

出國報告（出國類別：進修）

影像身體組成分析形態學及肌少症 於消化系癌症的大數據研究

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名：吳志宏

派赴國家：美國

出國期間：113年4月15日至113年10月14日

報告日期：113年12月20日

摘要

組織術（Histotripsy）是一種前景廣闊的非侵襲性治療技術，利用短周期高強度超音波的機械波來液化目標組織。這種方法能有效地造成細胞內部的空氣形成內生性開洞，將組織轉化為無細胞碎片，這些碎片會在 1 至 2 個月內被人體吸收，並且僅留下一個小的疤痕。

組織粉碎術具有幾個顯著優點：

1. **非侵襲性**：相較於傳統手術，這種技術不需要切開皮膚。
2. **無輻射暴露**：減少了病人接受輻射的風險。
3. **無熱效應**：能避免因熱造成的組織損傷，特別是對於血管的保護。

由於其組織選擇性，組織粉碎術特別適合用於肝細胞癌的局部治療，並且不受熱沉效應的限制。它可以通過即時超音波成像進行引導，確保精確治療。

除了腫瘤治療，組織粉碎術還能促進腫瘤微環境中的免疫反應，若與免疫治療結合，有望增強治療效果，提升患者的治療反應。這使得組織術在癌症治療領域中展現出新的希望和潛力。

目次

| | |
|------------------------------------|----|
| 摘要..... | i |
| 目次..... | ii |
| 1. 目的及前言 | 1 |
| 1.1 高強度聚焦超音波的現況： | 2 |
| 1.2 組織碎化術在密西根大學的發展..... | 3 |
| 2. 過程..... | 4 |
| 2.1 參與 Histotripsy Group 的實驗 | 4 |
| 2.2 小動物實驗流程..... | 5 |
| 2.3 大動物實驗流程..... | 8 |
| 3. 心得..... | 12 |
| 3.1 組織碎化術在肝癌的進展： | 12 |
| 3.2 組織碎化術的免疫反應..... | 13 |
| 4. 建議事項及結語 | 14 |
| 參考文獻..... | 1 |

1. 目的及前言

原規劃於前往密西根大學學習半年，在 Stewart C. Wang 教授的安排與指導下參與其實驗室 Morphomic Analysis Group (MAG) 的研究，觀摩並學習該團隊在身體組成分析形態學的大數據分析研究與深度學習開發的研究模式，並與密西根大學進行研究合作，期望可以利用身體組成分析進行東西方病人族群於消化系癌症的影響預後相關比較及驗證，並且在大數據基礎上能有所創新與進展，發展出嶄新的精準醫療預測模型，造福廣大的患者族群。但 Stewart C. Wang 教授因個人因素無法接待指導訪問學者，在陳世杰主任的同意之下改為去密西根大學徐綦教授的 Histotripsy Group 學習。

Histotripsy 中文為”組織碎化術”，這一術語於 2004 年在密歇根大學徐綦教授首次提出[1]。在希臘語中，“Histo”意為“軟組織”，“tripsy”指的是“破壞”。組織碎化術使用高強度短時低持續時間（ $\leq 1\%$ ，微秒級）的超音波脈衝，產生的峰值壓力使組織中的內源性氣體產生聲空化效應（Acoustic cavitation）。使用在腫瘤內部這些微小的氣泡會反覆膨脹與破裂，達到破壞腫瘤細胞的效果。組織碎化術與一般使用持續或長時間的超音波（持續時間 $\geq 10\%$ ）以加熱組織的高強度聚焦超音波（High-Intensity Focused Ultrasound, HIFU）不同 [2]，是全新的平臺科技，可以廣泛應用於心血管疾病及腫瘤消融，該技術所衍生的醫療器材愛迪生系統（Edison system），於 2023 年十月經美國食品暨藥物管理局（Food and drug administration, FDA）認證，是全球第一款無傷口治療肝癌的創新醫材。很幸運徐綦教授很快答應我訪問學者的申請，讓我有這次出國進修充實自己的機會。

1.1 高強度聚焦超音波的現況：

介入治療作為當前醫療的一個重要趨勢，利用微創或非侵入性的方法有效治療各種疾病。隨著影像技術的進步，許多疾病現在可以透過這些方法來治療。例如，從平面放射治療到立體定向體放射治療（SBRT）的發展，雖然這些技術可以精準照射腫瘤，但輻射暴露的毒性仍然限制了治療的範圍和部位[3]。另一方面，基於熱能的消融技術通常在影像引導下經皮進行，包括射頻消融（Radiofrequency ablation, RFA）[4]、微波消融[5]和冷凍消融[6]，通過加熱或冷凍目標組織來引起壞死。但熱消融技術的限制包括由血流引起的熱沉效應（Heat-sink effect），這限制了消融區域並導致邊界預測性不足，同時對醫師專業知識有著極高的依賴性，增加了治療的挑戰。高強度聚焦超音波（High-intensity focused ultrasound, HIFU）作為一種非侵入性的熱消融技術，使用聚焦的超音波能量來引起熱壞死。透過將超音波聚焦至病灶，瞬間提高溫度至 65 至 85°C，導致蛋白質變性及細胞壞死，進而實現治療效果。HIFU 的優勢包括無需開刀、無創、無需麻醉，且可以重複治療，特別適合針對特定復發的患者[7]。

在臨床應用方面，HIFU 已用於治療子宮肌瘤及某些神經系統疾病。最初在巴金森氏症的研究中，HIFU 需配合開顱手術進行，但隨著影像技術的進步，診斷型磁振造影及超音波的發展，使得 HIFU 逐漸獨立運作，並被應用於前列腺肥大、子宮肌瘤及腺肌症等疾病的治療。臺灣近年引進了磁振造影導引的 HIFU 技術，能夠在腹腔及骨盆腔內廣泛應用。本院近年來也陸續引進聚焦超音波「神波刀」來治療巴金森氏症服務，用非侵入性超音波燒灼神經，阻斷會產生顫抖的神經迴路，療程僅 3 小時就可完成，且為一次性療程，減輕患者顫抖程度達 9 成。目前亞洲共有 36 臺神波刀儀器，臺灣目前僅允許可用於治療「原發性顫抖」及「顫抖為主要表現之巴金森氏症」，並且會評估是藥物治療效果有限後，才會轉用神波刀，臺大 2022 年 8 月引進後第 1 個病例是 54 歲患有巴金森氏症的葉先生，這名經營建材生意的患者手部顫抖嚴重，連扣釦子、拉拉鍊都要他人協助，接受神波刀治療約 2-3 小時，並住院 3 天，顫抖程度減輕 9 成，葉先生終可正常生活。

