

エナメル質表層脱灰の
光干渉断層画像解析への $1/e^2$ 幅の応用

日本大学歯学部歯科保存学第 I 講座

研究講座員 三 富 純 一

(指導：宮崎 真至 教授, 黒川 弘康 助教)

概 要

光干渉断層画像法 (Optical Coherence Tomography, 以後, OCT) は, 装置が小型で簡便かつ非侵襲的に高解像度の精密断層像を得ることを可能とし, 歯科領域での新たなモダリティとして注目されている。OCT は, 近赤外線を対象物に照射してその表層および内部で反射あるいは散乱する光の様相を光学干渉計によって捉えることで, 光干渉強度と内部位置情報から 2 次元の精密断層像を構築する。したがって, 既存の画像診断システムとは画像構築原理が異なることから, OCT イメージ像から歯質の状態変化を正しく把握するための解析法が必要である。そこで, エナメル質初期齲蝕病変における OCT イメージ像の解析法について, エナメル質に pH サイクルを負荷した際の状態変化を, 観察し, 信号強度分布から最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅を求めることによって検討した。

ウシ下顎前歯歯冠部唇側面中央付近の歯質を, モデルトリマーを用いてエナメル質および象牙質で構成されたブロックとして切り出した。このブロック全面を, 耐水性 SiC ペーパー # 2,000 で調整した後, 象牙質面をネイルバーニッシュで被覆したものを測定用試片とした。これらの試片を, 0.1 M 乳酸緩衝液に 1 日 2 回, 各 10 分間浸漬した後, 37°C の精製水あるいは人工唾液に保管する 2 条件の pH サイクルを適用した。試片のエナメル質内部における状態変化観察には, Super Luminescent Diode を光源とする, Time-Domain 型 OCT 装置 (以後, TD-OCT, モリタ東京製作所) を用い, B-scan mode から断層像を得た。さらに, A-scan mode から TD-OCT に付属するソフトウェアを用いて信号強度分布を解析することで, 最大ピーク強度値を検出するとともに $1/e^2$ 幅を求めた。また, 形状測定レーザマイクロスコープ (VK-9710, キーエンス) を用いて歯質の表面性状を観察するとともに表面粗さ ($R_a, \mu\text{m}$) を測定した。なお, これらの観察時期としては, 実験開始前および実験開始 14 および 28 日後とし, 試片の数は各条件について 6 個とした。

その結果, 精製水保管条件における OCT イメージ像は, 実験期間の延長に伴ってエナメル質表層におけるシグナル輝度の上昇が認められた。また, レーザ顕微鏡像は実験開始前では, スミヤー層がエナメル質表面を覆う像が観察され, 表面粗さは $0.08 \mu\text{m}$ だったのに対し, 28 日経過後ではエナメル小柱が露出し, 表面粗さが $0.14 \mu\text{m}$ と大きくなった。

OCT イメージ像は、照射光線の歯質表層あるいは内部での反射性の強弱を段階ごとにカラー表示することで、透過率の高い部分は照射された光線の反射光強度が少ない暗部として、逆に散乱の強い部分では明部として可視化される。精製水保管条件の OCT イメージ像において、pH サイクル適用後にエナメル質表層のシグナル輝度が上昇したが、人工唾液保管条件では、28 日後ではエナメル質表層のシグナル輝度に変化は認められず、内部断層像の色調に変化が認められた。また、レーザ顕微鏡像では、精製水保管条件と比較して平坦な表面性状が観察された。このように、人工唾液保管条件においてエナメル質内部の変化が観察された理由としては、エナメル質表面の脱灰が抑制されたために、試片内部への光線透過性が増大し、OCT イメージ像の色調変化として表れたものと考えられた。

本研究では、OCT イメージ像の変化を数値化することを目的として、A-scan mode における最大ピーク強度値を求めるとともに、その幅を求めることで比較、検討した。すなわち、得られた信号強度分布グラフの最大ピーク強度値を基準として 86.5%が含まれる円を算出し、この円の直径から得られる波形の幅である $1/e^2$ 幅を用いた。その結果精製水保管条件における $1/e^2$ 幅は、実験開始前で 70 μm であり、28 日後で 60 μm と、ほとんど変化は認められなかった。一方、唾液保管条件における信号強度分布の解析からは、最大ピーク強度値は実験開始前と比較して 28 日後で約 14 dB 低下するものの、 $1/e^2$ 幅の変化は実験開始前で 60 μm であったものが、28 日後で 360 μm と有意に広がった。これは、精製水保管条件と比較して人工唾液に保管することでエナメル質表面における脱灰が抑制されたため、エナメル質表面での照射光線の散乱が少なく、試片内部への光線透過性が増大したことを示す。このように、OCT イメージ像から得られた情報について、A-scan mode から得られた最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅を代表値として比較することによって、エナメル質における表層下脱灰を定量的に比較、検討することが可能であった。

以上のように、本実験の結果から OCT を用いた歯質断層像の解析では、エナメル質が脱灰することによって生じた基質的变化が光線反射性および透過性に及ぼす影響を、OCT イメージ像の変化として捉えられることが示された。さらに、ピーク強度値および $1/e^2$ 幅を測定することで、より詳細な解析が可能であることが示された。

