

# ナノ液滴の高速衝突が biofilm 形成 *Pseudomonas aeruginosa* に与える影響

田村友梨奈<sup>1)</sup>・河村 真人<sup>1)</sup>・中嶋 智樹<sup>2)</sup>・Liu Siwei<sup>2)</sup>佐藤 匠<sup>1)</sup>・佐藤 岳彦<sup>2)</sup>・藤村 茂<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 東北医科薬科大学大学院薬学研究科臨床感染症学教室\*<sup>2)</sup> 東北大学流体科学研究所

受付日：2025 年 4 月 11 日 受理日：2025 年 7 月 8 日

高速ナノ液滴技術は 2017 年に開発された世界初の技術であり、水蒸気の凝縮を利用して直径 100 nm 以下にまで微細化したナノ液滴群を生成・高速照射できる。本研究では、衝撃圧 18 MPa のナノ液滴が biofilm 形成 *Pseudomonas aeruginosa* に与える影響を検討した。被検菌株は、東北地方の医療機関で臨床分離された multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) 5 株および標準株 *P. aeruginosa* PAO1 とした。これらの biofilm 形成モデルに対し、直径 100 nm のナノ液滴を 18 MPa の衝撃圧で 20～30 分間照射した後、生残菌数、biofilm 形成量および細胞外マトリックス量の測定、さらに scanning electron microscope (SEM) による菌の形態観察を行った。ナノ液滴を 20 分間照射した時に生残菌数の有意な減少は認められなかったものの biofilm を構成する多糖体および extracellular DNA (eDNA) 量が減少した。この時 biofilm 形成量も低下したため biofilm を構成する多糖体および eDNA の低下が biofilm 構造の脆弱化を促進したと考えられた。一方、30 分間照射後には 6 株すべてで生残菌数が減少し、特に MDRP-5 では 99.9% 以上の殺菌効果を示した。SEM で観察すると、PAO1 において菌体への穴の形成、MDRP-5 では菌体崩壊が観察された。したがって、高速ナノ液滴技術は biofilm 構造を破壊し、物理的な衝撃によって *P. aeruginosa* を殺菌することが明らかとなった。この殺菌効果は biofilm 形成量が少ない菌株ほど高く biofilm が破壊されることによりナノ液滴による殺菌効果が発揮されると考えられた。本技術は化学薬剤を使用せず、水のみで物理的作用による殺菌が可能であるため、菌株の薬剤感受性に関係なく殺菌効果を発揮できる。今後のさらなる検討を経て実用化されることにより殺菌法の選択肢が増える可能性が期待される。

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, nano droplet, extracellular matrix

## はじめに

*Pseudomonas aeruginosa* は、医療施設や高齢者施設における代表的な院内感染の原因菌であり、特に multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP)<sup>1)</sup> は感染管理上重要である<sup>2,3)</sup>。高齢者施設において MDRP を含む多剤耐性菌が環境表面から検出されている<sup>4)</sup>。感染予防体制は病院に比べて脆

弱であるため、共用物品などの環境を介した入居者間の伝播リスクが高い<sup>3,4)</sup>。

こうした感染対策の一つに環境消毒が重要であるが、消毒薬の廃液が河川に流出することによる薬剤耐性菌の増加や水生生物への影響<sup>5)</sup>、あるいは配管パイプの腐食進行<sup>6)</sup>が懸念されている。さらに、消毒薬抵抗性の獲得<sup>7-9)</sup>や biofilm 形成による殺菌効果の低下<sup>10)</sup>が問題となっている。*P. aeruginosa* の

\*宮城県仙台市青葉区小松島 4-4-1

Table 1. Drug susceptibilities of the strains used

strain	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	PIPC	IPM	MEPM	CPFX	AMK
PAO1	4	2	0.25	<0.125	2
MDRP-1	128	16	16	128	32
MDRP-2	>128	64	>128	64	64
MDRP-3	>128	>128	>128	64	>128
MDRP-4	>128	128	>128	128	32
MDRP-5	>128	32	32	32	32

PIPC: piperacillin; IPM: imipenem; MEPM: meropenem; CPFX: ciprofloxacin; AMK: amikacin

biofilm は、自己産生物質であるタンパク質、多糖体、細胞外 DNA (extracellular DNA ; eDNA) など構成<sup>11)</sup>され、外部刺激から菌体を保護する。この特性により biofilm 形成 *P. aeruginosa* は、医療施設の水回り環境において持続的な汚染源となり院内感染のリスクを高める要因の一つとされている。*P. aeruginosa* に有効な抗菌薬は限られており、特に MDRP が汚染環境を介して日和見感染を引き起こした場合、治療の選択肢がさらに制限される。したがって、環境消毒による感染対策はきわめて重要である。

