の老化の場合には、小核の移植技術を使用して老化細胞の小核由来の大核と小核を持つ細胞を作り直すことで解決できる可能性がある。

謝 辞

本総説で著者らが実施した実験は、次の方々の協力によって行われた。高橋恒夫氏(株 ライフバンクジャパン)、石井寛崇氏(株 ニチレイ技術戦略グループ)、松村和明氏(北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科)、田中大介氏(農研機構遺伝資源センター)、三輪岳志氏(大阪大学微生物病研究所)、河池正伸氏(筑波大学生命環境科学研究科)、Sascha KRENEK 氏(ドレスデン工科大学環境科学部)、成瀬 清氏(基礎生物学研究所 IBBP センター)、高橋三保子氏(元筑波大学生命環境科学研究科)、菅井俊郎氏(元茨城大学理学部)、中岡保夫氏(元大阪大学大学院生命機能研究科)。また、下記の研究費の支援を受けた。基礎生物学研究所生物遺伝資源新規保存技術開発共同利用研究(2013-2017 年度)、山口大学後援財団(2016 年度)、NBRP 基盤技術整備プログラム(2017 年度、2019 年度)。

文 献

1) Fokin SI: *Paramecium* genus: biodiversity, some morphological features and the key to the main morphospecies discrimination, *Protistology*, **6**, 227-235 (2010)

2) Johnson WH, Baker EGS: The sterile culture of *Paramecium multimicronucleatum*, *Science*, **95**, 333-334 (1942)

3) Van Wagtenonk WJ, Hackett PL: The culture of *Paramecium aurelia* in the absence of other living organisms, *Proc Natl Acad Sci USA*, **35**, 155-159 (1949)

4) Sold AT, Van Wagtenonk WJ: The nutrition of *Paramecium aurelia*, stock 299, *J Protozool*, **16**, 500-506 (1969)

5) Tanaka T, Watanabe T: Spatiotemporal sites of DNA replication in macro- and micronuclei of the ciliate *Paramecium caudatum*, *Chromosome Res*, **11**, 153-164 (2003)

6) Fujishima M: Micronuclear events during conjugation in nucleocytoplasmic hybrids of *Paramecium caudatum*, *J Exp Zool*, **213**, 297-299 (1980)

7) Fujishima M, Hiwatashi K: Transplantation of germ nuclei in *Paramecium caudatum*, I. Nuclei in the pre-meiotic S phase can enter into mitotic cycle, *Exp Cell Res*, **111**, 468-471 (1978)

8) Fujishima M, Hiwatashi K: Transplantation of germ nuclei in *Paramecium caudatum*, II. Induction of meiosis in transplanted interphase nucleus, *Exp Cell Res*, **131**, 63-71 (1981)

9) Fujishima M, Watanabe T: Transplantation of germ nuclei in *Paramecium caudatum*, III. Role of germinal micronucleus in vegetative growth, *Exp Cell Res*, **132**, 47-56 (1981)

10) Mikami K: Nuclear dimorphism and function, *In* “*Paramecium*”, Görtz HD, ed, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, p120-130 (1988)

11) Fujishima M: Infection and Maintenance of *Holospira*, *In* “Endosymbionts in *Paramecium*”, Fujishima M, ed, Springer, Dordrecht Heidelberg New York, p201-225 (2008)

12) Nakaoka Y: Localization of photosensitivity in *Paramecium bursaria*, *J Comp Physiol A*, **165**, 637-641 (1989)

13) Nakaoka Y, Oosawa F: Temperature-sensitive behavior of *Paramecium caudatum*, *J Protozool*, **24**,