緒 言

Minimal Intervention^{1,2)}という治療概念の普及に伴って、口腔内環境を改善することによって齲蝕を予防することの重要性が認識されている。すなわち、実質欠損を形成する以前の初期段階で齲蝕リスクを低減化させるとともに、積極的な再石灰化療法を行うことによって齲蝕の進行を抑制するという考え方である³⁻⁵⁾。適切な再石灰化療法を行うためには、齲蝕の進行状態を正確に把握する必要がある、いくつかの検査法を併用して判断しているのが現状である^{6,7)}。しかし、これまでの検査法の多くは、齲蝕病巣内部における経時的な構造変化を明瞭に捉えることは困難であり、とくに初期齲蝕病変の進行程度を判断することはできなかつた⁸⁾。

光干渉断層画像法 (Optical Coherence Tomography, 以後, OCT)⁹⁾は、近赤外光と光学干渉計を用いた画像診断システムである。医科においては、1991年にその有効性が報告¹⁰⁾されて以来、とくに眼科領域において実用化されており、現在では新たなモダリティとして多方面での開発が進められている。OCTの特徴としては、装置が小型であり簡便かつ非侵襲的に高解像度の精密断層像を得ることが可能であることが挙げられる。歯科領域においても、既存の画像診断システムでは観察が困難であった歯質の微細な変化を客観的に把握できることから、その臨床応用には期待がもたれている¹¹⁻¹⁵⁾。一方、OCTイメージ像の解析については、既存の画像診断システムとは画像構築原理が異なることから、得られたOCTイメージ像から歯質の状態変化を正しく把握するための解析法が必要である。

そこで著者は、エナメル質初期齲蝕病変におけるOCTイメージ像の解析法について、ウシ歯エナメル質にpHサイクルを負荷した際の状態変化を、OCT装置を用いて経時的に観察し、信号強度分布から最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅を求めることによって検討した。

材料および方法

1. 試片の調整

ウシ（2～3 歳齢）の下顎前歯で石灰化不全および破折の著しい歯などを除き、抜歯後、直ちに抜髄して蒸留水中に冷蔵保存（4℃）したものをを用いた。使用に際し、その歯冠部唇側面中央付近の歯質を、直径 4～6 mm、厚さ 2～3 mm のエナメル質および象牙質で構成されたブロックが得られるよう、モデルトリマー（TC251, アロー電子）を用いて調整した。このブロック全面を、耐水性 SiC ペーパー# 2,000（Ecomet 4000, Buehler）を用いて露出面が平坦となるよう、4×4×2 mm の大きさに調整、超音波洗浄を 5 分間行った後、ブロックの象牙質面をネイルバーニッシュで被覆し、これを測定用試片とした。

2. pH サイクル

測定用試片は、口腔内の pH サイクルをシミュレートした実験環境下に保管した。すなわち、1 日 2 回、0.1 M 乳酸緩衝液（pH 4.75, 0.75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ および 0.45 mM KH_2PO_4 ）¹⁶⁾に 10 分間浸漬し、37℃の精製水あるいは人工唾液中に保管した。なお、人工唾液としては、14.4 mM NaCl, 16.1 mM KCl, 0.3 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.0 mM K_2HPO_4 , 1.0 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ および sodium carboxymethyl cellulose 0.10 g/100 ml を加えて pH 7.0 に調整したものをを用いた¹⁷⁾。

3. OCT 観察

測定には、Super Luminescent Diode（以後、SLD）を光源とする、Time-Domain 型 OCT 装置（以後、TD-OCT, モリタ東京製作所）を用いた。TD-OCT は、マイケルソン型光干渉計の応用技術によって構築されており¹⁸⁾、干渉計にプローブを組合せ、パーソナルコンピュータで制御するシステムである（Fig. 1）。SLD 光源（中心波長 1,310 nm, 最大出力 7 mW）から発せられる近赤外線を OCT 装置内の光分割器によって 2 束に分割し、反射した 1 束を参照鏡に、透過した他方をプローブ先端（照射口径 4 mm）から試片に照射する。物体光と参照光とを干渉させ、得られた干渉光と散乱の影響を受けない直進光とを選択的に検出することによって、試片の表層から深層にわたる反

射光分布を測定する。こうして得られた二次元断層像は、水平方向 4 mm、深さ方向 5 mm の画像としてモニター上で観察される (Fig. 2)。

測定用試片内部の状態変化の観察には、SLD 光源からの照射光線がエナメル質面の中央に対して垂直に照射されるように試片をサンプルステージに静置し、試片表面との距離を 2 mm とした非接触状態でプローブを固定した (Fig. 3)。OCT 観察は、測定用試片を精製水あるいは人工唾液から取り出し、エアブローを 10 秒間行って歯質表面の水分を除去した状態で行った¹⁹⁾。測定には、B-scan mode とともに、A-scan mode を用い、測定範囲内の任意の 20 箇所における歯質の表層から深層にわたる反射光分布の信号強度情報を得た。

なお、OCT イメージ像の観察時期としては、実験開始前および実験開始 14 および 28 日後とし、試片の数は各条件についてそれぞれ 6 個とした。

4. $1/e^2$ 幅の測定

A-scan mode から TD-OCT に付属するソフトウェアを用いて信号強度分布を解析することで、最大ピーク強度値を検出し、その座標を割り出した。その後、先に求めた座標を中心として $1/e^2$ 幅を求めた。

5. レーザ顕微鏡観察

試片表面のレーザ顕微鏡 (以後、LSM) 観察は、形状測定レーザマイクロスコープ (VK-9710, キーエンス) を用いて行った。また、付属のソフトウェア (VK analyzer, キーエンス) を用いて表面粗さ (R_a , μm) を測定した。

