

リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材の
脱灰抑制ならびに象牙細管封鎖性に関する研究

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

遠藤 肇

(指導：宮崎 真至 教授)

概 要

象牙質知覚過敏症は、象牙質の露出に伴って象牙細管が開口し、その内部の組織液が移動することによって神経終末が刺激され、疼痛が惹起される疾患である。象牙質知覚過敏症に対する治療法はいくつか挙げられるが、開口した象牙細管を封鎖することが効果的であると考えられている。この象牙細管の封鎖法としては、象牙質表面での被膜形成あるいは細管内タンパク質成分の凝固などがあり、これらを目的とした知覚過敏抑制材が臨床応用されている。このうち、象牙細管を封鎖する方法としては、レジン系材料を歯面に塗布するものと、細管内にカルシウム塩などを析出させるものなどがある。前者の方法は、歯面の確実な乾燥や歯面の清掃など、適切な接着を獲得するためには厳密な操作を必要とする。一方、後者の方法は、析出物の形成に時間を要するとともに、酸性飲食物の摂取とともに溶解するという欠点を有している。そこで、臨床的に簡便な操作で、確実に象牙細管を封鎖する知覚過敏抑制材が望まれている。

そこで、新たに開発された自己硬化性リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材を用い、その脱灰抑制および象牙細管封鎖性について、超音波透過法とともにレーザー走査顕微鏡 (LSM) を用いて検討した。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行うとともにエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) を用いて元素分析を行い、考察資料とした。

測定には、ウシ下顎前歯の象牙質を $4 \times 4 \times 1$ mm のブロック体に調整し、耐水性シリコンカーバイドペーパーの #600 から #2000 まで順次研磨し、30 分間精製水中で超音波洗浄をしたものを用いた。知覚過敏抑制材としては、ティースメイトディセンシ

タイザー (TD, クラレノリタケデンタル) を用いた。

試片に対する脱灰条件としては、1日につき2度、0.1 Mの乳酸緩衝液 (pH 4.75) に10分間浸漬を行い、37 °C人工唾液に保管した。実験期間を通じて人工唾液中に保管した試片をベースライン (Baseline), TDを塗布することなく脱灰条件で保管した試片をDe群, TDを塗布して、脱灰条件で保管した試片をTDO群, TDの塗布を7日毎に行い、脱灰条件で保管した試片をTDR群, TDを塗布し、実験期間を通じて人工唾液中に保管した試片をコントロール (Control) とした。

超音波送受信装置としては、パルサーレシーバー (Model 5900PR, パナメトリクス), 縦波用トランスデューサー (V112, パナメトリクス) およびオシロスコープ (Wave Runner LT584, レクロイ) から構成されるシステムを用いた。超音波伝播時間の測定は、超音波洗浄直後 (0日), 実験開始7, 14, 21 および28日後に設定した。

測定は、試片をサンプルステージに静置してトランスデューサーを垂直に接触させ、音速の伝播時間と試片の厚みとから各試片の縦波音速を求めた。また、試片の表面性状を、LSM (VK-8700, キーエンス) を用いて観察した。SEM観察および元素分析には、超音波測定用試片と同様の処理を行った試片を *tert*-ブタノール濃度上昇系列を用いて脱水し、臨界点乾燥 (Model ID-3, エリオニクス) を行った。次いで、イオンコーター (Quick Coater Type SC-201, サンヨー電子) で金蒸着を施し、SEM (ERA-8800FE, エリオニクス) を用いて加速電圧 10kV の条件で観察するとともに、EDXによる元素組成分析を行った。

その結果、音速の変化は各条件によって異なり、Baselineにおける音速は実験期間

を通じて変化は認められなかったものの、De 群における音速は、実験開始 7 日目で大きく低下し、その後緩やかに低下する傾向を示した。TDO 群では、実験期間を通じて音速に有意差は認められなかった。TDR 群においては、TD 塗布後に音速の上昇が認められ、以後の音速に顕著な変化はなく、Control と有意差は認められなかった。このように、TDO および TDR 群において De 群と比較して高い音速が認められたのは、TD が象牙細管内に侵入して、ハイドロキシアパタイトを形成するとともに、象牙細管内にも結晶構造物が付着したためと考えられた。また、TDO 群とは異なり TDR 群では、TD を反復塗布するために、歯質に対する酸の影響が減弱されたものと考えられた。

LSM および SEM 観察からは、超音波洗浄後の試片では、スミアプラグは完全に除去され、象牙細管が開口した像が観察された。TD 塗布直後では、細管は完全に封鎖され、象牙質表面に粒状堆積物が認められた。Control においては、象牙質表面に粒状堆積物が認められ、実験期間を通じてその表面性状に変化はなかった。TDO 群では、一部に象牙細管の開口が認められたものの、TDR 群では、象牙細管が閉塞されるとともに TD 塗布面に析出物が認められた。TD を繰り返し塗布することによって象牙質表層に形成された結晶構造物は緻密な構造となっており、結晶性が向上した可能性が示唆された。

EDX による元素分析から、Baseline では、カルシウムとリンにピークが認められ、Ca/P 比は 1.84 であった。TDR 群においてもカルシウムとリンにピークが認められ、Ca/P 比は 1.86 であった。このように Baseline と TDR 群とで差がなかったところから、

