

Clostridium difficile トキシン迅速検査キットの評価と 微生物学的検討

¹⁾ 京都大学医学部附属病院感染制御部, ²⁾ 同 検査部

中川 莉彩¹⁾²⁾ 飯沼 由嗣¹⁾²⁾ 山本 正樹¹⁾²⁾ 松村 康史¹⁾²⁾
 白野 倫徳¹⁾²⁾ 松島 晶¹⁾²⁾ 長尾 美紀¹⁾²⁾ 斉藤 崇¹⁾²⁾
 高倉 俊二¹⁾²⁾ 伊藤 穰¹⁾²⁾ 樋口 武史¹⁾²⁾ 田中美智男²⁾
 一山 智¹⁾²⁾

(平成 21 年 7 月 1 日受付)

(平成 21 年 10 月 29 日受理)

Key words: *Clostridium difficile*, rapid toxin test, toxin gene, ribotyping

要 旨

2006 年 1 月～2009 年 3 月までの間に当院にて *Clostridium difficile* 関連下痢症 (*C. difficile*-associated diarrhea: CDAD) を疑い toxin 検査及び培養検査を行った検体 (n=877) を対象として, ①新旧の toxin 検査キットの評価, および, ②検出された *C. difficile* の微生物学的検討を行った. toxin 検査は 2007 年 10 月までは toxin A 検出キットである Uniquick を使用し, 以降は toxin A および B を検出可能な TOX A/B QUIK CHEK を使用した. 臨床的に CDAD と考えられた症例の検体を真の陽性とした場合の Uniquick/TOX A/B QUIK CHEK/培養法の感度, 特異度, 陽性予測率, 陰性予測率はそれぞれ 54.3%, 99.1%, 90.5%, 93.2%/46.2%, 97.6%, 65.2%, 95.0%/42.2%, 95.5%, 55.1%, 92.6% となり, 感度では培養法よりも両 toxin 検査が良好な傾向を示し, 陽性予測率では, Uniquick が TOX A/B QUIK CHEK および培養法に比べ有意に良好な結果を示した ($p < 0.03$). 臨床的 CDAD 症例における, 培養法との一致率は Uniquick で 24.3%, TOX A/B QUIK CHEK で 53.1% であった. また解析可能であった保存株 27 株について toxin 遺伝子タイプを確認したところ toxin A⁺B⁺産生株が産生株 48.1%, toxin A⁻B⁺産生株が 37.0%, toxin A⁻B⁻産生株が 14.8% であった. そのうち toxin A⁻B⁺産生株ではリボタイピングにより 10 株中 8 株が 2 つの cluster に分類され, さらにそのうち 7 株は特定の診療科や病棟に関連しており, 院内伝播の可能性が示唆された.

CDAD の診断において, 特に toxin A 非産生 toxin B 産生株が多く検出される施設においては迅速検査キットとして toxin A 及び B が検出できるキットを優先的に用いる必要があり, 加えて培養検査の併用が望ましい.

[感染症誌 84: 147~152, 2010]

序 文

C. difficile は抗菌薬関連腸炎の主要な原因菌として臨床上重要である. *C. difficile* はヒトの腸管内に保菌されている場合もあるが, 腸内細菌等に比べると菌量も少なく, 健常人では通常病原性を発揮しないと考えられている¹⁾. しかし, 宿主の腸管に生息する正常細菌叢が抗菌薬の使用などによりバランスを崩し, 本菌が異常繁殖した場合に感染症, すなわち *C. difficile* 関連下痢症 (*C. difficile*-associated diarrhea: CDAD) あ

るいは腸炎を引き起こす. *C. difficile* による感染症は軽症の下痢症状から, 偽膜性腸炎や中毒性巨大結腸や消化管穿孔などの重症例まで様々な病態を呈する. その発症には抗菌薬以外にも, 患者の年齢や基礎疾患, 入院期間, 緩下剤の使用, 経管栄養などの医療行為を含めた患者側の要因が大きく影響しているとされている²⁾. 本菌は芽胞を形成することにより病院内環境に定着し, 医療従事者や患者の手指を介して院内伝播する. このため, *C. difficile* は重要な院内感染菌となっており, がんセンター, 療養型病院, 高齢者施設などでの院内発生事例が国内外で多数報告されている³⁾.