但對於乳腺、肝臟和胰臟的腫瘤，但由於解剖學挑戰和較長的手術時間，其臨床應用仍然較少[8]。

1.2 組織碎化術在密西根大學的發展

為了克服以上的問題，密西根大學生醫工程徐綦教授的研發團隊則是發展出全新次世代高能聚焦超音波-組織碎化術（Histotripsy）。組織碎化術利用短周期給予高強度超音波的機械波來液化目標組織，使用細胞內的空氣造成內生性的開洞，具有非侵襲性，沒有輻射暴露，沒有熱效應的特色。並可通過即時超音波影像進行引導。該技術使用從體外發射的聚焦超音波，通過空化效應 (cavitation) 機械性地破壞組織，將目標區域轉化為無細胞碎片。組織粉碎術消融區的物質在 1 至 2 個月內被人體吸收，僅留下一個小的疤痕，是一種與 HIFU 類似的非侵入性聚焦超音技術 [1,9]。然而，組織粉碎術的基本機制截然不同，它依賴於在細胞層級的機械效應來破壞組織。“組織粉碎術”這一術語於 2004 年在密歇根大學徐綦教授首次提出 [1]。在希臘語中，“Histo” 意為“軟組織”，“tripsy” 指的是“破壞”。與使用持續或長時間的超音波（持續時間 $\geq 10\%$ ）以高強度加熱組織的熱 HIFU 不同 [2]，組織粉碎術使用短時（微秒級）的超音波脈衝，低持續時間（ $\leq 1\%$ ）以最小化加熱效應 [10]，並以更高的峰值壓力幅度從組織中的內源性氣體產生聲空化效應（Acoustic cavitation）。聲空化是指微泡的生成、振蕩和在超音波作用下的崩解。極高的超音波壓力導致空化泡的慣性膨脹和崩解，從而對局部施加強烈的應變，能夠使細胞破裂為無細胞碎片 [11]。此外，可以利用超音波影像即時引導和監控組織粉碎術過程。與許多現有的微創技術不同，組織粉碎術可以非侵入性地去除組織。密西根大學的 Histotripsy Group 位於大學的北校區（North Campus）的 Gerstacker building。



（圖一）密西根大學的 Histotripsy Group 的所在 Gerstacker building。

2. 過程

2.1 參與 Histotripsy Group 的實驗

組織粉碎術能夠有效去除組織，這使得它可以用於許多熱能技術無法實現的應用。其非熱破壞性質也使得組織粉碎術能夠克服與熱裝置相關的許多限制（如熱沉效應、缺乏精確邊界和可預測性）。對多個人體組織進行實驗，包含腦部、神經、眼睛、脂肪、肌肉、肝臟、肺臟、腎臟、輸尿管、腎上腺、淋巴結、膽囊、胃、食道、子宮、子宮頸及胰臟都達到明顯的組織破壞效果，而對動脈、靜脈的血管構造則是部分破壞，對皮膚、軟骨及韌帶則沒有破壞。組織粉碎術已在多個臨床前應用中進行研究，包括肝臟[14,15]、腎臟[16,17]和前列腺[18]的腫瘤治療，神經系統疾病血塊液化[19,20]，血栓溶解[21,22]，肌肉內血腫液化[23,24]，新生兒和胎兒先天性心臟病[9,25]，心瓣膜疾病[26–28]，腎結石[29]，膿腫[30]。利用此一在各組織間不同破壞效果的特性，能夠對高風險區域進行治療而不傷害到血管。雖然促進腫瘤轉移的風險也是使用組織粉碎術的一個關注點[31]。然而，Styn 等人[16]使用新西蘭兔腎臟腫瘤模型，植入 VX-2 腫瘤後進行組織粉碎術治療腎臟腫瘤的實驗，並在治療後對兔子的肺進行了組織學檢查。實驗顯示，組織粉碎術後肺部轉移瘤的數量或密度沒有顯著增加。當組織粉碎術應用於組織-液體界面（如血栓或心臟組織）時，組織從表面向內侵蝕，形成邊界清晰的穿孔[9]。當將組織粉碎術應用於體積大的組織內部（如腫瘤）時，組織粉碎術會將目標組織液化為無細胞均質物，這些碎片在 1 至 2 個月內被身體吸收，只留下一些小疤痕[12,13]。以上這些證據都有賴大量的小動物及大動物實驗來證明，在密西根大學進修期間很幸運地在實驗室參與了很多動物實驗，執行超音波的掃描。



（圖二）Histotripsy Group 的小動物實驗室

2.2 小動物實驗流程

小鼠（mice）至今仍是最常見的動物模式（animal mode），可以將腫瘤種植於小鼠的大腿或腹腔，待腫瘤長大之後再以 Histotripsy 進行治療，並比較治療前後影像的變化，徐綦教授團隊基於此一平臺進行了大規模的動物試驗，如下圖展示乳癌細胞株在小鼠大腿進行 Histotripsy 治療的流程：