6. 統計処理

各条件において得られた測定値については、重複測定分散分析を行うとともに Tukey-Kramer post-hoc test によって有意水準 5% の条件で統計学的検定を行った。

成 績

pH サイクル適用前および 28 日後の代表的な OCT イメージ像および信号強度分布グラフを Figs. 4, 5 に示した。また、信号強度分布から得られた最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅の経時的変化を Tables 1, 2 に示した。

精製水保管条件における OCT イメージ像 (Fig. 4) は、実験開始前ではエナメル質表層に青～緑色を示すシグナルが観察されたのに対し、pH サイクル負荷開始から 28 日後では黄色を示すシグナルが観察されるようになり、シグナル輝度の上昇が認められた。一方、人工唾液保管条件における OCT イメージ像 (Fig. 4) では、28 日後では表層のシグナルに色調変化は認められないものの、シグナル幅がわずかに広くなるとともに、シグナル下層のエナメル質内部に水色の弱いシグナルが点在するなど、内部断層像にも変化が認められた。

信号強度分布グラフによる波形 (Fig. 5) から、エナメル質表層の信号強度グラフの最大ピーク強度値を求めると、精製水保管条件では、実験開始前では -72.3 dB であったのに対し、28 日後では -44.5 dB と有意に上昇した (Table 1)。また、 $1/e^2$ 幅は実験開始前と比較して、28 日後でわずかに減少した (Table 2)。一方、人工唾液保管条件の最大ピーク強度値は、実験開始前で -52.7 dB であったのに対し、28 日後では -67.2 dB と有意に低下し (Table 1)、 $1/e^2$ 幅は実験開始前に比較して 28 日後では深さ方向に 300 μm 拡大した (Table 2)。

試片表面における LSM 像の代表例、および測定用試片の Ra の経時的変化を Fig. 6, Table 3 に示した。精製水保管条件では、実験開始前では、スミヤー層でエナメル質表面が覆われる像が観察され、Ra は 0.08 μm だったのに対し、28 日後ではスミヤー層が除去されるとともに、エナメル小柱が明瞭となり、Ra は 0.14 μm と有意に大きな値を示した。一方、人工唾液保管条件では、実験期間の経過に伴ってスミヤー層が除去される傾向を示したものの、精製水保管条件と比較して平坦な表面性状を呈していた。

考 察

カリオロジーの発展に伴う齲蝕に関する知識の蓄積と MI という概念の普及に伴って、実質欠損を伴わないエナメル質齲蝕に対して再石灰化療法を行うことが推奨されている³⁻⁵⁾。しかし、エナメル質表層下で生じている脱灰と再石灰化というプロセスを正確に把握することは、単独の検査法を用いるのみでは困難とされている^{6, 7)}。これまで用いられてきた齲蝕検査法は、特異度は高いものの敏感度が低いとされており、病変を見逃す可能性があることが指摘されていた⁸⁾。一方、エックス線検査による初期エナメル質齲蝕の観察では、病理組織的には初期病変を形成しているものの、エックス線写真からはこれを明確に判断できない時期もある。OCT は、コンピュータ断層撮影装置、磁気共鳴画像装置あるいは超音波断層装置などに続き開発された生体内の硬軟両組織における精密断層画像を非破壊的に得ることを可能とした新たなモダリティである¹⁰⁾。OCT で得られた画像の解像度は、コンピュータ断層撮影装置あるいは磁気共鳴画像装置に比較して高く、エックス線撮影に伴う被曝の問題などもないことから、口腔領域における画像診断への臨床応用が期待されている。

本研究で用いた TD-OCT は、参照鏡を駆動させることによって光遅延走査を行い、干渉信号データを取得している¹⁸⁾。したがって、既存の画像診断システムとは画像構築原理が異なることから、OCT イメージ像をより客観的に解析するためには、本装置に適した画像データ解析法が必要と考えられる。そこで著者は、B-scan mode とともに A-scan mode を用いて反射光分布の信号強度情報を得ることで、最大ピーク強度値を算出するとともに $1/e^2$ 幅を求め検討を加えた。

本研究で用いた TD-OCT は、中心波長が 1,310 nm の近赤外線を発する SLD 光源を用いている²⁰⁾。この波長は、生体組織内での水による吸収および散乱の影響が少なく、しかも生体組織中に深く浸透できる波長であるため、齲蝕病巣における光の散乱の差を検出し、病変の深さや広がりを検知することが可能である^{21, 22)}。すなわち、照射光線の歯質表層あるいは内部での反射性の強弱を段階ごとにカラー表示することで、透過率の高い部分は照射された光線の反射光強度が少なく暗部として、逆に散乱の強い部分では明部として可

視化される。したがって、精製水保管条件の OCT イメージ像において、pH サイクル適用後にエナメル質表層のシグナルの色調が変化した理由としては、脱灰によってエナメル質の表面粗さが大きくなり、照射光線の反射および散乱も大きくなったためと考えられた。一方、人工唾液保管条件では、28 日後でエナメル質表層のシグナルの色調に変化は認められないものの、エナメル質内部に水色を呈する弱いシグナルが点在するなど、内部断層像にも変化が認められた。また、同一試片の LSM 像からは、エナメル質表層での形態的变化は精製水保管条件と比較して少なく、平坦な表面性状が観察された。このように、人工唾液保管条件においてエナメル質内部の変化が観察された理由としては、エナメル質表面の脱灰が抑制されたために、試片内部への光線透過性が向上し、OCT イメージ像の色調変化として表れたものと考えられた。

