

## 공초점 레이저 주사 현미경을 이용한 혈구 유동가시화 및 세포공핍층 측정에 관한 연구

임수희\* · 김위한\* · 이호\*\* · 이춘영\*\* · 박철우†

### Flow Visualization of Blood Cell and Detection of Cell Depleted Layer Using a Confocal Laser Scanning Microscope

Soo Hee Lim, Wi Han Kim, Ho Lee, Choon Young Lee and Cheol Woo Park

**Abstract.** In the present study, we employed the confocal laser scanning microscopy (CLSM) system to visualize the blood flow field with  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  spatial resolution. Based on the confocal microscopic image of red blood cells (RBCs), we performed the velocity vector field measurement and evaluated characteristics of cell migration from the cell depleted layer thickness calculation. The rat and mouse's blood were supplied into a micro glass tubes in vitro. The line scanning rate of confocal microscopy was 15 kHz for a  $500 \times 500$  pixels image. As a result, the red blood cell itself can be used as a tracer directly without any kind of invasive tracer particle to get the velocity vector field of blood flow by performing particle image velocimetry (PIV) technique.

**Key Words:** Confocal Laser Scanning Microscopy (공초점 레이저 주사 현미경), Red Blood Cell (적혈구), Blood Flow (혈류 유동), Cell Depleted Layer (세포공핍층), PIV (입자영상상속계)

#### 기호설명

- $f_d$  : focal depth [ $\mu\text{m}$ ]
- $HR$  : hematocrit ratio [%]
- $Q$  : flow rate [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]
- $R$  : radius of micro tube [ $\mu\text{m}$ ]
- $Re$  : Reynolds number
- $t$  : cell depleted layer thickness [ $\mu\text{m}$ ]
- $u_z$  : streamwise mean velocity [ $\mu\text{m}/\text{s}$ ]

#### 1. 서론

현재의 식생활의 변화 등으로 인한 심혈관계 질환의 비중이 높아지고 혈류와 관련된 질환의 유발 및 임상

적 현상이 심각히 대두되고 있다. 혈관계 질환과 관련하여 의학 분야에서 뿐만 아니라 공학적 기법을 통한 혈류역학적(bio-fluid dynamic) 측정 및 해석에 대한 시도와 가설들이 진행되어지고 있다<sup>(1)</sup>.

혈액 유동은 비뉴턴(non-Newtonian) 유체 특성과 탄성적(elastic) 특성을 함께 가지고 있으며, 맥동구조를 가지고 있어 정량적 특성 파악이 매우 어렵다<sup>(2)</sup>. 혈액(blood)에 포함된 혈구들이 가지는 혈유변화적(hemorheology) 특성 값이 측정 및 해석은 심혈관계 질환의 심각성과 상관관계 도출의 중요성으로 인해 현재 까지 계속적인 연구가 이루어지고 있다.

혈액에는 여러 가지 부유물들을 포함하고 있는데, 그 중에서 적혈구는 산소 및 철분 그리고 여러 가지 영양분을 생체 내 구석구석에 있는 세포까지 공급해주는 역할을 수행함으로써 생체가 살아가는데 가장 큰 영향을 미친다고 할 수 있다. 그래서 적혈구의 유동을 측정하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있는 것이다. 하지만 혈액은 불투명하며 적혈구와 같은 적색을 띄고 있어서 혈액 내 적혈구를 가시화하기란 쉬운 일이 아니다.

---

†경북대학교 기계공학부  
E-mail : chwoopark@knu.ac.kr  
\*경북대학교 대학원 기계공학과  
\*\*경북대학교 기계공학부

최근까지 형광을 이용한 micro-PIV 시스템과 같은 가시화 기법이 일조를 하고 있으나, 제한된 신호강도와 투명 탐색창이 필수적으로 요구되어지고 있고, 생체의(in-vitro) 조건에 제한되어 실제 특성값 해석에 어려움이 따른다<sup>(3,4)</sup>. 특히, 형광입자의 경우 표면에 약한 전하를 띠고 있어 바이오 유체내에 삽입되었을 경우 단백질과의 점착 및 반응 등으로 인해 추적입자로서의 기능이 많이 저하되는 단점도 있다.