歯質に近似したハイドロキシアパタイトが形成されていることが示唆された。

以上のように、本研究の結果から、リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材である TD は、象牙質の脱灰抑制および象牙細管封鎖能を有することが明らかとなった。また、生体親和性に優れると考えられ、臨床における有効性が期待される。

なお、本論文は、原著論文 Endo H, Kawamoto R, Takahashi F, Takenaka H, Yoshida F, Nojiri K, Takamizawa T, Miyazaki M. Evaluation of a calcium phosphate desensitizer using an ultrasonic device. Dent Mater J 2013; 32: 456-461 を基幹論文とし、これに元素組成分析の実験データを加えることによって総括したものである。

緒 言

象牙質知覚過敏症は、象牙質の露出に伴って象牙細管が開口し、その内部の組織液が移動することによって神経終末が刺激されて疼痛が惹起される疾患である¹⁻³⁾。象牙質知覚過敏症に対する治療法はいくつか挙げられるが⁴⁾、開口した象牙細管を封鎖することが効果的であると考えられている⁵⁾。この象牙細管の封鎖法としては、象牙質表面での被膜形成あるいは細管内タンパク質成分の凝固などがあり、これらを目的とした知覚過敏抑制材が臨床応用されている⁶⁾。さらに、象牙細管を封鎖する方法としては、レジン系材料を歯面に塗布するものと、細管内にカルシウム塩などを析出させるものなどがある。前者の方法は、歯面の確実な乾燥や歯面の清掃など、適切な接着を獲得するためには厳密な操作を必要とする。一方、後者の方法は、析出物の形成に時間を要するとともに、酸性飲食物の摂取とともに溶解するという欠点を有していた。そこで、臨床的に簡便な操作で、確実に象牙細管を封鎖する知覚過敏抑制材が望まれているのが現状である⁷⁾。

リン酸水溶液中で、リン酸四カルシウム（以後、TTCP）と無水リン酸水素カルシウム（以後、DCPA）とが1:1のモル比で存在すると、水が介在することによってハイドロキシアパタイトが形成されることが報告されている⁸⁾。この反応を応用したリン酸カルシウムセメントについては、歯の石灰化用製剤⁹⁾、根管充填材¹⁰⁾あるいは骨補填材¹¹⁾などの検討が行われており、知覚過敏抑制への応用についても検討されてきた¹²⁾。しかし、リン酸カルシウムセメントの欠点として、TTCPとDCPAとの反応に30分以上の時間を要することが挙げられ、これが臨床応用につながらなかつ

た要因のひとつとされてきた¹³⁾。そこで、TTCP と DCPA の粉末特性に変更を加え
るとともに微量添加物を調整することによって、ペースト性状とともに硬化時間を適
正化した知覚過敏抑制材が市販された。

そこで著者は、この自己硬化性リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材を用い、その脱
灰抑制および象牙細管封鎖性について、超音波透過法¹⁴⁾とともにレーザー走査顕微
鏡 (LSM) を用いて検討した。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行うるととも
にエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) を用いて元素分析を行い、考察資料とした。

材料および方法

1. 試片の製作

実験にはウシ下顎前歯を使用し、実験に際して硬組織精密切断機 (Ecomet 4000,
Buehler) を用いてその唇側象牙質を約 1mm の厚さに切断した。次いで、スーパーフ
ァインダイヤモンドポイント (ISO #021, 松風) を用いてブロック体 (4×4×1 mm)
に調整し、各試片の表面を耐水性シリコンカーバイドペーパーの #600 から#2000 ま
で注水下で順次研磨した。最終的な試片の厚みおよび大きさは、マイクロメーター
(CPM15-25DM, ミットヨ) を用いて計測した。これらの試片を、精製水中で 30 分
間超音波洗浄することによってスミヤーを除去し、象牙細管が開口した試片を製作し
た。

2. 知覚過敏抑制材および人工唾液

知覚過敏抑制材として、自己硬化性リン酸カルシウム系であるティースメイトデ

イセンシタイザー (TD, クラレノリタケデンタル) を用いた。TD の塗布にあたって、象牙質試片を取り出し、ろ紙を用いて余剰水分を取り除いた。次いで、試片をシリコーン型に静置して、TD が塗布面以外に接触しないようにした。また、人工唾液としては、14.4 mM NaCl, 16.1 mM KCl, 0.3 mM MgCl₂ · 6H₂O, 2.0 mM K₂HPO₄, 1.0 mM CaCl₂ · 2H₂O および sodium carboxymethyl cellulose 0.1 g/100 ml を加えて pH 7.0 に調整したものとした¹⁵⁾。

3. 保管条件

試片の保管条件は、以下に示す 5 群とし、保管期間はいずれも 28 日間とした。なお、脱灰操作は、1 日に 2 回、28 日間 0.1 M 乳酸緩衝液¹⁶⁾ (pH 4.75, 0.75 mM CaCl₂ · 2H₂O および 0.45 mM KH₂PO₄) に 10 分間作用させ、37°C 人工唾液中に保管した。

