

アユにおける横川吸虫被囊幼虫の寄生密度測定法

—感染指数の提唱—

大島 智夫・影 井 昇・木畑 美知江

国立公衆衛生院

(1966年1月18日受領)

はじめに

横川吸虫症の疫学調査を行うばあいに、最も必要な数値は主たる感染源であるアユにおける横川吸虫被囊幼虫の寄生の程度である。すでにこの問題については伊藤(1962)の綜説がある。従来行われた多くの調査報告は捕獲アユ総数に対する横川吸虫被囊幼虫寄生アユの百分率を示し、または消化法による被囊幼虫総数を記載してある。前者ははたして1匹のアユ全体を調査した上で被囊幼虫寄生の有無を判断したのか、魚体の不特定の一部を調査したのみで判定したのかが不明のばあが多く、感染の実態を現わしているかどうかは疑わしい。また後者は人工胃液消化法のペプシン濃度などにつき技術的に不確定な要素が残っていて果して被囊幼虫を完全に回収したか疑問のばあが多い。

横川吸虫症の疫学調査を単に定性的でなく、定量的に検討しようとするばあいは、上記のような従来の方法ではアユにおける感染状況の観察はきわめて得るところ少ない。例えば本研究に用いたと同一河川のアユの横川吸虫被囊幼虫感染状況を調査した坂井(1962)による報告は、観察方法も記載されていない上に、その感染濃度は今回の調査成績に比し信ぜられぬ程少なく正確な情報とは判断し難く、合理的な感染度表示法をあらたに考慮する必要がある。

原理的にはアユの魚体の一部を検査して、その全寄生数を推定する可能性の有無と、アユが捕獲されるおよそ6月より11月までのどの断面で調査したものをその地方のアユの感染度として代表させるかの2つの問題がある。

さらに方法論的には人工胃液による消化法がアユ魚体より完全に被囊幼虫を回収できるかどうかを再検討した上で上記の方法による算定結果と比較せねばならない。

以下これらの点につき検討した上で、新たに合理的なアユ感染度表示法を提唱する。

実験方法および実験結果

本研究は方法論に関するものであるので方法および実験結果は一括説明する。

1. 試験に用いたアユ

本研究に用いたアユは、実験の精度をあげるため、従来より河川流域の住民が横川吸虫症の高浸淫地帯として知られている(影井, 1965)島根県高津川産の横川吸虫被囊幼虫の多数寄生のみられるものを使用した。そのほとんどは天然アユであった。

2. 人工胃液魚体消化法の問題点

a. 魚体細切法：消化を行う前に魚体を細切せねばならぬが従来は単に缺で細切するにすぎず、この方法では消化が不完全に行われ、消化残渣中に被囊幼虫が残存するばあが多いので、本実験にはホモジナイザー、ミキサー等で魚肉を消化液とともに10,000 rpm 30秒-1分破砕混合した。

b. ペプシンの種類および濃度：ペプシンの力価および濃度は魚肉消化の効率に影響するところが大きい。従来報告の人工胃液消化法はこの点を考慮していない。ペプシンは52°Cで塩酸酸性にしたばあ、2時間30分で分解し得る新鮮凝固卵白アルブミンの重量比で表現した力価(N.F. 価)の明確なものを使用せねばならぬ。本実験ではPepsin 1:10,000, Difco製のものをを用いた。

蒸留水1,000 mlに塩酸7 mlを加えた塩酸水にペプシンを0.0001%より0.5%まで8段階に溶解させ、その50 mlとアユ筋肉2.5 gをホモジナイザーで処理し、A群はそのまま2-3時間38°C-39°Cに保ち、B群は一