이러한 어려움들과 정확한 측정값을 가지기 위해 본 연구에서는 새로운 장비를 개발 및 활용 하였는데 새롭게 구현된 공초점 레이저 주사 현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM) 방식의 바이오 광학 이미징 장치로 혈액 내에 포함된 적혈구 자체를 직접 가시화할 수 있도록 장치를 구성하였다.

따라서, 본 연구에서는 공초점 현미경 시스템을 활용하여 생체의 상태의 마이크로 튜브 내 혈류 유동을 추적입자 없이 적혈구를 직접 이미징하여 이를 입자영상유속계 계산 방식을 통한 속도장 측정을 수행하고자 한다. 또한 혈구의 미세채널 내 이동 특성인 벽면 주위에 발생되는 세포공핍층(cell depleted layer)의 두께 측정에도 공초점 현미경으로 취득한 혈액 영상을 활용하고자 한다.

## 2. 실험 장치 및 방법

공초점 현미경(confocal microscopy)은 생명광학(biophotonics) 분야에서 활용되고 있는 대표적인 광학 계측 장비로써, 기존의 광학현미경(wide field microscopy)보다 매우 우수한 공간분해능을 가짐과 동시에 관찰물질(샘플)의 피하조직까지 관찰할 수 있는 첨단 광학 영상장비로 알려져 있다<sup>(5,6)</sup>.

공초점 현미경의 작동원리는 광원으로 사용되는 레이저(파장 488 nm, 최대 power 20 mW)의 빛은 빔분리기에서 반사가 된 뒤 두 개의 스캐닝 거울(dichromatic mirror)로 구성된 스캐너를 통과한다(Fig. 1). 이 스캐너는 raster 스캐닝을 위한 polygon mirror(DT-36-290-025)와 axis 스캐닝을 위한 galvanometer mirror(6240H)로 구성된다.

이렇게 스캐너를 통과한 빛은 대물렌즈(C apochromat 40X, Zeiss)를 통해 이미징 평면(imaging planes) 즉, 대물렌즈의 초점 평면(focal planes)에 2차원으로 주사된다. 대물렌즈는 water-immersing 형태이며

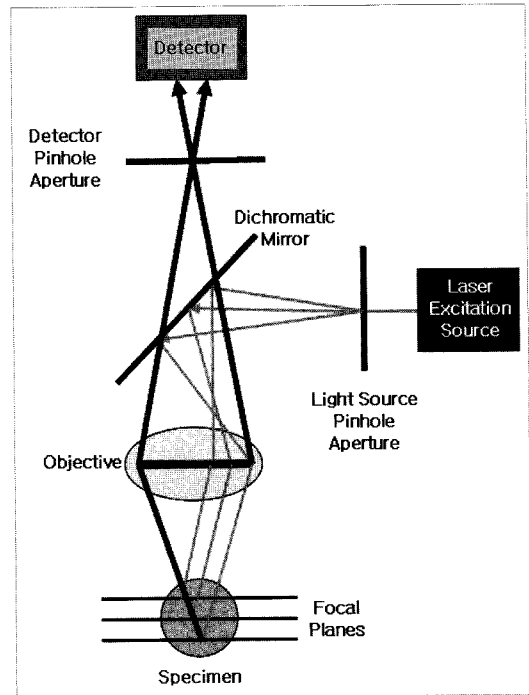


Fig. 1. The schematic diagram of laser scanning confocal microscopy

NA=1.2 이다. 이미징 평면의 각 지점에서 발생한 빛은 입사광의 경로를 다시 되밟아가고 빔분리기를 통과한다. 이 빛은 집안렌즈와 핀 홀(pin-hole)을 통과한 뒤 광 센서에 측정된다<sup>(7)</sup>.