別刷請求先: (〒606-8507) 京都市左京区聖護院川原町 54
 京都大学医学部附属病院検査部 飯沼 由嗣

C. difficile の検出方法としては、便検体中の *C. difficile* 毒素を検出する迅速検査キットが広く用いられている。Uniquick (関東化学) は、toxin A のみを検出する検査キットであり、培養陽性検体中の陽性率は 53%⁴⁾、細胞毒性試験陽性検体中で 60%⁵⁾ と報告されている。一方、最近市販された toxin A と B を検出可能な迅速キットである TOX A/B QUIK CHEK「ニッスイ」(日水製薬)では、培養陽性検体中で 62%⁶⁾ との報告がある。このように既報からは、両キットとも 6 割前後の陽性率であり、偽陰性に注意が必要な結果となっている。

今回我々は、Uniquick と TOX A/B の性能比較をする目的で toxin 検査キットの評価をするとともに、*C. difficile* の保存株について toxin 検査キット結果の比較検討、及び toxin 遺伝子検査及び ribotyping などの微生物学的検討を行った。

対象と方法

1. 対象検体

京都大学医学部付属病院にて 2006 年 1 月から 2009 年 3 月までの間に CDAD を疑い、便培養検査及び迅速検査キットによる toxin 検査を同時に実施した 877 検体を対象とした。本研究に先立ち、京都大学医学部の倫理委員会に申請し、承認を得た。

2. 培養検査法及び toxin 検査法

培養および同定検査は、便検体を Cycloserin Cefoxitin Fructose Agar (CCFA) に接種し、48 時間嫌気培養した後、培養陽性となった菌のコロニーの性状およびグラム染色性にて同定を行った。Toxin 検査法の迅速キットは 2006 年 1 月から 2007 年 10 月までは Uniquick、それ以降の 2007 年 11 月から 2009 年 3 月までは TOX A/B を使用しており、いずれも添付文書に記載されている方法に従い検査を実施した。

3. 臨床的 CDAD の定義

以下のすべての条件を満たすものを臨床的 CDAD とした：①下痢出現 4 週間以内に抗生物質あるいは制酸剤の投与を受けている、②軟便または水様便が 1 日に 3 回以上ある、③バンコマイシンやメトロニダゾールの投与、あるいは抗菌薬中止により症状の改善がみられる。

4. Toxin 遺伝子検査およびリボタイピング

対象のうち培養陽性となりマイクロバンクを用いて -80℃ に冷凍保存されていた株を用いた。CCFA 培地にて 48 時間嫌気培養し、QIAGEN kit にて DNA を抽出した。

Toxin A 及び B, binary toxin の遺伝子検索は既報⁷⁻⁹⁾ に準じて toxin A 遺伝子 (*tcdA*) の非反復塩基配列 (NK3-NK2 : *tcdA*) と反復塩基配列 (NK11-NK9 : *tcdA rep*)、toxin B 遺伝子 (*tcdB*) の非反復塩

基配列 (NK104-NK105 : *tcdB*)、及び binary toxin の *cdtA* (*cdtApos-cdtArev*) と *cdtB* (*cdtBpos-cdtBrev*) の 5 種の PCR 法により実施した。

これらの PCR 結果をもとに toxin A 及び B については *tcdA* にて 251bp, *tcdA rep* にて 1,265bp, *tcdB* にて 203bp の増幅産物が得られた菌株を toxin A 産生 toxin B 産生株 (A⁺B⁺株), *tcdA* にて 251bp, *tcdA rep* にて 714bp, *tcdB* にて 203bp の増幅産物が得られた菌株を toxin A 非産生 toxin B 産生株 (A⁻B⁺株), 増幅産物が認められない菌株を toxin A 非産生 toxin B 非産生株 (A⁻B⁻株) と同定した。また, binary toxin については *cdtA* 及び *cdtB* にて, それぞれ 375 bp 及び 510bp の増幅産物が得られた場合に産生株と同定した。