本研究は、昭和40年度の文部省科学研究費の補助を受けたことを記して、謝意を表する。

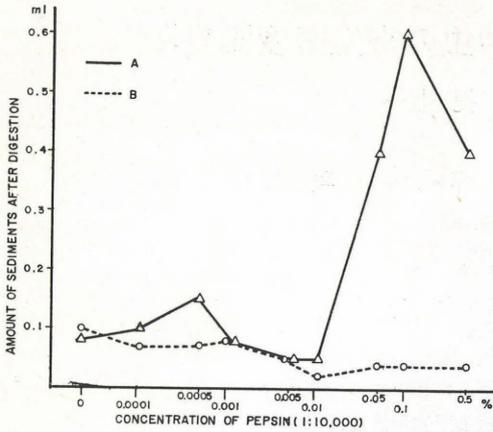


Fig. 1 Correlation between the concentration of pepsin solutions (pH 1.5) and the amounts of undigestive sediments after 2-3 hour digestion.
 A : 5 Gm of sweetfish meat was homogenized with 50 ml of pepsin solution and digested.
 B : 5 Gm of sweetfish meat was homogenized with 50 ml of pepsin solution and the supernatant was discarded after centrifugation. 50 ml of pepsin solution was added to the sediment and digested.

度遠心 (2,000 rpm 5分) にして上清を捨て、再びペプシン液 50 ml を加えて 2-3 時間放置し、いずれも最後に遠心 (3,000 rpm 3分) して沈渣量を測定した。結果は 1 図のように A 群も B 群も希薄なペプシン溶液より漸次ペプシン濃度を高めれば不消化残渣量は減少するが 0.01 % 以上の濃度では再び不消化残渣量が増加し、ことに A 群では大量の絮状沈澱が生じはじめる。恐らくアユ筋肉を細切した際に溶出するタンパク部分に高濃度のペプシンにより分解後再結合するものが含まれているものと解される。

以上より被囊幼虫を集める目的で魚肉消化を行うばあい 1 : 10,000 の力価のペプシンでは 0.01 % が適当 (1 : 1,000 であれば 0.1 %) であり、それ以上高濃度では沈澱量が激増し、それ以下では消化が不十分となるおそれがある。

3. アユ体表上の横川吸虫被囊幼虫の分布状況

1961 年 10 月に高津川で捕獲されたアユのうち大型で横川吸虫被囊幼虫寄生の高度のもの 1 尾を選び体半側における被囊幼虫分布状況を鱗の分布状況との関連において観察した。

まず側線に併行に 1 cm 間隔に横線を画し、2 cm 間

No. of Scales per 1 cm²

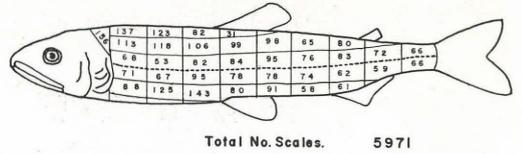


Fig. 2 The size of scales at the various parts of the sweetfish.

No. of Metacercariae per 1 cm²

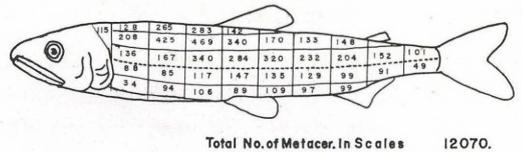


Fig. 3 Distribution of the metacercariae of the *M. yokogawai* on the surface of sweetfish.

隔に縦方向の線をいれ、ほぼ 2 cm² の区画を全面に作り、その 1 つ 1 つの中の全鱗数と全被囊幼虫数を数えた。第 2 図は各区画の 1 cm² あたりの鱗数を示す。

半側の総鱗数はこのばあい 5971 個であつた。記載(富山, 阿部, 時岡, 1963)によれば、アユ側線上の鱗数は 149-165 個と差異があるので、片側総鱗数もほぼ 5,000-6,000 個の間であらう。

第 2 図のように 1 cm² あたりの鱗数は側線の上下の体の中央部が比較的一定しており、背腹部は鱗が小形となつて増加し、尾部は大形となつて少なくなる。

一方同区画における 1 cm² 内の被囊幼虫数は、第 3 図のようで場所により 34-469 まで変動し、全体としては、側線より上部の体前半部が多く、腹側および尾端に近づくにしたがつて減少している。

以上の数値より各区画における鱗 1 枚あたりの被囊幼虫数平均値を算出すると第 4 図のようで各区画で 0.85 個より 4.42 個まで大きな差異がある。さらに同じ区画内の鱗 1 枚における被囊幼虫数の分布のポアソン分布に対する適合度を危険率 5% において検定してみると、第 4 図中の斜線区域のみポアソン分布が認められ、この区域中では被囊幼虫は各鱗に対して均等に分散していることが判明した。

これらの区域の中で側線の上部、1 cm の幅で背びれの下にあたる部分(第 5 図斜線部分)は鱗の大きさもほぼ

Average No. of Metacercariae per 1 Scale.