광센서는 샘플에서 발광(irradiation)된 레이저 반사광(back-scattered light)의 정확한 취득이 가능한 photomultiplier tube(PMT)를 사용하였다. 본 연구에서는 혈구의 경우 표면의 membrane이 존재하여 광의 굴절률의 차이가 발생하므로 반사광의 영상이 취득될 수 있는 것이다.

핀 홀 뒤에는 일반적으로 형광빛만을 통과시키기 위해 대역통과필터(band-pass filter)가 놓여 있으나 본 실험에서는 반사광을 직접 취득하였으므로 사용되지 않았다. 광센서에 의해 측정된 아날로그 신호는 프레임 그레버(frame grabber)를 거쳐서 컴퓨터가 처리할 수 있는 디지털신호로 전환된다. 이 신호는 영상 획득 및 분석 소프트웨어를 거쳐서 모니터에 표시된다. 3차원 영상은 샘플 스테이지(stage)를 다음 단면으로 순차적으로 움직이면서 촬영한 각 평면의 영상을 이미지 프로세싱을 통해 만들어 진다<sup>(8)</sup>.

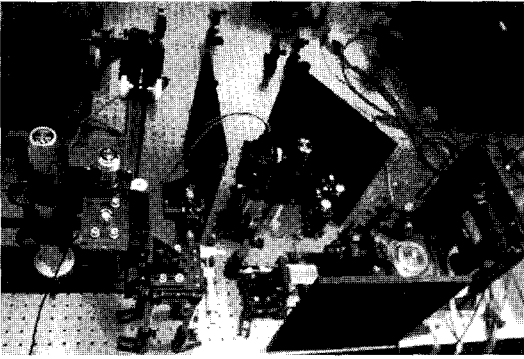


Fig. 2. Photograph of confocal laser scanning microscopy system

본 연구에서는 가변 파장 레이저를 이용하여 초당 30 프레임의 영상을 촬영할 수 있는 공초점 현미경을 구현하였다. 빛의 산란과 형광을 이용한 대표적 비절개적 3차원 투시 광영상 시스템으로 sub-micron 레벨의 우수한 공간분해능을 가지고 있다<sup>(9)</sup>. Fig. 2는 본 연구에서 사용된 공초점 레이저 주사 현미경 시스템의 구성 및 광학 배치 모습을 보여주고 있다.

Fig. 3은 먼저 작동유체로 쥐의 심장에서 추출한 혈액을 지름 300  $\mu\text{m}$  유리관에 시린지 펌프로 1.0  $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 일정한 유량을 흘려보냈을 때 적혈구가 가장 많이 분포하는 유리관의 중심부 즉 깊이 150  $\mu\text{m}$  부분을 15 kHz line scanning rate의 속도로 스캐닝하여 만들어진 이미지를 보여주고 있다. 따라서 이후 이렇게 연속적으로 취득한 이미지 영상 간의 시간 간격은 초당 30 프레임이다.

이러한 반사광 이미지 영상은 입자영상유속계의 속

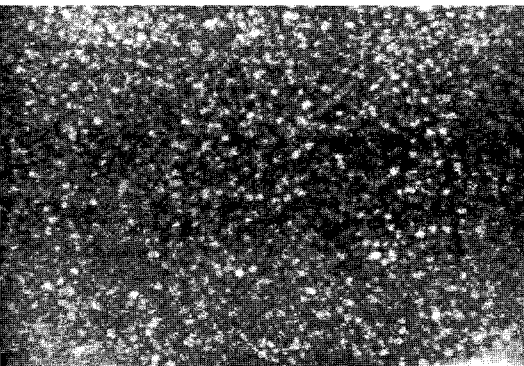


Fig. 3. Visualized image of red blood cell by using a confocal microscopy

도추출을 위한 추적입자를 유동 속에 포함하게 되는데 본 실험장치의 경우에는 별도의 추적 입자를 작동유체에 부유시킬 필요없이 적혈구 자체의 이동 영상에 대한 속도벡터의 추출이 가능한 장점이 있다. 기존의 일반 광학 현미경 장치로는 주위의 전체 조명에 대하여 상대적으로 투명한 적혈구 자체의 반사광 이미지 취득은 거의 불가능하였으나 본 연구에 사용된 공초점 현미경은 깨끗한 혈구의 영상 이미지를 보여주고 있다.