リボタイピングについては既報¹⁰⁾ に従い, 16sRNA 遺伝子と 23sRNA 遺伝子間のスペーサー領域を増幅するプライマーを用いて PCR 法で行った。PCR 産物を低電気浸透アガロース (Agarose for 50~800bp fragment, ナカライテスク) 3% ゲルを用いて電気泳動を行い, バンドパターンにて判定を行った。

5. 統計解析

有意差検定については母比率の差の検定を行い, p 値が 0.05 以下を有意と判定した。

成績

1. 迅速検査キットの評価

2006 年 1 月から 2009 年 3 月の間に培養及び迅速キットによる toxin 検査の両方が行われていた症例は計 877 件あり, 内訳は Uniquick が 514 件, TOX A/B が 363 件であった。臨床的に CDAD と考えられる症例を真の陽性とした場合について, 感度, 特異度, 陽性的中率, 及び陰性的中率は, それぞれ Uniquick では 54.3%, 99.1%, 90.5%, 93.2%; TOX A/B では 46.9%, 97.6%, 65.2%, 95.0%; 培養検査においては 42.2%, 95.5%, 55.1%, 92.6% であった (Table 1)。

培養検査との比較では, toxin 検査キットが良好な結果が得られた (有意差なし)。Uniquick と TOX A/B との比較では, 前者がより良好な結果が得られた (有意差なし)。陽性的中率については Uniquick が TOX A/B 及び培養検査よりも有意に良好な結果であった (TOX A/B : $p=0.03$ 及び培養検査 : $p<0.01$)。また, 特異度・陰性的中率は両キット及び培養検査ともに 90% を越える高い値であった。一方, toxin 検査キットと培養検査と比較検討では, Uniquick では 24.3%, TOX A/B では 53.1% と, ともに一致率は低値にとどまり, 特に Uniquick では低い結果となった (Table 2)。

2. toxin 遺伝子解析およびリボタイピング

マイクロバンクに保存されていた菌株のうち, 再培養及び遺伝子検索が実施できた 27 株 (27 症例) につ

Table 1 Uniquick, TOX A/B, and culture result evaluation compared to clinical CDAD

Uniquick: n=514, 2006/1 ~ 2007/10
 TOX A/B: n=363, 2007/11 ~ 2009/3
 Culture: n=877, 2006/1 ~ 2009/3

Test	Clinical CDAD		Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
	+	-				
Uniquick	+	38	54.3*	99.1	90.5**	93.2
	-	32				
TOX A/B	+	15	46.9	97.6	65.2	95.0
	-	17				
Culture	+	43	42.2	95.5	55.1	92.6
	-	59				

*: Not significant v.s. TOX A/B and Culture
 **: p=0.03 v.s. TOX A/B, p<0.01 v.s. Culture

Table 2 Comparison of Uniquick and TOX A/B results with culture.

Uniquick: n=70, 2006/1 ~ 2007/10
 TOX A/B: n=32, 2007/11 ~ 2009/3

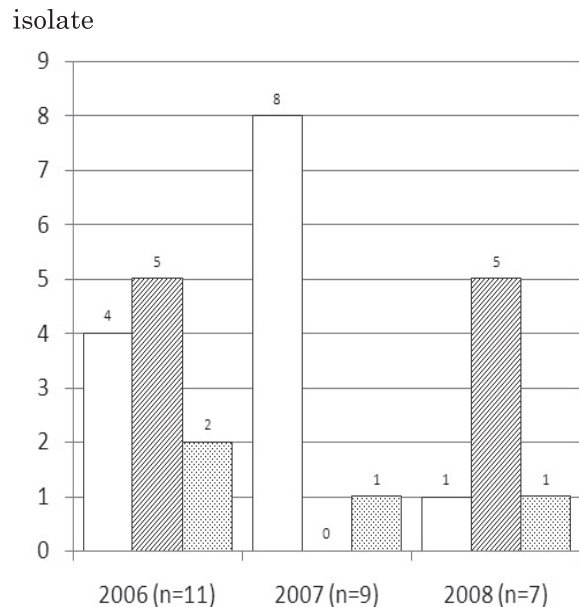
Toxin detection kit	Culture	
	+	-
Uniquick	+	7
	-	31
TOX A/B	+	7
	-	10

