PRESS RELEASE

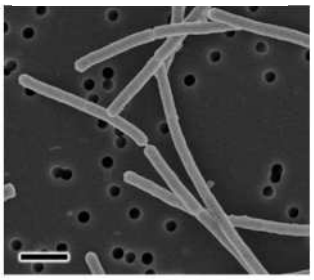
2026 年 8 月 1 8 日

走査型電子顕微鏡（SEM）用試料作製法「水凍結乾燥法（Water Freeze Drying;WFD 法）」を細菌にも適用拡大

細菌本来の構造に迫る！

- **SEM 用の凍結乾燥装置を用いず、かつ SEM 用試料の作成で生じる影響を低減した WFD 法を、世界で初めて細菌に適用しました。**
- **大腸菌では、従来法では見えにくかった細菌細胞末端の多様な形態を新たに捉えることができました。**
- **細菌の本来の構造解明に加え、抗菌剤による細菌の損傷作用など、幅広い微生物研究への応用が期待されます。**

枯草菌の SEM 写真



就実大学の山田 陽一、小川 和加野、神戸大学の洲崎 敏伸、自然科学研究機構 生理学研究所の村田 和義、島根大学の石田 秀樹、ウクライナ国立科学アカデミー進化生態学研究所の Liudmyla Gaponova、ウクライナ国立科学アカデミー物理学研究所の Andrii Kolosiuk、韓国・釜山大学の Chihong Song の研究グループは、実験室で一般的に使用される凍結乾燥装置を用いて、微生物の形態をより自然な状態に近いまま走査型電子顕微鏡で観察できる水凍結乾燥法（Water Freeze Drying：WFD 法）を世界で初めて細菌に適用しました。その成果が国際学術誌「Frontiers in Microbiology」に掲載されることが決定しました。

研究の概要

走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscopy：SEM）は、細菌や原生生物などの微細な表面構造を高倍率で観察するために広く使用されています。SEM 内部は真空であるため、水分を含む生物試料をそのまま観察することはできません。そのため、従来の試料作製では、グルタルアルデヒドなどによる固定後、エタノールを用いて段階的に脱水し、さらに臨界点乾燥や tert-ブチルアルコール凍結乾燥を行うのが一般的です。

しかし、エタノールなどの有機溶媒を用いた脱水処理では、細胞膜の脂質や可溶性成分が失われることがあります。また、細胞や細胞外マトリクスが収縮し、亀裂や変形が生じる場合があります。このような試料作製中の変化は「アーティファクト」と呼ばれ、観察した形

態が微生物本来の構造なのか、試料作製によって生じた変形なのかを区別することが難しいという課題がありました。特に、抗菌剤による細菌細胞の損傷などを評価する研究では、試料作製による変形を、抗菌剤の効果と誤って判断してしまう可能性が指摘されてきました。

生物試料の形態を高い精度で保存する方法として、高圧凍結法が知られています。高圧凍結法では、約 200 MPa という高い圧力を加えながら試料を急速に凍結します。この方法に使用する高圧凍結装置は高価であり、操作には専門的な技術が必要です。また、急激な加圧や機械的刺激が、生物試料の形態に影響を与えることがあります。

そこで本研究グループは、有機溶媒による脱水を行わず、水を含んだ状態の試料を凍結し、その氷を直接昇華させる水凍結乾燥法（WFD 法）について検討しました。

水凍結乾燥法（Water Freeze Drying：WFD 法）について

WFD 法では、マイナス 80℃に冷却した銅製ブロックを試料表面に接触させ、試料を急速に凍結します（図１）。凍結した試料は、低温状態を維持したまま凍結乾燥へ移行します。凍結乾燥では、試料中の氷が液体を経ずに直接水蒸気となる「昇華」によって除去されます。これにより、エタノール脱水や有機溶媒置換を行う必要がありません。