これらの問題を解決する新たな殺菌技術として、われわれは、微細化した水滴(ナノ液滴)群を生成・高速照射できる高速ナノ液滴技術に着目した。本技術は 2017 年に共同研究者の Sato ら<sup>12)</sup>により開発された世界初の技術であり、水蒸気の凝縮を利用して照射ノズルから 5 cm の距離で直径 100 nm 以下の液滴を最大速度 50 m/s で照射することができる。わずか 300 mL の水で 20 分間連続照射でき、また、液滴径が 100 nm 以下になるとケルビン効果により液滴は瞬時に乾燥するため、対象表面が濡れないという特徴をもつ。われわれは、これまでに、ナノ液滴を照射距離 5 cm、75 MPa の衝撃圧で biofilm 形成の 4 菌種 (*Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* および *Serratia marcescens*) に対して照射すると、菌体破壊によりすべての菌種が 30~240 秒で殺滅できることを報告した<sup>13)</sup>。一方、照射距離 17 cm、衝撃圧 18 MPa では 4 菌種に対して 20 分間照射後に殺菌効果を示さなかったが、グラム陰性菌 3 菌種においてはナノ液滴が biofilm 表層部の菌体を貫通することが確認された<sup>13)</sup>。このような物理的作用に着目し、殺菌効果を伴わない条件下でも菌体や biofilm に及ぼす構造的変化を検証する

ことは、細菌学における新たな基礎的知見を提供しうる。また、75 MPa では照射面に存在する biofilm 形成菌のうち 1/10,000 程度の生残菌の飛散が確認されたため<sup>13)</sup>、汚染源を拡大せずに高速ナノ液滴により殺菌できる条件を検討する必要がある。

本研究では、衝撃圧 18 MPa のナノ液滴が、特に院内感染の原因となる MDRP を含む biofilm 形成 *P. aeruginosa* に与える影響を検討した。

## 1. 材料と方法

### 1. 使用菌株

使用菌株は、東北地方の医療機関で臨床分離された MDRP 5 株および標準株 *P. aeruginosa* PAO1 の計 6 株とした。これらの株に対する piperacillin (Sigma-Aldrich, MO), imipenem (富士フイルム和光純薬, 大阪), meropenem (富士フイルム和光純薬), ciprofloxacin (Sigma-Aldrich) および amikacin (富士フイルム和光純薬) の抗菌力は微量液体希釈法で決定した。その最小発育阻止濃度を Table 1 に示した。

### 2. *In vitro* biofilm 形成モデルの作製

Mueller-Hinton agar (MHA : 栄研化学, 東京) 上で 35°C, 24 時間培養した菌株は McFarland no. 0.5 の菌液に調整され、その 100  $\mu\text{L}$  を tryptic soy broth (Becton, Dickinson and Company, NJ) 10 mL に接種した。この培養液中に滅菌処理されたステンレスディスク  $\Phi$  : 10 mm (大里, 東京) を重ねずに 20 枚浸漬し、35°C で 24 時間振盪培養した<sup>13)</sup>。これらの表面における biofilm の形成は scanning electron microscope VE-8800 (SEM : キーエンス, 大阪), 形成量は crystal violet assay により確認し、これを biofilm 形成モデルとした。

### 3. ナノ液滴照射による生残菌数と biofilm 形成量

2. で作製された biofilm 形成モデルを培養液から

新しいシャーレに取り出し、高速ナノ液滴を直接 20、25 および 30 分間照射した。ナノ液滴は Sato らが開発・報告した発生装置<sup>12)</sup>により Milli-Q から形成され、直径 100 nm 以下の液滴サイズである。照射ノズル先端から 17 cm の距離において速度 12 m/s で発出され、液滴温度は 30°C である。これらのナノ液滴が菌体に衝突する際の衝撃圧は、液体の密度、音速および速度に基づき算出された<sup>13)</sup>。ナノ液滴は照射ノズル真下を中心に半径 3 cm 以内に照射される。これらのモデル 20 枚をそれぞれ Milli-Q 3 mL が入ったチューブに入れ、5 分間ボルテックスした。この液 100  $\mu$ L を標準寒天培地（栄研化学）に塗抹し、35°C で 24 時間培養後に生残菌数を測定した。この測定は 3 回の独立した実験により実施された。また biofilm 形成モデル 1 枚を MHA 上に配置し、高速ナノ液滴 30 分間照射後、35°C で 24 時間培養した MHA を観察することで biofilm 形成モデル周囲の半径 10 cm 以内への生残菌の飛散の有無を確認した。

Biofilm 形成量は crystal violet assay により測定された<sup>14)</sup>。すなわち、ナノ液滴を 20 および 30 分間照射した biofilm 形成モデルを乾燥させた後、0.1% crystal violet により 20 分染色した。Biofilm 形成モデルを phosphate buffered saline（富士フィルム和光純薬）で洗浄後、1 mL の 99.5% ethanol に 30 分浸漬し、溶解した crystal violet の吸光度（595 nm）を iMark microplate reader（バイオ・ラッド、東京）で測定した。この測定は 3 回の独立した実験により実施された。