いて解析を行った。PCR法による toxin 遺伝子検査により、A⁺B⁺株が13例、A⁻B⁺株が10例、A⁻B⁻株が4例となった。年次推移では、2006年がA⁺B⁺株とA⁻B⁺株がほぼ同数であったのに対し、2007年はA⁺B⁺株のみ、2008年はA⁻B⁺株のみが検出された(2009年は1株のみが toxin A⁺B⁺となった)(Fig. 1)。また診療科としては、血液腫瘍内科が10例37%、次に肝胆膵移植外科が5例19%と、この2つの診療科で半数以上を占めていた。また、これとは別にICU入室中に発症した例が3例あった。遺伝子タイプとあわせて解析すると、A⁻B⁺株においては10例中9例(90%)が血液腫瘍内科(n=6)またはICU入室中の症例(n=3)のどちらかに属していた。

また、北米地域では、重症感染症を起こすとされる強毒株 NAP1/027 の流行が院内感染で大きな問題となっている。毒素については toxin A 及び B を過剰産生するとともに binary toxin という別の毒素も産生すると言われている。毒素の試験のみでは鑑別ができないが特徴的な遺伝子型を示すことがわかっている¹¹⁾。その binary toxin も同様に PCR で判定したところ、27例中1例(3.7%)のみ binary toxin 陽性株が検出されたが、重症例でもなくリボタイプは NAP1/027 とは異なるパターンであった。

Fig. 1 Annual toxin type change in isolated C. difficile strains (n=27)

Only 1 strain isolated in 2009 was included in 2008



PCR リボタイピングは目視においてパターンを分類すると、全18種類のバンドパターンが確認できたので任意にリボタイプ a~r として分類した (Fig. 2 及び Table 3)。13株あった A⁺B⁺株では10種類のリボタイプ a~j が存在し、そのうち6株は2株ずつ3つのリボタイプ a~c に分類できたが、診療科も別々で特に疫学的関連はなかった。一方、10株あった A⁻B⁺株においては4種類のリボタイプ k~n が存在し、そのうち5株がリボタイプ k に、3株がリボタイプ l に属していた。その8株中7株は血液腫瘍内科 (n=5) 及び ICU 入室患者 (n=2) で検出されたものであった。

考 察

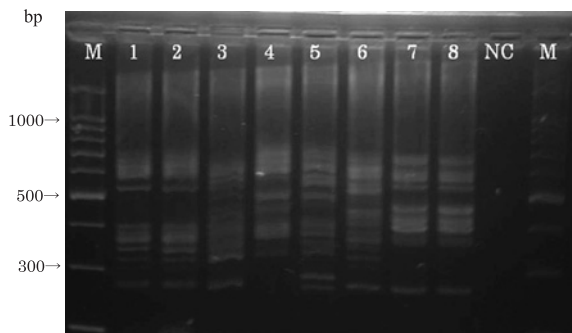
C. difficile による腸管粘膜障害性は腸管毒素である toxin A と細胞毒素である toxin B の2種類が主要な

Table 3 PCR ribotype patterns for toxin types Ribotype numbers are tentative

Toxin type	A ⁺ B ⁺ (n=13)										A ⁻ B ⁺ (n=10)				A ⁻ B ⁻ (n=4)			
Ribotype n	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r
	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	5	3	1	1	1	1	1	1

Fig. 2 PCR ribotype patterns for 8 *C. difficile* strains. Ribotype numbers are tentative.