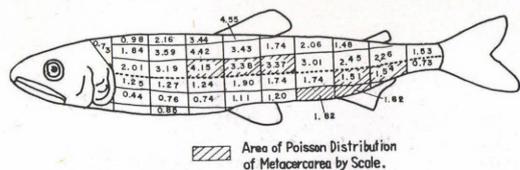


Fig. 4 Number of the metacercariae of the *M. yokogawai* per one scale and the areas of the even distribution of the metacercariae on the scales.

Area for Sampling of Scales

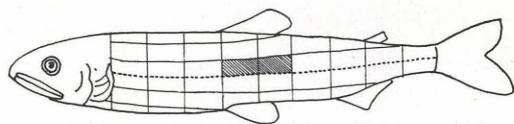


Fig. 5 The specified area for sampling scales for the estimation of infection's grade of the sweetfish.

等しく、1枚あたりの被囊幼虫数も比較的多くまたやや広い範囲にわたり均等に分散していることが判明した。

ついで横川吸虫被囊幼虫に感染している20匹のアユにつき第5図に示された部位より、それぞれ100枚の鱗を採取し、それぞれの鱗に対する被囊幼虫の分散状況を観察したところ第1表のようになり、これのポアソン分布の適合度検定(危険率5%)を行ったところ第1表のように全例にポアソン分布が成立し、アユ一般についてこの区画の鱗には横川吸虫被囊幼虫が均等に分散していることが証明された。

したがってこの附近の鱗を採取すれば、多少採取の位置が前後しても、被囊幼虫の鱗への附着密度は一定であり、他の体表の大部分のところでは、採取部位の僅かの違いにより被囊幼虫附着密度が異つて、サンプリングの場所としては不適当となる。

4. アユに寄生する横川吸虫被囊幼虫数の推定法

被囊幼虫の寄生総数を算出するには魚体の大小を問わずに寄生総数と部分寄生数とが比例関係の成立する魚体の部分を見だし、一定の係数を乗ずればよいわけである。

サンプリングの区域としては前述の脊びれの直下側線上の1cmの幅の場所が適当であり、ここの鱗100枚もしくは200枚中に検出される横川吸虫被囊幼虫数と全寄生数との関係を季節別、個体別に調査した。便宜上一匹

Table 1 Statistical observation of the distribution patterns of the metacercariae of *M. yokogawai* per one scale collected from the specified area of (Fig. 5) of 20 sweetfishes.

No. of Metacercariae in one scale	No. of scales									Average No. of metacercariae in one scale
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Fish No. 1	70 (69)	24 (25)	5 (5)	1 (1)						0.37
No. 2	46 (50)	39 (35)	14 (12)	1 (3)						0.70
No. 3	86 (85)	11 (14)	2 (1)	1						0.16
No. 4	85 (85)	14 (14)	1 (1)							0.16
No. 5	13 (13)	28 (27)	23 (27)	24 (18)	7 (9)	3 (4)	1 (1)	1		1.95
No. 6	63 (63)	30 (29)	5 (7)	1 (1)	1					0.43
No. 7	74 (74)	24 (22)	2 (3)							0.30
No. 8	76 (77)	22 (20)	2 (3)							0.26
No. 9	71 (74)	28 (22)	1 (3)							0.30
No. 10	73 (70)	26 (25)	6 (4)	1 (1)						0.35
No. 11	15 (11)	20 (24)	28 (27)	21 (20)	4 (11)	6 (5)	4 (2)	1 (1)	1	2.24
No. 12	54 (52)	35 (34)	7 (11)	2 (2)	1					0.59
No. 13	16 (14)	25 (27)	29 (27)	15 (18)	11 (9)	4 (4)	1 (1)			1.99
No. 14	27 (20)	27 (32)	22 (26)	14 (14)	5 (5)	4 (2)	1			1.59
No. 15	6 (8)	19 (20)	26 (25)	23 (22)	19 (14)	5 (7)		2 (3)	1 (1)	2.55
No. 16	17 (18)	31 (31)	26 (27)	23 (19)	18 (11)	5 (5)	2 (2)	1 (1)	1	1.74
No. 17	11 (10)	21 (23)	30 (27)	16 (20)	10 (11)	8 (5)	2 (2)	1 (1)		2.28
No. 18	12 (12)	28 (26)	22 (27)	21 (19)	14 (10)	1 (4)	1 (1)			2.10
No. 19	13 (13)	24 (26)	31 (27)	16 (18)	10 (10)	4 (4)	2 (1)			2.06
No. 20	22 (22)	38 (33)	17 (25)	14 (13)	8 (5)	1 (1)				1.52