- 1) ベースライン (Baseline) : 試片を実験期間を通じて人工唾液中に保管した。
- 2) De 群 : 試片に TD を塗布することなく脱灰条件で保管した。
- 3) TDO 群 : 試片に TD をマイクロブラシを用いて 30 秒間塗布し、次いで精製水で水洗した後、脱灰条件で保管した。
- 4) TDR 群 : TD の塗布を 7 日毎に行い、実験期間を通じて脱灰条件で保管した。
- 5) コントロール (Control) : 試片に TD を塗布し、実験期間を通じて人工唾液中に保管した。

4. 超音波測定

超音波送受信装置としては、パルサーレシーバー (Model 5900PR, パナメトリクス)、縦波用トランスデューサー (V112, パナメトリクス) およびオシロスコープ (Wave

Runner LT584, レクロイ) から構成されるシステム¹⁷⁾を用いた (Fig. 1)。超音波伝播時間の測定は, 超音波洗浄直後 (0 日), 実験開始 7, 14, 21 および 28 日後に設定した。なお TDR 群の 7 日以降においては, TD 塗布後に測定を行った。

測定は, 試片をサンプルステージに静置してトランスデューサーを垂直に接触させ, 超音波透過法によって行い, 音速の伝播時間と試片の厚みとから各試片の縦波音速を求めた。なお, 測定は室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 相対湿度 $50 \pm 5\%$ の恒温恒湿室で行い, 試片数は各条件につき 6 個とした。

5. 統計分析

各条件において得られた測定値については, 分散分析ならびに Tukey HSD test を用いて, 有意水準 5% の条件で統計学的検定を行った。

6. LSM 観察

試片表面の形態的な観察には, LSM (VK-8700, キーエンス) を使用した。

7. SEM 観察および元素分析

超音波測定用試片と同様の処理を行った試片を *tert*-ブタノール濃度上昇系列を用いて脱水し, 臨界点乾燥 (Model ID-3, エリオニクス) を行った。次いで, イオンコーター (Quick Coater Type SC-201, サンヨー電子) で金蒸着を施し, SEM (ERA-8800FE, エリオニクス) を用いて加速電圧 10 kV の条件で観察するとともに, EDX による元素組成分析を行った。

成 績

保管条件が、ウシ象牙質を透過する音速の変化に及ぼす影響の成績を Table 1 および Fig. 2 に示した。音速の変化は各条件によって異なり、Baseline における音速は実験期間を通して変化は認められなかったものの、De 群における音速は、実験開始 7 日目で大きく低下し、その後緩やかに低下する傾向を示した。TDO 群においては、音速が低下する傾向を示したが、実験期間を通じて有意差は認められなかった。TDR 群においては、TD 塗布後に音速の上昇が認められ、以後の音速に変化はなく、Control と有意差は認められなかった。

LSM および SEM 像の代表例を Figs. 3,4 に示した。超音波洗浄後の試片では、スミアプラグは完全に除去され、象牙細管が開口した像が観察された。TD 塗布直後では、細管は完全に封鎖され、象牙質表面に粒状堆積物が認められた。Control においては、象牙質表面に粒状堆積物が認められ、実験期間を通じてその表面性状に変化はなかった。TDO 群では、一部に象牙細管の開口が認められたものの、TDR 群では、象牙細管が閉塞されるとともに TD 塗布面に析出物が認められた。

EDX による元素組成分析の結果を Fig. 5 に示した。Baseline では、カルシウムとリンにピークが認められ、Ca/P 比は 1.84 であった。TDR 群においてもカルシウムとリンにピークが認められ、Ca/P 比は 1.86 であった。

考 察

歯質に生じる脱灰と再石灰化というプロセスは、とくにその初期段階において形態

的な変化として把握することは困難である。そこで、これを観察するためにマイクロラジオグラム¹⁸⁾、共焦点レーザー顕微鏡^{19,20)}あるいは Quantitative Light-induced Fluorescence 法^{21,22)}などが用いられているが、装置が大型であるなどの問題点を有している。そこで著者は、非破壊的に歯質の脱灰程度を経時的に把握できるとともに、装置全体が比較的小型なことを特徴とする超音波透過法に着目した。この超音波透過法は、工業界あるいは医学領域に広く応用されており、歯科領域においても歯質や歯科における超音波特性などについて研究されている²³⁻²⁵⁾。本研究では、この装置を用いて、TD が象牙質の脱灰抑制および象牙細管封鎖性に及ぼす影響について検討した。

その結果、Baseline における象牙質試片の音速は 3742~3775 m/s であったものの、De 群では 28 日間経過した時点で 3462 m/s と有意に低下した。また、TDO 群では、実験期間を通じて音速に有意差は認められなかったが、TDR 群では音速が有意に上昇した。このように、TDO および TDR 群において De 群と比較して高い音速が認められたのは、TD が象牙細管内に侵入して、ハイドロキシアパタイトを形成するとともに²⁶⁾、象牙細管内にも結晶構造物が付着したためと考えられた。また、TDO 群とは異なり TDR 群では、TD を反復塗布するために、歯質に対する酸の影響が減弱されたものと考えられた。