M : size marker, 100bp ladder ; Lane 1, 2 : toxin A⁺B⁺ ribotype b ; Lane 3 : toxin A⁺B⁺ ribotype i ; Lane 4 : toxin A⁺B⁺ ribotype c ; Lane 5 : toxin A⁻B⁺ ribotype r ; Lane 6 : toxin A⁻B⁺ ribotype n ; Lane 7, 8 : toxin A⁻B⁺ ribotype k ; NC : negative control.



役割を担っている。これらの毒素はグルコース・トランスフェラーゼ（グルコース転移酵素）である事が分かっており、この酵素がグルコースを必要とする他の酵素を失活させるため、細胞骨格であるアクチン障害、アポトーシス誘発、サイトカイン増加、炎症細胞遊走といった細胞障害を引き起こすとされている¹²⁾。*C. difficile*には toxin A 及び toxin B の両 toxin を産生する株、toxin A は産生しないが toxin B は産生する株、及び両 toxin とも産生しない株が知られている。従来、A⁻B⁺株についてはヒト消化管における病原性が明らかではなかったが、2000年のLimaye等による偽膜性大腸炎の症例報告¹³⁾以降、世界各地で臨床分離報告がなされ、現在ではA⁺B⁺株と同様に抗菌薬関連下痢症/腸炎を起こすと考えられている。そして最近においては toxin A ではなくむしろ toxin B が病原性に強く関与しているとの報告もなされている¹⁴⁾。CDADの検査法としては、糞便中の toxin B の検出が最も有用な方法であると言われており、その toxin B 検出法として検出感度・特異性に優れた細胞毒素試験が世界的に標準法（gold standard）として位置付けられている。しかし、この方法は細胞培養を行うための設備や技術が必要であり、通常病院検査室では実施困難である⁵⁾。また培養検査は感度が高いものの、結果が出るまで少なくとも48時間を要することや無症候性保菌者もみられることから、培養検査のみでは判断に苦慮する場合がある¹⁵⁾。そこで臨床現場やサーベイラン

スでは特殊な設備や機器を必要とせず、毒素抗原を短時間で検出する迅速検査キットが広く用いられている。キットを用いた toxin 検査は特異性が高く、検体を採取した当日に結果を出すことが可能であり、迅速に感染症の診断及び治療が行うことができるため臨床的有用性が高いとされている。

本研究における迅速検査キットの評価として、臨床的にCDADと考えられた症例を真の陽性とした場合、感度についてUniquickでは54.3%、TOX A/Bでは46.9%の結果が得られた。これは日本における既報^{4)~6)}に比べて10%前後低い結果となり、臨床検査として感度は不十分であると考えられた。その原因としてスワブ検体のような不適切な検体も含まれていたことや、搬送や保存中において毒素が不活化する可能性が考えられる。また、UniquickはTOX A/Bに比べて有意に陽性的中率が高く、偽陽性が低い傾向が見られたが、最近増加傾向であるA⁻B⁺株は toxin A のみを検出するキットでは検出されない。そのため適切な治療や感染対策がとられずに感染が広がってしまう可能性がある。A⁻B⁺株は近年その存在が確認されて以降、我が国においても毒素産生株の中で6.8から40%存在していると報告されており^{16)~18)}、A⁻B⁺株によるアウトブレイク発生の報告もある¹⁹⁾。当院においてはA⁻B⁺株は3年間の推移では明らかな増加傾向はみられなかったが、検査可能であった保存株のうち37% (10/27) がA⁻B⁺株であることが確認され、今後用いる迅速検査キットとしては、両毒素を検出可能なキットが望ましい。

一方、培養検査の感度や陽性的中率は toxin 検査キットよりも低い傾向が見られた。培養結果の陽性予測率や特異度の低下には、無症候性保菌患者やA⁻B⁻株の存在が関与しているものと推測された。実際今回解析可能であった17株中4株(23%)が toxin A⁻B⁻となった。さらに、toxin 検査キットとの検査一致率はUniquickでは24.3%、TOX A/Bでは53.1%と低値にとどまり、CDADの検査法として迅速検査と培養検査は不十分な感度を互いに補うものとして必要であると考えられた。