#### 4. 細胞外マトリックス (extracellular matrix ; ECM) の抽出と定量

2. で作製されたナノ液滴照射後の biofilm 形成モデル 20 枚をそれぞれ Milli-Q 3 mL が入ったチューブに入れ、5 分間ボルテックスした。生残菌が回収された Milli-Q 3 mL を別の 1.5 mL チューブに 1 mL ずつ分注し、25°C、 $\times 8,000$  g で 10 分超遠心分離後、ペレットを回収した<sup>15,16)</sup>。続いて、ECM を菌体から分離するため、ペレットに 1.5 M NaCl を 30  $\mu$ L ずつ添加した。ボルテックス後、25°C、 $\times 5,000$  g で 10 分超遠心分離し、ECM が抽出された上清を使用した。ECM 中の各成分は以下の方法にて、3 回の独立した実験により定量された。

ECM に含まれるタンパク質は Bradford protein

assay kit（タカラバイオ、滋賀）を用いて定量された<sup>15,16)</sup>。すなわち、96 穴プレート内で Bradford Dye 200  $\mu$ L に ECM 4  $\mu$ L を添加し、25°C で 5 分間の反応後、iMark microplate reader により 595 nm において測定した。標準物質としてウシ血清アルブミンを使用した。

多糖体はフェノール-硫酸法により定量された<sup>15,16)</sup>。すなわち、96 穴プレートに ECM 20  $\mu$ L と 5% フェノール 20  $\mu$ L を混合し、硫酸 100  $\mu$ L を添加後、25°C で 10 分間反応させた。この濃度は iMark microplate reader により 490 nm において測定し、標準物質はグルコースを使用した。

eDNA 量は BioSpec-nano（島津製作所、京都）を用いて計測された<sup>15,16)</sup>。

#### 5. ナノ液滴照射による殺菌メカニズム

使用菌株の形態的特徴を把握するため、ナノ液滴未照射の使用菌株 6 株を用いて SEM およびグラム染色による観察を行った。SEM の前処理として、試料を 2.5% glutaraldehyde で 30 分固定後、50、75 および 99.5% ethanol によりおのおの 5 分間脱水した。この試料を金でコーティング後、加速電圧 8 kV で観察した<sup>13)</sup>。また、グラム染色された菌体は、fluorescence microscope BZ-X800（キーエンス）を用いて観察倍率 100 倍で撮影後、各菌株 300 菌体について平均長径が算出された。

ナノ液滴照射による殺菌メカニズムの検討には、標準株 *P. aeruginosa* PAO1 および MDRP-5 の 2 株を用いた。これらの biofilm 形成モデルにナノ液滴を衝撃圧 18 MPa で 20 および 30 分間照射した。固定・脱水後に SEM により形態変化を観察した。

#### 6. 統計解析

3. および 4. で測定された生残菌数、biofilm 形成量および ECM 成分は Student's t-test により解析され、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## II. 結果

### 1. ナノ液滴照射による生残菌数と biofilm 形成量

ナノ液滴を経時的に照射後の生残菌数を Fig. 1 に示した。ナノ液滴を 20 分間照射後、使用された 6 株すべてにおいて生残菌数の有意な減少は確認されなかった。その後 10 分の追加照射により MDRP-5 は  $10^5$  CFU/mL (99.9% 以上) 殺菌された。しかしながら、他の 5 株は  $10^2$  CFU/mL (90%) 程度の殺菌にとどまった。また、30 分間照射後、いずれ

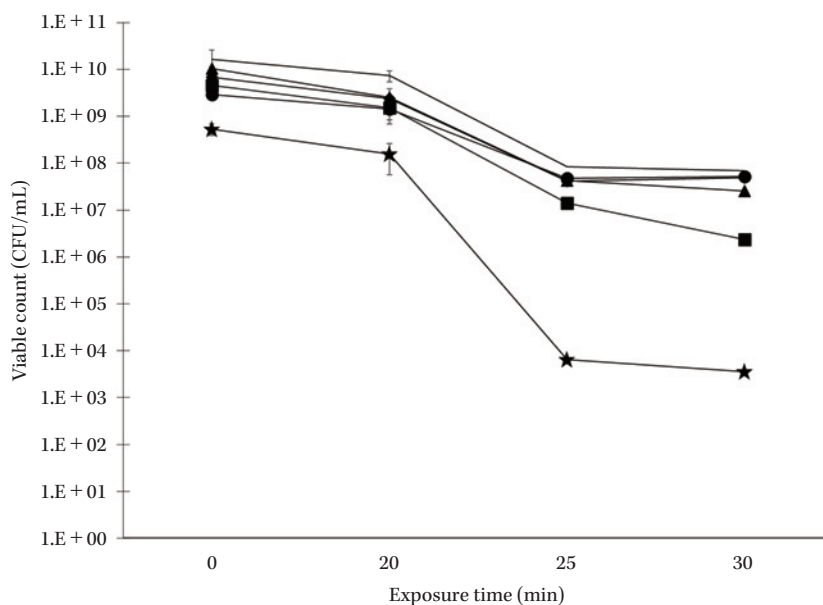


Fig. 1. Viable count after exposure to nanodroplets  
The viable counts of *P. aeruginosa* PAO1 strain (filled circle), MDRP-1 (filled square), MDRP-2 (filled upward-pointing triangle), MDRP-3 (filled downward-pointing triangle), MDRP-4 (filled diamond), and MDRP-5 (filled star) were measured over time after exposure to nanodroplets. These data are based on three independent experiments. Error bars indicate the standard deviation (SD).