이미지에서 레이저에 반응하여 검출되는 것은 적혈구뿐이며, 백혈구 및 다른 부유물들은 검출되지 않았다. 측정단면의 초점영상 초점두께(focal depth,  $f_d$ )는 약 6  $\mu\text{m}$ 이다. 속도장 측정을 위해서는 이와 같이 스캐닝한 이미지를 연속 200장을 취득하여 평균 속도장을 구하고, 유동을 파악하였다. 그러나 데이터 저장의 한계로 연속 200장 이상의 영상취득은 어렵기 때문에 앙상블(ensemble) 평균에는 차이가 존재할 수 있으나 정상상태를 가정할 수 있도록 가능한 한 실험조건에 주의를 기울였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 PIV measurement

속도장 측정을 위해서 본 연구에서는 공초점 레이저 주사 현미경 시스템을 통하여 마이크로 튜브 내의 쥐의 혈액을 작동유체로 활용하였다. 앞서 언급된 것처럼 추적입자를 주입하여 혈류유동을 측정된 기존의 PIV 방식과는 달리 혈류내의 적혈구를 직접 유동입자로 인식되도록 하였다. 또한 기존의 형광 신호를 획득하는 방법과 달리 본 연구에서는 혈구에서 직접 반사되는 산란광을 이미징 신호로 처리하여 활용하였다.

유동형성을 위하여 시린지 펌프를 이용하여 혈류를 마이크로 튜브로 공급하였고 채널 중심부까지의 선명한 혈류 유동 이미징을 위하여 PBS 용액으로 혈액을 충분히 희석시켰다. 혈액을 희석하여 작동유체로 사용하였으므로 원래의 전혈(whole blood)의 경우 혈류 속에 포함된 혈구의 수는 줄어들게 된다. 이러한 희석의 정도를 정량적으로 나타내기 위해서는 일반적으로 전체 혈액 부피에 대한 혈구가 차지하는 부피의 비율로 정의되는 헤마토크릿 비율(hematocrit ratio, HR)을 퍼센트를 사용하여 나타낸다.

일반적으로 전혈의 경우에 있어서 혈구의 비율은 혈액 전체 부피의 약 40~50%를 차지하고 있으므로 많은

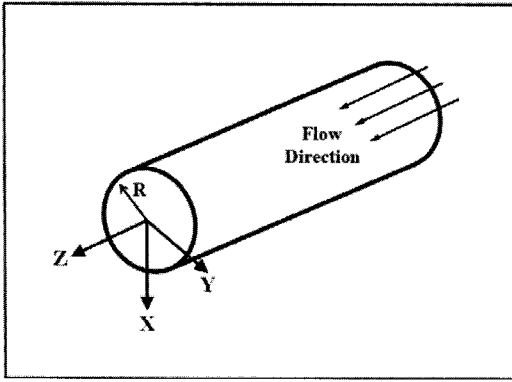


Fig. 4. Blood flow direction and coordinate system

수의 혈구로 인해 속도장 측정이 불가능하다. 따라서 본 속도장 측정의 경우에는 헤마토크리트의 비율을 10%로 희석하여 실험을 수행하였다. 또한 혈액은 전형적인 비뉴우튼 유체로 점도가 일반 물에 비해 약 5.5배 정도로 알려져 있다<sup>(10,11)</sup>. 희석된 혈류 유동의 점도를

물의 점도의 약 3배로 가정하여 마이크로 튜브 직경과 최대 유속에 기초한 레이놀즈수(Reynolds number, Re)는 약  $Re=0.004$  이었다. 속도장 측정에 사용된 마이크로 튜브의 직경은 이후 세포공핍층 두께의 측정을 위하여 100  $\mu\text{m}$  유리관을 사용하였다.