また、toxin 遺伝子検索とリボタイピングとの比較検討結果からは、今回10株検出されたA⁻B⁺株のうち8株はリボタイピングにて2つのclusterに分類された。この8株のうち7株は1診療科及びICUにて

検出されており、院内伝播による拡散が推測される。同様の事例が日本国内でも報告されており、A⁻B⁺株はA⁺B⁺株よりも院内伝播に注意がより必要と考えられる。ただし、PCRリボタイピングはパルスフィールドゲル電気泳動によりさらに細分化可能との報告²⁰⁾もあることから、すべて同一とは一概には言えず、今後さらに検討を重ねていく必要がある。また、強毒株 NAP1/027 は今回の調査では発見されず、binary toxin 保有株について、臨床像では特別な特徴は見られなかった。

toxin A⁻B⁺産生 C. difficile は稀ではなく、toxin Aのみを検出するキットでは偽陰性による過小評価につながる可能性が高く、両毒素を検出できるキットの採用が望ましい。また、C. difficile の培養は結果判定までに時間がかかるものの、迅速キットの不十分な感度を補うことができ、併用して行うべきであると考えられた。さらに、A⁻B⁺株はA⁺B⁺株より院内伝播に関与している可能性があり、院内感染対策により注意が必要であるといえる。

謝辞：toxin 遺伝子解析およびリボタイピングに関しまして、貴重なご助言をいただきました国立感染症研究所加藤はる先生に深謝申し上げます。

文 献

- 丸山篤芳, 吉村 平, 森下芳孝, 登 勉: C. difficile 関連検査の臨床的有用性の検討. 日臨微生物誌 2004; 14: 99—103.
- 沢辺悦子, 欠塚杏奈, 千田俊雄, 大澤佳代, 岡村 登, 武部 功, 他: 当院で分離された C. difficile の分子疫学的解析. 日臨微生物誌 2003; 13: 1—7.
- 村端真由美, 加藤はる, 矢野久子, 小椋正道, 柴山順子, 脇本幸夫, 他: 長期入院がん患児における C. difficile 消化管保有と院内伝播に関する検討. 感染症誌 2008; 82: 419—26.
- 泉田さゆり, 加藤秀章, 橋本政治, 中村 誠: トキシン A 検出キット, D1 抗原検出キット及び培養法による C. difficile 検出の比較検討. 日消誌 2005; 102: 1004—9.
- 豊川真弘, 上田安希子, 西 功, 浅利誠志, 安達桂子, 安中めぐみ, 他: 関連下痢症の迅速診断における糞便中 toxin A 及び toxin B 同時検出キットの有用性に関する検討. 感染症誌 2007; 81: 33—8.
- 仲宗根勇, 潮平知佳, 山根誠久: Clostridium difficile Toxin A および B 検出用試薬, TOX A/B QUIK CHEK 「ニッスイ」の一次性能評価. JARMAM 2007; 18: 109—16.
- 加藤はる, 加藤直樹: C. difficile 感染症と細菌学的検査. 日臨微生物 2002; 12: 115—21.
- Terhes G, Urbán E, Sóki J, Hamid KA, Nagy E: Community-acquired C. difficile diarrhea caused by binary toxin, toxin A, and toxin B