（一）將小鼠進行氣麻將腫瘤部位剃毛，紅圈圈處為腫瘤的位置



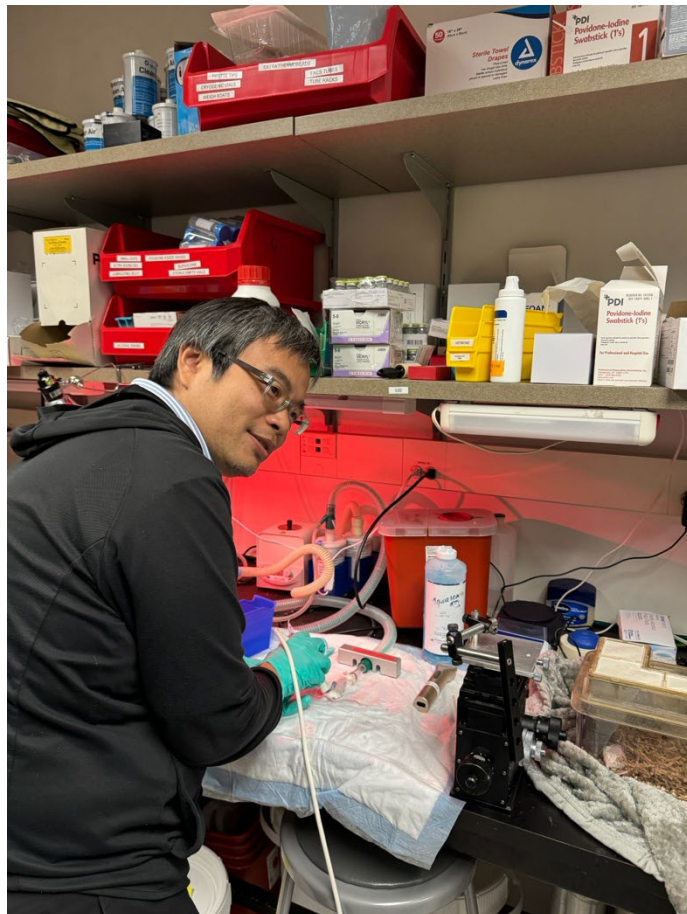
（二）將小鼠固定在特製的固定板以便水浴進行治療



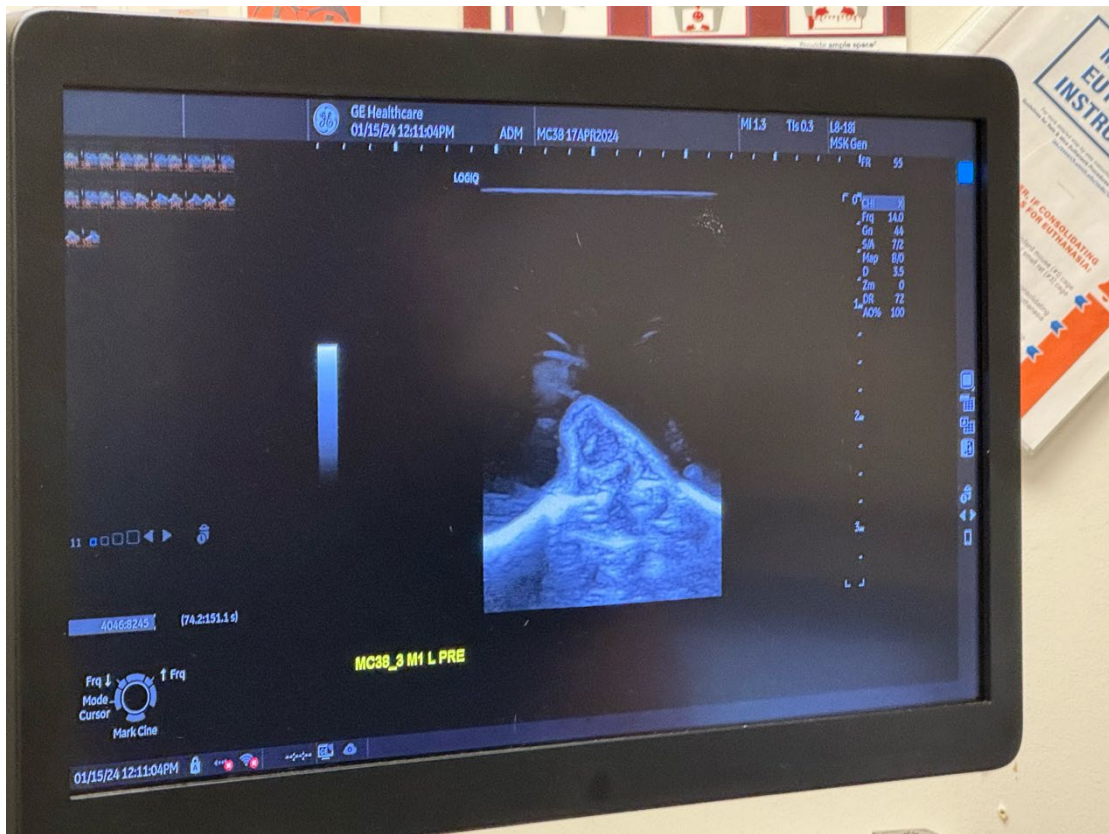
(三) 動物特製的超音波探頭



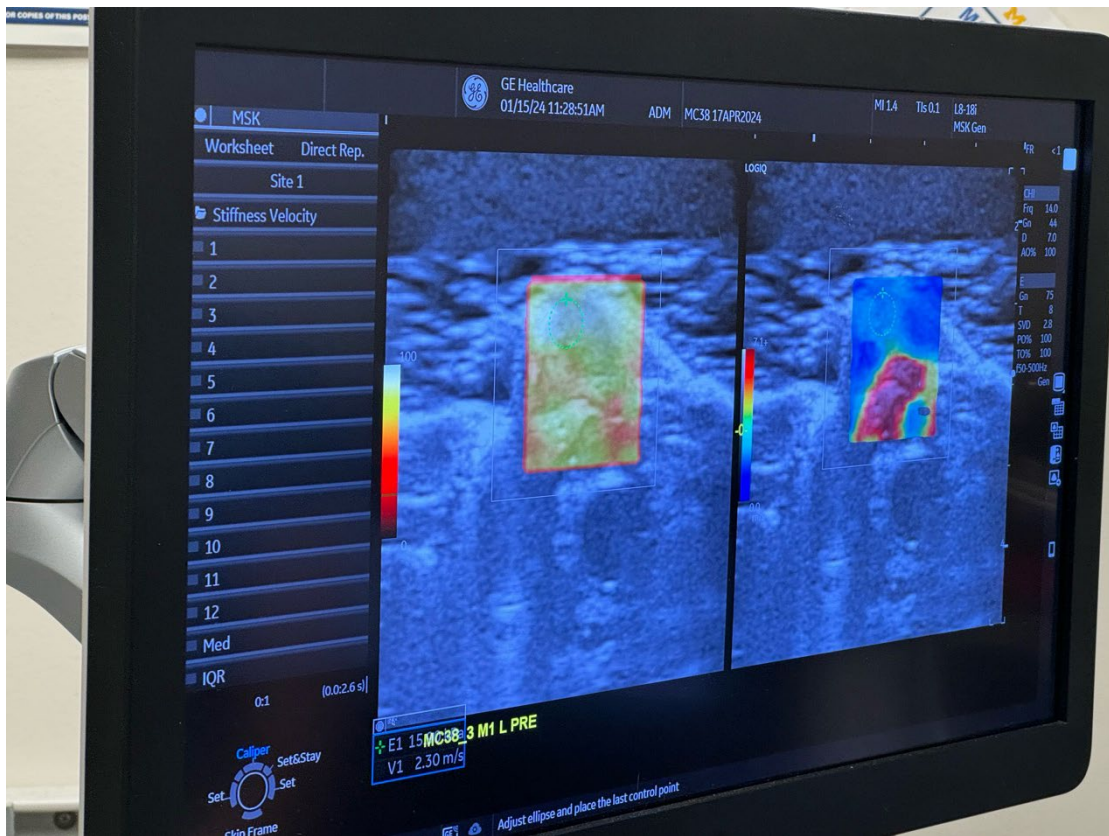
(四) 使用動物特製的超音波探頭進行掃描



(五) 使用 Histotripsy 進行治療可以看到腫瘤內空洞化 cavitation



(六) 使用 Histotripsy 進行治療後進行彈性測量



2.3 大動物實驗流程

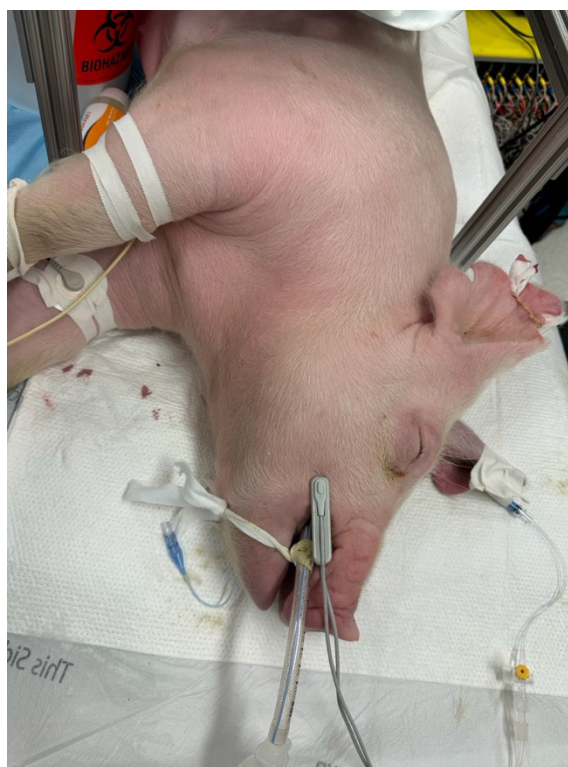
創新醫材若最後要使用在人體，小鼠因為與人類體型差異巨大，無法進行人體試驗前的印證，至今最常見的方法是使用豬作為動物模式，並選用與人類體重相近的豬，其肝臟大小也與人類相近，但大動物的實驗需要較大的空間，也非常消耗研究經費，密西根大學的大動物實驗位在北校區研究核心（North Campus Research Core），佔地廣闊有成熟的養殖技術跟完整的獸醫服務，如下圖所示：

（七）進行大動物試驗的密西根大學北校區研究核心



徐綦教授團隊也基於此一平臺以 Histotripsy 進行治療，並比較預期治療範圍與實際消融範圍是否一致，如下圖展示在豬進行 Histotripsy 治療的流程：