()...Expected number as Poisson distribution

のアユの寄生状況は体の右半分と左半分とは差異のないこととし、1側で鱗を採取して部分寄生数を算定し、他側で寄生全数を推定して比較した。

a) 寄生全数の消化法による測定：アユの半身は鱗をおとし、筋肉部と鱗を含む表皮とにわけ、局方塩酸7mlに蒸留水を加え1,000mlとした液に、Difco ペプシン

Table 2 Observation on the relationship of the total number and the partial number (from 100 scales of specified area) of the metacercariae of the *M. yokogawai* in July and September.

Body Weight of Fish	A	B	C	A/C	2A/C
July					
67.0 g	1024	36.1%	37	27.7	55.4
61.8	1714	70.2	70	24.5	49.0
57.8	1372	20.4	9	43.2	86.4
56.6	630	28.6	10	63.0	126.0
43.8	4860	78.4	204	23.8	47.6
43.2	1074	81.0	47	22.9	55.8
43.2	876	87.9	30	29.2	55.8
42.0	866	33.5	26	33.0	66.0
41.6	1200	85.0	30	40.0	80.0
40.6	1366	75.4	35	39.0	78.0
38.6	6174	87.0	224	37.6	75.2
37.6	1590	64.2	65	24.5	49.0
35.6	596	88.9	16	37.2	74.8
31.4	620	41.9	16	38.8	77.6
Average	1711.5	64.1	58.5	36.3	72.6
				(=10.5)	
September					
62.2 g	4875	71.6	199	24.5	49.0
54.0	3743	65.7	159	23.5	47.0
50.8	5237	64.9	255	20.5	41.0
49.4	4964	63.1	174	28.5	57.0
49.2	6361	82.3	217	29.3	58.6
46.8	4112	88.2	228	18.0	36.0
47.6	3206	89.5	210	15.3	30.6
46.2	4686	81.4	206	22.7	45.4
44.0	1458	92.2	124	11.8	23.6
39.0	1902	92.7	114	16.7	33.4
38.0	1389	98.7	111	12.5	25.0
38.0	1158	55.4	42	27.6	55.2
Average	3590.9	74.1	169.9	18.9	39.8
				(=6.15)	

- A : Total number of the metacercariae recovered from half side of fish.
 B : Percentage of the number of the metacercariae in the scales
 C : Total number of the metacercariae from the 100 scales in sampling area (Fig. 5)

(1 : 10,000) を 0.01% に加えた消化液を、魚肉に 200 ml、表皮に 60 ml 加えて各々をホモジナイザーで破砕して懸濁液とし、3時間 37°C で消化し、よく攪拌混和した後にその 50 ml および 15 ml を遠心管にとり、2-3分 1,500 rpm で遠心して沈渣を 5 mm 方眼に刻線をつけた手札乾板大のガラス板上に展開して実体顕微鏡によつて被囊幼虫数を数え、その数を 4 倍して全数を推定した。算出された魚肉および表皮の被囊幼虫数を合計し、その 2 倍をアユ 1 匹の全寄生数とした。このばあい鰭の部分の被囊幼虫数が含まれないが、アユを食べるばあいは鰭はたべぬので一応ヒトに感染する可能性のある総

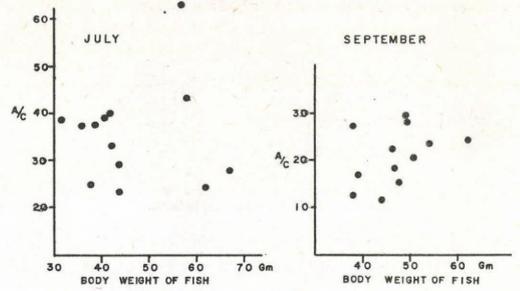


Fig. 6 The ratio (A/C in Table 2) and the body weight of sweetfish.