LSM 観察では、超音波洗浄直後(0日)においては、象牙質表層にはシリコンカーバイドペーパーの削状痕が認められ、象牙細管が開口している像が観察された。この面にTDを塗布すると、試片表面は析出物で覆われた像を示した。Controlにおいては、

TD 塗布後の象牙質表面性状に変化は認められず、リン酸およびカルシウムイオンが過飽和な環境では、TD 塗布によって生じた析出物が比較的安定であることが示された。TDO 群においては、pH サイクルの負荷によって象牙細管の開口が観察されたが、TDR 群では TD を繰り返し塗布したことによって実験期間中も細管の開口は認められず、経時的に象牙質表面における析出物が著明に認められた。

SEM 観察の結果からは、Baseline においては象牙細管の開口とともに細管内にはスミアプラグも認められなかった。各条件における 28 日経過後の試片における SEM 像からは、De 群では象牙細管が漏斗状に開口した像を示したのに対して、Control では象牙細管は開口しているものの、De 群とは明らかに異なる像を示していた。TDO 群においては、pH サイクルが負荷されていない Control と比較すると象牙細管の開口が認められたものの、細管の一部には析出物が残留しており、さらに TDR 群においては、表層ならびに細管口に析出物が充満している像が観察された。さらに、EDX の結果をもとに Ca/P 比を算出したところ、Baseline と TDR 群とで差がなかったところから、歯質に近似した hidroキシアパタイトが形成されていることが示唆された。

本実験の結果から、TD の塗布によって象牙細管が hidroキシアパタイトによって封鎖され、さらに繰り返し塗布することによって象牙質表層も析出物で覆われることが示された。また、元素分析の結果から歯質の構成成分に変化がないことから生体親和性に優れると考えられ、臨床における有効性が期待された。

結 論

リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材が、象牙質の脱灰抑制および象牙細管封鎖性に及ぼす影響について、超音波透過法を応用するとともに LSM および SEM を用いて検討した結果、以下の結論を得た。

1. 超音波透過法を用いた音速測定の結果、De 群においては音速の低下を示したが、TDR 群では、有意な音速の上昇が認められ、pH サイクルの負荷によっても音速は変化しなかった。
2. LSM を用いた表面性状の観察からは、TDO 群では象牙細管の開口像が観察されたものの、TDR 群では象牙細管が封鎖されていた。
3. SEM 観察からは、Control、TDO および TDR 群のいずれにおいても細管深部に析出物が観察された。また元素組成分析では、歯質の構成成分に変化は認められなかった。

文 献

- 1) Brännström M, Lindén LA, Aström A. The hydrodynamics of the dental tubule and of pulp fluid. A discussion of its significance in relation to dentinal sensitivity. *Caries Res* 1967; 1: 310-317.
- 2) Absi EG, Addy M, Adams D. Dentine hypersensitivity. A study of the patency of dentinal tubules in sensitive and non-sensitive cervical dentine. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 280-284.
- 3) Charoenlarp P, Wanachantararak S, Vongsavan N, Matthews B. Pain and the rate of dentinal fluid flow produced by hydrostatic pressure stimulation of exposed dentine in man. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 625-631.
- 4) Chu CH, Lam A, Lo EC. Dentin hypersensitivity and its management. *Gen Dent* 2011; 59: 115-122.
- 5) Pashley DH, Matthews WG, Zhang Y, Johnson M. Fluid shifts across human dentine in vitro in response to hydrodynamic stimuli. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 1065-1072.
- 6) Cummins D. Advances in the clinical management of dentin hypersensitivity: A review of recent evidence for the efficacy of dentifrices in providing instant and lasting relief. *J Clin Dent* 2011; 22: 100-107.
- 7) Cunha-Cruz J, Stout JR, Heaton LJ, Wataha JC. Dentin hypersensitivity and oxalates: A systematic review. *J Dent Res* 2011; 90: 304-310.
- 8) Bowen WE, Chow LC. A new calcium phosphate setting cement. *J Dent Res* 1983; 62: 672 (Abst. #207).

- 9) Thanatvarakorn O, Nakashima S, Sadr A, Prasansuttiorn T, Ikeda M, Tagami J. In vitro evaluation of dentinal hydraulic conductance and tubule sealing by a novel calcium phosphate desensitizer. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 101: 303-309.
- 10) Ogata H, Hayashi M, Tsuda H, Suzuki N, Maeno M, Sugawara A, Ogiso B. Effect of a calcium phosphate cement on mineralized nodule formation compared with endodontic cements. *Dent Mater J* 2012; 31: 92-97.
- 11) Thein-Han W, Liu J, Xu HH. Calcium phosphate cement with biofunctional agents and stem cell seeding for dental and craniofacial bone repair. *Dent Mater J* 2012; 28: 1059-1070.
- 12) 菅原明喜, Chow LC, 高木章三, 西山 實, 大橋正敬. Calcium Phosphate Cementを応用した象牙質知覚過敏症の治療に関する研究. *歯材器* 1989; 8: 282-294.
- 13) Miyamoto Y, Ishikawa K, Fukao H, Sawada M, Nagayama M, Kon M, Asaoka K. In vivo setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement. *Biomaterials* 1995; 16: 855-860.
- 14) Miyazaki M, Inage H, Onose H. Use of an ultrasonic device for the determination of elastic modulus of dentin. *J Oral Sci* 2002; 44: 19-26.
- 15) Adair SM, Whitford GM, McKnight-Hanes C. Effect of artificial saliva and calcium on fluoride output of controlled-release device. *Caries Res* 1994; 28: 28-34.
- 16) Silverstone LM, The primary translucent zone of enamel caries and of artificial caries-like lesions. *Br Dent J* 1966; 120: 461-471.