（八）將豬進行插管麻醉並調整姿勢



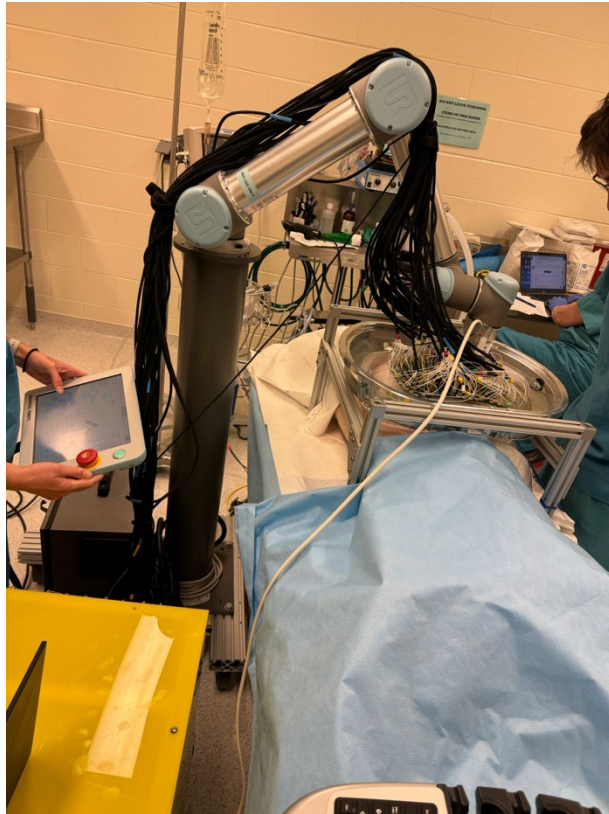
(九) 將豬右上腹除毛及去角質



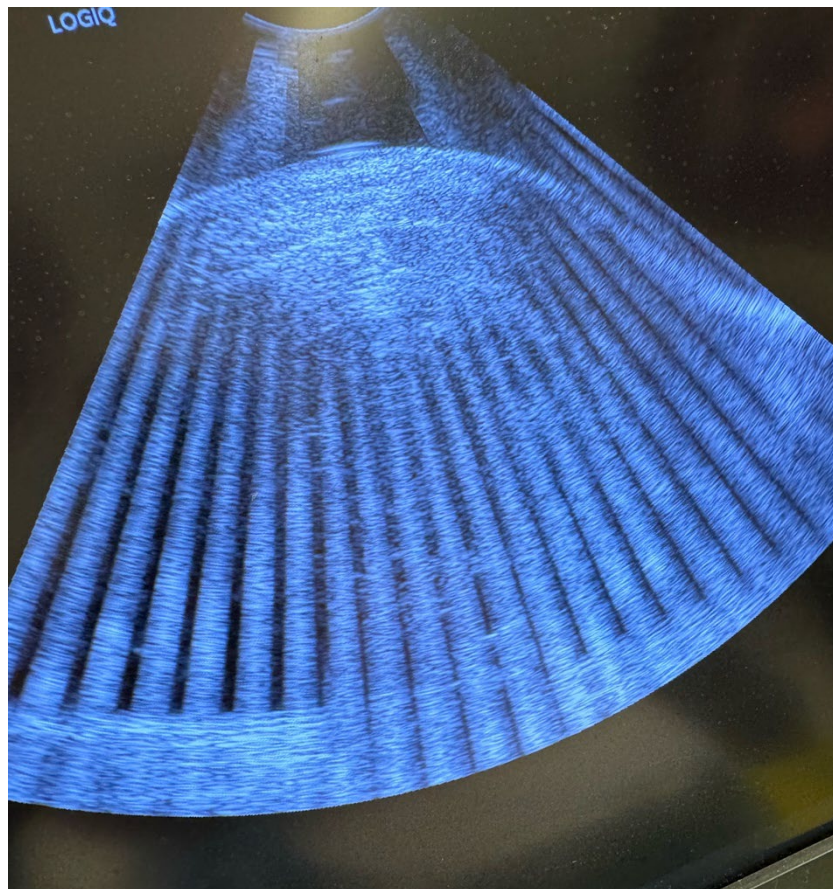
(十) 將 Histotripsy 探頭浸入去氣水 (degassing water) 透過彈性膜與上腹接觸