の菌株においても biofilm 形成モデル周囲の半径 10 cm 以内に生残菌の飛散は確認されなかった。

Biofilm 形成量の推移を Fig. 2A に示す。ナノ液滴照射前における MDRP-1~3 の biofilm 形成量は PAO1 と同等以上であったが、MDRP-4 および 5 は PAO1 の 0.12~0.65 倍であった。ナノ液滴の 20 分間照射により MDRP-5 を除く 5 株において biofilm 形成量が減少した。30 分照射した場合 MDRP-5 を含むすべての菌株においてナノ液滴照射前よりも 60% 以上減少した。

## 2. ECM 成分の変化

ナノ液滴照射前の MDRP-1~5 のうち、MDRP-1~3 における ECM 中の多糖体は PAO1 の 1.42~2.14 倍、eDNA は 1.42~2.73 倍であった (Fig. 2C, D)。一方、MDRP-4 および 5 は多糖体が PAO1 の 0.06~0.35 倍、eDNA は 0.24~0.60 倍を示した (Fig. 2C, D)。また、タンパク質は 6 株間で有意差がみられなかった (Fig. 2B)。

ナノ液滴 20 分照射後、ECM 中の多糖体および eDNA はすべての菌株において減少傾向がみられた (Fig. 2C, D)。特に MDRP-1~3 における多糖

体の減少率は 79.2~93.5%、eDNA では 46.4~66.3% を示した (Fig. 2C, D)。タンパク質はナノ液滴照射前後で 6 株とも有意な減少はみられなかった (Fig. 2B)。

ナノ液滴 30 分照射により、PAO1 は ECM 中の多糖体がナノ液滴照射前の 0.02 倍となり、MDRP では 5 株すべてが検出限界以下を示した (Fig. 2C)。eDNA は 6 株すべてにおいて有意な減少を示し、その減少率は 55.6~93.9% であった (Fig. 2D)。一方、タンパク質量に変化は認められなかった (Fig. 2B)。

なお、BioSpec-nano による eDNA の定量時、測定されたすべての株の OD<sub>260/280</sub> 値は 1.8~2.0 の範囲内であった。

## 3. ナノ液滴照射による殺菌メカニズム

ナノ液滴未照射の 6 株の長径平均は、それぞれ PAO1 : 0.955  $\mu\text{m}$ , MDRP-1 : 1.546  $\mu\text{m}$ , MDRP-2 : 1.308  $\mu\text{m}$ , MDRP-3 : 0.844  $\mu\text{m}$ , MDRP-4 : 1.405  $\mu\text{m}$ , MDRP-5 : 1.337  $\mu\text{m}$  であり、MDRP は PAO1 よりも菌体が大きい傾向にあった。この傾向は SEM による観察でも確認された (Fig. 3)。