数ということになる。厳密な意味での総寄生数は鰭の部分として表皮中の被囊幼虫数の $1/3$ を加えればよい。

b) アユの個体差による係数の変動

1961年7月21日に高津川で捕獲したアユ 14 匹、9月5日捕獲したアユ 12 匹につき体重別に上記の方法で算出した諸数値を配列すると第2表のようになった。1匹平均前者は 1711.5 個、後者は 3590.9 個の横川吸虫被囊幼虫を検出した。表皮および筋肉内への被囊幼虫の分布の割合は7月のアユでは変動が多いが9月のアユではほぼ一定となりほぼ 7 : 3 の比率になる。

指定区域の鱗 100 枚の被囊幼虫数 (C) と魚体半身の被囊幼虫数 (A) との比率 A/C をみるに、第6図にみられるように体重増加による傾向的な変化は少なく、アユの大小の比率への影響は少ないように思われる。ただし、7月下旬に捕獲したものはこの比率の変動が大で平均値 36.3 に対し標準偏差 $\sigma=10.5$ であり、9月のものは平均値 18.9 で $\sigma=6.15$ と変動の幅が少なくなっている。これは感染の初期では体表と筋肉との被囊幼虫の分布状況がまだ安定しないために生ずる現象と思われ鱗の被囊幼虫寄生密度からの全寄生推定法は、感染の初時にはやや誤差が多い欠点があることが考えられる。

c) 季節差による係数の変動

前項のように係数 A/C は7月下旬のアユは9月上旬のアユのほぼ 2 倍であり、季節変動が充分予想されるので、1965年6月より11月まで各月の高津川産アユにつき係数を測定してみた。結果は第3表のようであり、明らかな季節による変異があり、係数は6月より上昇し9月に最高となり、10月より漸減するが、8月以降はおおむね 40-50 の間にあつた。表2の9月は異常に低かつた理由は不明である。

10月に平均寄生被囊幼虫数と係数が目立って低下している。

Table 3 Seasonal variation of the total number of the metacercariae of *M. yokogawai* in sweetfish and the ratio (A/C in Table 2)

	No. fishes ex.	No. metacercariae per one fish	Average ratio A/C
June	18	297	9.9
July	18	2046	33.5
Aug.	17	2848	44.5
Sept.	10	4560	50.7
Oct.	10	2535	43.8
	21	2995	31.2
Nov.	16	4271	34.0

d) アユの横川吸虫被囊幼虫の少数寄生例の検討

上記の例はきわめて濃厚に横川吸虫被囊幼虫の寄生をうけたアユについての観察例であるが、同様のことが希薄感染のアユについて成立するかどうかを、高津川流域の柿の木村でコンクリート養魚池中に、鹿児島県始良郡始良川より移送したアユ苗を地下水で池中養殖をしたアユについて観察した。このアユは出荷前にすでに感染をうけていたもので、現地に到着して以後は新感染はなかつたものと思われる。希薄感染であるため、指定域の鱗 200 枚を調べて被囊幼虫を数えた。第 4 表にあるように第 3 表とほぼ同じ結果を得、この係数は被囊幼虫寄生の多少にかかわらず同じ季節ではほぼ一定であることが判明した。

Table 4 Observation of sweetfish in the cases of light infection of the metacercariae of *M. yokogawai*

No. fish	Average of the Total No. metacercariae (2A)	Average of the No. of metacer. of 200 scales in specified are (2C)	2A/2C	
July	1	214	7	30.6
Aug.	2	87	2	43.5
Sept.	5	44	1.6	27.8
Oct.	3	40	0	
Nov.	11	70	0	

考 察

従来十分に検討することなしにいわゆる人工胃液により魚肉を消化して被囊幼虫を回収する方法が広く行われていたが、今回ペプシンの力価と濃度如何が魚肉の消化にきわめて重要な影響を与えることがわかった。ペプシン力価 1 : 10,000 であれば 0.01 % が至適であり、力価が低いばあいは濃度を高め溶液のタンパク分解能力を一定にする必要がある。