Fig. 4는 본 속도장 측정을 위한 좌표계를 나타낸 그림이며, 본 연구에서는 유동이 튜브의 축방향으로 유입될 경우 YZ-단면에 대한 2차원 단면 스캐닝을 통한 단면 속도장 측정을 수행하였다. Fig. 5는 채널 내부를 유동하는 적혈구의 주유동 방향 속도장을 보여주고 있다. 혈액은 전단을 변화에 따라 점도가 변화되는 비뉴우튼 특성을 가지고 있다. 하지만 매우 낮은 레이놀즈수 범위의 마이크로 튜브 내부 유동은 충분히 유속이 느리고 층류유동 영역에 속하므로 채널 중심부의 적혈구 속도가 채널 가장자리의 적혈구 속도보다 빠르게 나타나는 전형적인 포물선 형태의 속도장 분포가 나타나게 된다.

속도장 그림은 공초점 현미경을 이용하여 혈액이 주

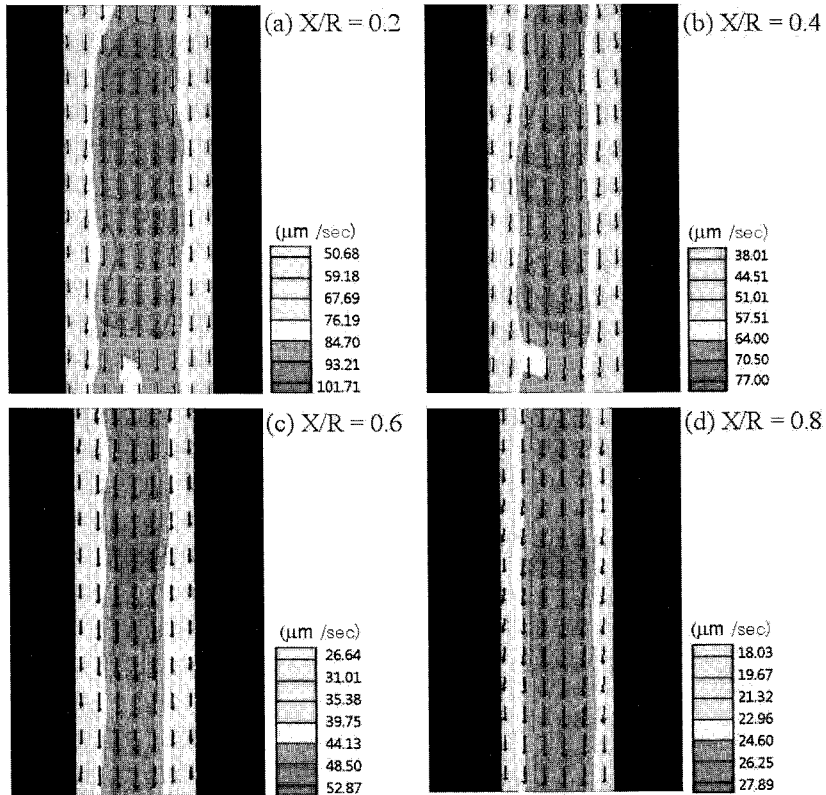


Fig. 5. Streamwise mean velocity vector field and contour plot ((R = 50  $\mu\text{m}$ , YZ-plane)