標準株 PAO1 と 30 分照射後に生残菌数減少が最

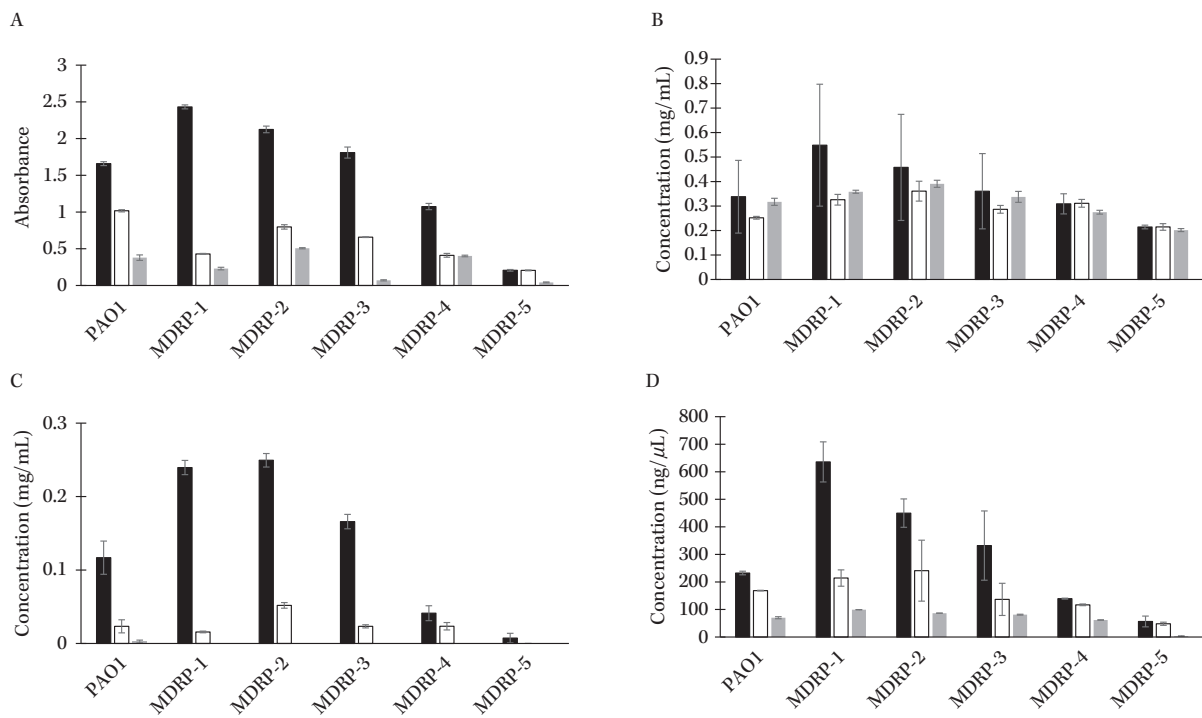


Fig. 2. Biofilm formation and ECM components

Biofilm formation (A), proteins (B), polysaccharides (C) and extracellular DNA (D) were measured. Black indicates the results before the exposure to nanodroplets, white indicates the results after 20 minutes of exposure, and gray indicates the results after 30 minutes of exposure. These data are based on three independent experiments. Error bars indicate the standard deviation (SD).

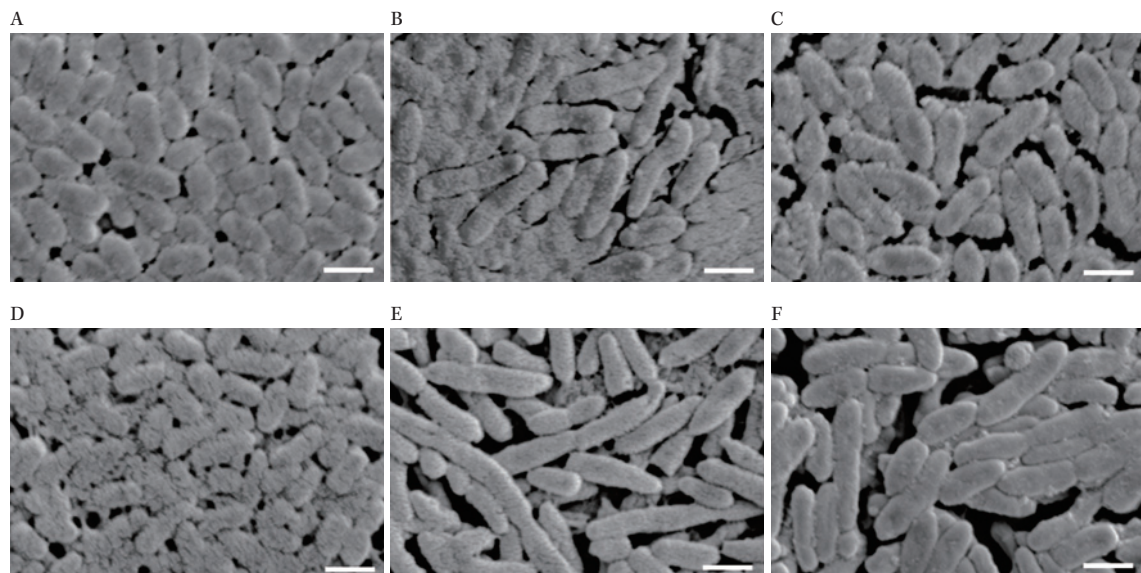


Fig. 3. Morphological observation of the strains used

The bacterial morphology of PAO1 (A), MDRP-1 (B), MDRP-2 (C), MDRP-3 (D), MDRP-4 (E), and MDRP-5 (F) used in this study was observed by SEM. Bar, 1 μm, magnification: × 15,000.