アユ寄生の全横川吸虫被囊幼虫数は消化法によって算定されてきたが、多数の検体を扱うばあいや、現地にお

いて調査するに当つては到底このような非能率的な検査法を採用するわけにはゆかずこのためにアユに関する横川吸虫症の疫学調査は遅々として進まない。

今回それに代るものとして 1 側の背鰭直下の側線上幅 1 cm の範囲の鱗 100 枚もしくは 200 枚に寄生する被囊幼虫数を算え、適当な係数を乗ずることにより全寄生数を推定する方法を検討した。一部分の鱗の観察により魚体の寄生の程度を推察する方法は古賀(1938)が試みているが理論的根拠は全くない。

まず鱗を採取する部位として、その範囲の鱗の大きさが一様であり、しかも被囊幼虫の附着状況が各鱗に対しポアソン分布を示す区域でなければならぬ。これに相当する区域として背びれの直下、側線上の幅 1 cm の区域が適当であることが判明した。

この区域の鱗 100 枚もしくは 200 枚内の被囊幼虫数と全寄生数との係数関係を観察すると、アユ採取日によって係数とその標準偏差の変動があることが見いだされた。

アユへの感染初期である 6 月、7 月は表皮上および筋肉内の被囊幼虫の分散が不安定であり、筋肉内への侵入も少ないために係数は小さく、変動も大きい。8 月、9 月には感染情況もほぼ定常状態となり、係数の変動範囲も少く安定をしてくる。

もともと被囊幼虫のアユへの寄生密度測定は、それ自体厳密性を要求される性質のものでなく、ある範囲の変動、誤差以内で推定できれば実用上は差しつかえない性質のものであり、係数も簡約化されることが望ましい。

鱗を 100 枚調査するか 200 枚調査するかはアユの横川吸虫被囊幼虫の感染状況による。

一般には本調査に用いた高津川産アユのように高度の寄生をうけているばあいは少ないと思われるので、一応 200 枚を調査し全数は $2A/2C = A/C$ として上述の係数をそのまま乗じて全数とすればよい。便宜的に、下表のように係数を測定すればよい。

	鱗 100 枚 (2A/C)	鱗 200 枚 (2A/2C)
6 月	×20	×10
7 月	×60	×30
8 月	×80-100	×40-50
9 月	×100	×50
10 月	×80	×40
11 月	×60	×30

ある 1 河川のアユの横川吸虫寄生状況を推定するには一応アユの被囊幼虫の分布が定常化し、ほぼ寄生数の比

ークに達する8月に調査するのが適当である。8月捕獲のアユ10-20匹の背びれ下側線上部幅1cmの区域の鱗200枚に附着する被囊幼虫数の平均をもつて感染の指数とすることが望ましい。

この際のアユは同一河川のほぼ中流域のもので、水温の低い上流域のものは当然寄生数が少いのでその河川を代表することはできない。この事については別に稿をあらためて述べる(影井, 1966印刷中)。そうして、以上の結果は感染指数1-4を軽感染、5-9を中等度感染、10-19を高度感染、20以上を濃厚感染とすべきであろう。この際係数0は寄生数50以下を意味し、寄生を認めない意味とはならない。

まとめ

1) アユより横川吸虫被囊幼虫を検出するため、人工胃液消化法を行うばあい、ペプシンは1:10,000の力価のばあい0.01%の濃度が適当であり、低力価のものは濃度を力価に反比例させて上昇させる必要がある。これ以上高濃度のペプシンは不溶性沈澱物を増加し、希薄なばあいは消化が不充分である。

2) アユ体表上の横川吸虫被囊幼虫の分布密度は一様でなく、側線上部の体前半部に多く、腹側および尾端に近づくにしたがい減少する。

3) アユの鱗は片側で約5000-6000枚であり、背腹部は小形で、尾部に近づくにしたがい大形となり、体中央の側線上下の部分が比較的均一な中形の鱗が揃っている。

4) 鱗1枚あたりの横川吸虫被囊幼虫の分布は、大型のアユ体表を横幅2cm、タテ1cmの区画に区切つたばあいポアソン分布にしたがう区域は少なく、尾端腹側部と、背びれ下の側線上部域のみに均等分散が証明された。