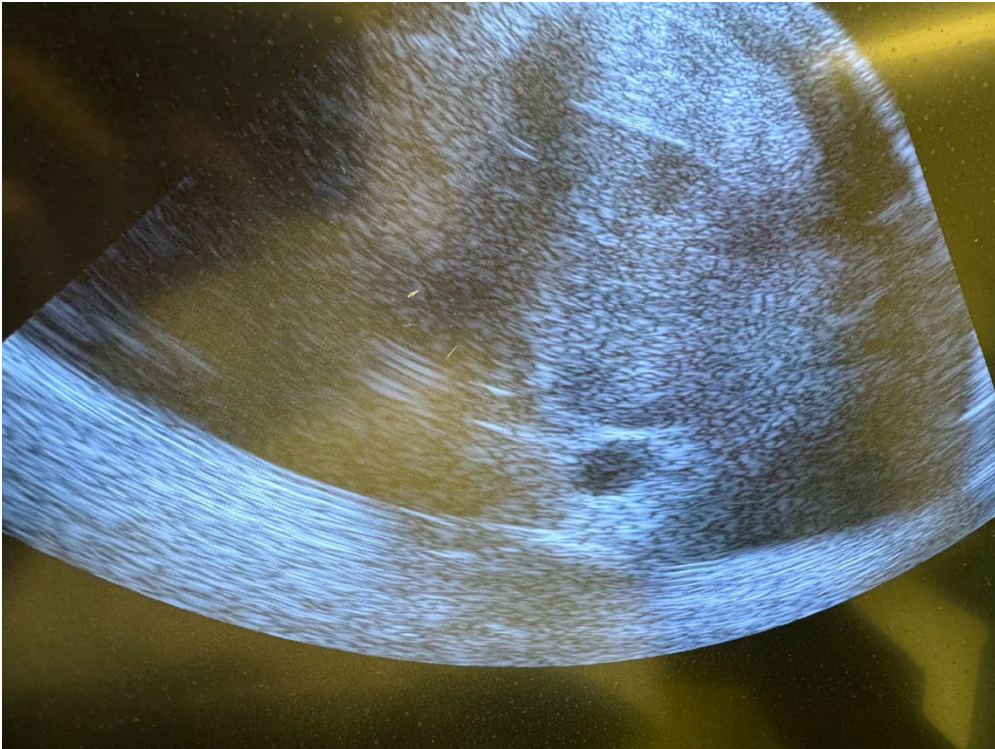
(十一) 以機器手臂調整超音波探頭的角度



(十二) Histotripsy 治療肝臟產生的氣泡跟假影在超音波底下的影像



(十三) Histotripsy 治療肝臟產生的消融區域在超音波底下的顯像



(十三) Histotripsy 治療後將肝臟取下進行病理檢查



3. 心得

3.1 組織碎化術在肝癌的進展：

消融治療已被證明在不可手術的肝細胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）局部控制中有效，且在近期的治療指引中推薦將射頻消融作為一線治療選擇[32,33]。主流的肝腫瘤消融方法基於熱效應，但射頻消融受到血流通過富含血管的肝臟所引起的熱沉效應的限制。基於機械效應的組織粉碎術彌補了射頻消融在肝腫瘤治療中的不足。密歇根大學 Vlaisavljevich 等人[14]進行了經皮豬肝組織粉碎術的實驗。結果顯示，不同機械強度的組織對組織粉碎術的敏感性不同。治療後，肝臟的主要血管和膽管保持完整，但周圍的肝實質被完全破壞。該研究團隊隨後使用大鼠模型研究了經皮肝組織粉碎術的長期效果。結果顯示，治療後的病變區形成了無細胞的均質區，該區與周圍正常組織之間有明顯的界限。這種無細胞的均質區隨後被再生的肝實質所取代，28 天後僅有輕微的纖維化病變殘留[13]。除了對正常肝組織進行組織粉碎術消融的實驗外，一些研究團隊還使用患者來源的異種移植小鼠模型對腫瘤進行組織粉碎術消融，以驗證組織粉碎術在肝腫瘤治療中的可行性和安全性[34,35]。一些實驗結果顯示，組織粉碎術後第 26 天，腫瘤直徑平均減少了 73%，且未出現明顯的不良事件，腫瘤無進展生存期和總生存期相比未治療對照組顯著延長[35]。Worlikar 等人使用組織粉碎術部分消融大鼠 HCC 模型中的腫瘤。結果顯示，組織粉碎術後腫瘤負擔減少，15 隻（93.3%）受治療的大鼠中有 14 隻的消融腫瘤幾乎完全吸收[36]。該實驗初步驗證了組織粉碎術在 HCC 治療中的可行性和安全性，並表明組織粉碎術可能刺激免疫反應，導致局部腫瘤細胞破壞。儘管組織粉碎術在肝腫瘤治療中的可行性已在實驗中得到證實，但仍存在一些顯著問題，如經皮肝組織粉碎術引起的肺出血和由肋骨引起的像差，這些問題對未來的臨床應用構成限制[13]。Kim 等人[37]比較了使用豬模型在無像差校正的情況下進行的經肋骨和經腹組織粉碎術對肝組織消融的效果。實驗顯示，經肋骨組織粉碎術治療 40 分鐘後，腹壁溫度升高了 3.9 ± 2.1 °C。儘管在相同的參數和治療時間下，經肋骨組織粉碎術產生的消融區域比經腹組織粉碎術小 (3.6 ± 1.7 cm³ vs. 4.5 ± 2.0 cm³)，但該研究團隊認為，在無像差校正的情況下，經肋骨組織粉碎術仍然是一種有效且安全的治療方法。Knott 等人[38]也使用豬模型進行了經肋骨組織粉碎術肝消融實驗，結果顯示，6 隻豬的肝臟消融病灶完全，無組織殘留。T2 加權（T2W）磁共振成像（MRI）顯示，在 5 隻豬中（1 隻動物未進行 MRI），消融區域上方的體壁出現水腫，並且 5 隻動物中有 6 隻右下肺葉出現肺變色，伴隨肺泡出血，但仍認為經肋骨肝組織粉碎術消融是可行且有效的。組織粉碎術可誘發免疫反應。由此可見，使用 Histotripsy 在人體試驗前進行大動物實驗有其必要性，這次在密西根大學進修期間也很幸運有多次參與大動物試驗的機會。

3.2 組織碎化術的免疫反應