も顕著であった MDRP-5 の 2 株を用いた SEM による形態観察の結果を Fig. 4 に示した。ナノ液滴 20

分照射後、これら 2 株とも菌体に穴が形成され始め 30 分照射により PAO1 の菌体表面には穴の他に細

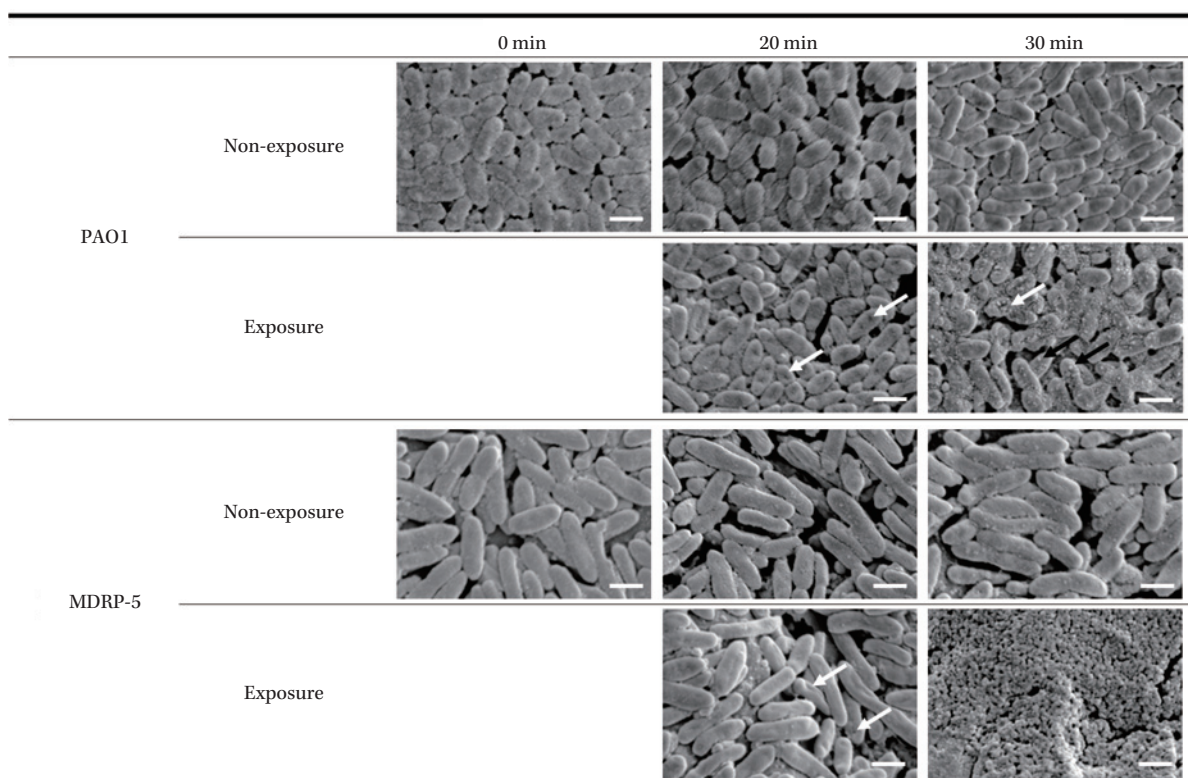


Fig. 4. Morphological observation of biofilm-forming *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* strains PAO1 and MDRP-5 were used. After 20 min of exposure, holes were formed on the bacterial surface of both strains (white arrows). After 30 min of exposure, the cells had completely disintegrated in MDRP-5, and holes (white arrow) and protrusions (black arrows) were observed in PAO1. Bar, 1  $\mu\text{m}$ , magnification:  $\times 15,000$ .

かい突起がみられた。一方 MDRP-5 では SEM で観察された biofilm 表層部において菌体の完全な崩壊が確認された。

### III. 考察

Biofilm 形成菌に対する消毒効果の低下は課題であるが biofilm 形成 *P. aeruginosa* に対する消毒効果に関する検討はいくつかなされている。Biofilm 形成 MDRP に対して蒸気化過酸化水素を曝露すると 100 分間以内に完全殺菌されることが示された<sup>17)</sup>。また、塩酸の電気分解により得られる非解離次亜塩素酸を主成分とする塩素消毒剤である微酸性電解水は、10 分間の浸漬により biofilm を破壊し、内部の *P. aeruginosa* を完全に殺菌することが報告されている<sup>18)</sup>。このように、現在、さまざまな消毒薬による殺菌効果についての検討が進められている。しかしながら、今回は環境問題を考慮し、消毒薬を使わず、水のみでの殺菌効果を検討した。

本研究において、われわれは、衝撃圧 18 MPa の水による高速ナノ液滴衝突が biofilm 形成 *P. aerugi-*

*nosa* に与える影響を検討したところ、高速ナノ液滴を 20 分間照射した時には、生残菌数の有意な減少は認められなかったものの biofilm 構造の多糖体および eDNA の減少が顕著であった。Biofilm の構造形成において多糖体の Pel, Psl およびアルギン酸は主要な構成成分であり、特に Pel は陽電荷を帯びた多糖体として eDNA と静電的相互作用により結合し biofilm マトリックスを強化する役割を担う<sup>11,19)</sup>。本研究では多糖体成分について詳細に直接定量は行っていないが、観察された変化には Pel の関与が示唆された。さらに、DNase I 処理による eDNA の分解により biofilm の厚さや凝集性が低下し、構造的に脆弱化するという報告がある<sup>20)</sup>。したがって、ナノ液滴の高速衝突による Pel 多糖および eDNA の破壊が biofilm を脆弱化し、結果として biofilm 形成量が低下した可能性が考えられた。多糖体および eDNA の減少から biofilm 構造の破壊が示唆されたものの、タンパク質は有意に減少しなかった。この理由として、ナノ液滴照射により ECM

にナノサイズの穴が複数形成され biofilm が局所的に損傷されたものの、多くを占めるタンパク質の分解まではいたらなかったためと考えられた。すなわち、本研究におけるタンパク質の定量には Bradford 法を用いており、この手法に用いられる染料である coomassie brilliant blue は主にアルギニン残基と結合して青色を呈する<sup>21)</sup>。そのため、ナノ液滴照射後もアルギニン残基が保持されていれば、タンパク質の部分的な損傷による顕著な吸光度の低下が表れなかったと示唆された。