本研究では、OCT イメージ像の変化を数値化することを目的として、A-scan mode における最大ピーク強度値を求めるとともに、その幅を求めることで比較、検討した。最大ピーク強度を示す波形の幅を決定するために、本研究では最大ピーク強度を示す波形における $1/e^2$ 幅を用いた^{23, 24)}。すなわち、得られた信号強度分布グラフのように非対称の形状を持つ波形の場合、最大ピーク強度値を基準として 86.5%が含まれる円を算出し、この円の直径から得られる波形の幅が $1/e^2$ 幅である。精製水保管条件における $1/e^2$ 幅は、実験開始前で 70 μm であり、28 日後で 60 μm と、ほとんど変化は認められなかった。一方、唾液保管条件における信号強度分布の解析からは、ピーク強度値は実験開始前と比較して 28 日後で約 15 dB 低下するものの、 $1/e^2$ 幅の変化は実験開始前で 60 μm であったものが、28 日後で 360 μm と有意に広がった。これは、精製水保管条件と比較して人工唾液に保管することでエナメル質表面における脱灰が抑制された結果、エナメル質表面での照射光線の散乱が少なく、試片内部への光線透過性が増大したことを示す。このように、OCT イメージ像から得られた情報について、A-scan mode から得られた最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅を代表値として比較することによって、エナメル質における表層下脱灰を定量的に比較、検討することが可能であった。

以上のように、本実験の結果から OCT を用いた歯質断層像の解析では、エナメル質が脱灰することによって生じた基質的变化が光線反射性および透過性に及ぼす影響を、OCT

イメージ像の変化として捉えられることが示された。さらに、最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅を測定することで、詳細な解析が可能であることが示された。

結 論

OCT イメージ像の解析法に関する基礎的研究として、ウシ歯エナメル質に対して pH サイクルを適用した際の OCT イメージ像と、信号強度分布で得られる最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅について検討した結果、以下の結論を得た。

1. pH サイクルを適用したウシ歯エナメル質の OCT イメージ像は、実験期間の延長に伴って精製水保管条件では表層のシグナル輝度の上昇が観察された。一方、人工唾液保管条件では表層のシグナル輝度に変化は認められないものの、内部断層像に変化が認められた。
2. pH サイクルを適用したウシ歯エナメル質の最大ピーク強度値は、実験期間の延長に伴って精製水保管条件では有意に大きくなった。一方、人工唾液保管条件では有意に低下した。
3. pH サイクルを適用したウシ歯エナメル質の $1/e^2$ 幅は、精製水保管条件では実験期間の延長に伴う変化は認められなかった。一方、人工唾液保管条件では有意に大きくなった。

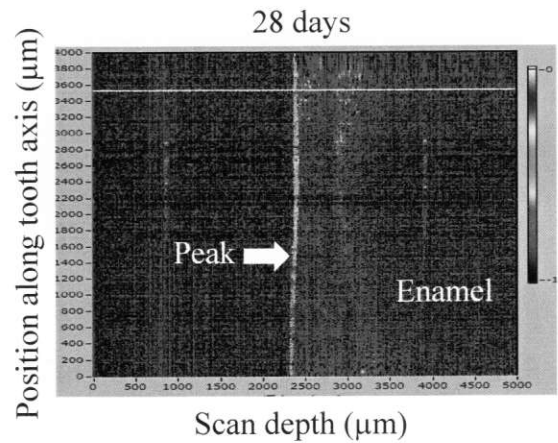
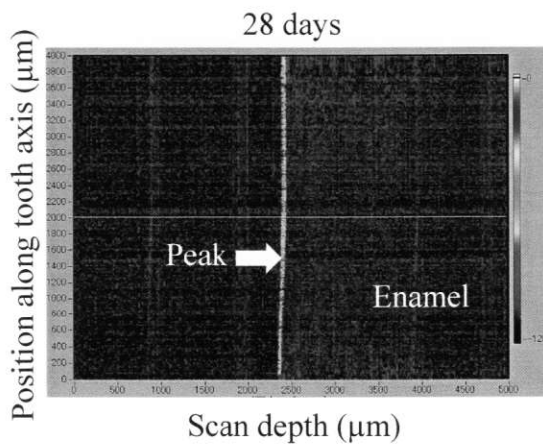
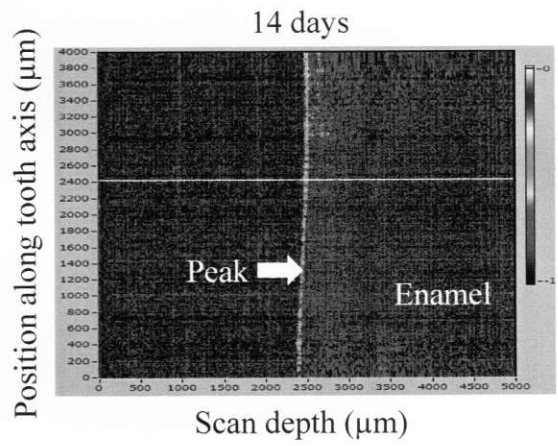
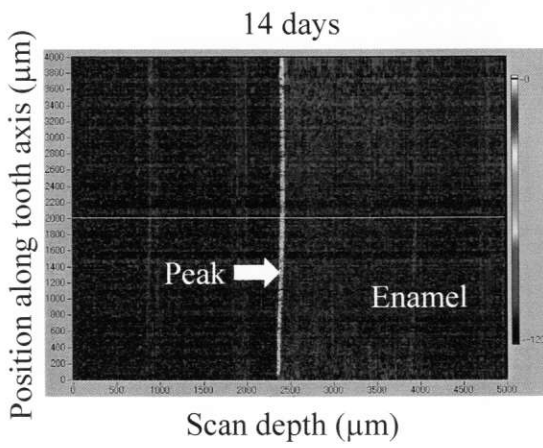
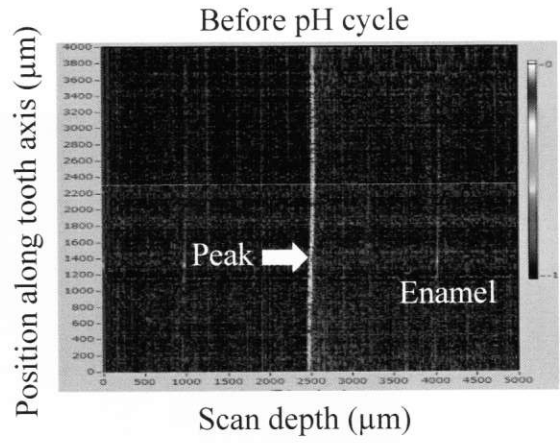
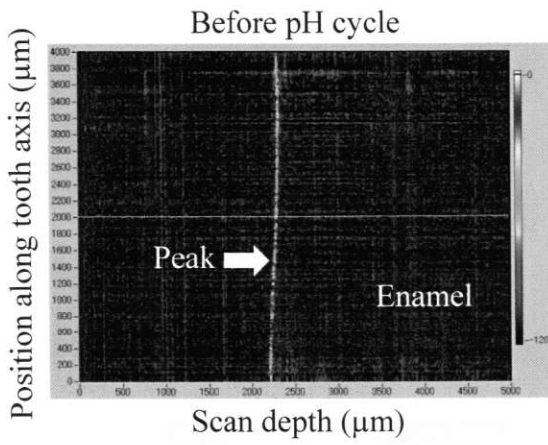
文 献