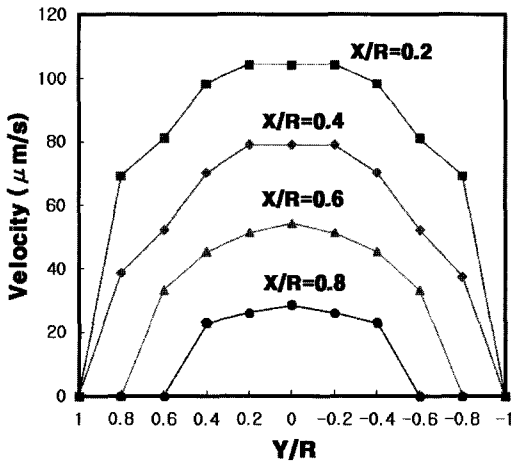


Fig. 6. Mean velocity profile distributions at different focal depths

입되는 마이크로 튜브의 표면으로부터 중심부 방향으로 초점거리를 변화시키면서 관찰 깊이의 변화에 따른 단면의 유동장 분포를 연속적으로 보여주고 있다. 측정된 각 단면의 중심부에서의 속도분포(profile)의 정량적 비교와 증감의 비교를 위하여 각 높이 변화에 따른 유속의 분포 모습을 Fig. 6에 나타내었다. 여기서 보면, 표면에서 중심쪽으로 관찰영역이 이동될수록 유속은 선형적으로 증가하게 된다. 본 연구에서 측정된 중앙부의 최대 유속은 튜브 중심축 부근에서는 약 120~140  $\mu\text{m/s}$ , 채널의 가장자리 부근에서는 약 20~30  $\mu\text{m/s}$  범위의 유속 값을 나타내었다.

그림에서 보면 전체적으로 일반적인 층류의 뉴우튼 유체에서 보이는 포물선 형태의 평균유속분포와 유사하지만 전단력 변형률의 변화가 있는 중심부와 벽면부에서는 혈액의 비뉴우튼 특성으로 인해 다소 무디어지거나 가속된 형태의 분포를 가지게 된다. 특히 사람의 혈류유동의 경우에는 전단력 변형률이 증가함에 따라 점도가 감소하는 shear-thinning 형태를 가지는 것으로 알려져 있다<sup>(3)</sup>.

또한 속도장 그림에서 주유동 평균유속( $u_z$ )의 등속 분포도를 나타내었는데 일반적인 균일한 추적입자가 분포된 유체의 운동과는 달리 상대적으로 많은 양의 적혈구가 임의의 운동성을 가지고 흘러가면서 충돌 등으로 인해 서로 간섭효과를 일으키고 적혈구의 크기가 탐색창 영역에 비해 상대적으로 크기 때문에 추적 영역을 벗어나는 경우도 존재하게 된다. 따라서 상관관

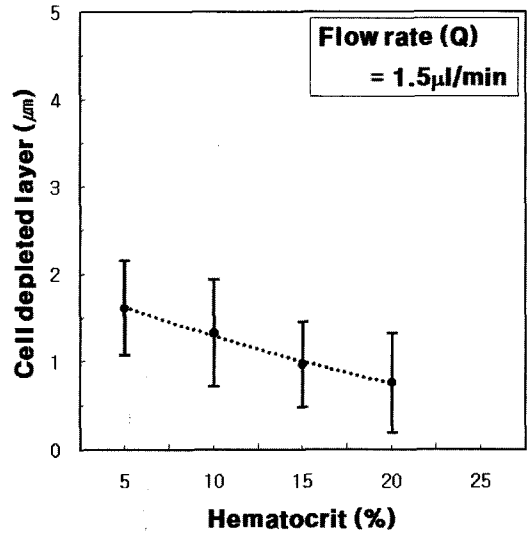


Fig. 7. Variation of cell depleted layer thickness according to hematocrit ratio ( $R=50 \mu\text{m}$ )

계의 진행에 따라 다소 등속분포의 변화량이 존재하고 있음을 확인할 수 있다<sup>(12)</sup>.

특히, 본 현미경 시스템의 이미징 가능 구간의 크기가  $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ 로 한정되어 있어서 튜브의 후단면에서의 전체적 경향을 연속적으로 보일 수 없었으며, 속도의 변화를 정량적으로 파악하기는 어려웠다. 그러나 본 측정 결과를 통하여 하류에서는 혈구의 지속적인 운동량 감소와 중력장의 영향으로 혈류의 유속이 감소되는 경향을 보일 것으로 판단된다.

### 3.2 Cell depleted layer detection

바이오 유동 해석과 관련하여 보다 효과적인 약물전달 및 물질 대사 교환 메커니즘 해석을 위해서는 다양한 혈류의 특성 및 상관관계 규명 필요로 되어지고 있다. 또한, 최근들면서 시약 및 약물 전달을 위한 방법으로 시약이 포함된 캡슐 형태의 마이크로드롭렛 생성 등의 다양한 방법을 동원하여 보다 효과적인 약물전달 연구도 수행되어지고 있다.