また、本研究では電子顕微鏡専用の高価な凍結乾燥装置だけでなく、一般の研究室で使用されている汎用的な凍結乾燥装置でも、同様の試料調整が可能であることを確認しました。固定した微生物をフィルター上に集め、純水で洗浄した後、マイナス 80℃に冷却した銅製ブロックを接触させて凍結します。凍結状態を維持したままフリーズドライヤーに移し、試料中の氷を昇華させます。

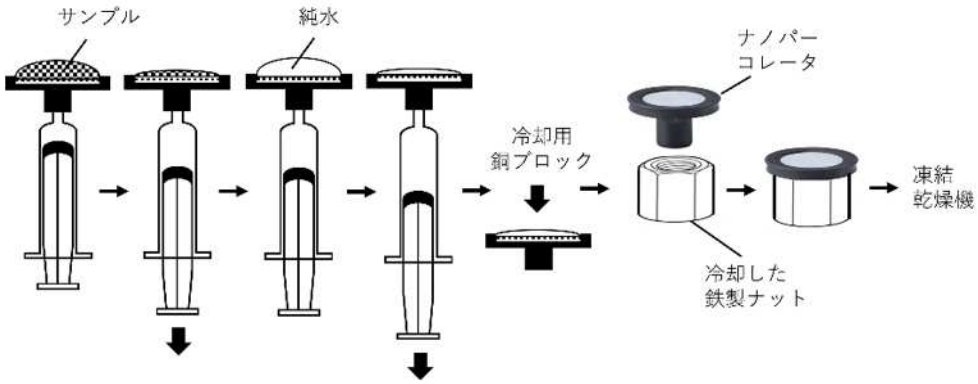


図 1. 水凍結乾燥法の流れ

大腸菌の細胞末端に多様な形態を発見

従来法で作製した大腸菌試料では、多くの細胞が、教科書などで一般的に示される丸みを帯びた半球状の細胞末端を示しました。これに対し、WFD 法で作製した試料では、丸みを帯びた細胞末端だけでなく、まるで切断されたように平坦で鋭い末端（図 2 の矢印）を持つ細

胞も多数観察されました。

データ解析の結果、細胞幅については従来法と WFD 法の間に有意な差はありませんでした。一方、細胞末端の高さと細胞極形状指数は、WFD 法で有意に低くなりました。この結果は、WFD 法で観察された平坦な細胞末端が、単なる見た目の違いではなく、定量的にも異なる形態であることを示しています。

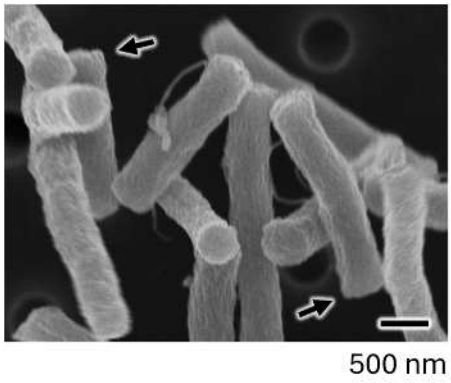


図 2. 大腸菌の細胞末端形態

従来法では、脱水によって細胞表面が収縮し、細胞内部の圧力が末端部に集中することで、本来よりも丸く膨らんで観察されている可能性があります。一方、WFD 法で観察された平坦な形態は、細胞分裂直後など、一時的な生理状態を反映している可能性があります。ただし、この形態の生物学的な意味については、今後さらに検討する必要があります。

研究開発者からのひとこと

走査型電子顕微鏡で生物を観察する際には、観察そのものだけでなく、観察前の試料作製が非常に重要です。従来法では、資料作成時に微生物やその周囲の構造が収縮したり、潰れたりすることがあります。そのため、電子顕微鏡で見えている形が、本当に微生物本来の姿なのか、それとも試料作製によって生じた形なのかを慎重に判断する必要がありました。