- 1) Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry -a review. FDI commission project 1-97. *Int Dent J* 2000; 50: 1-12.
- 2) Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: a new concept for operative dentistry. *Quintessence Int* 2000; 31: 527-533.
- 3) Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Moore BK. Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *J Dent* 2006; 34: 230-236.
- 4) Lee YE, Baek HJ, Choi YH, Jeong SH, Park YD, Song KB. Comparison of remineralization effect of three topical fluoride regimens on enamel initial carious lesions. *J Dent* 2010; 38: 166-171.
- 5) Zhou SL, Zhou J, Watanabe S, Watanabe K, Wen LY, Xuan K. In vitro study of the effects of fluoride-releasing dental materials on remineralization in an enamel erosion model. *J Dent* 2012; 40: 255-263.
- 6) Pretty IA. Caries detection and diagnosis: novel technologies. *J Dent* 2006; 34: 727-739.
- 7) 日本歯科保存学会編. う蝕治療ガイドライン. 1版. 永末書店: 京都; 2009. 16-22.
- 8) Bader JD, Shugars DA, Bonito AJ. A systematic review of the performance of methods for identifying carious lesions. *J Public Health Dent* 2002; 62: 201-213.
- 9) Fujimoto JG, Drexler W. Introduction to optical coherence tomography. Drexler W, Fujimoto JG. *Optical coherence tomography: technology and applications*. 1st ed. Springer: New York; 2008. 1-45.
- 10) Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, Fujimoto JG. Optical coherence tomography. *Science* 1991; 254: 1178-1181.
- 11) Bakhsh TA, Sadr A, Shimada Y, Tagami J, Sumi Y. Non-invasive quantification of resin-dentin interfacial gaps using optical coherence tomography: validation against confocal

- microscopy. *Dent Mater* 2011; 27: 915-925.
- 12) Kang H, Darling CL, Fried D. Nondestructive monitoring of the repair of enamel artificial lesions by an acidic remineralization model using polarization-sensitive optical coherence tomography. *Dent Mater* 2012; 28: 488-494.
 - 13) Lenton P, Rudney J, Chen R, Fok A, Aparicio C, Jones RS. Imaging in vivo secondary caries and ex vivo dental biofilms using cross-polarization optical coherence tomography. *Dent Mater* 2012; 28: 792-800.
 - 14) Imai K, Shimada Y, Sadr A, Sumi Y, Tagami J. Noninvasive cross-sectional visualization of enamel cracks by optical coherence tomography in vitro. *J Endod* 2012; 38: 1269-1274.
 - 15) Lin CL, Kuo WC, Yu JJ, Huang SF. Examination of ceramic restorative material interfacial debonding using acoustic emission and optical coherence tomography. *Dent Mater* 2013; 29: 382-388.
 - 16) Silverstone LM. The primary translucent zone of enamel caries and of artificial caries-like lesions. *Br Dent J* 1966; 120: 461-471.
 - 17) Adair SM, Whitford GM, McKnight-Hanes C. Effect of artificial saliva and calcium on fluoride output of controlled-release devices. *Caries Res* 1994; 28: 28-34.
 - 18) Chinn SR, Swanson EA, Fujimoto JG. Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source. *Opt Lett* 1997; 22: 340-342.
 - 19) Shimamura Y, Murayama R, Kurokawa H, Miyazaki M, Mihata Y, Kmaguchi S. Influence of tooth-surface hydration conditions on optical coherence-tomography imaging. *J Dent* 2011; 39: 572-577.
 - 20) Colston BW, Sathyam US, DaSilva LB, Everett MJ, Stroeve P, Otis LL. Dental OCT. *Optics Express* 1998; 3: 230-238.
 - 21) 近江雅人, 春名正光. 高分解能光コヒーレンストモグラフィ. *レーザー研究* 2006; 34: 470-475.
 - 22) Karlsson L. Caries detection methods based on changes in optical properties between healthy and carious tissue. *Int J Dent* 2010; 2010: 1-9.