- gene-positive isolates in Hungary. J Clin Microbiol 2004; 42: 4316—8.
- Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B, Popoff M: Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of C. difficile. FEMS microbiology letters 2000; 186: 307—12.
- Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI: PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of C. difficile and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. J Clin Microbiol 1999; 37: 461—3.
- 加藤はる: C. difficile BI/NAP1/027 菌株と引き起こされる感染症. 臨と微生物 2008; 35: 315—20.
- Voth DE, Ballard JD: Clostridium difficile toxins: Mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 247—63.
- Limaye AP, Turgeon DK, Cookson BT, Fritsche TR: Pseudomembranous colitis caused by a toxin A(-)B(+) strain of C. difficile. J Clin Microbiol 2000; 38: 1696—7.
- Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, et al.: Toxin B is essential for virulence of Clostridium difficile. Nature 2009; 458: 1176—9.
- 國島広之: Clostridium difficile 感染症及びその感染対策. ICU と CCU 2008; 32: 221—7.
- Kikkawa H, Hitomi S, Watanabe M: Prevalence of toxin A-nonproducing/toxin B-producing C. difficile in the Tsukuba-Tsuchiura district, Japan. J Infect Chemother 2007; 13: 35—8.
- Toyokawa M, Ueda A, Nishi I, Asari S, Inamatsu T, Yamaguchi H, et al.: Isolation and characterization of C. difficile from 2 geographically separate hospitals in Japan. LABMEDICINE 2008; 39: 282—6.
- Komatsu M, Kato H, Aihara M, Shimakawa K, Iwasaki M, Nagasaka Y, et al.: High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive C. difficile in a hospital in Japan and risk factors for infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 525—9.
- 佐藤洋子, 加藤はる, 小岩井健司, 酒井 力: がんセンターにおける Toxin A 陰性 toxin B 陽性による C. difficile 下痢症の院内集団発生. 感染症誌 2004; 78: 312—9.
- Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, et al.: Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of C. difficile: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. J Clin Microbiol 2008; 46: 431—7.

Rapid-Tests Detection Evaluation of *Clostridium difficile* Toxins and Microbiological Investigation

Risa NAKAGAWA¹⁾²⁾, Yoshitsugu IINUMA¹⁾²⁾, Masaki YAMAMOTO¹⁾²⁾, Yasufumi MATSUMURA¹⁾²⁾,
Michinori SHIRANO¹⁾²⁾, Aki MATSUSHIMA¹⁾²⁾, Miki NAGAO¹⁾²⁾, Takashi SAITO¹⁾²⁾, Shunji TAKAKURA¹⁾²⁾,
Yutaka ITO¹⁾²⁾, Takeshi HIGUCHI¹⁾²⁾, Michio TANAKA²⁾ & Satoshi ICHIYAMA¹⁾²⁾

¹⁾Department of Infection Control & Prevention and ²⁾Department of Clinical Laboratory Medicine,
Kyoto University Hospital

We evaluated two rapid toxin tests for *C. difficile* combined with stool specimen cultures used from January 2006 to March 2009. Stool specimens numbered 877, 102 among which were from the cases of diagnosed clinical *C. difficile*-associated diarrhea (CDAD). Rapid toxin A 'Uniquick' detection kits were used until October 2007 and toxin A&B 'TOX A/B' detection kits thereafter. Clinical CDAD was considered the detection gold standard. Uniquick sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were 54.3%, 99.1%, 90.5%, and 93.2% while those for TOX A/B were 46.2%, 97.6%, 65.2%, and 95.0% and for culture 42.2%, 95.5%, 55.1%, and 92.6%. Rapid toxin tests tended to have better sensitivity than culture results although not significantly so, and Uniquick showed significantly better positive predictive value than TOX A/B or culture results. Among clinical CDAD cases, concordance with culture was 24.3% for Uniquick and 53.1% for TOX A/B. For stored strains, 27 were typed toxin A⁺B⁺ (48.1%), toxin A⁻B⁺ (37.0%) and toxin A⁻B⁻ (14.8%) with toxin gene detection by PCR. Eight of the 10 toxin A⁻B⁺ strains were classified into two cluster by ribotyping, and 7 of those were detected in two hospital wards, indicated the possibility of nosocomial toxin A⁻B⁺ strain spread. The rapid toxin test for both toxins A and B should be used if toxin A⁻B⁺ predominate. Simultaneous culture testing may be useful for detecting clinical CDAD more accurately, however.