- 17) Watanabe T, Miyazaki M, Inage H, Kurokawa H. Determination of elastic modulus of the components at dentin-resin interface using the ultrasonic device. *Dent Mater J* 2004; 23: 361-367.
- 18) Amaechi BT, Porteous N, Ramalingam K, Mensinkai PK, Ccahuana Vasquez RA, Sadeghpour A, Nakamoto T. Remineralization of artificial enamel lesions by theobromine. *Caries Res* 2013; 47: 399-405.
- 19) Huysmans MCDNJM, Longbottom C, Christie AM, Bruce PG, Shellis RP. Temperature dependence of the electrical resistance of sound and carious teeth. *J Dent Res* 2000; 79: 1464-1468.
- 20) Ando M, van Der Veen MH, Schemehorn BR, Stookey GK. Comparative study to quantify demineralized enamel in deciduous and permanent teeth using laser-and light-induced fluorescence techniques. *Caries Res* 2001; 35: 464-470.
- 21) Lussi A, Francescut P. Performance of conventional and new methods for the detection of occlusal caries in deciduous teeth. *Caries Res* 2003; 37: 2-7.
- 22) Higham SM, Pretty IA, Edger WM, Smith PW. The use of in situ models and QLF for the study of coronal caries. *J Dent* 2005; 33: 235-241.
- 23) Ng SY, Ferguson MWJ, Payne PA, Slater P. Ultrasonic studies of unblemished and artificially demineralized enamel in extracted human teeth: a new method for detecting early caries. *J Dent* 1988; 16: 201-209.
- 24) Louwse C, Kjaeldgaard M, Huysmans MCDNJM. The reproducibility of ultrasonic enamel thickness measurement: an in vitro study. *J Dent* 2004; 32: 83-89.

- 25) Arslantunali Tagtekin D, Oztürk F, Lagerweij M, Hayran O, Stookey GK, Çalışkan Yanikoğlu F. Thickness measurement of worn molar cusps by ultrasound. *Caries Res* 2005; 39: 139-143.
- 26) Ambard AJ, Mueninghoff L. Calcium phosphate cement : Review of mechanical and biological properties. *J Prosthodont* 2006; 15: 321-328.

表および図

Table 1 Ultrasonic velocities (m/s) of bovine dentin specimens

Group	Treatment time (days)				
	0	7	14	21	28
Baseline	3775 (55) ^{a,A}	3742 (55) ^{a,A}	3750 (54) ^{a,A}	3761 (57) ^{a,A}	3764 (56) ^{a,A}
De	3785 (50) ^{a,A}	3590 (49) ^{b,C}	3524 (43) ^{b,C}	3495 (44) ^{b,C}	3462 (44) ^{b,C}
TDO	3781 (57) ^{a,A}	3794 (65) ^{a,A}	3733 (66) ^{a,A}	3674 (65) ^{a,A}	3664 (61) ^{a,A}
TDR	3772 (57) ^{a,A}	3945 (65) ^{b,B}	3990 (68) ^{b,B}	3992 (62) ^{b,B}	3990 (51) ^{b,B}
Control	3782 (57) ^{a,A}	3942 (65) ^{b,B}	3940 (68) ^{b,B}	3921 (62) ^{b,B}	3924 (51) ^{b,B}

Values in parenthesis indicate standard deviations (N = 6).

Within groups, values with the same lower-case superscript letter are not significantly different (P > 0.05).

Between groups at the same treatment times, values with the same upper-case superscript letter are not significantly different (P > 0.05).

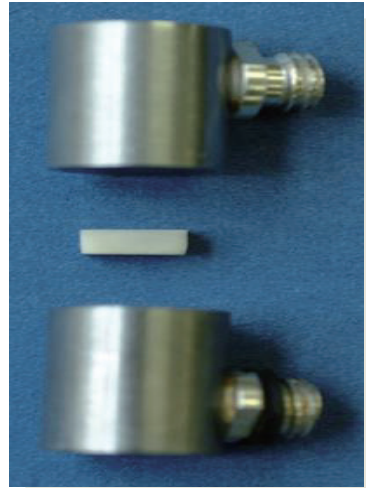
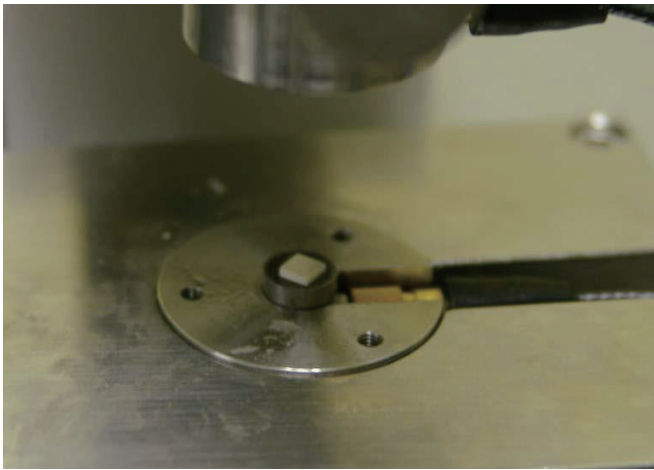


Fig. 1 Experimental set-up of the ultrasonic device for detection of tooth demineralization.