- 23) 池田正幸. レーザー工学. 1版. オーム社: 東京; 1995. 24-25.
- 24) Murayama R, Furuichi T, Yokokawa M, Takahashi F, Kawamoto R, Takamizawa T, Kurokawa H, Miyazaki M. Ultrasonic investigation of the effect of S-PRG filler-containing coating material on bovine tooth demineralization. Dent Mater J 2012; 31: 954-959.

表および図

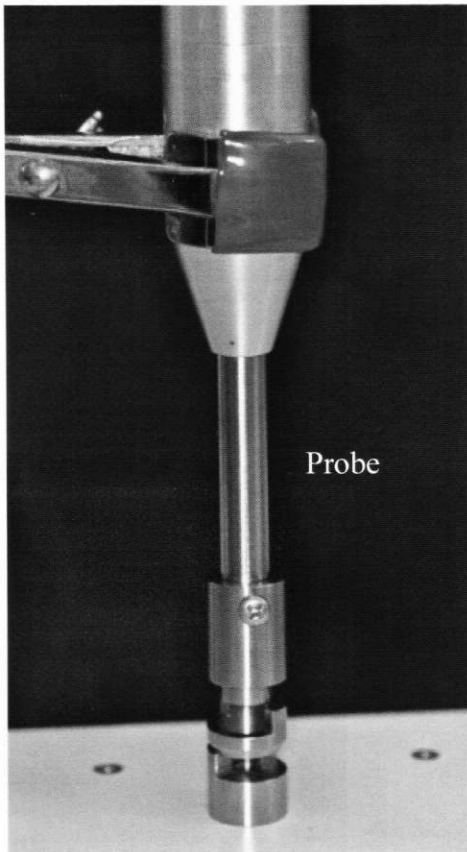


Storage in 37°C distilled water

Storage in 37°C artificial saliva

Fig. 4 OCT images of bovine enamel

(a)



(b)

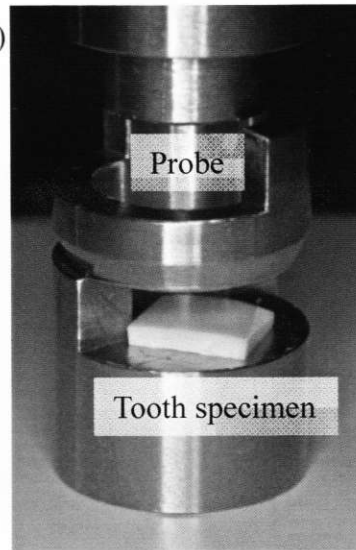


Fig. 3 Scanning beam set at a right angle with respect to the surface of tooth specimen (a), and magnified view (b).