특히, 이러한 약물 및 물질전달(예, oxygen transportation)은 혈관 내벽(blood vessel)과의 상호작용과 벽면 주위의 유동장과 매우 깊은 연관성을 가지고 있다. 혈구와 같은 입자 형태의 부유물이 포함된 2상(two-phase) 유동의 특성은 벽면과의 상호작용으로 인해 표면 주위에 세포공핍층(cell depleted layer)이 존

재한다<sup>(13)</sup>.

이러한 혈유변화적 현상의 발생은 혈구의 응집과 분산에 따른 점도(viscosity) 변화와 연관되며 물질전달의 측면에서 장점으로 혹은 단점으로 작용할 수 있으며, 혈액의 점도는 비뉴우튼 유동 특성으로 전단율에 따라 변화하는 형태를 나타내며 이는 혈구의 응집(aggregation)과 관련되고 세포공핍층을 형성하는 메커니즘으로 연관될 수 있으므로 보다 체계적 실험적 연구가 필요하다.

즉, 세포공핍층의 존재는 혈구응집력, 혈류역학적 저항력 및 변형률의 변화 등과 연관되어 있으므로 동맥경화와 같은 질환과 직접적으로 상관관계를 가지고 있고, 이러한 세포공핍층은 주로 세동맥(arteriole) 레벨의 혈관에서 특징을 나타내며, 모세혈관 영역에서는 혈구의 탄성적 변화로 혈관벽과 접촉하여 거의 관찰되지 않고 있다<sup>(14)</sup>.

세포공핍층은 혈류의 유속 및 헤마토크릿(hematocrit)과 상관관계를 가지고 있으며, 이러한 내벽 주위의 정량적 속도 데이터 및 유동구조 파악은 혈류역학적 주요 파라미터인 표면 전단력 해석에도 필수적이다. 또한, 세포공핍층 생성 형태와 두께 등의 구조적 데이터는 미세유체기기를 이용한 혈구와 혈장(plasma)의 분리에 매우 효과적으로 필요하다.

Fig. 7은 본 연구에서 공초점 현미경으로 취득한 마이크로 튜브 중심영역의 단면 영상에서 벽면과 혈구의 떨어진 거리를 그레이 레벨의 설정값(threshold)을 설정하고 전체 이미지 라인에 대해 평균하여 구한 세포공핍층 영역의 두께를 나타낸 그림이다. 세포공핍층의 두께 변화의 관찰을 위해서 헤마토크릿의 비율을 5~20% 까지 변화시키면서 측정을 수행하였다. 앞서 언급되었듯이 헤마토크릿 비율은 전체 혈액 부피에 대한 적혈구의 부피 비율로 헤마토크릿의 비율을 조절하기 위해 원심분리기를 이용하여 혈장을 제거하고, PBS 용액을 첨가하여, 원하는 헤마토크릿 비율을 형성하였다.

일반적으로 세포공핍층의 두께( $t$ )는 수 마이크로이기 때문에 다소의 오차가 존재하게 된다. 그림에서 볼 수 있듯이 헤마토크릿의 비율이 낮아질수록 세포공핍층의 두께는 증가하는 경향을 보인다. 헤마토크릿의 비율이 낮아질 경우, 보다 충분한 양의 산소공급을 원활히 하게 하기 위하여 적혈구들은 높은 응집성(aggregation)을 가져 많은 수의 적혈구들이 지나가야 하므로 그 결과, 세포공핍층의 두께가 증가하는 것으로 판단된다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 일반적으로 투명하고 뉴우튼 점성 특성을 가진 물과 같은 작동유체가 아닌 불투명 혈장 성분이 포함된 용액인 혈액을 작동유체로 하여, 그 내부에 다른 추가적 추적입자를 주입하지 않고 혈액 내의 적혈구 자체를 직접 추적입자로 인식 및 이미징 하여 혈류 유동장의 속도장을 입자영상유속계 방식의 상관관계를 활용하여 속도장 분포를 측정하고, 유동을 가시화 할 수 있는 공초점 레이저 주사 현미경 시스템을 활용하여 연구를 수행하였다.