- 575-580 (1977)
- 14) Allen RD, Naitoh Y: Osmoregulation and contractile vacuole of protozoa, *Int Rev Cytol*, **215**, 351-394 (2002)
 - 15) Fok AK, Paeste RM: Lysosomal enzymes of *Paramecium caudatum* and *Paramecium tetraurelia*, *Exp Cell Res*, **139**, 159-169 (1982)
 - 16) Fok AK, Allen RD: The lysosome system, In " *Paramecium*", Görtz HD, ed, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, p301-324 (1988)
 - 17) Kodama Y, Fujishima M: Timing of perialgal vacuole membrane differentiation from digestive vacuole membrane in infection of symbiotic algae *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria*, *Protist*, **160**, 65-74 (2009)
 - 18) Sonneborn TM: Mating types in *Paramecium aurelia*: diverse conditions for mating in different stocks: occurrence, number and interrelations of the types, *Proc Am Philos Soc*, **79**, 411-434 (1938)
 - 19) Fujishima M: Conjugation, In " *Paramecium*", Görtz HD, ed, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, p70-84 (1988)
 - 20) Bomford R: The syngens of *Paramecium bursaria*: New mating types and inter-syngenic mating reactions, *J Protozool*, **13**, 501-504 (1966)
 - 21) Miwa I: Regulation of circadian rhythms of *Paramecium bursaria* by symbiotic *Chlorella* species, In " *Endosymbionts in Paramecium*", Fujishima M, ed, Springer, Dordrecht Heidelberg New York, p83-110 (2008)
 - 22) Spanner C, Darienko T, Filker S, Sonntag B, Pröschold T: Morphological diversity and molecular phylogeny of five *Paramecium bursaria* (Alveolata, Ciliophora, Oligohymenophorea) syngens and the identification of their green algal endosymbionts, *Sci Rep*, **12**, 18089 (2022)
 - 23) Matsuoka K, Nakaoka Y: Photoreceptor potential causing phototaxis of *Paramecium bursaria*, *J Exp Biol*, **137**, 477-485 (1988)
 - 24) Smith-Sonneborn J: Genetics and ageing in protozoa, *Int Rev Cytol*, **73**, 319-354 (1981)
 - 25) Takagi Y: Aging. In " *Paramecium*", Görtz HD, ed, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, p131-140 (1988)
 - 26) Gilley D, Blackburn EH: Lack of telomere shortening during senescence in *Paramecium*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 1955-1958 (1994)
 - 27) Fujishima M: Microspectrophotometric and autoradiographic study of the timing and duration of pre-meiotic DNA synthesis in *Paramecium caudatum*, *J Cell Sci*, **60**, 51-65 (1983)
 - 28) Simon EM: *Paramecium aurelia*: Recovery from -196°C, *Cryobiol*, **8**, 361-365 (1971)
 - 29) Simon EM, Schneller MV: The preservation of ciliated protozoa at low temperature, *Cryobiol*, **10**, 421-426 (1973)
 - 30) Daggett PM, Nerad TA: Cryopreservation of *Paramecium*, In " *Protocols in Protozoology*", Lee JJ and Sold AT, eds, Society of Protozoologists, Lawrence, pA90.1-90.3 (1992)
 - 31) 孫 樹春, 田中義光, 高橋三保子: ゾウリムシの凍結保存, *原生動物学雑誌*, **29**, 58 (1996)
 - 32) Krenk S, Berendonk TU: A long-term conservation tool for cell characteristics: Cryopreservation of *Paramecium caudatum*, *Protist*, **160**, 355-363 (2009)
 - 33) Sasaki H, Suzuki T, Asakawa A, Waki N, Tagawa H, Shishiuchi T, Itabashi K, Haga N: A glass micro-capillary method for cryopreservation of *Paramecium caudatum*, *Nano Biomed*, **2**, 239-246 (2010)
 - 34) Dryl S: Antigenic transformation in *Paramecium aurelia* after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation, *J Protozool*, **6** (Suppl), 25 (1959)
 - 35) Takagi Y, Yoshida M: Clonal dearth associated with the number of fissions in *Paramecium caudatum*, *J Cell Sci*, **41**, 177-191 (1980)