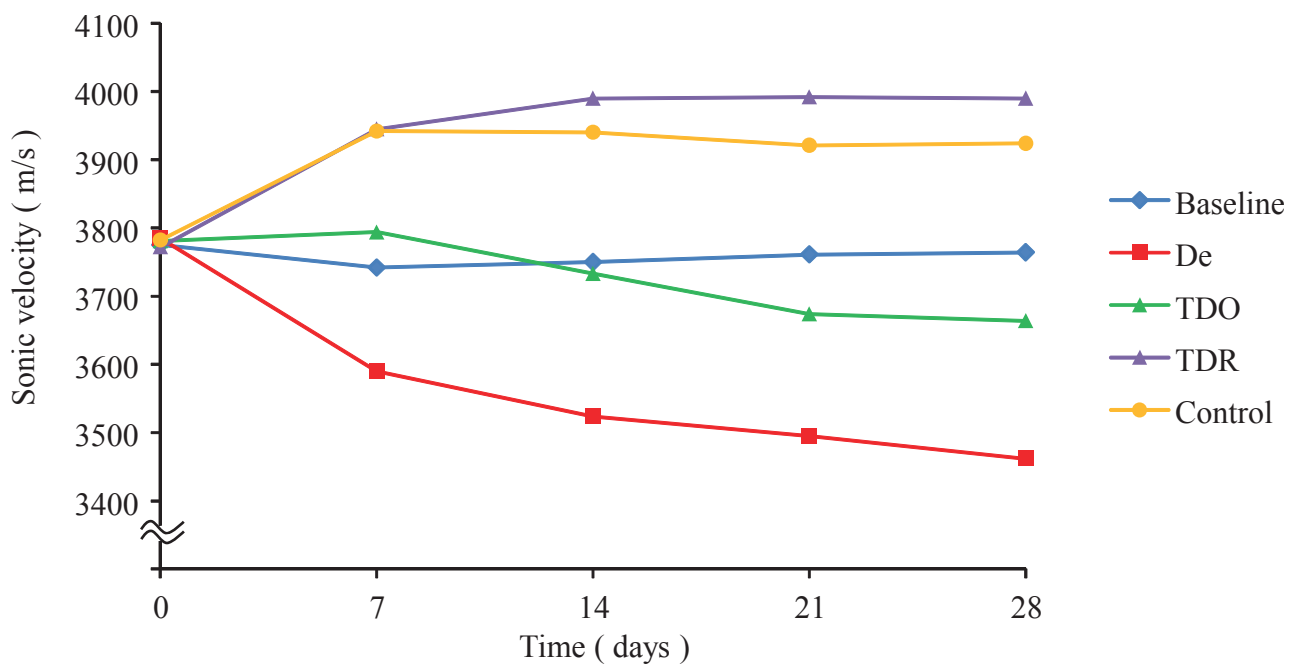


Fig. 2 Sonic velocities of bovine dentin under the different treatment conditions with different storage periods.