今回の水凍結乾燥法（WFD 法）は、水を含んだ試料を凍結し、氷を直接取り除くという比較的シンプルな方法です。特に重要なのは、特殊で高価な装置だけでなく、実験室で一般的に使用されている凍結乾燥装置でも実施できたことです。

本手法が広く利用されることにより、微生物の本来の形態や、抗菌剤による細胞損傷、バイオフィルムの立体構造などを、これまで以上に正確に評価できるようになることを期待しています。

今後の展開

今後は、WFD 法をさまざまな細菌、真菌、原生生物へ応用し、菌種による細胞表面構造や細胞壁の性質の違いを明らかにしていきます。また、抗菌薬、消毒薬、抗菌材料などによって生じる微生物表面の微細な変化を観察し、それぞれの作用機序の解明に活用する予定です。従来法では変形しやすいとされる細胞外多糖やバイオフィルムの立体構造を保持できれば、微生物同士の相互作用や、薬剤がバイオフィルム内部へ及ぼす影響を、より正確に解析できると期待されます。

さらに、一般的な実験室用フリーズドライヤーを利用した再現性の高い標準手順を整備し、大学、研究機関、医療、食品、環境分野などにおける幅広い活用を目指します。

PRESS RELEASE

研究論文

論文タイトル

Water Freeze-Drying for High-Resolution SEM: An Accessible Strategy for Capturing Native Microorganism Morphology Without Dedicated Rapid-Freezing Systems

日本語訳

高分解能 SEM 観察のための水凍結乾燥法：専用急速凍結装置を用いずに微生物の本来の形態を捉える実用的手法

著者

Yoichi Yamada, Wakano Ogawa, Toshinobu Suzaki, Kazuyoshi Murata, Liudmyla Gaponova, Andrii Kolosiuk, Hideki Ishida, Chihong Song

掲載誌

Frontiers in Microbiology

掲載日

2026 年 8 月 18 日

DOI

10.3389/fmicb.2026.1870866

研究体制

本研究は、以下の研究機関の共同研究として実施されました。

- 就実大学
- 島根大学
- 神戸大学
- 自然科学研究機構 生理学研究所
- 韓国・釜山大学
- ウクライナ国立科学アカデミー進化生態学研究所
- ウクライナ国立科学アカデミー物理学研究所

研究助成

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費助成事業および韓国研究財団の支援を受けて実施されました。

用語説明

- **走査型電子顕微鏡（SEM）**

電子線を試料表面に照射し、そこから発生する電子を検出することで、試料表面の凹凸や微細構造を高倍率で観察する装置です。細菌、細胞、材料表面などの観察に広く用いられています。

- **水凍結乾燥法（WFD 法）**

水を含む試料を凍結し、真空中で氷を直接昇華させる乾燥方法です。本研究では、有機溶媒による脱水を行わずに SEM 試料を作製する方法として使用しました。

参考

１）Ishida, H., Matsumoto, C., Shimada, M., and Suzaki, T. (2022a). Use of water freeze-drying to prepare unfixed ciliates for scanning electron microscopy. J. Electr. Microsc. Tech. Med. Biol. 35, 1-7.

２）Ishida, H., Matsumoto, C., Shimada, M., and Suzaki, T. (2022b). SEM observation of non-fixed and water freeze-dried Spirostomum ambiguum. Europ. J. Protistol. 85: 125896. doi: 10.1016/j.ejop.2022.125896

３）Ishida, H., Yamamoto, K., Yano, Y., Ikeda, K., Gaponova, L., Higuchi, R., Kolosiuk, A., and Suzaki, T. (2023). Method of preparing unfixed ciliates for scanning electron microscopy without noticeable artifacts. Front. Protistol. 1:1293531. doi: 10.3389/frpro.2023.1293531

４）Ishida, H., Fukuda, N., Shimada, M., Yamamoto, K., Gaponova, L., Higuchi, R., et al. (2026). Artifact-free preparation of biological samples for SEM by optimized water freeze-drying. Sci. Rep. 16:717. doi: 10.1038/s41598-025-30335-4