5) 20匹の感染アユの背びれ直下の側線上部幅1cmの区域の鱗100枚につき同様に分散状況を観察し、い

れも均等分散が証明された。

6) 横川吸虫被囊幼虫の同区域の鱗200枚の数と全寄生数とは次の係数が成立する。ただし係数は6月は変動が大きい。

6月捕獲魚	×10
7月 "	×30
8月 "	×40-50
9月 "	×50
10月 "	×40
11月 "	×30

7) ある河川のアユの横川吸虫感染状況調査は8月-9月に河川の中流域で捕獲されたアユ10-20匹の背びれ下、側線のすぐ上部幅1cm帯の鱗200枚中の被囊幼虫平均値をもつて感染指数として表現するのが適当である。濃厚寄生のばあいは100枚を観察して2倍してもよい。これを50倍すれば1匹あたり総寄生被囊幼虫数がわかる。

8) 上記の感染指数で1-4を軽感染、5-9を中等度感染、10-19を高度感染、20以上を濃厚感染とする。

おわりに本研究は島根県益田保健所長美濃地裏二氏の御好意御協力なくしては完成しなかつたことを記し、厚く謝意を表する次第である。

参考文献

- 1) 伊藤二郎(1963): メタゴニムスおよび其の他の異形吸虫類. 日本における寄生虫学の研究. II. 目黒寄生虫館.
- 2) 影井昇(1965): 横川吸虫症の疫学的研究 I. 島根県高津川流域住民の横川吸虫浸淫実態とその疫学的解析. 公衆衛生院研究報告. 14(4)213-227.
- 3) 古賀元晃(1938): めたごにむす属吸虫に関する研究. 医学研究, 12, 3, 471-3, 528.
- 4) 坂井豊(1962): 中国地方における横川吸虫および高橋吸虫の中間宿主と人体感染との関係について. 寄生虫誌, 11(6), 421-426.
- 5) 富山一郎・阿部宗明・時岡隆(1962): 原色動物大図鑑. II, 276, 北隆館.

Abstract

A SIMPLE METHOD FOR ESTIMATING THE TOTAL NUMBER OF THE METACERCARIAE OF *METAGONIMUS YOKOGAWAI* IN SWEETFISH *PLECOGLOSSUS ALTIVELIS* — A NEW PROPOSAL OF THE INFECTIONS INDEX OF FISH —

TOMOO OSHIMA, NOBORU KAGEI and MICHIE KIHATA
(Division of Parasitology, Institute of Public Health)

It has been well known that the most important intermediate host for the human metagonimiasis was the sweetfish *Plecoglossus altivelis* which are the most common and delicious fresh water fish throughout Japan.

From the epidemiological view point of human metagonimiasis, the infection's rate and grade of sweetfishes with the metacercaria of *Metagonimus yokogawai* are the most important index of endemy in the endemic area.

Unfortunately, no exact, simple and practical ways to find the grade of endemicity of metagonimiasis have ever been established regarding the second intermediate host. Peptic digestion method for recovering the metacercariae from sweetfish was time consuming and not as exact as man expected.

Comparing the total number of the metacercariae and the number of the partial metacercariae in the every partial areas of the fish, the following new methods were devised to estimate the total number of the metacercaria of *M. yokogawai* in the sweetfish as follows.

Collect 200 scales of sweetfish from the area of the one cm zone just above the lateral line and just beneath the dorsal fin. Distribution of the metacercaria to each scale in this area was quite even in every sweetfish. (Fig. 4 and Table 1).

To estimate the total number of the metacercariae in the fish body, sum up the number of the metacercaria of 200 scales and multiply with the following multiplier number according the month when the fishes were captured.

The multiplier numbers were June 10, July 30, August and September 50, October 40, and November 30 respectively.

The average number of the metacercariae found in the 200 scales in the specified area of more than 10 sweetfishes which were caught in August and September was designated as the infection's index of the sweetfish with *M. yokogawai* in the river.

The indexes were evaluated as follow. 1-4 light infection, 5-9 medium infection, 10-19 heavy infection, above 20 heaviest infection.

For the exact recovery of the total number of metacercariae from the fish body the concentration of pepsin was proved to be important. The most optimum concentration for digestion of fish meat was 0.01% by Difco Pepsin (1 : 10,000) and the thicker the concentration the more the amount of the sediments and the weaker the concentration resulted in uncomplete digestion as shown in Fig. 1.