ナノ液滴を 30 分間照射後の 6 株すべてで生残菌数の減少が確認され、特に MDRP-5 においては 99.9% 以上の殺菌効果を示した。SEM で観察すると PAO1 においては菌体への穴の形成、MDRP-5 では菌体崩壊が観察されたため、その殺菌メカニズムはナノ液滴の衝突による菌体破壊であると考えられた。この形態変化はナノ液滴未照射のコントロールにおいては示されなかったため、乾燥によるものではなく、ナノ液滴照射によるものと判断された。この時、液滴温度は 30℃ であり、この熱により殺菌された可能性は低い。また、MDRP-5 の菌体長径は PAO1 の 1.4 倍長く、この大きさにより、ナノ液滴から受ける照射総面積が相対的に大きくなり、より大きなダメージを受けた可能性がある。しかしながら、30 分間のナノ液滴照射により 99.9% 以上の殺菌効果を示したのは MDRP-5 のみであり、同様に PAO1 よりも 1.3~1.6 倍の長径を有する他の MDRP では 90% 程度にとどまった。このことから、菌体サイズの違いのみにより殺菌効果を説明することは難しく、他の要因も関与していると考えられる。特に biofilm 形成量が最も少ない MDRP-5 において最も高い殺菌効果を示し菌体崩壊の程度も大きかったことから biofilm 形成量が少ないほど菌体への直接的なダメージが大きくなり、ナノ液滴による殺菌効果は biofilm 形成量に依存する可能性が示唆された。さらに、MDRP-5 では ECM 中の多糖体および eDNA 量も他 5 株と比して著しく低値を示した。前述のように、多糖体と eDNA は biofilm 構造の安定化に重要であるため、これらの構成成分が少ないことにより biofilm 構造が脆弱であると考えられ、ナノ液滴の高速衝突から菌体を保護する機能が低かった可能性がある。したがって、本殺菌効果は biofilm 量、すなわち ECM の構成成分である多糖体および

eDNA 量と密接に関連していることが示唆された。

今回、20 分間のナノ液滴照射は *P. aeruginosa* によりステンレス表面に形成された biofilm を破壊することが示された。さらに、ナノ液滴による biofilm 破壊後の照射により菌体への直接作用で殺菌されることが示された。本技術の殺菌メカニズムは薬剤による化学的作用ではなく、物理的な菌体破壊であった。そのため、菌株の薬剤感受性に関係なく殺菌が可能である点は大きな利点と考えられる。

本研究のリミテーションとして、第一に本研究ではナノ液滴照射後に菌体外への遺伝子の飛散を評価しておらず、遺伝子レベルでの安全性検討には課題が残る。第二に、ナノ液滴による菌体内および ECM タンパク質への物理的・化学的損傷の程度については、現時点では直接的な評価が困難であり、詳細な解析は今後の課題である。第三に、照射対象となる表面への影響や材料劣化についても具体的な影響の評価は実施しておらず、長期的使用における安全性の検証が求められる。さらに、本技術は環境・手指の殺菌に応用されることを想定しており、用いられる水は純水または水道水などの浄水を前提としている。

これらをふまえ、今後はナノ液滴照射が細菌の遺伝子構造および機能に与える影響の網羅的解析、プロテオミクスなどを用いたタンパク質の損傷や機能変化の詳細な評価、対象物への長期照射による影響試験、さらには濾過・精製技術との併用による水質条件の拡張可能性などについて検討する必要がある。これらの知見が蓄積されることで、高速ナノ液滴技術はより広範な現場に応用可能な新規殺菌法として実用化に向けて大きく前進することが期待される。

#### 謝 辞

本研究は第 71 回日本化学療法学会東日本支部総会において一般演題として発表し、第 16 回東日本支部長賞（基礎部門）を受賞した。また、日本化学療法学会雑誌編集委員会より執筆推薦を受けた。なお、本研究は JSPS 科研費 25H00405 によって実施された。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