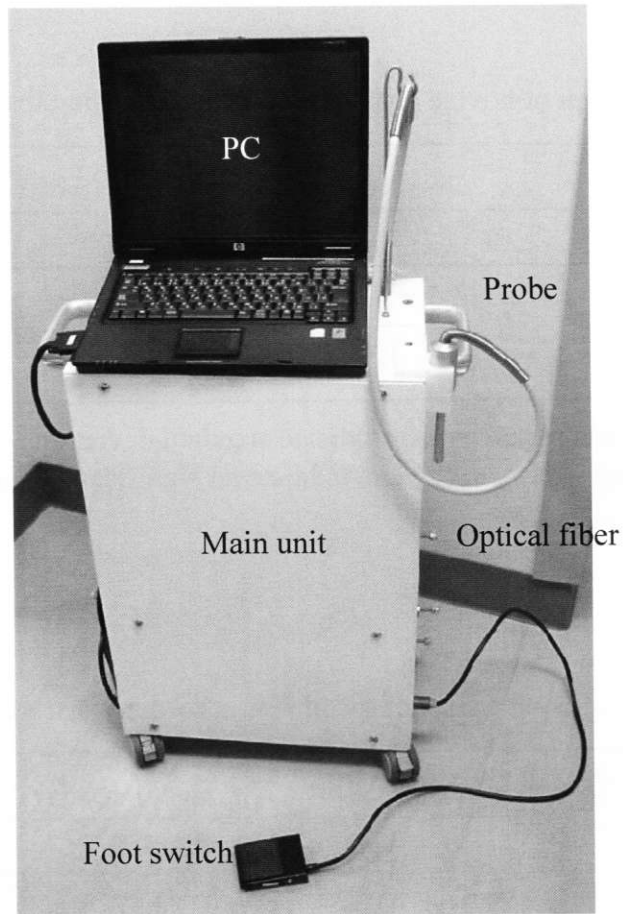


Fig. 1 TD-OCT system used in this study

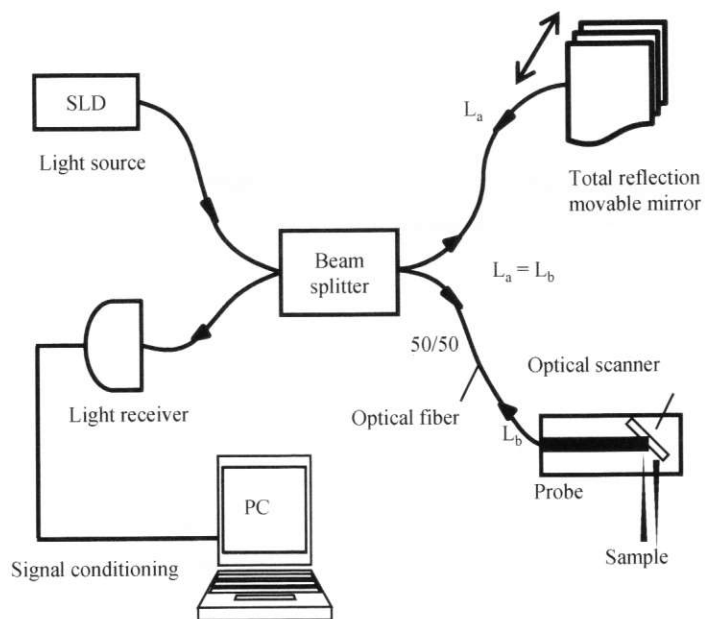


Fig. 2 Principle image of TD-OCT employed

Table 1 Maximum peak of bovine enamel specimens according to storage conditions

Storage condition	Storage time (days)		
	0	14	28
Distilled water	-72.3 (3.5) ^a	-68.6 (6.4) ^a	-44.5 (4.2) ^b
Artificial saliva	-52.7 (2.2) ^A	-57.0 (3.4) ^A	-67.2 (5.2) ^B

Unit: dB, n = 6, values in parenthesis indicate standard deviations.

Values with the same superscript letters indicate no significant difference ($p > 0.05$).

Table 2 $1/e^2$ width of bovine enamel specimens according to storage conditions

Storage condition	Storage time (days)		
	0	14	28
Distilled water	70.0 (11.4) ^a	70.0 (13.8) ^a	60.0 (11.9) ^a
Artificial saliva	60.0 (14.5) ^A	90.0 (12.2) ^B	360.0 (13.1) ^C

Unit: μm , n = 6, values in parenthesis indicate standard deviations.

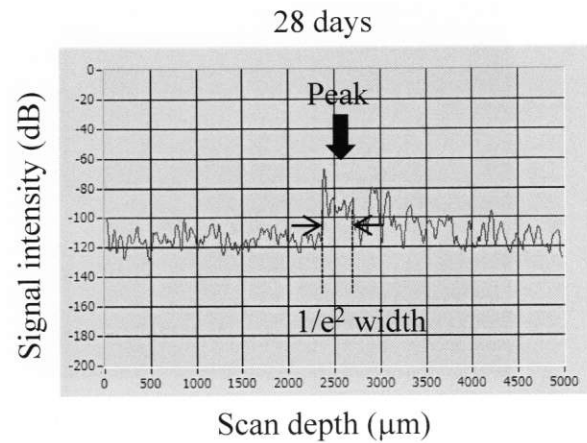
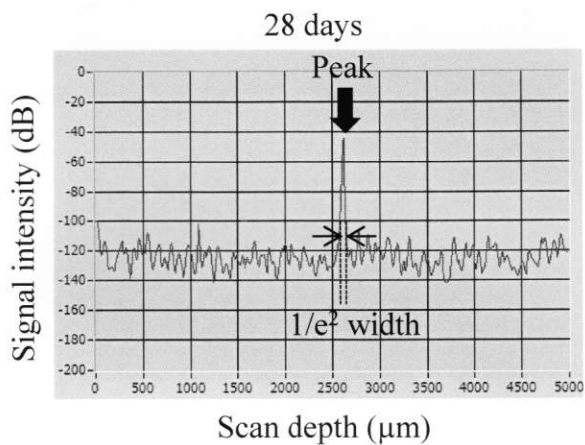
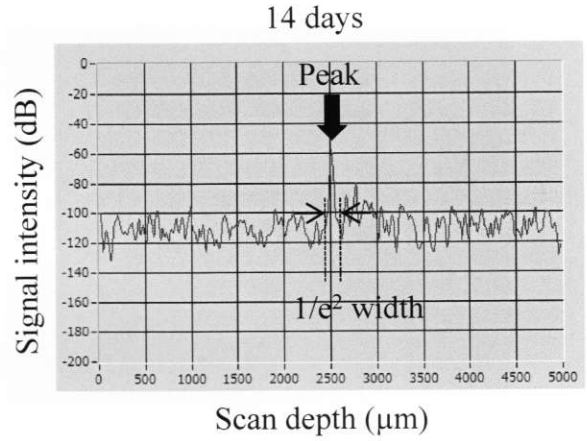
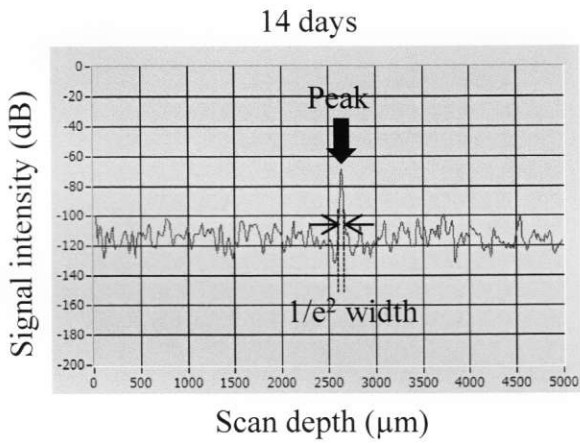
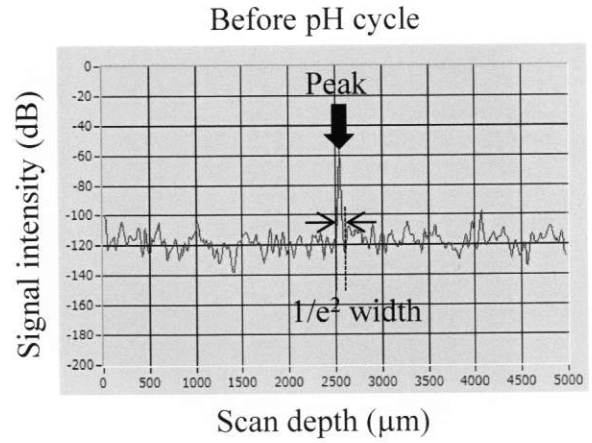
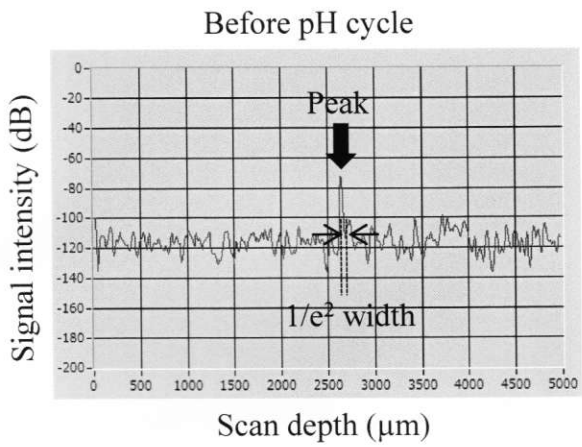
Values with the same superscript letters indicate no significant difference ($p > 0.05$).