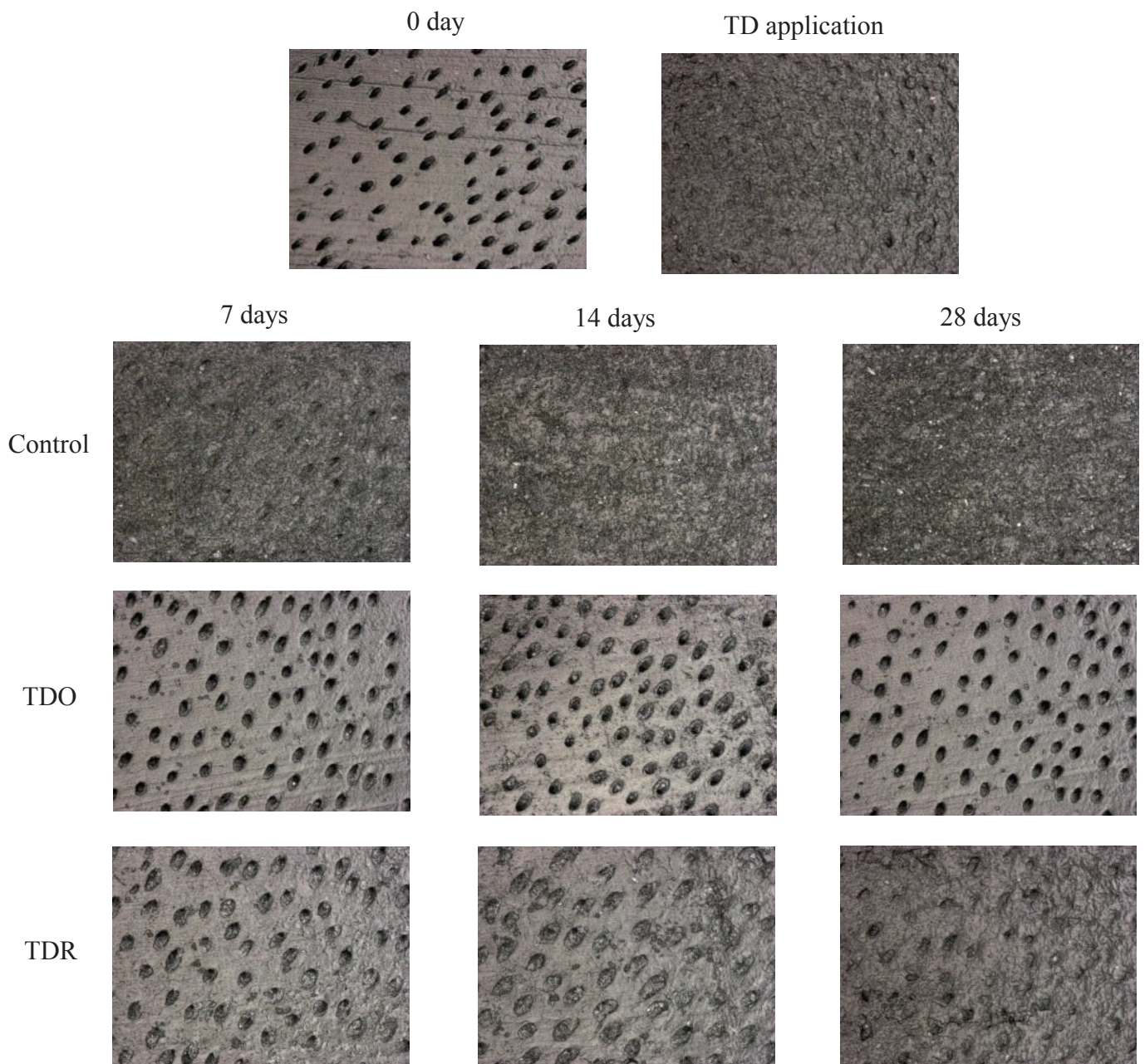
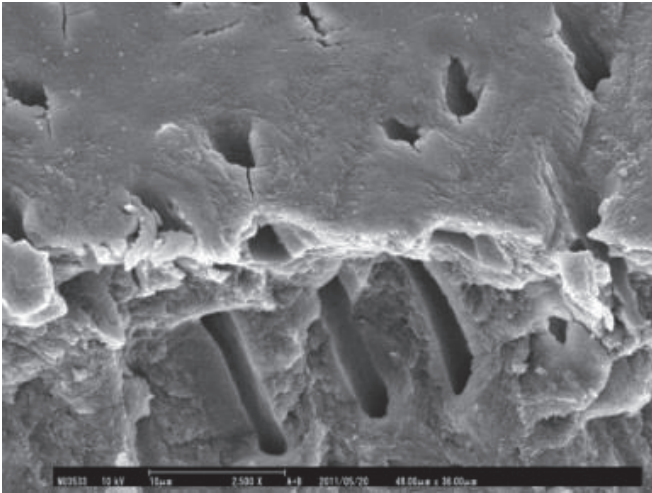
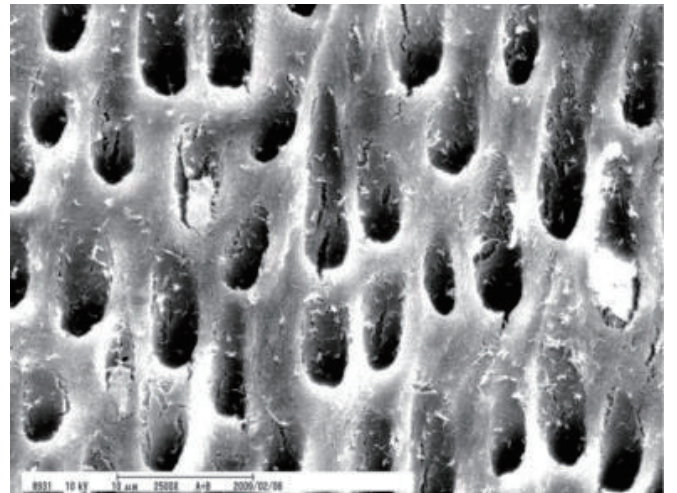


Fig. 3 Laser scanning microscope observations of dentin surfaces.