組織粉碎術除了可以治療腫瘤之外，也可以促進腫瘤微環境中的免疫反應。一個當前的假設是，煮沸型組織粉碎術（Boiling Histotripsy）可以上調功能性 CD8+ T 細胞的數量，並促進 M1 巨噬細胞的激活，從而促進腫瘤免疫 [39,40]。Pahk 等人[39]證明，煮沸型組織粉碎術可以改變腫瘤微環境中初始巨噬細胞和腫瘤相關巨噬細胞的表型，並產生大量損傷相關分子模式（Damage-Associated Molecular Patterns, DAMP）。DAMP 通過結合受體可以刺激強大的免疫反應[17]。Hu 等人[41]發現，組織粉碎術比起基於熱效應的傳統高強度聚焦超聲更能產生更多的 DAMP 並更顯著地刺激下游免疫變化，例如通過樹突狀細胞的激活。Qu 等人[42]使用氣泡雲型組織粉碎術(Cavitation Cloud Histotripsy)治療小鼠的皮下黑色素瘤，發現組織粉碎術能有效促進內源性和適應性免疫細胞群在腫瘤內部的局部滲透。免疫刺激的幅度比放射治療或熱消融更強。氣泡雲型組織粉碎術也可以促進在未治療部位的腫瘤中的遠端免疫反應，並抑制轉移瘤的生長。Worlikar 等人[43]在使用大鼠肝細胞癌（HCC）模型的實驗中顯示，9 隻大鼠中有 11 隻在使用氣泡雲型組織粉碎術消融 50 - 75%的腫瘤體積後發展出完全的局部腫瘤退縮，而所有未治療的大鼠則顯示出局部腫瘤進展並發展為肝內轉移。Hendricks-Wenger[44]等人發現，氣泡雲型組織粉碎術可以通過改變小鼠 Pan02 腫瘤模型中的胰腺癌免疫微環境來增加先天免疫系統的刺激。此外，檢查點抑制劑（Check-point inhibitor）與氣泡雲型組織粉碎術的聯合治療提高了檢查點抑制劑的療效，這對腫瘤免疫療法具有重要意義[45]。

4. 建議事項及結語

目前正在廣泛的發展組織粉碎術治療腫瘤相關的臨床試驗，包含前列腺增生（Benign prostatic hyperplasia, BPH）及鈣化性主動脈狹窄（Calcific aortic stenosis, CAS）。在前列腺增生方面，2016 年和 2017 年於美國兩個醫療中心進行的第 I 期臨床試驗（NCT01896973）中，25 名因 BPH 引起排尿困難的患者接受了由 HistoSonics 公司製造的前列腺組織碎裂裝置（Vortex Rx）的治療。組織碎裂術後，3 例暫時性尿滯留（<3 天）、1 例尿滯留（持續 8 天，定義為嚴重）、1 例輕微的肛門擦傷和顯微鏡下血尿被認為是與裝置相關的不良事件。儘管經直腸超聲影像或內窺鏡觀察未見前列腺組織的減容，也未出現尿流或排尿後殘餘尿量的臨床顯著改善，但參與者的國際前列腺症狀評分與治療前基線相比顯著改善。在肝癌方面，2019 年在巴塞隆納進行了一項針對多病灶性肝惡性腫瘤患者的肝臟組織碎裂術第 I 期臨床試驗（NCT03741088, THERESA trial）。該試驗同樣使用了由 HistoSonics 公司製造的臨床原型肝臟組織碎裂裝置（Vortex Rx）。試驗包括 8 名患者的 11 個肝惡性腫瘤：5 名患者的 7 個結直腸肝轉移瘤、1 名膽管癌患者的 2 個轉移瘤、1 名乳腺癌患者的 1 個轉移瘤以及 1 名患者的 1 個原發性肝細胞癌（HCC）腫瘤。在試驗期間，未出現與組織碎裂術相關的重大不良事件，證明了組織碎裂術在治療肝惡性腫瘤中的安全性。除了 1 個位置不正確的 5 毫米腫瘤外，所有腫瘤在組織碎裂術治療後 2 個月通過 MRI 觀察到局部腫瘤縮小。1 名 HCC 患者和 1 名結直腸肝轉移瘤患者的腫瘤標誌物在組織碎裂術治療後繼續下降，且 1 名結直腸肝轉移瘤患者在組織碎裂術治療後 8 周出現了未經治療的遠端結直腸癌縮小。該試驗證明了人類肝臟組織碎裂術的安全性和有效性，並收集了人類組織碎裂術能夠導致遠端腫瘤縮小的首個證據。Histotripsy 無創、無熱效應、精準及組織選擇性的特色，未來具有潛力治療高風險區域如胰臟及腎臟腫瘤的消融，Histotripsy 除了在癌症領域的進展，近年發現其在心血管疾病、及神經疾病的也有潛力作廣泛的應用。希望返國之後可以利用自身在介入放射領域的專長在組織粉碎術進行發展，藉由超音波及磁振造影進行導航執行 Histotripsy 手術，也能協助在臺灣已有的高能聚焦超音波基礎上有所創新與進展，造福廣大的患者族群。