Table 3 Surface roughness (Ra) of bovine enamel specimens according to storage conditions

Storage condition	Storage time (days)		
	0	14	28
Distilled water	0.08 (0.02) ^a	0.11 (0.05) ^{a, b}	0.14 (0.03) ^b
Artificial saliva	0.09 (0.05) ^A	0.10 (0.06) ^A	0.08 (0.04) ^A

Unit: μm , n = 6, values in parenthesis indicate standard deviations.

Values with the same superscript letters indicate no significant difference ($p > 0.05$).



Storage in 37°C distilled water

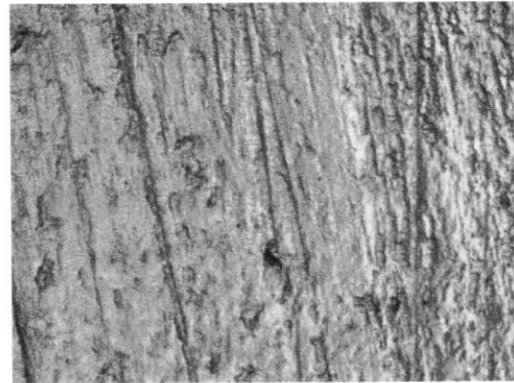
Storage in 37°C artificial saliva

Fig. 5 Signal intensities plotted as a function depth from the tooth surface

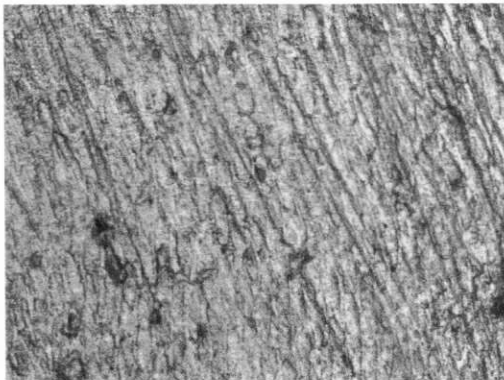
Before pH cycle



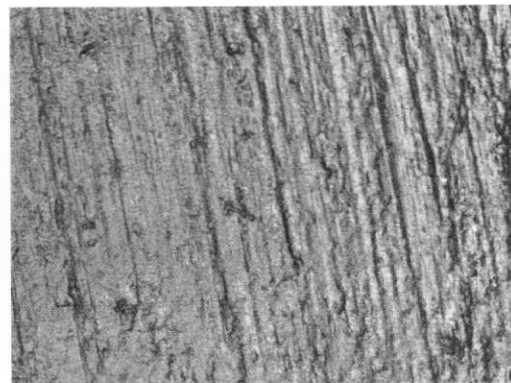
Before pH cycle



14 days



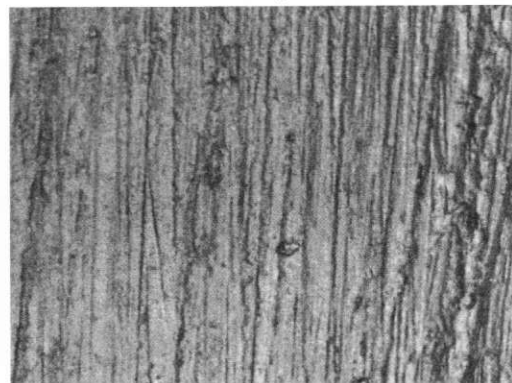
14 days



28 days



28 days



(Original magnification: $\times 3,000$)

Storage in 37°C distilled water

Storage in 37°C artificial saliva

Fig. 6 LSM observations of bovine enamel