먼저 개발된 공초점 현미경 시스템의 깨끗한 적혈구 반사광 이미지 영상 취득에 대한 평가를 수행하고, 유리 재질의 마이크로 튜브 내를 흐르는 혈류유동의 속도장 분포를 튜브의 표면에서부터 중심축 주위 단면으로 초점거리 변화에 따른 유속분포를 측정하였다. 특히, 혈구의 axial migration 특성으로 나타나는 세포공핍층에 대한 두께를 헤마토크릿의 변화에 따라 측정하였다. 특히, 본 연구에서 개발된 공초점 레이저 주사 현미경 시스템은 생체 외의 경우 뿐 아니라 생체 내 혈관(blood vessel)의 가시화에도 직접 활용될 수 있으므로 추후 생체 내(in-vivo) 실험으로의 진행을 목표로 하고자 한다.

## 후 기

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 20090069912).

## 참고문헌

- 1) Maeda N., 1996, "Erythrocyte Rheology in Micro-circulation", Japanese J. Physiology, Vol.46, pp.1~14.
- 2) Basurt O. K., Gelmont D. and Meiselman H., 1998, "Red Blood Cell Deformability in Sepsis", Am J Respir Crit Care Med, Vol.157, pp.421~427.
- 3) Park C. W., Lee S. J. and Shin S., 2003, "Micro-PIV Measurements of in vitro Blood Flow in a Micro-channel", Int. J. Vascular Biomed. Eng., Vol.1(2), pp.30~35.
- 4) Adrian R. J., 1991, "Particle-Imaging Techniques

- for Experimental Fluid Mechanics”, *Annu. Rev. Fluid Mech.*, Vol.23, pp.261~304.
- 5) Wilson T., 1990, *Confocal Microscopy*, Academic Press, San Diego. Calif., pp.27~32.
  - 6) Webb R. W., 1996 “Confocal Optical Microscopy”, *Reports on Progress on Physics*, Vol.59, pp.424~471.
  - 7) Pawley J. B., 1990, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Press, New York, pp.19~38.
  - 8) Lee H. and Kim W. H., 2008, “The Video-Rate in vivo Confocal Microscopy for Biomedical Applications”, *KSME J.*, Vol.56, pp.127~128.
  - 9) Jalbert I., Stapleton F., Papas E., Sweeney D. F. and Coroneo M., 2003, “In vivo Confocal Microscopy of the Human Cornea”, *Br. J. Ophthalmol.*, Vol.87(2), pp.225~236.
  - 10) Toth K., Kesmarky G. and Vekasi J., 1999, “Hemorheological and Hemodynamic Parameters in Patients with Essential Hypertension”, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* Vol.21, pp.209~216.
  - 11) Resch K. L., Ernst E., Matrai A. and Paulsen H. F. 1992, “Fibrinogen and Viscosity as Risk Factors for Subsequent Cardiovascular Event in Stroke Survivors”, *Ann. Intern. Med.* Vol.117, pp.371~375.
  - 12) Lima R., Wada S., Tsubota K. and Yamaguchi T., 2006, “Confocal Micro-PIV Measurements of Three-Dimensional Profiles of Cell Suspension Flow in a Square Microchannel”, *Meas. Sci. Technol.* Vol.17, pp.797~808.
  - 13) Park C. W., Shin S. H., Kim G. M., Jang J. H. and Gu Y. H., 2006, “A Hemodynamic Study on a Marginal Cell Depletion Layer of Blood Flow inside a Microchannel”, *Key Eng. Materials*, Vol.326, pp.863~866.
  - 14) Kim S., Kong R. L., Popel A. S., Intaglietta M. and Johnson P. C., 2007, “Temporal and Spatial Variations of Cell-Free Layer Width in Arterioles”, *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol.293, pp.1526~1535.