參考文獻

1. Xu Z, Ludomirsky A, Eun LY, Hall TL, Tran BC, Fowlkes JB, et al. Controlled ultrasound tissue erosion. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2004;51:726–36.
2. ter Haar GR. High intensity focused ultrasound for the treatment of tumors. *Echocardiography*. 2001;18:317–22.
3. Lo SS, Fakiris AJ, Chang EL, Mayr NA, Wang JZ, Papiez L, et al. Stereotactic body radiation therapy: a novel treatment modality. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7:44–54.
4. Kudo M. Radiofrequency Ablation for Hepatocellular Carcinoma: Updated Review in 2010. *OCL*. 2010;78:113–24.
5. Martin RCG, Scoggins CR, McMasters KM. Safety and efficacy of microwave ablation of hepatic tumors: a prospective review of a 5-year experience. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:171–8.
6. Lanza E, Palussiere J, Buy X, Grasso RF, Beomonte Zobel B, Poretti D, et al. Percutaneous Image-Guided Cryoablation of Breast Cancer: A Systematic Review. *J Vasc Interv Radiol*. 2015;26:1652-1657.e1.
7. Haar GT, Coussios C. High intensity focused ultrasound: physical principles and devices. *Int J Hyperthermia*. 2007;23:89–104.
8. Fukuda H, Ito R, Ohto M, Sakamoto A, Karasawa E, Yamaguchi T, et al. Treatment of small hepatocellular carcinomas with US-guided high-intensity focused ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 2011;37:1222–9.
9. Xu Z, Owens G, Gordon D, Cain C, Ludomirsky A. Noninvasive creation of an atrial septal defect by histotripsy in a canine model. *Circulation*. 2010;121:742–9.
10. Khokhlova VA, Fowlkes JB, Roberts WW, Schade GR, Xu Z, Khokhlova TD, et al. Histotripsy methods in mechanical disintegration of tissue: towards clinical applications. *Int J Hyperthermia*. 2015;31:145–62.
11. Parsons JE, Cain CA, Abrams GD, Fowlkes JB. Pulsed cavitation ultrasound therapy for controlled tissue homogenization. *Ultrasound Med Biol*. 2006;32:115–29.
12. Hall TL, Kieran K, Ives K, Fowlkes JB, Cain CA, Roberts WW. Histotripsy of rabbit renal tissue in vivo: temporal histologic trends. *J Endourol*. 2007;21:1159–66.

13. Vlasisavljevich E, Greve J, Cheng X, Ives K, Shi J, Jin L, et al. Non-Invasive Ultrasound Liver Ablation Using Histotripsy: Chronic Study in an In Vivo Rodent Model. *Ultrasound Med Biol*. 2016;42:1890–902.
14. Vlasisavljevich E, Kim Y, Allen S, Owens G, Pelletier S, Cain C, et al. Image-guided non-invasive ultrasound liver ablation using histotripsy: feasibility study in an in vivo porcine model. *Ultrasound Med Biol*. 2013;39:1398–409.
15. Smolock AR, Cristescu MM, Vlasisavljevich E, Gendron-Fitzpatrick A, Green C, Cannata J, et al. Robotically Assisted Sonic Therapy as a Noninvasive Nonthermal Ablation Modality: Proof of Concept in a Porcine Liver Model. *Radiology*. 2018;287:485–93.
16. Styn NR, Hall TL, Fowlkes JB, Cain CA, Roberts WW. Histotripsy of renal implanted VX-2 tumor in a rabbit model: investigation of metastases. *Urology*. 2012;80:724–9.
17. Schade GR, Wang Y-N, D’Andrea S, Hwang JH, Liles WC, Khokhlova TD. Boiling Histotripsy Ablation of Renal Cell Carcinoma in the Eker Rat Promotes a Systemic Inflammatory Response. *Ultrasound Med Biol*. 2019;45:137–47.
18. Hempel CR, Hall TL, Cain CA, Fowlkes JB, Xu Z, Roberts WW. Histotripsy fractionation of prostate tissue: local effects and systemic response in a canine model. *J Urol*. 2011;185:1484–9.
19. Gerhardson T, Sukovich JR, Chaudhary N, Chenevert TL, Ives K, Hall TL, et al. Histotripsy Clot Liquefaction in a Porcine Intracerebral Hemorrhage Model. *Neurosurgery*. 2020;86:429–36.
20. Sukovich JR, Cain CA, Pandey AS, Chaudhary N, Camelo-Piragua S, Allen SP, et al. In vivo histotripsy brain treatment. 2018 [cited 2024 Aug 12]; Available from: <https://thejns.org/view/journals/j-neurosurg/131/4/article-p1331.xml>
21. Maxwell AD, Owens G, Gurm HS, Ives K, Myers DD, Xu Z. Noninvasive treatment of deep venous thrombosis using pulsed ultrasound cavitation therapy (histotripsy) in a porcine model. *J Vasc Interv Radiol*. 2011;22:369–77.
22. Zhang X, Macoskey JJ, Ives K, Owens GE, Gurm HS, Shi J, et al. Non-Invasive Thrombolysis Using Microtripsy in a Porcine Deep Vein Thrombosis Model. *Ultrasound Med Biol*. 2017;43:1378–90.
23. Khokhlova TD, Kucewicz JC, Ponomarchuk EM, Hunter C, Bruce M, Khokhlova VA, et al. Effect of Stiffness of Large Extravascular Hematomas on Their Susceptibility to Boiling Histotripsy Liquefaction in Vitro. *Ultrasound Med Biol*. 2020;46:2007–16.
24. Khokhlova TD, Monsky WL, Haider YA, Maxwell AD, Wang Y-N, Matula TJ. Histotripsy Liquefaction of Large Hematomas. *Ultrasound Med Biol*. 2016;42:1491–8.