#### 文献

- 1) 厚生労働省：薬剤耐性緑膿菌感染症 [cited 2025

- May 23]  
<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-05-42-01.html>
- 2) Sendra E, Fernández-Muñoz A, Zamorano L, Oliver A, Horcajada J P, Juan C, et al: Impact of multidrug resistance on the virulence and fitness of *Pseudomonas aeruginosa*: a microbiological and clinical perspective. *Infection* 2024; 52: 1235-68
  - 3) Kanayama A, Kawahara R, Yamagishi T, Goto K, Kobaru Y, Takano M, et al: Successful control of an outbreak of GES-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a long-term care facility in Japan. *J Hosp Infect* 2016; 93: 35-41
  - 4) Kanamori H, Rutala W A, Sickbert-Bennett E E, Weber D J: Role of the contaminated environment in transmission of multidrug-resistant organisms in nursing homes and infection prevention. *Am J Infect Control* 2023; 51: A151-7
  - 5) Mohapatra S, Yutao L, Goh S G, Ng C, Luhua Y, Tran N H, et al: Quaternary ammonium compounds of emerging concern: Classification, occurrence, fate, toxicity and antimicrobial resistance. *J Hazard Mater* 2023; 445: 130393
  - 6) He H, Li F, Liu K, Zhan J, Wang X, Lai C, et al: The disinfectant residues promote the leaching of water contaminants from plastic pipe particles. *Environ Pollut* 2023; 327: 121577
  - 7) Maillard J Y: Resistance of bacteria to biocides. *Microbial Spectr* 2018; 6: 10.1128/microbiolspec.arba-0006-017
  - 8) Merchel Piovesan Pereira B, Tagkopoulos I: Benzalkonium chlorides: Uses, regulatory status, and microbial resistance. *Appl Environ Microbiol* 2019; 85: e00377-19
  - 9) Fox L J, Kelly P P, Humphreys G J, Waigh T A, Lu J R, McBain A J: Assessing the risk of resistance to cationic biocides incorporating realism-based and biophysical approaches. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2022; 49: kuab074
  - 10) Maillard J Y, Centeleghe I: How biofilm changes our understanding of cleaning and disinfection. *Antimicrob Resist Infect Control* 2023; 12: 95
  - 11) Thi M T T, Wibowo D, Rehm B H A: *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 8671
  - 12) Xiao Y, Liu S, Nakajima T, Sato T: Characteristics of high-speed mist generated by condensation of water vapor in pressurized air. *Int J Plasma Environ Sci Technol* 2022; 16: e03003
  - 13) Tamura Y, Kawamura M, Sato T, Nakajima T, Liu S, Sato T, et al: Impact of high-speed nanodroplets on various pathogenic bacterial cell walls. *J Bacteriol* 2024; 206: e0013924
  - 14) Akinbobola A B, Sherry L, McKay W G, Ramage G, Williams C: Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in in-vitro biofilms to high-level peracetic acid disinfection. *J Hosp Infect* 2017; 97: 162-8
  - 15) Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, et al: *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol* 2013; 195: 1645-55
  - 16) Chiba A, Sugimoto S, Sato F, Hori S, Mizunoe Y: A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microb Biotechnol* 2015; 8: 392-403
  - 17) Watson F, Keevil C W, Wilks S A, Chewins J: Modelling vaporised hydrogen peroxide efficacy against mono-species biofilms. *Sci Rep* 2018; 8: 12257
  - 18) Okanda T, Takahashi R, Ehara T, Ohkusu K, Furuya N, Matsumoto T: Slightly acidic electrolyzed water disrupts biofilms and effectively disinfects *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother* 2019; 25: 452-7
  - 19) Jennings L K, Storek K M, Ledvina H E, Coulon C, Marmont L S, Sadovskaya I, et al: Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 11353-8
  - 20) Ferguson D L, Gloag E S, Parsek M R, Wozniak D J: Extracellular DNA enhances biofilm integrity and mechanical properties of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2023; 205: e0023823
  - 21) Song J G, Baral K C, Kim G L, Park J W, Seo S H, Kim D H, et al: Quantitative analysis of therapeutic proteins in biological fluids: recent advancement in analytical techniques. *Drug Deliv* 2023; 30: 2183816

## Impact of high-speed nanodroplet collisions on *Pseudomonas aeruginosa* cells and biofilm formation

Yurina Tamura<sup>1)</sup>, Masato Kawamura<sup>1)</sup>, Tomoki Nakajima<sup>2)</sup>, Siwei Liu<sup>2)</sup>,  
Takumi Sato<sup>1)</sup>, Takehiko Sato<sup>2)</sup> and Shigeru Fujimura<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Clinical Infectious Diseases & Chemotherapy, Tohoku Medical and Pharmaceutical University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, Japan

<sup>2)</sup> Institute of Fluid Science, Tohoku University

High-speed nanodroplet technology, developed in 2017, is the world's first technique capable of generating and rapidly exposing to groups of nanodroplets miniaturized to less than 100 nm in diameter via water vapor condensation. This study was aimed at evaluating the effectiveness of this novel sterilization method against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*, a particular problem in nosocomial infections. Five multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) strains, clinically isolated from a medical institution in the Tohoku region of Japan, along with the *P. aeruginosa* PAO1 strain, were used to prepare biofilm formation models. These models were exposed to 100 nm-diameter nanodroplets at an impact pressure of  $1.8 \times 10^8$  Pa (18 MPa) for 20-30 minutes. Subsequently, the viable count, amount of biofilm formation, and extracellular matrix (ECM) components were measured. Additionally, morphological changes in the bacteria were examined by scanning electron microscopy (SEM). After 20 minutes of nanodroplet exposure, no significant reduction in the viable count was observed. However, the amounts of polysaccharides and extracellular DNA (eDNA) in the ECM decreased, leading to a reduction in biofilm formation. This suggests that the decrease in polysaccharides and eDNA contributed to weakening of the structure of the biofilm. In contrast, after 30 minutes of exposure, the viable count decreased in all six strains, with MDRP-5 exhibiting a bactericidal effect of over 99.9%. SEM observations revealed pore formation in the PAO1 cells and complete destruction of the cell integrity in the MDRP-5 cells. These results indicate that high-speed nanodroplet technology disrupts the structure of the biofilm and physically kills *P. aeruginosa* through mechanical impact. The bactericidal effect was greater in strains showing lower biofilm formation, suggesting that biofilm destruction may enhance the bactericidal efficiency. Because this technique uses only water and does not rely on chemical disinfectants, it is effective regardless of bacterial drug susceptibility. In addition, only a small amount of water is used, and it is expected that the number of options for sterilization methods will increase when the method is put to practical use after further studies.