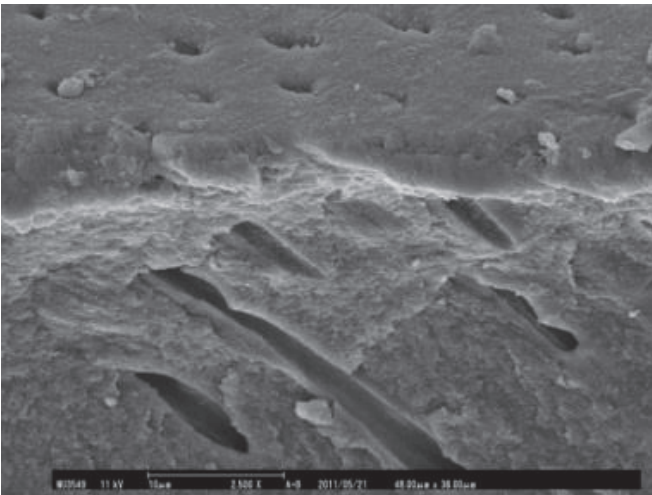
Baseline



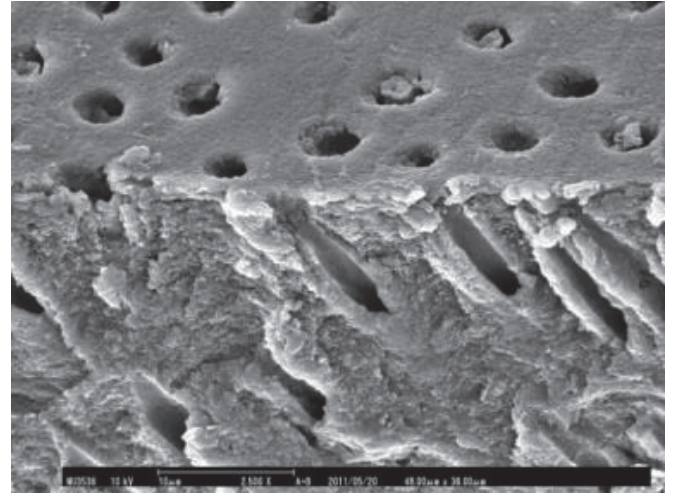
De 28 days



Control 28 days



TDO 28 days



TDR 28 days

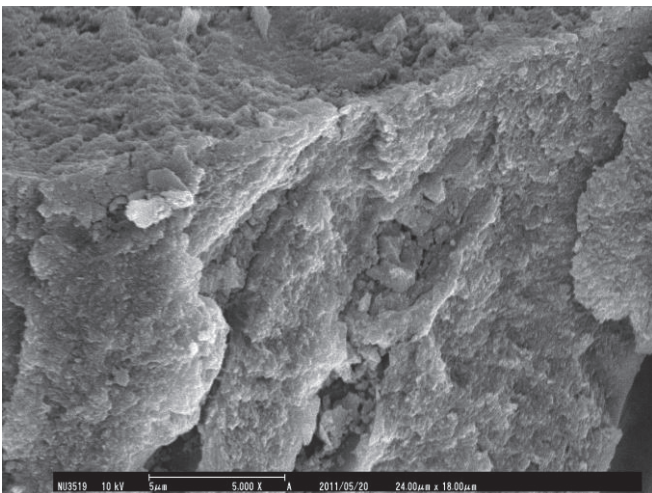
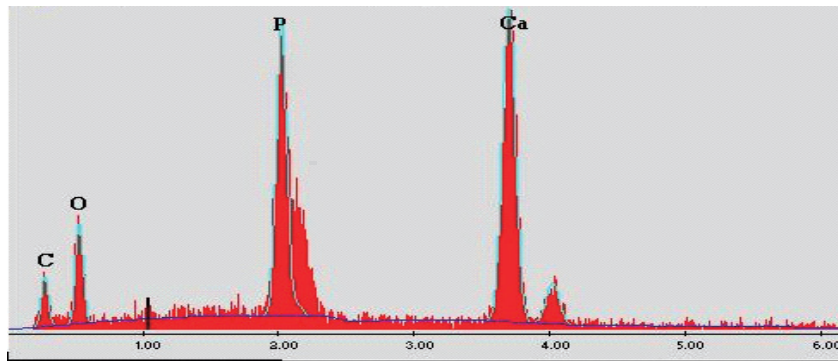


Fig. 4 SEM observation of dentin surfaces.

Baseline

Element	Wt%	At%
C	21.8	36.4
O	29.0	36.3
P	17.3	11.2
Ca	31.9	16.0

Ca /P : 1.84



TDR 28 days

Element	Wt%	At%
C	14.3	26.8
O	32.0	42.1
P	18.3	13.8
Ca	34.1	16.4

Ca /P : 1.86

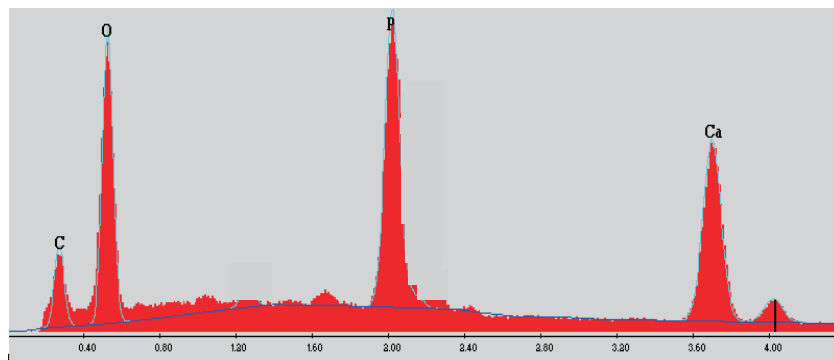


Fig. 5 Elemental analysis of the specimen of Baseline and TDR (28 days) groups.