25. Owens GE, Miller RM, Owens ST, Swanson SD, Ives K, Ensing G, et al. Intermediate-term effects of intracardiac communications created noninvasively by therapeutic ultrasound (histotripsy) in a porcine model. *Pediatr Cardiol.* 2012;33:83–9.
26. Villemain O, Robin J, Bel A, Kwiecinski W, Bruneval P, Arnal B, et al. Pulsed Cavitation Ultrasound Softening: a new non-invasive therapeutic approach of calcified bioprosthetic valve stenosis. *JACC Basic Transl Sci.* 2017;2:372–83.
27. Messas E, Rémond MC, Goudot G, Zarka S, Penot R, Mateo P, et al. Feasibility and safety of non-invasive ultrasound therapy (NIUT) on an porcine aortic valve. *Phys Med Biol.* 2020;65:215004.
28. Messas E, IJsselmuiden A, Goudot G, Vlieger S, Zarka S, Puymirat E, et al. Feasibility and Performance of Noninvasive Ultrasound Therapy in Patients With Severe Symptomatic Aortic Valve Stenosis: A First-in-Human Study. *Circulation.* 2021;143:968–70.
29. Duryea AP, Hall TL, Maxwell AD, Xu Z, Cain CA, Roberts WW. Histotripsy erosion of model urinary calculi. *J Endourol.* 2011;25:341–4.
30. Matula TJ, Wang Y-N, Khokhlova T, Leotta DF, Kucewicz J, Brayman AA, et al. Treating Porcine Abscesses with Histotripsy: A Pilot Study. *Ultrasound Med Biol.* 2021;47:603–19.
31. Kieran K, Hall TL, Parsons JE, Wolf JS, Fowlkes JB, Cain CA, et al. Refining histotripsy: defining the parameter space for the creation of nonthermal lesions with high intensity, pulsed focused ultrasound of the in vitro kidney. *J Urol.* 2007;178:672–6.
32. European Association For The Study Of The Liver, European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012;56:908–43.
33. Singal AG, Llovet JM, Yarrow M, Mehta N, Heimbach JK, Dawson LA, et al. AASLD Practice Guidance on prevention, diagnosis, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2023;78:1922.
34. Hendricks-Wenger A, Weber P, Simon A, Saunier S, Coutermarsh-Ott S, Grider D, et al. Histotripsy for the Treatment of Cholangiocarcinoma Liver Tumors: In Vivo Feasibility and Ex Vivo Dosimetry Study. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2021;68:2953–64.
35. Hendricks-Wenger A, Saunier S, Simon A, Grider D, Luyimbazi D, Allen IC, et al. Histotripsy for the Treatment of Cholangiocarcinoma in a Patient-Derived Xenograft Mouse Model. *Ultrasound Med Biol.* 2022;48:293–303.

36. Worlikar T, Mendiratta-Lala M, Vlasisavljevich E, Hubbard R, Shi J, Hall TL, et al. Effects of Histotripsy on Local Tumor Progression in an in vivo Orthotopic Rodent Liver Tumor Model. *BME Front.* 2020;2020:9830304.
37. Kim Y, Vlasisavljevich E, Owens GE, Allen SP, Cain CA, Xu Z. In vivo transcostal histotripsy therapy without aberration correction. *Phys Med Biol.* 2014;59:2553–68.
38. Knott EA, Longo KC, Vlasisavljevich E, Zhang X, Swietlik JF, Xu Z, et al. Transcostal Histotripsy Ablation in an In Vivo Acute Hepatic Porcine Model. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2021;44:1643–50.
39. Pahk KJ, Shin C-H, Bae IY, Yang Y, Kim S-H, Pahk K, et al. Boiling Histotripsy-induced Partial Mechanical Ablation Modulates Tumour Microenvironment by Promoting Immunogenic Cell Death of Cancers. *Sci Rep.* 2019;9:9050.
40. Singh MP, Sethuraman SN, Miller C, Malayer J, Ranjan A. Boiling histotripsy and in-situ CD40 stimulation improve the checkpoint blockade therapy of poorly immunogenic tumors. *Theranostics.* 2021;11:540–54.
41. Hu Z, Yang XY, Liu Y, Morse MA, Lysterly HK, Clay TM, et al. Release of endogenous danger signals from HIFU-treated tumor cells and their stimulatory effects on APCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335:124–31.
42. Qu S, Worlikar T, Felsted AE, Ganguly A, Beems MV, Hubbard R, et al. Non-thermal histotripsy tumor ablation promotes abscopal immune responses that enhance cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2020;8:e000200.
43. Worlikar T, Zhang M, Ganguly A, Hall TL, Shi J, Zhao L, et al. Impact of Histotripsy on Development of Intrahepatic Metastases in a Rodent Liver Tumor Model. *Cancers (Basel).* 2022;14:1612.
44. Hendricks-Wenger A, Sereno J, Gannon J, Zeher A, Brock RM, Beitel-White N, et al. Histotripsy Ablation Alters the Tumor Microenvironment and Promotes Immune System Activation in a Subcutaneous Model of Pancreatic Cancer. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2021;68:2987–3000.
45. Hendricks-Wenger A, Hutchison R, Vlasisavljevich E, Allen IC. Immunological Effects of Histotripsy for Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2021;11:681629.